



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESIS DOCTORAL

**Metabolismo y funcionalidad de HDL en un modelo murino
(db/db) de diabetes y efectos de la sobreexpresión de
apolipoproteína A-I humana**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Universidad Autónoma de Barcelona

Teresa Laura Errico

2016

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Universidad Autónoma de Barcelona

**Metabolismo y funcionalidad de HDL en un modelo murino
(db/db) de diabetes y efectos de la sobreexpresión de
apolipoproteína A-I humana**

Memoria presentada por la licenciada en Farmacia y Farmacia Industrial, Teresa Laura Errico para optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Barcelona en el programa de doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

La presente tesis ha sido realizada en el grupo de Bioquímica Cardiovascular del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, co-dirigida por el Dr. Francisco Blanco-Vaca y el Dr. Josep Julve

Los directores de la tesis:

Dr. Francisco Blanco-Vaca

IP del Grup de Bases metabòliques de Risc Cardiovascular
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
Universitat Autònoma de Barcelona

Dr. Josep Julve

Investigador Miguel Servet Tipus 1 que pertany al Grup de Bases metabòliques de Risc Cardiovascular
Institut de recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
Universitat Autònoma de Barcelona

La doctoranda:

Teresa Laura Errico

Grup de Bases metabòliques de Risc Cardiovascular
Institut de recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Barcelona, 2016

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	17
Resumen	19
Abstract	21
I - INTRODUCCIÓN	23
I.1 Lípidos y lipoproteínas plasmáticas	25
I.1.1 Lípidos	25
I.1.1.1 Constituyentes del perfil lipídico plasmático.....	26
I.1.2 Características de las lipoproteínas plasmáticas	27
I.1.2.1 Características cuantitativas de las lipoproteínas plasmáticas humanas	28
I.1.2.2 Características cuantitativas de las lipoproteínas plasmáticas de ratones de la cepa C57BL/6J	32
I.1.3 Lipoproteínas plasmáticas y arteriosclerosis	34
I.1.4 Componentes moleculares de las HDL	37
I.1.4.1 Proteoma	37
I.1.4.2 Principales apolipoproteínas	39
I.1.4.2.1 Apolipoproteína (apo)A-I	39
I.1.4.2.2 Apolipoproteína (apo)A-II.....	40
I.1.4.2.3 Otras apolipoproteínas	40
I.1.4.3 Enzimas.....	41
I.1.4.3.1 Lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT).....	41
I.1.4.3.2 Paraoxonasa (PON).....	43
I.1.4.3.3 Fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (Lp-PLA2).....	45
I.1.4.4 Proteínas transferidoras de lípidos	46
I.1.4.4.1 Proteína transferidora de fosfolípidos (PLTP).....	46
I.1.4.4.2 Proteína transferidora de ésteres de colesterol (PTEC).....	47
I.1.4.5 Lipasas	48

I.1.4.5.1 Lipoproteína lipasa	48
I.1.4.5.2 Lipasa hepática (LH)	49
I.1.4.5.3 Lipasa endotelial (LE)	50
I.1.4.6 Proteínas de fase aguda	50
I.1.4.7 Lipidoma	52
I.1.4.7.1 Fosfolípidos	52
I.1.4.7.2 Esfingolípidos	54
I.1.4.7.3 Lípidos neutros	55
I.1.5 Metabolismo de las HDL.....	56
I.1.5.1 Biogénesis	56
I.1.5.2 Remodelaje y catabolismo	60
I.1.6 Actividades biológicas de las HDL.....	63
I.1.6.1 Papel de las HDL en el eflujo de colesterol y transporte reverso de colesterol	64
I.1.6.1.1 Eflujo de colesterol	65
I.1.6.1.2 Transporte reverso de colesterol	72
I.1.6.1.3 Aproximaciones metodológicas para cuantificar el TRC-m in vivo	75
I.1.6.1.4 Factores moduladores del TRC-m in vivo	76
I.1.6.2 Propiedades antioxidantes de las HDL	79
I.1.6.3 Propiedades antiinflamatorias de las HDL.....	83
I.1.7 Impacto de la obesidad y sus complicaciones sobre el perfil lipídico y lipoproteico plasmático en pacientes y modelos animales	89
I.1.7.1 Efectos de las HDL sobre el desarrollo de adiposidad y metabolismo de la glucosa ...	95
<i>II - HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</i>	<i>99</i>
HIPÓTESIS	101
OBJETIVOS.....	103
<i>III - MATERIALES Y MÉTODOS</i>	<i>105</i>
III.1 Animales y condiciones de estabulación.....	107
III.1.1 Modelos experimentales.....	107

III.1.2 Condiciones de estabulación.....	108
III.1.3 Diseños experimentales	109
III.1.3.1 Estudio del efecto metabólico del fenotipo obeso sobre las propiedades de las lipoproteínas en ratones db/db.....	109
III.1.3.2 Evaluación de la inducción de LXR sobre la función antiaterogénica de las HDL plasmáticas de ratones db/db.....	111
III.1.3.3 Análisis del efecto de la hiperexpresión de apoA-I humana sobre la función antiaterogénica de las HDL plasmáticas de ratones db/db	114
III.2 Obtención de muestras biológicas	116
III.2.1 Sangre y tejidos/órganos.....	116
III.3 Análisis bioquímicos	118
III.3.1 Parámetros plasmáticos	118
III.3.1.1 Lípidos y proteínas	118
III.3.1.2 Actividades enzimáticas.....	121
III.3.1.2.1 Determinación de actividad LCAT	121
III.3.1.2.2 Determinación de actividad PLTP	122
III.3.1.2.3 Determinación de actividad PON1	123
III.3.1.2.4 Determinación de actividad Lp-PLA2	123
III.3.1.3 Separación de las lipoproteínas plasmáticas.....	124
III.3.1.3.1 Aislamiento de las lipoproteínas por ultracentrifugación secuencial	124
III.3.1.3.2 Separación de lipoproteínas mediante sistema de filtración en gel	126
III.3.1.3.3 Electroforesis de lipoproteínas mediante gel en gradiente de densidad en condiciones nativas	127
III.3.1.3.4 Cuantificación de pre β -HDL.....	128
III.3.2 Parámetros tisulares.....	130
III.3.2.1 Lípidos.....	130
III.3.2.2 Proteínas	131
III.4 Análisis histológicos.....	133

III.4.1	Análisis de la estructura parenquimal del hígado	133
III.4.2	Análisis de la acumulación lipídica del hígado	134
III.5	Análisis moleculares	135
III.5.1	Obtención de DNA genómico	135
III.5.2	Aislamiento de RNA mensajero y análisis de la expresión génica mediante RT-PCR a tiempo real	136
III.6	Análisis funcionales	139
III.6.1	Metabolismo de la glucosa	139
III.6.1.1	Test de sensibilidad a la insulina (TSI)	139
III.6.1.2	Test de tolerancia a la glucosa (TTG)	140
III.6.1.3	Seguimiento del colesterol administrado vía oral	140
III.6.2	Metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas.....	142
III.6.2.1	Cinética catabólica in vivo de las LDL de ratón marcadas con [³ H]-colesterol oleato	142
III.6.2.2	Cinética catabólica in vivo de las HDL de ratón marcadas con [³ H]-colesterol oleato	143
III.6.3	Propiedades antiaterogénicas de las lipoproteínas HDL plasmáticas	145
III.6.3.1	Análisis in vitro del eflujo de colesterol desde macrófagos a la fracción plasmática de HDL	145
III.6.3.2	Evaluación del TRC-m.....	148
III.6.3.3	Evaluación de las propiedades antioxidantes de HDL	151
III.6.3.4	Actividad antiinflamatoria de HDL en un ensayo in vitro con una línea monocitos humanos (THP-1) diferenciados a macrófagos	153
III.7	Análisis estadísticos	155
IV – RESULTADOS.....	157
IV.I	Caracterización metabólica y lipoproteica de ratones db/db.....	159
IV.I.1	Análisis de la adiposidad.....	159
IV.I.2	Efecto de la adiposidad sobre el desarrollo de esteatosis hepática	162
IV.I.3	Efecto de la adiposidad sobre el metabolismo de la glucosa	169

IV.I.4 Efecto de la adiposidad sobre los niveles plasmáticos de lípidos y características de las lipoproteínas plasmáticas	170
IV.I.4.1 Análisis de los niveles lipídicos plasmáticos y su distribución en lipoproteínas	170
IV.I.4.2 Evaluación del metabolismo de las lipoproteínas y de sus principales determinantes metabólicos	183
IV.I.4.2.1 Características metabólicas de la fracción lipoproteica LDL	183
IV.I.4.2.2 Características metabólicas de la fracción lipoproteica HDL.....	186
IV.I.5 Propiedades antiaterogénicas de las HDL de ratones db/db.....	193
IV.I.5.1 Estudio del TRC-m en ratones db/db.....	193
IV.I.5.1.1 Análisis de la capacidad de eflujo de colesterol in vitro por parte de las HDL	193
IV.I.5.1.2 Evaluación de TRC-m en ratones db/db	195
IV.I.6 Inducción del TRC-m mediante agonistas de LXR.....	203
IV.I.7 Análisis de la capacidad antioxidante de las HDL de ratones db/db.....	213
IV.II Efecto de la hiperexpresión de apoA-I en ratones db/db sobre los parámetros lipídicos.	217
IV.II.1 Efecto de la sobreexpresión de apoA-I en ratones db/db sobre el TRC-m.....	222
IV.II.2 Análisis del impacto de la sobreexpresión de apoA-I sobre la mejora de la capacidad antioxidante y antiinflamatoria de las HDL de ratones db/db	229
IV.II.2.1 Impacto de la sobreexpresión de apoA-I sobre la capacidad antioxidante de las HDL de ratones db/db	229
IV.II.3 Impacto de la sobreexpresión de apoA-I sobre la capacidad antiinflamatoria de las HDL de ratones db/db	233
V - DISCUSIÓN.....	237
V.1 Características cuantitativas y metabólicas de las lipoproteínas	240
V.2 Características funcionales y fisiopatológicas de las lipoproteínas	258
V.2.1 TRC-m	258

V.2.2 Capacidades antioxidante y antiinflamatoria	263
V.3 Impacto de la sobreexpresión in vivo de apoA-I humana sobre las propiedades antiaterogénicas de HDL	267
VI - CONCLUSIONES	275
Abreviaciones	281
Bibliografía	283
Agradecimientos.....	321

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1 Características físico-químicas de las principales clases de lipoproteínas plasmáticas en humanos.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabla 2 Características cuantitativas de las clases principales de lipoproteínas plasmáticas en humanos.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabla 3 Características cuantitativas de las clases principales de lipoproteínas plasmáticas en ratones de la cepa C57BL/6J.</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 4 Listado de sondas específicas utilizadas para los análisis de expresión génica</i>	<i>138</i>
<i>Tabla 4 (Cont.).....</i>	<i>139</i>
<i>Tabla 5 Parámetros corporales, ingesta y estimación de la eficiencia calórica.....</i>	<i>159</i>
<i>Tabla 6 Regionalización de la adiposidad en los ratones db/db.</i>	<i>160</i>
<i>Tabla 7 Pesos y parámetros bioquímicos hepáticos.</i>	<i>162</i>
<i>Tabla 8 Perfil de expresión génica de marcadores de esteatosis hepática.</i>	<i>165</i>
<i>Tabla 9 Parámetros plasmáticos y pruebas funcionales relacionados con el metabolismo de la glucosa.</i>	<i>169</i>
<i>Tabla 10 Concentración de lípidos plasmáticos.</i>	<i>171</i>
<i>Tabla 11 Masa circulante y composición de fracciones lipoproteicas plasmáticas.</i>	<i>172</i>
<i>Tabla 12 Masa circulante y composición de lipoproteínas que contienen apoB.</i>	<i>175</i>
<i>Tabla 13 Separación de HDL en función de su carga eléctrica y distribución de la apoA-I y proteína de HDL a partículas preβ y α-HDL.</i>	<i>181</i>
<i>Tabla 14 Perfil de expresión de genes en hígado y niveles plasmáticos de actividad enzimática de dianas moleculares asociadas a HDL que intervienen en su maduración y remodelaje.....</i>	<i>182</i>

<i>Tabla 15 Perfil de expresión génica de determinantes metabólicos hepáticos de los niveles de LDL plasmáticas.....</i>	<i>184</i>
<i>Tabla 16. Tasa catabólica fraccional y de secreción de colesterol de lipoproteínas LDL.</i>	<i>186</i>
<i>Tabla 17 Tasa catabólica fraccional y de secreción de colesterol de lipoproteínas HDL.....</i>	<i>188</i>
<i>Tabla 18 Perfil de expresión génica de determinantes metabólicos hepáticos de los niveles de HDL plasmáticas.....</i>	<i>188</i>
<i>Tabla 19 Análisis de la proporción relativa de colesterol libre y de [³H]-colesterol en su forma libre y esterificada en hígado total calculada a partir de los datos de TRC-m.</i>	<i>197</i>
<i>Tabla 20 Proporción de la fracción de [³H] en sales bilares y de colesterol analizada en heces de 48 h.....</i>	<i>198</i>
<i>Tabla 21 Perfil de expresión hepático de genes involucrados en el TRC-m.</i>	<i>198</i>
<i>Tabla 22 Perfil de expresión intestinal de genes involucrados en el TRC-m.....</i>	<i>199</i>
<i>Tabla 23. Niveles plasmáticos y hepáticos de 27-OH-colesterol.....</i>	<i>200</i>
<i>Tabla 24 Parámetros corporales y bioquímicos plasmáticos.</i>	<i>204</i>
<i>Tabla 25 Análisis de la proporción relativa de colesterol libre y de [³H]-colesterol en su forma libre y esterificada en hígado calculada a partir de los datos de TRC-m.....</i>	<i>206</i>
<i>Tabla 26 Proporción de la fracción de [³H] en sales bilares y de colesterol analizada en heces de 48 h.....</i>	<i>210</i>
<i>Tabla 27 Perfil de expresión hepático de genes involucrados en el TRC-m.</i>	<i>211</i>
<i>Tabla 28 Perfil de expresión intestinal de genes involucrados en el TRC-m.....</i>	<i>211</i>
<i>Tabla 29 Perfil de expresión de genes en hígado y niveles plasmáticos de actividad enzimática de dianas moleculares asociadas a HDL que intervienen en su actividad antioxidante y antiinflamatoria.....</i>	<i>216</i>
<i>Tabla 30 Efecto de la sobreexpresión de apoA-I humana sobre los parámetros corporales y bioquímicos plasmáticos en ratones db/db.</i>	<i>218</i>

<i>Tabla 31 Efecto de la sobreexpresión de apoA-I humana sobre la concentración y componentes de las lipoproteínas LRT y LDL plasmáticas en ratones db/db.....</i>	<i>220</i>
<i>Tabla 32 Efecto de la sobreexpresión de apoA-I humana sobre la concentración y componentes de las lipoproteínas HDL plasmáticas en ratones db/db.....</i>	<i>221</i>
<i>Tabla 33 Análisis de la proporción relativa de colesterol libre y de [³H]-colesterol en su forma libre y esterificada en hígado calculada a partir de los datos de TRC-m.....</i>	<i>224</i>
<i>Tabla 34 Proporción de la fracción de [³H] en sales bilares y de colesterol analizada en heces de 48 h.....</i>	<i>225</i>
<i>Tabla 35 Perfil de expresión hepático de genes involucrados en el TRC-m.....</i>	<i>226</i>
<i>Tabla 36 Perfil de expresión intestinal de genes involucrados en el TRC-m.....</i>	<i>228</i>
<i>Tabla 37 Perfil de expresión de genes en hígado y niveles plasmáticos de actividad enzimática de dianas moleculares asociadas a HDL que intervienen en su actividad antioxidante y antiinflamatoria.....</i>	<i>231</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 Metabolismo de las HDL</i>	62
<i>Figura 2 Propiedades antiaterogénicas principales de las HDL</i>	64
<i>Figura 3 Transporte reverso de colesterol mediado por HDL</i>	73
<i>Figura 4 Dislipemia aterogénica</i>	90
<i>Figura 5 Estudio del efecto metabólico del fenotipo obeso sobre las propiedades de las lipoproteínas en ratones db/db</i>	110
<i>Figura 6 Estudio del efecto de la inducción de LXR sobre el TRC in vivo en ratones db/db</i>	112
<i>Figura 7 Estudio del efecto de la hiperexpresión de apoA-I sobre diferentes funciones antiaterogénicas de las HDL en ratones db/db</i>	115
<i>Figura 8 Fórmula de Radding y Steinberg</i>	125
<i>Figura 9 Distribución en diferentes compartimentos del marcaje radioactivo en un análisis metabólico estándar de HDL</i>	144
<i>Figura 10 Diagrama representativo de un protocolo estándar de evaluación de la capacidad de eflujo de colesterol desde macrófagos a HDL</i>	147
<i>Figura 11 Diagrama representativo de un protocolo estándar de evaluación de TRC in vivo específico de macrófagos</i>	149
<i>Figura 12 Monitorización de la formación de dienos conjugados</i>	152
<i>Figura 13 Adiposidad en los ratones db/db y sus controles</i>	161
<i>Figura 14 Análisis histológico de secciones de hígado de ratones db/db y sus controles</i>	164
<i>Figura 15 Destino metabólico del triglicérido de la dieta</i>	166

<i>Figura 16 Análisis del porcentaje de colesterol libre en hígado de ratones db/db.....</i>	<i>168</i>
<i>Figura 17 Perfiles de lipoproteínas plasmáticas separadas por FPLC.....</i>	<i>176</i>
<i>Figura 18 Perfil representativo de lipoproteínas LDL de ratones db/db separadas mediante cromatografía de intercambio aniónico.....</i>	<i>177</i>
<i>Figura 19 Tamaño de las HDL circulantes.....</i>	<i>180</i>
<i>Figura 20 Cinética catabólica de las lipoproteínas LDL marcadas con colesterol tritiado.....</i>	<i>185</i>
<i>Figura 21 Cinética catabólica de las lipoproteínas HDL marcadas con colesterol tritiado.....</i>	<i>187</i>
<i>Figura 22 Destino metabólico del colesterol de la dieta.</i>	<i>190</i>
<i>Figura 23 Capacidad de eflujo de colesterol por parte de la fracción plasmática de HDL (plasma de ratones db/db y sus controles desde macrófagos J774.A1... ..</i>	<i>194</i>
<i>Figura 24 Evaluación de TRC-m en ratones db/db.....</i>	<i>196</i>
<i>Figura 25 Efecto de la inducción de LXR sobre el TRC-m en ratones db/db.....</i>	<i>209</i>
<i>Figura 26 Análisis de la abundancia relativa de transportadores Abcg5 y Abcg8.....</i>	<i>212</i>
<i>Figura 27 Propiedades antioxidantes de las lipoproteínas de ratones db/db.....</i>	<i>214</i>
<i>Figura 28 Efecto de la sobreexpresión de apoA-I humana sobre el TRC-m en ratones db/db.....</i>	<i>223</i>
<i>Figura 29 Análisis de la abundancia relativa de transportadores Abcg5 y Abcg8.....</i>	<i>227</i>
<i>Figura 30 Efecto de la sobreexpresión de apoA-I humana sobre las propiedades antioxidantes de las lipoproteínas de ratones db/db.....</i>	<i>230</i>
<i>Figura 31 Efecto de la sobreexpresión de apoA-I humana sobre las propiedades antiinflamatorias de las lipoproteínas HDL de ratones db/db.....</i>	<i>235</i>

RESUMEN

Resumen

Numerosos estudios experimentales revelan una relación causal entre HDL y el riesgo de arteriosclerosis; de ahí, el interés en el desarrollo de diferentes estrategias basadas en la hiperexpresión de su principal apolipoproteína, (apo)A-I, para su prevención y tratamiento. Datos previos en humanos y modelos experimentales sugieren que las propiedades antiaterogénicas de las HDL se encuentran alteradas en obesidad y diabetes. El presente trabajo se centró en el estudio de las propiedades antiaterogénicas más importantes atribuidas a las HDL (ie, transporte reverso de colesterol específico de macrófagos in vivo -TRC-m-, y actividad antioxidante y antiinflamatoria) en un modelo animal de obesidad, el ratón db/db, y el impacto de la sobreexpresión de apoA-I humana (hA-I) sobre dichas propiedades. Los ratones db/db presentaron un aumento en los niveles plasmáticos de colesterol, principalmente debido a su aumento en HDL. El análisis cuantitativo y cualitativo de HDL reveló alteraciones en su tamaño y composición, y su catabolismo se encontró disminuido. Los estudios metabólicos en ratones db/db también revelaron una acumulación hepática del colesterol transportado por HDL y una eliminación de colesterol fecal disminuida, lo que se asoció con una disminución en la expresión génica de los transportadores de colesterol (ie, *Abcg5* y *Abcg8*) y de ácidos biliares (ie, *Bsep*). Además de *Abcg5* y *Abcg8*, la expresión de otras dianas moleculares de LXR también se encontró disminuida, sugiriendo que esta vía de señalización estaría comprometida en estos ratones. El análisis del TRC-m arrojó resultados similares a los alcanzados en la evaluación del metabolismo de HDL. La activación de LXR contribuyó a rescatar parcialmente el TRC-m en los ratones db/db, en concomitancia con un aumento en la expresión hepática de *Abcg5* y *Abcg8*. Otras de las funciones ateroprotectoras más importantes de HDL analizadas ex vivo (ie, capacidad antioxidante y antiinflamatoria) también se encontraron alteradas en estos ratones. La sobreexpresión de hA-I en ratones transgénicos y en db/db (ie, db/db-hA-I) resultó en un aumento de los niveles plasmáticos de HDL y en cambios en su composición. También aumentó el TRC-m, en parte debido a un aumento combinado en la capacidad del plasma en promover el eflujo de colesterol desde macrófagos y su eliminación fecal, lo que coincidió con un restablecimiento de la expresión génica de los transportadores *Abcg5* y *Abcg8*, principalmente involucrados en regular el tráfico de colesterol de hígado a heces. Sin embargo, dicho aumento no previno, incluso aumentó la esteatosis hepática en ratones db/db-hA-I en comparación con los ratones db/db. Por otro lado, aunque no se observaron cambios en la capacidad de HDL de los ratones db/db-hA-I de proteger de la oxidación a LDL, la resistencia de sus HDL a ser oxidadas sí aumentó, así como su capacidad antiinflamatoria. En conclusión, las principales propiedades funcionales ateroprotectoras de las HDL se encontraron comprometidas en el ratón db/db, principalmente debido a alteraciones en su composición y metabolismo. Aunque la presencia de cantidades elevadas de hA-I en este modelo experimental de diabetes resultó en una mejora del TRC-m y en la capacidad antiinflamatoria de sus HDL, ello también se asoció al empeoramiento de otras alteraciones patológicas ya existentes, como la esteatosis hepática.

Abstract

A large body of experimental evidences reveals a causal inverse relationship between HDL and the risk of atherosclerotic vascular diseases. The demonstration that HDL and, its main apolipoprotein, apoA-I, exhibit favorable antiatherogenic actions has led to the development of different HDL-based strategies, such as that provided by the hyperexpression of apoA-I, for the prevention and treatment of atherosclerosis. Previous data in both humans and experimental models suggest that the antiatherogenic properties of HDL are impaired in obesity and diabetes. In this context, the main aims of the present work were to evaluate the most important anti-atherogenic properties attributed to HDL (ie, macrophage-specific reverse cholesterol transport in vivo -TRC-m-, and its anti-oxidant and anti-inflammatory activities ex vivo) in an animal model of diabetes, the db/db mouse, and the impact of overexpression of human apoA-I (hA-I) on these properties. The db/db mice showed an increase in their plasma levels of cholesterol, mainly attributed to elevated plasma levels of HDL. The quantitative and qualitative analysis of these lipoproteins revealed alterations in both their size and composition. The HDL from db/db were poorly catabolized compared with those from control mice. Metabolic studies also revealed that the HDL-related radiolabel was found to accumulate in the liver of the db/db mice, whereas the radiolabel reaching the feces was reduced compared with that of control mice. Notably, the latter finding was found further associated with a decreased expression in both the *Abcg5* and *Abcg8*, and *Bsep* involved in the cholesterol and bile acid trafficking into bile, respectively. In addition to *Abcg5* and *Abcg8*, the expression of other molecular targets of LXR was also reduced in the liver of db/db mice, suggesting that this signaling pathway could be compromised in these mice. Similar data were obtained after the evaluation of TRC-m in this model. Induction of LXR partially rescued the TRC-m in db/db mice, being the latter associated with a concomitant increase in the hepatic expression of *Abcg5* and *Abcg8*. The other two most important atheroprotective functions attributed to HDL (ie, its anti-oxidant and anti-inflammatory capacity) were also found compromised in the db/db mice. The overexpression of hA-I in transgenic and in db/db mice (ie, db/db-hA-I) produced a striking elevation in the plasma levels of HDL in this model and in changes in the composition of their HDL. The TRC-m was also stimulated in this animal model, partly due to the combined increase in the capacity of plasma to promote cholesterol efflux from macrophages and cholesterol trafficking from the liver to feces, which coincided with a restoration of the hepatic expression of *Abcg5* and *Abcg8*, two transporters mainly involved in modulating this process. However, such increase did not prevent, even exacerbated the hepatic steatosis in db/db-hA-I compared with db/db mice. Furthermore, the overexpression of hA-I in the db/db mice did not significantly improve the ability of their HDL to prevent LDL oxidation ex vivo, despite being less prone to oxidation than those from db/db mice, but significantly enhanced their anti-inflammatory capacity, being the latter mainly attributed to the presence of hA-I in their HDL. In conclusion, the main atheroprotective properties of HDL were hampered in the db/db mice, primarily due to alterations in their composition and metabolism. Furthermore, although the presence of hA-I in this experimental model of diabetes displayed a favorable impact on the TRC-m and improved the anti-inflammatory properties of their HDL, it also worsened other existing pathological alterations, such as hepatic steatosis.

I - INTRODUCCIÓN

I.1 Lípidos y lipoproteínas plasmáticas

I.1.1 Lípidos

Desde un punto de vista clínico los lípidos plasmáticos más importantes son el colesterol y los triglicéridos. Ambas especies lipídicas juegan además un sabido papel metabólico muy importante. Por su parte el colesterol es componente de las membranas celulares, es precursor de las hormonas esteroideas y de la vitamina D y de oxisteroles y ácidos biliares (que actúan de activadores de receptores nucleares involucrados en la regulación del metabolismo de los esteroides), y se requiere para la síntesis de moléculas de señalización neuronal (Hegele 2009). La mayor parte (~80%) del colesterol es sintetizada por el propio organismo, siendo 2-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa el enzima que cataliza el paso limitante en este proceso. La mayor parte del colesterol plasmático circula en forma esterificada. Por otro lado, los triglicéridos son una fuente de energía clave que se produce a partir de la esterificación de los ácidos grasos a un esqueleto de glicerol. Los triglicéridos se sintetizan en el intestino e hígado y son transportados a través del plasma a los diferentes tejidos periféricos donde, a través de su lipólisis en la superficie del endotelio, los ácidos grasos liberados son captados y utilizados para su β -oxidación o almacenamiento.

I.1.1.1 Constituyentes del perfil lipídico plasmático

Un perfil lipídico estándar incluye la determinación de los niveles plasmáticos de colesterol total, colesterol de LDL, colesterol de HDL y triglicéridos (Nordestgaard, Langsted et al. 2016). El colesterol total, colesterol de HDL y triglicéridos se determinan directamente, mientras que el colesterol de LDL puede medirse directamente o calculado por la *ecuación de Friedewald* si los triglicéridos $< 4,5$ mM (< 400 mg/dL): $[(\text{colesterol total}) - (\text{colesterol de HDL}) - (\text{triglicéridos})/2,2]$ (cuando todos estos parámetros expresados en mM; o menos $(\text{triglicéridos})/5$ cuando los valores se expresan en mg/dL) (Friedewald, Levy et al. 1972); con la determinación directa de colesterol de LDL a concentraciones de triglicéridos $> 4,5$ mM (>400 mg/dL). Tradicionalmente, la ecuación de Friedewald se emplea para la determinación del perfil lipídico en ayunas, aunque el colesterol de LDL calculado con esta ecuación a concentraciones de triglicéridos $<4,5$ mM (<400 mg/dL) es similar al colesterol de LDL medido directamente tanto en perfiles lipídicos en ayunas como en situación postprandial. Estas cuatro medidas pueden incorporarse además al informe de la analítica junto con el colesterol de no-HDL y el colesterol remanente sin coste adicional.

El colesterol remanente (=colesterol de las LRT) se calcula como el colesterol total menos el de LDL y menos el de HDL tanto en los perfiles lipídicos determinados en ayunas como en situación postprandial; en el caso que el colesterol de LDL se haya

obtenido mediante cálculo, entonces el colesterol remanente equivale al valor de triglicéridos/2,2 cuando se expresa en mM y a triglicéridos/5 cuando se expresa en mg/dL. El colesterol remanente es un sólido factor de riesgo cardiovascular. Por otro lado, el colesterol no-HDL se calcula como el colesterol total menos el colesterol de HDL y es equivalente a la combinación del colesterol asociado a LDL, remanente y lipoproteína (a). Su utilización para la predicción del riesgo cardiovascular aparece en diferentes guías y artículos de consenso.

Finalmente, también se utilizan las determinaciones de apoB y apoA-I como alternativas a las determinaciones de colesterol de no-HDL y HDL, respectivamente, aunque estas determinaciones suponen un sobre coste.

1.1.2 Características de las lipoproteínas plasmáticas

La insolubilidad del colesterol y triglicéridos en el plasma requiere de una adaptación hidrofílica que garantice su biodisponibilidad. En plasma estos lípidos son principalmente transportados en forma de macromoléculas esféricas denominadas lipoproteínas (Errico, Chen et al. 2013).

Las lipoproteínas tienen un núcleo lipídico altamente hidrofóbico en el que se distribuyen los ésteres de colesterol y triglicéridos, además de ciertos antioxidantes y vitaminas de carácter apolar, y una interfase anfipática en la que se distribuyen las moléculas de colesterol libre, fosfolípidos y apolipoproteínas. También forman parte

de las lipoproteínas otras moléculas minoritarias tales como diferentes enzimas y moléculas antioxidantes.

I.1.2.1 Características cuantitativas de las lipoproteínas plasmáticas humanas

En plasma humano existen diferentes clases principales de lipoproteínas (Errico, Chen et al. 2013) (**Tabla 1**). En general, dentro del conjunto de lipoproteínas ricas en triglicéridos se incluyen los quilomicrones, cuyos niveles plasmáticos aumentan en situación postprandial y son de origen intestinal (Julve, Martin-Campos et al. 2016), y lipoproteínas de muy baja densidad (ie, VLDL), cuya síntesis es eminentemente hepática y revela los niveles plasmáticos de triglicéridos en ayunas. Por otro lado, las lipoproteínas que tienen el colesterol como componente principal son las lipoproteínas de baja densidad (ie, LDL) y lipoproteínas de alta densidad (ie, HDL).

Las lipoproteínas plasmáticas se distinguen las unas de las otras en función de su tamaño, densidad hidratada, movilidad electroforética (**Tabla 1**) y composición (**Tabla 2**) (Havel, Eder et al. 1955, Barrans, Jaspard et al. 1996, Hegele 2009), siendo la separación en función de la densidad hidratada mediante ultracentrifugación analítica la técnica más fiable y precisa.

Tabla 1 Características físico-químicas de las principales clases de lipoproteínas plasmáticas en humanos.

Clase de lipoproteína	Densidad (g/mL)	Tamaño (nm)	Movilidad electroforética (relativa a la de las globulinas)
quilomicrones	<0,9	80-1000	origen
VLDL	0,9-1,006	30-80	pre β
LDL	1,019-1,063	18-25	β
HDL	1,063-1,210	7-12	pre β / α

Las características físico-químicas diferenciales entre las diferentes clases de lipoproteínas permiten su clasificación con arreglo a diferentes criterios: [i] densidad hidratada, que permite la identificación de hasta cuatro clases principales; [ii] tamaño, tras su separación mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida en gradiente en condiciones nativas; y [iii] migración electroforética en un soporte de agarosa, en que pueden distinguirse unas lipoproteínas que quedan retenidas en el origen (son aquellas de dimensiones tan grandes que no logran penetrar en el entramado del soporte de agarosa), las que migran a la altura de las bandas de lipoproteínas β (lipoproteínas de movilidad β), α_2 (lipoproteínas de movilidad pre β) y α_1 (lipoproteínas de movilidad α) de las globulinas. Abreviaciones empleadas: VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad; LDL, lipoproteínas de baja densidad; HDL, lipoproteínas de alta densidad.

Las lipoproteínas plasmáticas se distinguen las unas de las otras en función de su tamaño, densidad hidratada, movilidad electroforética (**Tabla 1**) y composición (**Tabla 2**) (Havel, Eder et al. 1955, Barrans, Jaspard et al. 1996, Hegele 2009), siendo la separación en función de la densidad hidratada mediante ultracentrifugación analítica la técnica más fiable y precisa.

Tabla 2 Características cuantitativas de las clases principales de lipoproteínas plasmáticas en humanos.

Clase de lipoproteína	Triglicérido (%)	Fosfolípidos (%)	Colesterol libre (%)	Colesterol esterificado (%)	Proteína (%)	Principales apolipoproteínas
quilomicrones	80-95	3-6	1-3	2-4	1-2	A-I, A-IV, A-V, B-48, C-I, C-II, C-III, E
VLDL	45-65	15-20	4-8	16-22	6-10	B-100, E, C-I, C-II, C-III
LDL	4-8	18-24	6-8	45-50	18-22	B-100
HDL	2-3	37-49	9-14	35-37	45-55	A-I, A-II, E

Abreviaciones empleadas: VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad (<1,006 g/mL); LDL, lipoproteínas de baja densidad (rango de densidad de flotación 1,006 g/mL<d<1,063 g/mL); HDL, lipoproteínas de alta densidad (rango de densidad de flotación 1,063 g/mL<d<1,210 g/mL).

Las HDL maduras (ie, α -HDL) pueden subdividirse además en dos grandes subclases: las menos densas o HDL2 (1,063-1,125 g/mL) y las más densas (1,125-1,210 g/mL) (De Lalla and Gofman 1954, Delalla, Elliott et al. 1954, Nichols, Krauss et al. 1986). Estas a su vez pueden ser fraccionadas en distintas subclases con diferentes movilidades electroforéticas mediante su análisis por electroforesis en condiciones utilizando gel de poliacrilamida en gradiente (Nichols, Krauss et al. 1986) que las separa en función de su tamaño. Mediante esta técnica se ha logrado identificar dos subclases de HDL2 y tres de HDL3: HDL3c, 7,2-7,8 nm de diámetro, HDL3b, 7,8-8,2 nm, HDL3a, 8,2-8,8 nm, HDL2b, 8,8-9,7 nm, y HDL2a, 9,7-12,0 nm (**Tabla 1**).

La electroforesis en gel de agarosa es otra metodología frecuentemente empleada que permite la separación analítica de las HDL, de acuerdo con su carga de superficie y forma, en partículas α , que representan la mayor parte de las HDL circulantes, y $\text{pre}\beta$, que consisten en las HDL discoidales pobremente lipidizadas (Favari, Lee et al. 2004) (**Tabla 1**). Esta metodología en combinación con la GGE permite su separación bidimensional separando en función de su carga en una primera separación y tamaño en una segunda. Mediante esta metodología se han identificado hasta doce subclases distintas de HDL que contienen apoA-I, descritas como $\text{pre}\beta$ ($\text{pre}\beta_1$ y $\text{pre}\beta_2$) y α (α_1 , α_2 , α_3 y α_4) y $\text{pre}\alpha$ ($\text{pre}\alpha_1$, $\text{pre}\alpha_2$, $\text{pre}\alpha_3$) (Asztalos and Schaefer 2003, Asztalos and Schaefer 2003).

En función de su composición apolipoproteica, las HDL pueden ser separadas en partículas que contienen apoA-I con (LpA-I:A-II) o sin apoA-II (LpA-I) mediante análisis de inmunodifusión en geles de agarosa (Franceschini, Calabresi et al. 2007).

Más recientemente, los análisis de HDL mediante resonancia magnética nuclear se han identificado HDL de tamaño grande (8,8-13,0 nm de diámetro), medio (8,2-8,8 nm) y pequeño (7,8-8,2 nm) (Otvos, Jeyarajah et al. 1992).

I.1.2.2 Características cuantitativas de las lipoproteínas plasmáticas de ratones de la cepa C57BL/6J

Los ratones de la cepa congénita C57BL/6J, es junto a los ratones de la cepa ICR, uno de los modelos animales más empleados en la generación de modelos animales modificados genéticamente de interés en investigación cardiovascular (de Silva, Mas-Oliva et al. 1994).

El perfil lipoproteico plasmático en estos ratones es marcadamente diferente al observado en plasma humano (Paigen 1995). Por ejemplo, en humanos las lipoproteínas LDL transportan alrededor del 75% del colesterol plasmático, mientras que en estos ratones cerca del 80% del colesterol plasmático es transportado por las HDL (Paigen 1995), resultando en unos niveles plasmáticos de lipoproteínas que contienen apoB muy disminuidos en comparación con los observados en plasma humano. Esta diferencia se ha atribuido al menos en parte a que estos ratones [i] son deficientes en la actividad proteína transferidora de ésteres de colesterol (ie, PTEC), cuya deficiencia en pacientes conduce a un aumento en el porcentaje de colesterol asociado a la fracción lipoproteica HDL (Ha and Barter 1982, Inazu, Brown et al. 1990, Agellon, Walsh et al. 1991, Marotti, Castle et al. 1993), y [ii] presentan elevados niveles plasmáticos de lipoproteínas que contienen apoB48 (van Beek, van Barlingen et al. 1998, Veniant, Zlot et al. 1998, Zheng, Ikewaki et al. 2006). Otra característica diferencial importante es que las HDL y LDL aisladas por gradiente de

densidad en estos ratones presentan rangos de densidad solapados (de Silva, Mas-Oliva et al. 1994). A diferencia de las HDL plasmáticas de origen humano, cuyo rango de tamaños es extraordinariamente heterogéneo, identificándose dos subclases principales de α -HDL (ie, HDL2 y HDL3) (Nichols, Krauss et al. 1986) y una subpoblación minoritaria de pre β -HDL, el rango de tamaño de las lipoproteínas HDL de ratón es monodisperso (ie, con un diámetro de partícula medio de unos 10 nm), muy similar al de las HDL2 humanas (Asztalos, Tani et al. 2011). De igual modo que en plasma humano, los niveles circulantes de lipoproteínas pre β -HDL pobres en lípidos son análogamente minoritarios (de Silva, Mas-Oliva et al. 1994).

Tabla 3 Características cuantitativas de las clases principales de lipoproteínas plasmáticas en ratones de la cepa C57BL/6J.

Clase de lipoproteína	triglicérido (%)	Fosfolípidos (%)	Colesterol libre (%)	Colesterol esterificado (%)	Proteína (%)
LRT	45-57	11-14	3-5	3-6	23-32
LDL	21-36	16-25	7-9	11-17	29-38
HDL	1-3	20-32	4-6	16-27	40-55

Los datos porcentuales han sido extraídos a partir de registros del propio grupo de investigación. Abreviaciones empleadas: LRT, lipoproteínas ricas en triglicéridos (<1,006 g/mL); LDL, lipoproteínas de baja densidad (rango de densidad de flotación 1,006 g/mL<d<1,063 g/mL); HDL, lipoproteínas de alta densidad (rango de densidad de flotación 1,063 g/mL<d<1,210 g/mL).

La composición en lípidos y proteínas de las HDL de ratones (**Tabla 3**) es muy similar a la observada en HDL humanas (**Tabla 2**). En comparación con otras clases

de lipoproteínas, las HDL son ricas en proteínas, representando un ~50% de su masa ((Kontush and Chapman 2012).

1.1.3 Lipoproteínas plasmáticas y arteriosclerosis

La arteriosclerosis representa el proceso inflamatorio crónico cuya progresión se encuentra directamente asociada al aumento en la morbilidad y mortalidad por causas cardiovasculares. Este proceso cursa a través de la formación de la placa en la íntima y media de la pared arterial que se forma como consecuencia de la acumulación progresiva de [i] colesterol y de otros lípidos en forma nativa y oxidada, [ii] material de matriz extracelular, y [iii] de células inflamatorias (Kontush and Chapman 2006).

El colesterol representa uno de los componentes lipídicos predominantes en la lesión arteriosclerótica (Lusis 2000). Siendo las LDL el principal vehículo de transporte del colesterol en plasma (transportan el 70% del colesterol circulante) y por tanto representa el principal aporte de colesterol no solo a tejidos periféricos sino también a la pared arterial (Lusis 2000). Consistentemente, unos niveles plasmáticos de colesterol de LDL muy por encima de los valores normales en humanos, como aquellos determinados en plasma de pacientes con hipercolesterolemia, que se considera una forma común de dislipemia aterogénica (Wilson and Chowdhury 1990), se han encontrado directamente relacionados con el riesgo de desarrollo de arteriosclerosis en varios estudios clínicos y epidemiológicos (Manninen, Elo et al. 1988). Se ha sugerido que una retención aumentada en la íntima de esta clase de

lipoproteínas promovida por su interacción con otras proteínas de matriz extracelular, tales como proteoglicanos, colágeno y fibronectina, sea uno de los mecanismos involucrados en el desarrollo de la aterosclerosis (Khalil, Wagner et al. 2004).

Aunque las LDL nativas no son en principio directamente aterogénicas, cuando estas se modifican pueden quedar más fácilmente retenidas en la matriz extracelular de la pared arterial, al adquirir durante esta transformación propiedades inflamatorias o ser captadas por los receptores *scavenger*, aumentando de este modo su potencial aterogénico (Steinberg, Parthasarathy et al. 1989). A pesar de que la teoría más ampliamente aceptada es que las LDL nativas se modifican en la pared arterial, la presencia de LDL modificadas circulantes relativamente minoritarias, que por cuyas características se diferencian claramente de las LDL nativas, tales como la fracción electronegativa de las LDL (LDL(-)), la LDL glicada o la LDL oxidada (Sanchez-Quesada, Villegas et al. 2012), aun no se conoce el origen plasmático de las formas modificadas. Estas LDL modificadas pierden afinidad por el receptor de LDL (ie, LDLR) y acaban siendo reconocidas y captadas masivamente por receptores *scavenger* por parte de los macrófagos de la pared arterial (Lusis 2000, Rader and Daugherty 2008). Una vez internalizados, los lípidos acumulados en los macrófagos pueden oxidarse, generar intermediarios oxidados, que a su vez pueden inducir la producción de citoquinas y la quimiotaxis de células inflamatorias (Lusis 2000, Rader and Daugherty 2008).

Un gran número de evidencias derivado de estudios poblacionales, análisis de imagen de lesión arteriosclerótica en pacientes y modelos experimentales animales sugieren un papel activo de las HDL sobre el desarrollo de arteriosclerosis (Camont, Chapman et al. 2011). En humanos, se ha demostrado que existe una relación inversa entre la concentración de colesterol de HDL y el riesgo de desarrollar arteriosclerosis (Kontush and Chapman 2010, Camont, Chapman et al. 2011).

En estudios experimentales (preclínicos) se ha podido demostrar directamente el impacto antiaterogénico producido por un aumento de los niveles plasmáticos de HDL o apoA-I (Badimon, Badimon et al. 1990, Tangirala, Tsukamoto et al. 1999). Sin embargo, diferentes estudios clínicos y genéticos realizados en humanos han arrojado resultados en cierto modo conflictivos, sugiriendo que las intervenciones o variantes genéticas dirigidas a aumentar la concentración plasmática de colesterol no se encuentran necesariamente asociadas a una disminución del riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular (Barter, Caulfield et al. 2007, Frikke-Schmidt, Nordestgaard et al. 2008, Boden, Probstfield et al. 2011, Schwartz, Olsson et al. 2012, Voight, Peloso et al. 2012, Landray, Haynes et al. 2014). Esta discrepancia ha llevado al desarrollo de estrategias dirigidas al estudio de las propiedades antiaterogénicas de las HDL.

Entre las múltiples funciones antiaterogénicas atribuidas a las HDL su capacidad de estimular el eflujo del exceso de colesterol desde los macrófagos cargados de lípidos

es una de sus propiedades más reconocidas y es el primer paso en el proceso conocido como transporte reverso de colesterol (TRC) (Rothblat, de la Llera-Moya et al. 1999). La capacidad de eflujo de colesterol estimulada por las HDL se ha encontrado recientemente asociada de manera inversa con un aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular en un estudio transversal (Khera, Cuchel et al. 2011) y prospectivos (Saleheen, Scott et al. 2015). Aparte de esta propiedad también se ha atribuido a las HDL un papel clave en la mejora de la disfunción endotelial a través de su capacidad de estimular la síntesis de óxido nítrico por parte del endotelio, previniendo el desarrollo de arteriosclerosis coronaria, disminuyendo la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, lo que conlleva una reducción en la inflamación. También se le han atribuido otras funciones ateroprotectoras como su capacidad de inhibir la oxidación de las LDL y su papel antiapoptótico (Rosenson, Brewer et al. 2016) (ver apartado I.1.5).

1.1.4 Componentes moleculares de las HDL

I.1.4.1 Proteoma

Las proteínas de las HDL son su componente estructural y funcional. Las HDL transportan un gran número de proteínas que pueden ser divididas en varios subgrupos principales como las apolipoproteínas, enzimas, proteínas transferidoras de lípidos, proteínas de fase aguda, componentes de complemento, inhibidores de proteinasas

además de otros. Mientras que por un lado las apolipoproteínas y enzimas son considerados los componentes funcionales de las HDL, el papel de las proteínas minoritarias, en concreto, las implicadas en la regulación del complemento, protección contra infecciones, y respuesta de fase aguda, han recibido creciente atención en los últimos años, principalmente como resultado de los avances en la utilización de tecnologías proteómicas.

Diferentes estudios han permitido la identificación reproducible de hasta 95 proteínas en las HDL humanas (ver también HDL Proteome Watch en http://homepages.uc.edu/~davidswm/HDLproteome.html) (Heinecke 2009, Hoofnagle and Heinecke 2009, Davidsson, Hulthe et al. 2010, Shah, Tan et al. 2013). El perfil proteico de diferentes subfracciones de HDL de ratones es muy similar al encontrado en humanos (Gordon, Li et al. 2015) lo que apoya su uso como modelo animal para el estudio del lipoproteoma de HDL y quizás de muchos aspectos del metabolismo de estas lipoproteínas en investigación traslacional.

En este subapartado se abordan brevemente sólo aspectos directamente relacionados con proteínas de HDL cuyo papel es relevante en el contexto en el que se desarrolló el trabajo experimental. No hay duda de que el proteoma de HDL es mucho más extenso que el que se describe en este apartado. Es por ello que se emplaza la lectura de una extensa revisión sobre este tema (Kontush, Lindahl et al. 2015).

I.1.4.2 Principales apolipoproteínas

En este trabajo nos centraremos en exponer las características estructurales y propiedades fisiológicas de las principales apolipoproteínas de HDL.

I.1.4.2.1 Apolipoproteína (apo)A-I

La apoA-I es el componente estructural y funcional principal de las HDL y representa aproximadamente un 70% del total de la proteína. Se considera que casi todas las lipoproteínas HDL contienen apoA-I (Asztalos and Schaefer 2003, Asztalos and Schaefer 2003, Schaefer, Santos et al. 2010). Las funciones principales de la apoA-I se basan en su acción como ligando de receptores celulares, activación de LCAT y dotar a las HDL de múltiples actividades antiaterogénicas. Desde un punto de vista estructural, la apoA-I tiene un carácter anfipático que consta de hasta ocho dominios α -helix y dos repeticiones de 22 aminoácidos. Como consecuencia de estas características la apoA-I presenta una elevada afinidad por los lípidos y posee potentes propiedades emulgentes similares a los detergentes. No presenta sitios de glicosilación ni residuos cisteína para establecer puentes disulfuro. La apoA-I puede desplazarse entre lipoproteínas y también puede encontrarse en quilomicrones y VLDL. De igual modo que para otras muchas apolipoproteínas, sus sitios principales de síntesis son el hígado y el intestino delgado.

1.1.4.2.2 Apolipoproteína (apo)A-II

La apoA-II es la segunda apolipoproteína de HDL más importante, representando aproximadamente un 15-20% de su contenido proteico. Aproximadamente la mitad de las HDL circulantes contienen apoA-II (Duriez and Fruchart 1999). La apoA-II es más hidrofóbica que la apoA-I y circula en plasma humano como homodimero conectado a través de un puente disulfuro (Brewer, Lux et al. 1972). La apoA-II igualmente forma heterodímeros con otras apolipoproteínas que contienen cisteína (Hennessy, Kunitake et al. 1997). Esta apolipoproteína se sintetiza predominantemente en el hígado y en menor grado en el intestino delgado (Gordon, Budelier et al. 1983).

1.1.4.2.3 Otras apolipoproteínas

Existen otras apolipoproteínas pertenecientes a la familia de las apolipoproteínas solubles (tales como apoA-IV, apoE, apoCs) (Kontush and Chapman 2012) y otras que pertenecen a la superfamilia de la lipocalinas (tales como apoD y apoM) (Kontush and Chapman 2012, Schiefner and Skerra 2015) además de otras minoritarias (tales como la apoJ, apoF, apoH, apoO, apoL-1) (Kontush and Chapman 2012) que no han sido tratadas en este trabajo.

I.1.4.3 Enzimas

I.1.4.3.1 Lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT)

La LCAT es una proteína plasmática de 416 aminoácidos que cataliza la transferencia del grupo 2-acil de la lecitina o fosfoatidiletanolamina a residuos hidroxilo libres del colesterol para formar ésteres de colesterol en las lipoproteínas plasmáticas, utilizando apoA-I como activador (Fielding, Shore et al. 1972, Fielding, Shore et al. 1972). Se ha propuesto que en el mecanismo de activación de la LCAT por parte de la apoA-I participan los residuos aminoacídicos R130 y K133. De acuerdo con una de las predicciones moleculares de la proteína, estos jugarían un papel clave en la formación de un tunel anfipático que potencialmente permitiría la migración de las cadenas de grupos acil hidrofóbicas de los fosfolípidos y el colesterol libre de carácter anfipático desde la bicapa al sitio activo de la LCAT que contiene los sitios con actividad fosfolipasa y esterificadora (Jones, Catta et al. 2009). Este enzima también cataliza la reacción de reversa de esterificación de lisolecitina a lecitina (Subbaiah, Albers et al. 1980). La LCAT interacciona predominantemente con las HDL tanto discoidales como esféricas (aproximadamente un 75% de la actividad LCAT plasmática total) aunque también en lipoproteínas que contienen apoB (Glomset 1968). La esterificación de colesterol libre de HDL in vivo promueve la conversión de lipoproteínas discoidales en esféricas (Jonas 2000). En el plasma, la LCAT se encuentra estrechamente asociada con la apoD, con la cual se encuentra

frecuentemente copurificada (Holmquist 2002). El gen que codifica la LCAT se expresa principalmente en hígado (Yang, Manoogian et al. 1987). La proteína LCAT está altamente glicosilada y su estructura terciaria está en parte conformada gracias a dos puentes disulfuro que protege el sitio activo del enzima (Yang, Manoogian et al. 1987, Rousset, Vaisman et al. 2009). Aunque se ha descrito que la fuente de colesterol que es esterificado por la LCAT provendría, al menos en parte, directamente de las membranas celulares, otros autores han demostrado que las LDL aportarían buena parte del sustrato (Huang, von Eckardstein et al. 1993).

Mutaciones en el gen LCAT se encuentran asociadas con dos fenotipos. La deficiencia familiar de LCAT que se caracteriza por la incapacidad de la LCAT mutante en esterificar el colesterol de HDL y de LDL y la acumulación de HDL discoidales en el plasma. La otra entidad patológica se denomina *Fish Eye Disease* que se caracteriza por por la incapacidad de la LCAT mutante en esterificar el colesterol de sólo HDL. Ambas enfermedades se caracterizan por tener bajos niveles plasmáticos de HDL (Santamarina-Fojo, Hoeg et al. 2001) y formación de pre β -HDL.

La sobreexpresión de la forma humana LCAT en ratones transgénicos resulta en un aumento en los niveles plasmáticos de HDL, sin embargo este hallazgo se encontró asociado a un aumento inesperado en el desarrollo de arteriosclerosis en estos animales (Berard, Foger et al. 1997). Este efecto podría deberse a una elevación de HDL grandes cargadas de lípidos, no funcionales, que daría lugar a un catabolismo

disminuido y transformarse en lipoproteínas de carácter proaterogénico. Por otro lado, su deficiencia se asocia a una disminución en los niveles plasmáticos de HDL y de sus apolipoproteínas principales, junto con un aumento en los niveles plasmáticos de triglicéridos y de HDL nacientes de pequeño tamaño (Lambert, Sakai et al. 2001). En este último modelo se describió además que estos animales presentaron una disminución en los niveles plasmáticos de actividad paraoxonasa (PON)1 y fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (Lp-PLA2), aunque sus niveles de expresión génica en hígado se encontraron inalterados en comparación con los mostrados por sus controles (Forte, Oda et al. 1999).

Además de su acción en la esterificación del colesterol plasmático, también se le ha atribuido una actividad antioxidante asociada a la LCAT (Vohl, Neville et al. 1999), la cual podría contribuir en la capacidad antioxidante y antiinflamatoria de las HDL, aunque hay cierta controversia en relación a esta propiedad de la LCAT (Murakami, Kamiyama et al. 2002).

1.1.4.3.2 Paraoxonasas (PON)

La familia PON está constituida por una serie de miembros con actividad lactonasa dependientes de calcio PON1, PON2 y PON3 (Goswami, Tayal et al. 2009). La PON1 se sintetiza principalmente en el hígado (Mackness and Mackness 2010). En el plasma, la PON1 está casi exclusivamente asociada a HDL. Dicha asociación está en gran parte facilitada por los fosfolípidos de las HDL y requiere de una secuencia líder

hidrofóbica que queda retenida en la estructura primaria de la PON1 secretada. Se ha descrito que este enzima tiene la capacidad de metabolizar diferentes productos que son nocivos para el organismo, incluyendo los organofosfatos (pesticidas frecuentes), gases nerviosos y ésteres aromáticos altamente reactivos (ie, lactonas) (Mackness and Mackness 2010). En relación a esta última, se ha sugerido que uno de los papeles fisiológicos principales de este enzima bien podría ser su participación en la hidrólisis de homocisteína tiolactona (Jakubowski 2000), una especie altamente reactiva derivada de la homocisteína. El interés por la PON empezó a partir de que se encontrara que en esta proteína se concentraba la mayor parte del componente antioxidante de las HDL (Mackness, Arrol et al. 1993). En este sentido, cuando este enzima se encuentra asociada a HDL previene la acumulación de lípidos oxidados en estas lipoproteínas (Watson, Berliner et al. 1995, Aviram, Rosenblat et al. 1998) y además puede inhibir la oxidación de lípidos de LDL (Mackness, Arrol et al. 1993). Se considera que la prevención de la oxidación de la LDL podría ser el mecanismo principal a través del cual la PON1 asociada a HDL protege contra el desarrollo de arteriosclerosis. Consistentemente, el desarrollo de ratones deficientes en PON1 son más susceptibles a desarrollar arteriosclerosis (Shih, Gu et al. 1998) (Shih, Xia et al. 2000), estando ello asociado a una mayor susceptibilidad a la oxidación de sus LDL y HDL en comparación con los ratones control (Shih, Gu et al. 1998).

1.1.4.3.3 Fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (Lp-PLA2)

La fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas, también conocida con el nombre de acetil hidrolasa del factor activador plaquetario (PAF-AH) es un enzima independiente de calcio y *N*-glicosilada, que degrada PAF mediante la hidrólisis de los enlaces éster *sn*-2 liberando liso-PAF que es biológicamente inactivo (Mallat, Lambeau et al. 2010). Este enzima tiene la capacidad de catalizar la hidrólisis de fosfolípidos de cadena corta a nivel de enlaces éster *sn*-2 y por tanto puede hidrolizar fosfolípidos de cadena corta oxidados pro-inflamatorios de LDL oxidadas (Stremmler, Stafforini et al. 1991). Se ha sugerido que los fosfolípidos oxidados podrían ser transferidos desde las LDL a las HDL donde estos serían inactivados mediante su hidrólisis a través de Lp-PLA2. Consistentemente, su acción en HDL, previniendo la peroxidación de LDL, desaparece en presencia de inhibidores del enzima (Watson, Navab et al. 1995). Los macrófagos representan la fuente principal de los niveles plasmáticos de actividad Lp-PLA2 (McIntyre, Prescott et al. 2009). Su análisis estructural revela que esta lipasa contiene un pliegue α/β y una triada catalítica característicos (Samanta and Bahnsen 2008). Su sitio activo se encuentra muy cercano a la superficie de las lipoproteínas. Estos análisis también revelaron un dominio de unión a lípidos conformado por dos *clusters* de residuos hidrofóbicos como responsables de su asociación a lipoproteínas. En humanos, la Lp-PLA2 circula en plasma predominantemente asociada a lipoproteínas LDL y en menor grado a HDL (Stafforini, Tjoelker et al. 1999),

mostrando mayor afinidad por las LDL densas y pequeñas y a lipoproteína (Lp)(a) (Tselepis, Dentan et al. 1995), lipoproteínas con un elevado componente proaterogénico asociado. Por el contrario, en ratones la mayor parte de la Lp-PLA2 se encuentra asociada a HDL (Stafforini, Tjoelker et al. 1999). Existen evidencias que apoyan que su asociación a HDL puede ser antiaterogénica (Kontush and Chapman 2010). Consistentemente su sobreexpresión previene del desarrollo de arteriosclerosis en ratones (Quarck, De Geest et al. 2001).

I.1.4.4 Proteínas trasferidoras de lípidos

I.1.4.4.1 Proteína trasferidora de fosfolípidos (PLTP)

La PLTP pertenece a la superfamilia de proteínas Plunc de unión a lipopolisacárido (LPS) y a la proteína que induce la permeabilidad bactericida (BPI/LBP/Plunc). Este enzima se sintetiza en hígado además de otros tejidos metabólicamente muy activos. En plasma, la PLTP circula predominantemente asociada a HDL donde facilita la transferencia de fosfolípidos, diacilglicerol (Rao, Albers et al. 1997), colesterol libre (Nishida and Nishida 1997), R-tocopherol (vitamina E) (Kostner, Oetl et al. 1995) y lipopolisacáridos (Hailman, Albers et al. 1996, Levels, Marquart et al. 2005) entre lipoproteínas y entre lipoproteínas y células. A la PLTP se le atribuyen dos funciones principales en la circulación: [i] transforma las partículas HDL en un proceso de conversión o fusión donde las partículas más pequeñas HDL3 se fusionan llevando a

la generación de HDL más grandes y provocando el desplazamiento de apoA-I de estas lipoproteínas y por consiguiente la aparición de partículas más pequeñas (pre β 1-HDL) (von Eckardstein, Jauhiainen et al. 1996), que a su vez pueden participar en la retirada de colesterol de las células (Vikstedt, Metso et al. 2007); y [ii] transfiere los fosfolípidos poslipolíticos de la superficie de las VLDL a las HDL (Albers and Cheung 2004, Siggins, Bykov et al. 2007). Entre las funciones por las cuales PLTP puede influir en la formación de lesión arteriosclerótica se contemplan la generación de aceptores para el eflujo de lípidos desde las células, la regulación de los niveles plasmáticos de HD, la protección de las lipoproteína contra la oxidación, y la regulación de la producción de lipoproteínas aterogénicas (Jiang, Qin et al. 2001).

Aparte de estas funciones, también se la ha identificado como un reactante de fase aguda lo que le atribuiría un papel potencial en el sistema inmune innato (Tzotzas, Desrumaux et al. 2009). Consistentemente, sus niveles plasmáticos de proteína y actividad enzimática suelen encontrarse elevados en el plasma de pacientes diabéticos y obesos (Qin, Song et al. 2014).

1.14.4.2 Proteína transferidora de ésteres de colesterol (PTEC)

La PTEC pertenece igualmente a la superfamilia BPI/LBP/Plunc (Kopec, Alva et al. 2011) y también contiene múltiples sitios de *N*-glicosilación en su estructura. Este enzima se encuentra primariamente expresada en el hígado y en el tejido adiposo. En el plasma, este enzima favorece el intercambio de lípidos entre HDL y lipoproteínas

que contienen apoB, favoreciendo la transferencia bidireccional de ésteres de colesterol y triglicéridos entre ellas. La estructura de la PTEC revela la existencia de un tunel hidrofóbico relleno con dos moléculas de ésteres de colesterol y en cada uno de cuyos extremos se encuentra unida una molécula de fosfatidilcolina (Qiu, Mistry et al. 2007). Tales interacciones dotan a la PTEC de actividad transferidora de fosfolípidos y se ha sugerido que esta proteína podría también sufrir cambios conformacionales dirigidos a acomodar las lipoproteínas de diferentes tamaños (Qiu, Mistry et al. 2007).

Se estima que alrededor del 66% de los ésteres de colesterol de HDL retornan al hígado a través de la acción de PTEC, indicando su papel en el TRC (Barter, Brewer et al. 2003), mientras que el 33% restante iría a cuenta del receptor SR-BI (Fielding and Fielding 2007).

I.1.4.5 Lipasas

I.1.4.5.1 Lipoproteína lipasa

Aunque se trata de una proteína relacionada con el metabolismo de LRT más que con el de HDL, existen diferentes estudios que relacionan este enzima con los niveles plasmáticos de colesterol en plasma (Patsch, Prasad et al. 1987). Así, por ejemplo, individuos con deficiencia hereditaria de lipoproteína lipasa (síndrome quilomicronémico) frecuentemente presentan niveles plasmáticos de HDL

disminuidos (Patsch 1998).

1.1.4.5.2 Lipasa hepática (LH)

La lipasa hepática (LH) está codificada por el gen *Lipc* (Brown and Rader 2007). Es un enzima que se sintetiza en el hígado y tras su secreción se une a la superficie de las células endoteliales de los vasos que perfunden el hígado. Del mismo modo que la lipoproteína lipasa, este enzima puede ser liberado mediante perfusión con heparina la cual compite con el sitio de unión de la LH con los proteoglicanos de las membranas de las células endoteliales. Su acción es la hidrólisis de fosfolípidos y triglicéridos (Zambon, Deeb et al. 2003). Comparte junto a la lipasa endotelial (ver siguiente sección) su especificidad principalmente por los fosfolípidos y en menor medida por los triglicéridos de las lipoproteínas que contienen apoB y de las HDL de gran tamaño (Maugeais, Tietge et al. 2003, Santamarina-Fojo, Gonzalez-Navarro et al. 2004). La LH activa existe como homodímero y presenta un amplio rango de especificidad de sustrato. Las lipoproteínas sobre las que actúa son preferentemente los remanentes de VLDL (ie, IDL) y sobre las HDL (Olivecrona and Olivecrona 1995). En concreto, cataliza la hidrólisis de cadenas de ácidos grasos en la posición *sn*-1 de los fosfolípidos y triglicéridos de estas partículas. En este último caso su acción promueve la conversión de partículas grandes (ie, HDL2) a pequeñas (ie, HDL3), ya que la hidrólisis de los triglicéridos de las HDL provoca la disociación de moléculas de apoA-I (Clay and Barter 1996). A partir de estas se sugiere que se originan

partículas HDL de menor tamaño, cuya única apolipoproteína es la apoA-I (ie, pre β -HDL). A parte de esta acción, también se ha descrito que este enzima puede facilitar la unión y captación de lipoproteínas (Olivecrona and Olivecrona 1995).

1.14.5.3 Lipasa endotelial (LE)

La lipasa endotelial (LE) está codificada por el gen *Lipg* (Jaye, Lynch et al. 1999). Esta lipasa se sintetiza por las células endoteliales in vitro e in vivo y se expresa en diferentes órganos, tales como el hígado, placenta, pulmón y riñón. Este enzima tiene una actividad fosfolipasa (predominantemente fosfolipasa A1) y unos bajos niveles de actividad lipasa de triglicéridos (Jaye, Lynch et al. 1999).

1.1.4.6 Proteínas de fase aguda

Las proteínas de respuesta de fase aguda positiva, cuyos niveles plasmáticos aumentan en respuesta a la inflamación aguda, forman una gran familia de proteínas asociadas a HDL (Vaisar, Pennathur et al. 2007, Heinecke 2009). En condiciones normales, el contenido en estas proteínas en HDL es de todas maneras mucho más bajo en comparación con el de las apolipoproteínas. Por otro lado, se da la circunstancia de que los niveles plasmáticos de algunas de las apolipoproteínas de HDL, tales como la apoA-I y la apoA-IV, se encuentran disminuidas durante la respuesta de fase aguda (Navab, Ananthramaiah et al. 2004); de tal modo, tales proteínas podrían considerarse como reactantes de fase aguda negativos. En este

subapartado se abordaron brevemente sólo aspectos directamente relacionados con proteínas de HDL cuyo papel es relevante en el contexto en el que se desarrolló el trabajo experimental. No hay duda de que el proteoma de HDL es mucho más extenso que el que se describe en este apartado. Es por ello que se emplaza la lectura de una extensa revisión sobre este tema (Kontush, Lindahl et al. 2015).

Las proteínas séricas amiloides (SAA), son reactantes principales de fase aguda, y son secretadas durante la fase aguda como consecuencia de la respuesta inflamatoria. En humanos, tres de las isoformas SAA (ie, SAA1, SAA2 y SAA4) se encuentran expresadas predominantemente por el hígado. La expresión hepática de SAA1 y SAA2 se induce durante la reacción de fase aguda, lo que resulta en un aumento concomitante en sus niveles circulantes que alcanzan elevaciones de hasta 1000 veces su concentración en condiciones basales (Khovidhunkit, Kim et al. 2004). En contraste, la SAA4 se expresa constitutivamente en el hígado y, de este modo, recibe el nombre de SAA constitutiva. La SAA1, el miembro principal de esta familia, es transportada principalmente por las HDL plasmáticas en humanos, conejos y ratones (Benditt, Hoffman et al. 1982, Hoffman and Benditt 1982, Marhaug, Sletten et al. 1982, Cabana, Lukens et al. 1996). En plasma, SAA1 no existe en forma libre y se asocia con la fracción lipoproteica plasmática no-HDL en ausencia de HDL (Cabana, Feng et al. 2004).

I.1.4.7 Lipidoma

El desarrollo de la metabolómica ha permitido el análisis lipidómico mediante la espectrometría de masas, que permite obtener datos cuantitativos de especies moleculares de lípidos individuales, así como de moléculas lipídicas que se encuentran pobremente representadas. En el caso de las HDL en un estudio pionero utilizando esta tecnología se ha logrado determinar valores de referencia para el lipidoma de las HDL aisladas a partir de plasma de sujetos normolipémicos sanos mediante FPLC (Wiesner, Leidl et al. 2009). Más tarde, con el objetivo de caracterizar más exhaustivamente la composición de las HDL se ha conseguido analizar el fosfo- y esfingolipidoma de las 5 especies moleculares de HDL también en sujetos normolipémicos sanos (Camont, Lhomme et al. 2013).

I.1.4.7.1 Fosfolípidos

La fosfatidilcolina es la principal especie fosfolipídica en plasma que representa el 32-35 mol % de los lípidos totales en HDL (Wiesner, Leidl et al. 2009). Esta especie fosfolipídica es un lípido estructural y se encuentra distribuido uniformemente entre las diferentes clases de HDL. Las especies moleculares principales de fosfatidilcolina se encuentran representadas por las especies 16:0/18:2, 18:0/18:2 y 16:0/20:4 (Lhomme 2012). La lisofosfatidilcolina es una subespecie muy importante en las HDL (1,4 -8,1 mol % de los lípidos totales en HDL). Esta especie deriva de una

degradación controlada de la fosfatidilcolina por las fosfolipasas, incluyendo la LCAT, que se basa en su asociación preferencial con las HDL (Kontush, Therond et al. 2007). En concreto, la LCAT a través de su asociación preferente con las partículas HDL de menor tamaño y más densas, que a su vez contienen del orden del doble de lisofosfatidilcolina que las más grandes y ligeras (Camont, Lhomme et al. 2013). La lisofosfatidilcolina también se produce como consecuencia de la acción hidrolítica mediada por la Lp-PLA2 sobre los fosfolípidos oxidados o por la PLA2 secretada en condiciones proaterogénicas, tales como el estrés oxidativo y la inflamación, y se erige de este modo como un potencial biomarcador de inflamación. Cabe destacar que las principales especies moleculares de lisofosfolípidos de HDL contienen cantidades sustanciales de ácidos grasos en las que predomina los átomos de carbono 16 y 18, reflejando la preferencia por parte de la LCAT sobre las fosfatidilcolinas de 16 y 18 átomos de carbono (Lhomme 2012).

Otras especies moleculares de fosfolípidos como el fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico y cardiolipina son especies cargadas negativamente que también se encuentran en HDL, y cuya carga contribuye significativamente en la carga neta negativa de las HDL (Rosenson, Brewer et al. 2011, Lhomme 2012). El contenido en estos lípidos ejerce un papel muy importante en la modulación de las interacciones entre las lipoproteínas y las lipasas, proteínas de membrana, matriz extracelular y otros componentes proteicos.

1.1.4.7.2 Esfingolípidos

La esfingomielina es un lípido estructural que promueve la rigidez lipídica de la superficie (Rye, Hime et al. 1996) y constituye el principal esfingolípidos de las HDL circulantes (Wiesner, Leidl et al. 2009, Camont, Lhomme et al. 2013, Stahlman, Fagerberg et al. 2013). Entre los esfingolípidos, la esfingomielina 1-fosfato (S1P) es un lípido bioactivo al que se le atribuye un papel clave en biología vascular (Lucke and Levkau 2010). Más del 90% de los fosfatos de base esfingoide circulantes se encuentran en las HDL y en las fracciones plasmáticas donde eluye la albúmina (Kontush and Chapman 2012). S1P se asocia preferentemente con las lipoproteínas HDL pequeñas y densas (contienen del orden de 10 veces más S1P que las partículas grandes y ligeras) (Kontush, Therond et al. 2007) lo que a su vez es consistente el elevado contenido de apoM, el cual es un transportador específico de S1P en estas lipoproteínas (Davidson, Silva et al. 2009).

Por otro lado, la ceramida es un esfingolípidos intermediario que está involucrado en la señalización celular, apoptosis, en las respuestas inflamatorias, función mitocondrial y sensibilidad a la insulina (Lipina and Hundal 2011). Esta especie lipídica se encuentra probablemente representada en las HDL (25 mol % del total de la ceramida en plasma total), representando tan solo un 0,022-0,097 mol % del total de lípidos de HDL (Wiesner, Leidl et al. 2009, Camont, Lhomme et al. 2013, Stahlman, Fagerberg et al. 2013).

1.1.4.7.3 Lípidos neutros

Los esteroides no esterificados (libre) se localizan en la monocapa de la superficie lipídica de las lipoproteínas HDL y ejercen un papel importante modulando su fluidez. Los esteroides de HDL son fundamentalmente colesterol, reflejando el papel clave de las lipoproteínas en el transporte de colesterol en el organismo. En las HDL también se encuentran presentes otros esteroides aunque en cantidades más pequeñas, tales como el lanosterol, ergosterol, diferentes fitosteroides, así como oxisteroides y estrógenos (que en gran medida circulan en su forma éster) (Kontush and Chapman 2012).

El colesterol libre, que presenta afinidad por la esfingomielina tiende a encontrarse asociado con las HDL ligeras y grandes. Por otro lado, los ésteres de colesterol se producen principalmente (hasta un 80%) en las HDL circulantes como resultado de la transesterificación de los fosfolípidos y el colesterol catalizada por el enzima LCAT. Estos lípidos altamente hidrofóbicos forman el núcleo lipídico de las HDL y representan hasta un 36 mol % del total de lípidos en HDL (Wiesner, Leidl et al. 2009, Camont, Lhomme et al. 2013, Stahlman, Fagerberg et al. 2013). La distribución de las diferentes especies moleculares de ésteres de colesterol es muy similar entre todo el rango de lipoproteínas HDL (Vieu, Jaspard et al. 1996).

Los triglicéridos asociados a HDL son sobretodo especies lipídicas en las que predomina su contenido en ácido oleico, palmítico y linoleico (Lhomme 2012) y sólo

representan un 3 mol % del total de lípidos de HDL (Kontush, Therond et al. 2007, Wiesner, Leidl et al. 2009, Camont, Lhomme et al. 2013, Stahlman, Fagerberg et al. 2013). De manera similar que los ésteres de colesterol, el perfil de especies de triglicéridos de HDL es similar entre HDL2 y HDL3 (Vieu, Jaspard et al. 1996).

Existen también especies lipídicas bioactivas minoritarias en las HDL, tales como los diacilglicéridos, monoacilglicéridos y ácidos grasos libres (Lhomme 2012). En este último caso, las especies de ácidos grasos que predominan son el ácido palmítico, esteárico y oleico (Lhomme 2012).

1.1.5 Metabolismo de las HDL

1.1.5.1 Biogénesis

La biogénesis de las HDL es un proceso complejo que implica la interacción funcional entre diferentes proteínas presentes en las membranas celulares y en el plasma (Zannis, Fotakis et al. 2015). El primer paso en este proceso implica la secreción de apoA-I principalmente por el hígado y el intestino. La apoA-I tras ser secretada interacciona funcionalmente con el transportador ABCA1 lo que inicia la transferencia de fosfolípidos y colesterol a las moléculas apoA-I circulantes pobremente lipidizadas. Como consecuencia de este proceso de lipidización gradual se generan partículas discoidales que a su vez incorporan colesterol no esterificado. La esterificación del colesterol por parte de LCAT convierte a su vez estas partículas

discoidales HDL en esféricas.

El transportador ABCA1 es una proteína que pertenece a la familia de los transportadores ABC y se encuentra expresada abundantemente en el hígado, macrófagos, cerebro, y muchos otros tejidos (Langmann, Klucken et al. 1999, Brousseau, Bodzioch et al. 2001). Este transportador se localiza en la superficie basolateral de los hepatocitos (Neufeld, Demosky et al. 2002); aunque también se encuentra en vesículas endocíticas desde donde este transportador se transportaría entre las vesículas endocíticas tardías a la superficie celular (Neufeld, Remaley et al. 2001). Como ya se ha indicado, ABCA1 promueve el eflujo de fosfolípidos celulares y de colesterol a apoA-I deslipidizada o pobremente lipidizada y a otras apolipoproteínas, pero no a lipoproteínas HDL esféricas (Wang, Silver et al. 2000, Remaley, Stonik et al. 2001).

El hígado es el principal responsable en la síntesis de HDL tanto en humanos como en ratones (Brunham, Kruit et al. 2006). En ratones deficientes de *Abca1* en el hígado e intestino delgado presentan niveles plasmáticos de HDL muy reducidos, indicando que ambos tejidos son los principales sitios de producción de HDL (Timmins, Lee et al. 2005). En este contexto, mediante la inactivación en el intestino de la expresión de *Abca1* en ratones se pudo concluir que el hígado contribuye con un 70% a los niveles plasmáticos de HDL (Brunham, Kruit et al. 2006). Por otro lado, en ratones que no expresan *Abca1* en el hígado presentaron una concentración de HDL en la linfa

significativamente disminuida a pesar de que el intestino contribuye en un 30% de su producción, sugiriendo que la HDL producida en el intestino sería muy posiblemente secretada directamente al plasma (Brunham, Kruit et al. 2006).

La deficiencia de *Abca1* total o específica de hígado en ratones se encuentra asociada con un aumento de la tasa de aclaramiento de las HDL por parte del hígado y en menor medida por las adrenales y los riñones (Timmins, Lee et al. 2005, Singaraja, Stahmer et al. 2006). En los ratones con una deficiencia total de *Abca1* la maduración de la apoA-I pobremente lipidizada como de las partículas pre β -HDL es disfuncional que además son aclaradas a nivel renal más rápidamente (Timmins, Lee et al. 2005).

La presencia de mutaciones en el gen *ABCA1* en pacientes con la enfermedad de *Tangier* contribuyó a entender el mecanismo de interacción in vivo entre la apoA-I y *ABCA1* en el proceso de la biogénesis de HDL. El plasma de estos pacientes presenta muy bajos niveles de colesterol total y de HDL, además de una capacidad de eflujo de colesterol por parte de estas HDL disminuida. También tienen alterada la formación de partículas pre β -HDL y presentan una acumulación de lípidos anormalmente elevada en varios tejidos (Orso, Broccardo et al. 2000, Assmann, von Eckardstein et al. 2001, Daniil, Phedonos et al. 2011). En humanos, varias de estas mutaciones en el gen *ABCA1* que alteran la función de la proteína se encuentran asociadas a una susceptibilidad aumentada a desarrollar arteriosclerosis (Singaraja, Brunham et al. 2003). La inactivación de *Abca1* en ratones resulta en unos niveles plasmáticos de

colesterol muy disminuidos, acumulación lipídica en varios tejidos, un crecimiento de estos animales y desarrollo neuronal comprometidos, características que mimetizan el fenotipo que desarrollan pacientes con enfermedad de *Tangier* (Orso, Broccardo et al. 2000). Además de todo ello, los ratones deficientes en *Abca1* muestran un aumento en la absorción de colesterol en respuesta a una dieta con elevado contenido en colesterol (McNeish, Aiello et al. 2000, Aiello, Brees et al. 2002).

Se han descrito una serie de mutaciones en el gen *APOA1* que comprometen la interacción entre la ApoA-I y ABCA1 e inhiben el primer paso en la biogénesis de HDL (Zannis, Fotakis et al. 2015). Otro elemento clave en la biogénesis de las HDL es la acción de la LCAT. El plasma obtenido de mutantes en el gen *LCAT* en grado heterocigoto presentaron una capacidad aumentada en promover el eflujo de colesterol mediado por ABCA1, pero disminuida cuando se determinó el eflujo de colesterol mediado por ABCG1 y SR-BI en comparación con el plasma de sujetos normolipémicos sanos. Esto último fue atribuido a la presencia de cantidades elevadas de pre β -HDL y disminuidas de α -HDL en el plasma de los pacientes heterocigotos para LCAT (Calabresi, Baldassarre et al. 2009).

Por su parte alteraciones en la apoA-I (químicas o genéticas) también afectan la interacción entre esta proteína y la LCAT y por consiguiente la formación de HDL. La modificación con este enzima también altera varias funciones atribuidas a las HDL y genera partículas HDL proinflamatorias (Undurti, Huang et al. 2009). En cuanto a las

causas genéticas del total de 46 mutaciones naturales descritas en el gen *APOA1*, 25 de ellas están asociadas a niveles plasmáticos disminuidos de HDL, y 17 de estos mutantes presentan una capacidad reducida por parte de la apoA-I en activar la LCAT (Zannis, Fotakis et al. 2015).

I.1.5.2 Remodelaje y catabolismo

El remodelaje de las HDL afecta la estructura y el recambio metabólico de estas lipoproteínas, generando una mezcla dinámica de subpoblaciones discretas de HDL plasmáticas que se diferencian en función de su tamaño, aspecto, composición lipídica y proteica, y en sus funciones (Zannis, Fotakis et al. 2015).

El remodelaje de las HDL se produce primero en la circulación mediante la participación de diferentes proteínas cuyo proceso finaliza con su catabolismo por parte de las células y tejidos, acción mediada por diferentes receptores celulares.

La acción de la LH y LE comporta la hidrólisis de fosfolípidos y de triglicéridos residuales de las HDL (Maugeais, Tietge et al. 2003, Santamarina-Fojo, Gonzalez-Navarro et al. 2004) lo que produce la conversión de HDL2 a HDL3 y pre β -HDL (Breckenridge, Little et al. 1982, Brunzell and Deeb 2001, Ishida, Choi et al. 2003) y acelera el catabolismo de HDL. La formación de pre β -HDL también requiere de las funciones de la apoM (Wolfrum, Poy et al. 2005). Por otro lado, una parte de los ésteres de colesterol generados por la LCAT pueden ser transferidos a las

lipoproteínas que contienen apoB mediante la acción de la PTEC (Hopkins and Barter 1980, Barter, Kastelein et al. 2003). La PLTP puede transferir los fosfolípidos desde las lipoproteínas que contiene apoB a las HDL durante la lipólisis para generar HDL2 y también pueden convertir HDL3 a HDL2 y pre β -HDL (Tall, Abreu et al. 1983, Lusa, Jauhiainen et al. 1996). La participación de proteínas/receptores con capacidad de unir HDL está documentada en todos los pasos del metabolismo de HDL. Una de estas proteínas es el SR-BI, cuya expresión predomina en los hepatocitos, macrófagos y tejidos esteroideogénicos, media la captación selectiva de ésteres de colesterol por parte de estas células y tejidos, así como el eflujo de colesterol (Gu, Trigatti et al. 1998, Krieger 1999, Krieger and Kozarsky 1999, Pagler, Rhode et al. 2006, Rohrl and Stangl 2013); el transportador ABCG1, que media el eflujo de colesterol a lipoproteínas HDL maduras (Nakamura, Kennedy et al. 2004); la subunidad ecto-F1-ATPasa acoplada a receptores purinérgicos P2Y, que media la endocitosis de holopartículas HDL por el hígado utilizando como ligando la apoA-I (Martinez, Jacquet et al. 2003, Champagne, Martinez et al. 2006, Martinez, Perretv et al. 2007, Martinez, Najib et al. 2015); y los receptores megalina/cubilina que participan en la retirada de apoA-I y lipoproteínas pre β -HDL vía renal (Martinez, Perretv et al. 2007). El colesterol esterificado transportado por las HDL también puede ser captado a través de la internalización de las partículas HDL a través del receptor LRP, aunque de manera minoritaria, especialmente en el hígado y riñón. Otra vía de entrada del

colesterol esterificado es a través de su transferencia a partículas que contienen apoB mediante la actividad PTEC, las cuales son más tarde captadas por las células mediante diferentes receptores de la familia de LDLR (ie, LDLR, LRP o VLDLR).

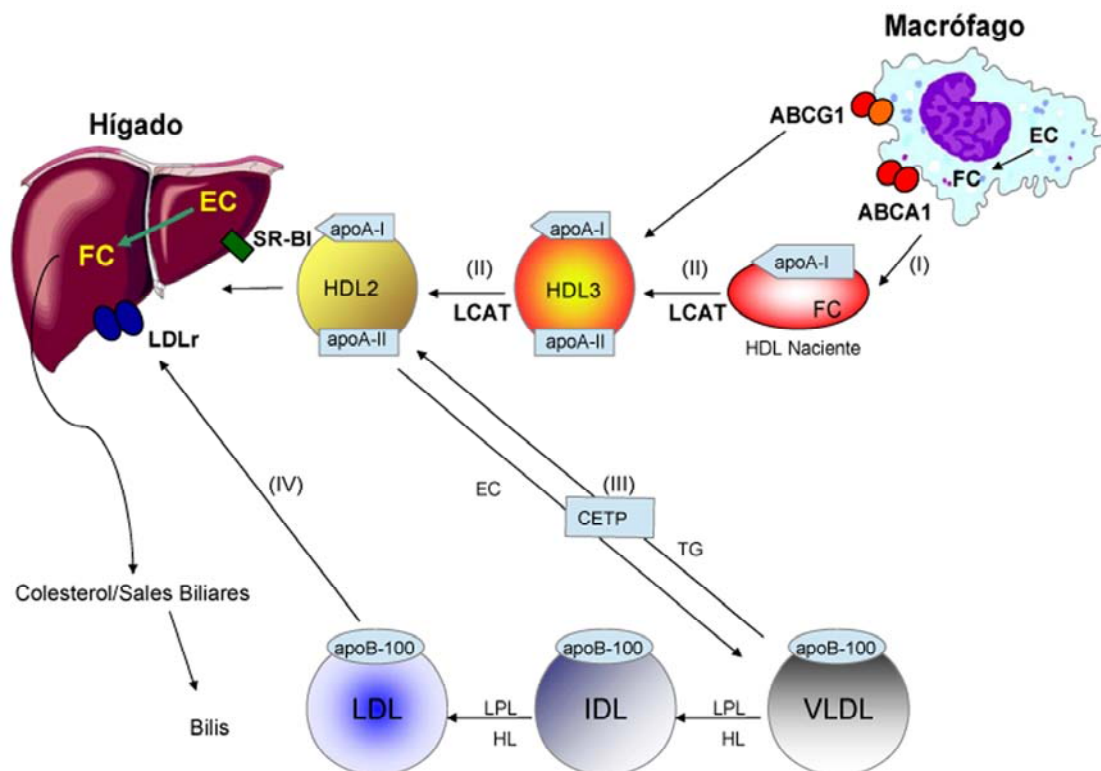


Figura 1 Metabolismo de las HDL. Abreviaciones empleadas: apo, apolipoproteína; ABC, *ATP-binding cassette transporters*; apoA-I, apolipoproteína A-I; apoB-100, apolipoproteína B-100; CETP, proteína transferidora de ésteres de colesterol; EC, éster de colesterol; FC, colesterol libre; HDL, lipoproteínas de alta densidad; IDL, lipoproteínas de densidad intermedia; LDL, lipoproteínas de baja densidad; LDLr, receptor de LDL; HL, lipasa hepática; LPL, lipoproteína lipasa; SR-BI, scavenger receptor class B type I; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad.

1.1.6 Actividades biológicas de las HDL

Como ya se ha apuntado anteriormente, a partir de muchos estudios prospectivos a gran escala se ha demostrado la existencia de una relación inversa entre la concentración de HDL y el desarrollo de enfermedad coronaria (Rosenson, Brewer et al. 2013). En diferentes estudios de intervención en animales demuestran que las HDL inhiben el desarrollo de arteriosclerosis (Badimon, Badimon et al. 1990, Rubin, Krauss et al. 1991, Paszty, Maeda et al. 1994, Plump, Scott et al. 1994).

Se han identificado diferentes propiedades ateroprotectoras atribuidas a las HDL (Kontush and Chapman 2006, Kontush and Chapman 2010, Camont, Chapman et al. 2011), siendo las principales [i] la estimulación de eflujo de colesterol actuando como aceptores primarios, facilitando de este modo el transporte reverso de colesterol desde la pared arterial y tejidos periféricos al hígado; [ii] la protección de las LDL contra la oxidación; [iii] su acción antiinflamatoria sobre células de la pared arterial, [iv] antiapoptótica, [v] vasodilatadora, [vi] antitrombótica, y [vii] antiinfecciosa (ver Figura 2).

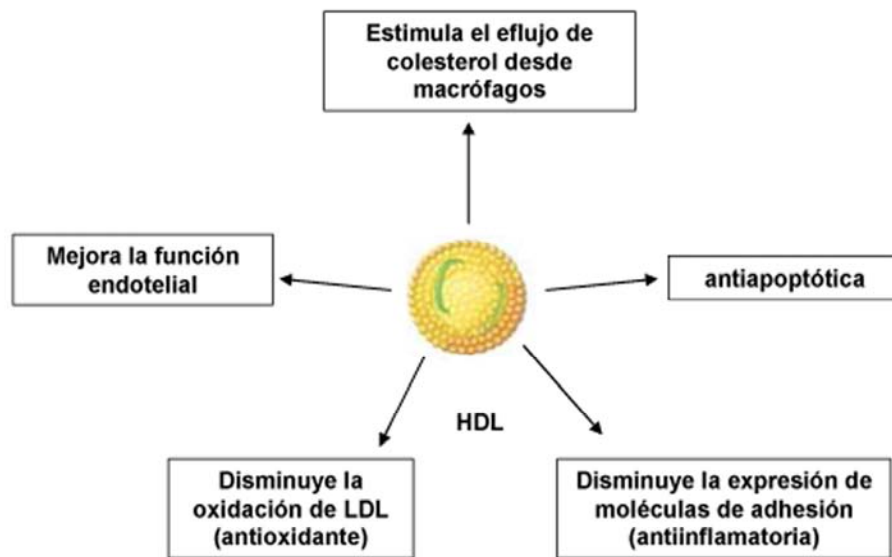


Figura 2 Propiedades antiaterogénicas principales de las HDL. Abreviaciones empleadas: HDL, lipoproteínas de alta densidad; LDL, lipoproteínas de baja densidad.

No es objetivo de esta introducción abordar extensivamente todas las propiedades antiaterogénicas atribuidas a las HDL, si no centrarnos en las abordadas en este trabajo, las cuales son posiblemente las más importantes, ie, su capacidad de estimular el transporte reverso de colesterol, y sus cualidades antioxidante y antiinflamatoria (Yu, Yekta et al. 2008).

I.1.6.1 Papel de las HDL en el eflujo de colesterol y transporte reverso de colesterol

La acumulación de lípidos en los macrófagos, que da lugar a la formación de células espumosas, representa uno de los hallazgos principales en la aterogénesis (Wynn, Chawla et al. 2013). Desde que se propuso por Glomset en 1968 (Glomset 1968),

quien definió el TRC como el proceso por el que las HDL transportan colesterol desde tejidos extrahepáticos al hígado para su reciclaje o excreción del organismo a través de la bilis se ha erigido en quizás una de las propiedades antiaterogénicas principales de las HDL. Entre las estrategias a través de las cuales las células pueden revertir este proceso, la capacidad de estimular el eflujo del exceso de colesterol por parte de aceptores extracelulares de lípidos (ie, apolipoproteínas, HDL) desde macrófagos, que es considerada como el primer paso en este proceso (Rothblat, de la Llera-Moya et al. 1999), ha sido y aun es objeto de estudio como una posible métrica en la predicción del riesgo cardiovascular (Khera, Cuchel et al. 2011, Saleheen, Scott et al. 2015, Lee-Rueckert, Escola-Gil et al. 2016).

1.1.6.1.1 Eflujo de colesterol

La capacidad de eflujo de colesterol por parte de las lipoproteínas HDL está relacionada con su capacidad de extraer el colesterol de las membranas de las células periféricas y en particular macrófagos y células espumosas. Aunque esta propiedad representa solo una pequeña parte del colesterol que es transportado en el organismo por parte de las HDL, se ha erigido como uno de los más importantes desde un punto de vista antiaterogénico. Por esta razón, ha sido propuesto recientemente como una nueva diana terapéutica (Rosenson, Brewer et al. 2012).

En el eflujo de colesterol participan mecanismos activos y pasivos y su eficiencia

viene determinada por diferentes componentes, tales como el *status* del colesterol celular, la actividad de transporte de lípidos, y la naturaleza de los aceptores extracelulares (Zanotti, Favari et al. 2012).

El eflujo de colesterol viene determinado por el colesterol localizado en la membrana plasmática que a su vez proviene de diferentes compartimentos intracelulares, tales como el endosomal tardío/lisosomal o el aparato de Golgi. El colesterol localizado en el retículo endoplasmático proviene principalmente de la síntesis endógena y puede ser liberado a orgánulos citoplasmáticos principalmente a través de la vía no vesicular en la que participan diferentes proteínas transportadoras. Por otro lado, el colesterol de los endosomas tardíos/lisosomas deriva fundamentalmente de la captación de lipoproteínas, el cual sufre una hidrólisis por parte de la hidrolasa ácida (Maxfield and Tabas 2005). En condiciones fisiológicas el contenido intracelular de colesterol se encuentra a niveles muy bajos, al estar mayoritariamente (~80%) transferido a la membrana plasmática, donde se encuentra en un equilibrio dinámico con el contenido en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (Huang, Gu et al. 2003).

La membrana plasmática contiene diferentes microdominios lipídicos en equilibrio estable. Los *lipid rafts* se caracterizan por estar fuertemente empaquetados y ser uno de estos microdominios de la membrana donde el colesterol se encuentra asociado con los esfingolípidos y la caveolina, cuyo papel se ha establecido importante en la señalización celular (Gargalovic and Dory 2003). Por otro lado, los dominios

independientes de los *lipid rafts* se ha sugerido sirvan como la fuente principal del colesterol disponible durante la interacción con los aceptores extracelulares y su subsiguiente eflujo vía ABCA1 localizado en la membrana plasmática (Landry, Denis et al. 2006). Además, el TRC puede ser también estimulado por otros microdominios donde el colesterol se encuentra asociado a matriz extracelular, en cuya formación participaría ABCG1 (Vaughan and Oram 2005).

En cuanto a los aceptores extracelulares se ha descrito que las apolipoproteínas A-I, A-II, E y otras apolipoproteínas de HDL inducen un eflujo de colesterol rápido, saturable y unidireccional (Yokoyama 2006). Como resultado, las lipoproteínas HDL adquieren colesterol de manera eficiente desde el compartimento extravascular que además es independiente del eflujo de colesterol y fosfolípidos inducido por la LCAT. La apoA-I, principal proteína de las HDL, presenta un papel central en el TRC desde macrófagos al hígado. Esta proteína es un aceptor de fosfolípidos y colesterol transferidos por el transportador ABCA1. La apoA-I también participa en el remodelaje de las HDL al actuar como cofactor de la actividad enzimática LCAT (Aron, Jones et al. 1978) y es también ligando de receptor SR-BI (Williams, Connelly et al. 1999) por lo que participa en la captación de los ésteres de colesterol vehiculados por las HDL por parte del hígado y de tejidos esteroideogénicos. Estas observaciones son consistentes con la demostración de que los ratones que sobreexpresan la apoA-I humana presentan un TRC in vivo específico de macrófagos

a heces (TRC-m) acelerado (Zhang, Zanotti et al. 2003).

El eflujo de lípidos mediado por apolipoproteínas implica interacciones específicas con proteínas de membrana, la absorción de los lípidos de membrana de las caveolas, la lipidación de las apolipoproteínas deslipidizadas o pobres en lípidos y la producción de HDL pobres en lípidos pequeñas (Rothblat, de la Llera-Moya et al. 1999, von Eckardstein, Nofer et al. 2001). Como ya se ha indicado anteriormente, los mecanismos que contribuyen al eflujo de colesterol incluyen procesos de difusión pasiva y vías activas tales como las mediadas gracias a su interacción con diferentes transportadores, ie, ABCA1, ABCG1 y SR-BI, siendo la más eficiente aquella mediada por los transportadores de colesterol ABCA1 y ABCG1. Estos transportadores facilitan el transporte de colesterol a apoA-I libre de lípidos y lipoproteínas pre β -HDL, y a partículas α -HDL maduras, respectivamente (Mineo and Shaul 2012).

El eflujo de colesterol mediado por apoA-I se encuentra disminuido o aumentado en modelos experimentales deficientes o hiperexpresores de ABCA1, respectivamente (revisado en (Oram 2002)). Sin embargo, la contribución de la expresión de ABCA1 en macrófagos en cambios en los niveles plasmáticos de colesterol de HDL es relativamente baja, siendo al parecer el principal contribuidor el ABCA1 expresado en hepatocitos (Haghsassand, Bourassa et al. 2001). Aun así, la expresión de ABCA1 en macrófagos presenta un papel más importante en la aterogénesis, independiente del

colesterol de HDL, al permitir que los macrófagos eliminen el exceso de colesterol evitando de este modo su transformación en células espumosas. En este sentido, se ha descrito un aumento en el reclutamiento de macrófagos deficientes de *Abca1* en la pared arterial de ratones deficientes del *Ldlr* (van Eck, Bos et al. 2002). La vía de eflujo de colesterol dependiente de ABCA1 está regulada a nivel de proteína, que a su vez se encuentra regulada por mecanismos transcripcionales y postrcripcionales. La expresión del gen *Abca1* se encuentra principalmente inducida por la estimulación del eje *liver X receptor (LXR)/retinoid X receptor (RXR)*, cuya actividad se modula por la acumulación de colesterol en las células (Larrede, Quinn et al. 2009).

Además de ABCA1, otro transportador ABC, ie, ABCG1, también está involucrado en el eflujo de colesterol preferencialmente desde macrófagos a lipoproteínas preformadas en el compartimiento plasmático (ie, HDL2 y HDL3 maduras), pero no apolipoproteínas pobres en lípidos (revisado en (Kontush and Chapman 2006)). ABCG1 muestra muchas similitudes con ABCA1, tales como su localización intracelular, su traslocación desde compartimentos intracelulares a la membrana plasmática y su expresión estimulada vía LXR, que es a su vez promovida por los niveles intracelulares de colesterol. Una de las principales características del eflujo promovido por ABCG1 es su especificidad por las HDL maduras y las LDL lo que contribuye a la eliminación de colesterol y de oxisteroles tóxicos desde los macrófagos (Vaughan and Oram 2005).

SR-BI es una proteína integral de membrana que pertenece a la familia de CD36 y cuya función fisiológica se ha atribuido a la captación selectiva de ésteres de colesterol desde HDL sin que este proceso implique la captación endocítica y degradación de estas lipoproteínas, proceso en el que se requiere la participación de apoA-I. En modelos in vivo se ha observado que su sobreexpresión en hígado se asocia con [i] una disminución en el colesterol de HDL, [ii] aceleración del aclaramiento de los ésteres de colesterol plasmáticos y [iii] un aumento en los niveles de colesterol en la bilis, sugiriendo un TRC-m acelerado, alcanzándose el efecto contrario en ratones deficientes de SR-BI (Rigotti, Miettinen et al. 2003). SR-BI es otro determinante molecular al que también se le ha atribuido un papel en mediar la transferencia bidireccional de lípidos, incluyendo colesterol libre, entre lipoproteínas HDL maduras y las membranas plasmáticas de manera pasiva y a favor de gradiente. Este receptor se encuentra localizado en las caveolas en los *lipid rafts* e invaginaciones de microdominios de la membrana plasmática donde se acumula el colesterol libre (Rosenson, Brewer et al. 2012).

La contribución relativa a la exportación de colesterol de una única vía muestra una naturaleza específica de especie: mientras que el eflujo mediado por ABCA1 es el mecanismo predominante tanto en células espumosas de origen humano como de ratones, el papel de ABCG1 parece tener mayor relevancia en ratones que en humanos. En contraposición, SR-BI tendría un papel dual en humanos pero no en

ratones (Adorni, Zimetti et al. 2007, Sun, Zhang et al. 2012).

Por último, tanto las HDL discoidales como esféricas son capaces de aceptar colesterol no esterificado de las células mediante un proceso de difusión pasiva que aparentemente sería independiente de los procesos dirigidos por ABCA1, ABCG1 y SR-BI (Yancey, Bortnick et al. 2003). En este proceso de difusión el colesterol no esterificado en las membranas celulares es espontáneamente liberado al fluido extracelular, donde es incorporado en cualquier HDL preformada. Aunque este se trate de un proceso bidireccional en el que el colesterol no esterificado es intercambiado entre las HDL y las membranas celulares, se produce una transferencia neta de colesterol en las HDL que podría resultar ser a favor del gradiente de concentración de colesterol en la superficie de las HDL generado por su esterificación mediada por LCAT a través del cual el colesterol fluiría al interior de la partícula. En general, se sugiere que las lipoproteínas pobres en lípidos, pequeñas y densas son mejores aceptores de colesterol que las ricas en lípidos, grandes y ligeras (Asztalos, Zhang et al. 1997). Las apolipoproteínas de HDL pobres lípidos y/o deslipidizadas inducen la captación de colesterol vía ABCA1; consistentemente, los niveles plasmáticos de pre β 1-HDL se encuentran correlacionados con la capacidad del plasma en inducir el eflujo de colesterol mediado por ABCA1 desde macrófagos de la línea celular J774 (Asztalos, de la Llera-Moya et al. 2005), mientras que las lipoproteínas HDL ricas en lípidos más grandes representan mejor ligando para la captación celular de ésteres de

colesterol mediada por SR-BI que las HDL pobres en lípidos más pequeñas (de Beer, Durbin et al. 2001, Thuahnai, Lund-Katz et al. 2004).

1.1.6.1.2 Transporte reverso de colesterol

En el eflujo de colesterol las HDL inician la vía conocida como TRC-m (Rothblat and Phillips 2010, Annema and Tietge 2012). Esta vía es quizás el principal mecanismo por el cual las HDL protegen contra el desarrollo de arteriosclerosis. En parte esto último quizás sea debido a que en el proceso arteriosclerótico el número de macrófagos cargados de lípidos alcanza cuotas elevadas, el TRC-m es un proceso crítico en la prevención o inducción de arteriosclerosis (Rosenson, Brewer et al. 2012).

En este proceso ABCA1, ABCG1, y SR-BI modulan coordinadamente el eflujo de colesterol desde macrófagos, utilizando las HDL como aceptores e inician el TRC-m (Wang, Collins et al. 2007). En la circulación, las HDL pueden ser remodeladas mediante diferentes vías como la mediada por LCAT (Annema and Tietge 2012) y las actividades transferidoras de lípidos, tales como la PTEC y la PLTP, y lipasas, tales como la LH y LE (Annema and Tietge 2012). Consecuentemente, tanto la acción de la PTEC como de la LH, por sí solas o combinadamente, promueven la reducción de los niveles plasmáticos de colesterol de HDL.

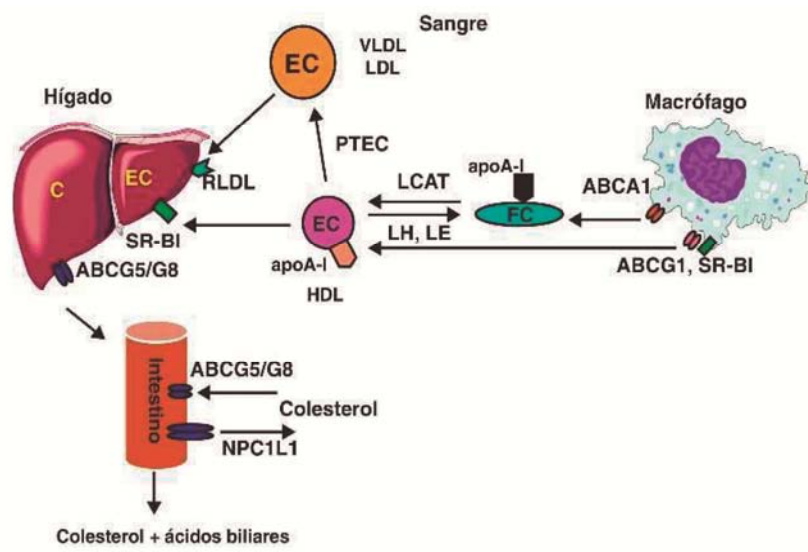


Figura 3 Transporte reverso de colesterol mediado por HDL. Abreviaciones: EC, éster de colesterol; C., colesterol libre (Errico, Chen et al. 2013).

Como ya se ha indicado previamente, la captación de HDL en los hepatocitos puede ser a través de dos vías distintas, la vía captación selectiva mediante SR-BI (Annema and Tietge 2012) o vía captación de holopartículas (Vantourout, Radojkovic et al. 2010). En hepatocitos el colesterol puede ser secretado directamente en la bilis, cuyo proceso que es principalmente mediado por los transportadores ABCG5 y ABCG8 y en menor medida por SR-BI, o a través de su conversión en ácidos biliares, para el cual ABCB11 (ie, BSEP) es el transportador clave de estas moléculas a la bilis (Dijkers and Tietge 2010). El colesterol excretado puede ser reabsorbido en el intestino mediante el *Niemann-Pick type C like 1* (NPC1L1) pero también (re)secretado a través de la participación del heterodímero ABCG5 y ABCG8, situación en la cual una actividad disminuida de NPC1L1 aumentaría la excreción de colesterol a heces, mientras que una actividad disminuida de ABCG5 y ABCG8 disminuiría la salida de colesterol a heces (Annema and Tietge 2012). A su vez los ácidos biliares pueden ser reabsorbidos en la parte terminal del íleo mediante la *apical sodium-dependent bile acid transporter* (ASBT; SLC10A2) (Dawson 2011). Además de su papel en la absorción de esteroides, el intestino también media la secreción directa de colesterol, un proceso que se ha denominado excreción transintestinal de colesterol (TICE) (Tietge and Groen 2013).

1.16.1.3 Aproximaciones metodológicas para cuantificar el TRC-m in vivo

Dado que las moléculas de colesterol que derivan de los macrófagos no se diferencian de las que derivan de otros tipos celulares junto con que la contribución del TRC-m es muy pequeña (Lee-Rueckert, Blanco-Vaca et al. 2013), el único ensayo disponible para medir in vivo la transferencia de colesterol derivado de macrófagos a heces requiere del marcaje de los macrófagos con colesterol radiactivo y su subsiguiente inyección en el animal (Zhang, Zanotti et al. 2003). Mediante este ensayo in vivo se traza el tráfico de [³H]-colesterol en su tránsito desde los macrófagos a las HDL, hígado y en última instancia a heces. Por razones éticas y de práctica médica este ensayo no se puede desarrollar en seres humanos y se encuentra limitado a su uso en modelos animales, siendo los ratones el modelo animal principalmente utilizado. Dada la dinámica de intercambio de moléculas de colesterol entre los diferentes compartimentos plasmáticos, el contenido de trazador en sangre e hígado puede que no refleje el flujo de colesterol a lo largo de todo el proceso de TRC-m. Aunque el destino de esta fracción minoritaria de colesterol una vez secretada pueda resultar ser irrelevante, el objetivo final del ensayo TRC-m es lograr cuantificar la excreción fecal irreversible de la radiactividad derivada de macrófagos fuera del organismo.

El ratón es la especie predominantemente empleada para generar modelos experimentales para el estudio de arteriosclerosis a través de su manipulación genética, farmacológica o dietética y es el modelo animal más comúnmente empleado

para evaluar el TRC-m (Daugherty 2002, Annema and Tietge 2012). Dadas las diferencias específicas de especie en el metabolismo de las HDL, la comprensión del papel de las HDL en el TRC-m en seres humanos basándonos en datos experimentales generados en ratones ofrece limitaciones y requiere sin embargo de una continua actualización.

1.1.6.1.4 Factores moduladores del TRC-m in vivo

Diferentes estudios muestran que la expresión de ABCA1 y ABCG1 en macrófagos está asociada con un aumento en el TRC-m (Wang, Franklin et al. 2007, Wang, Collins et al. 2007, Out, Jessup et al. 2008). Sin embargo, la deficiencia de SR-BI en este tipo celular no ejerce ningún efecto sobre dicho proceso (Wang, Collins et al. 2007, Zhao, Pennings et al. 2011). Por otro lado, la expresión de apoE en macrófagos se ha podido demostrar que activa el TRC-m (Zanotti, Pedrelli et al. 2011).

En cuanto a las proteínas plasmáticas que tienen un papel en el metabolismo de HDL, no se han encontrado datos consistentes en relación a un efecto de la LCAT sobre el TRC-m. De este modo, su sobreexpresión o inactivación solo contribuye mínimamente al TRC-m aunque esta tenga un papel principal en la regulación de los niveles plasmáticos de HDL (Tanigawa, Billheimer et al. 2009). En el caso de las proteínas transferidoras de lípidos, la sobreexpresión de PLTP se encuentra asociada con un aumento en el TRC-m (Samyn, Moerland et al. 2009), mientras que la

sobreexpresión de PTEC en modelos animales muestra datos conflictivos, en tanto que en algunos estudios se ha demostrado que el aumento en este enzima induce (Tanigawa, Billheimer et al. 2007, Tchoua, D'Souza et al. 2008) o no altera el TRC-m (Rotllan, Calpe-Berdiel et al. 2008). En el caso de las LH y LE también se han publicado datos conflictivos. De hecho su deficiencia combinada o por separado de ambas se ha descrito que no influye en el TRC-m en ratones (Brown, Zhang et al. 2010) o aumenta tanto en ratones deficientes de LH o LE (Escola-Gil, Chen et al. 2013). En contraste con el efecto de la expresión de apoE en macrófagos sobre el TRC-m, la sobreexpresión sistémica de esta apolipoproteína no parece tener ningún efecto sobre el TRC-m (Annema and Tietge 2012).

En el contexto del componente hepático del TRC-m, la expresión de SR-BI en hepatocitos se ha demostrado que tiene un claro efecto inductor sobre el TRC-m tanto en ratones que sobreexpresan como deficientes de SR-BI (Zhang, Da Silva et al. 2005, El Bouhassani, Gilibert et al. 2011, Zhao, Pennings et al. 2011). La expresión de *Scarb1* en el hígado es independiente de la expresión de *Abcg5* y *Abcg8*, ya que en ratones deficientes para ambos transportadores muestran una disminución significativa en el TRC-m en comparación con los niveles mostrados por los ratones deficientes solamente de *Abcg5* (Dijkers, Freak de Boer et al. 2013). Existe cierta controversia en relación al papel de *Abcg5* y *Abcg8* en el TRC-m. Su sobreexpresión induce (Wu, Basso et al. 2004) mientras que su deficiencia disminuye el transporte

hepatobiliar de esteroides, estando ello asociado a una disminución de tasa de excreción fecal de esteroides en un estudio (Su, Sabeva et al. 2012) lo que sugeriría un TRC-m disminuido en ratones deficientes para ambos transportadores. Sin embargo, otros estudios muestran ausencia de cambios en la tasa de excreción fecal de esteroides en este mismo modelo (Yu, York et al. 2003), siendo esto último posiblemente atribuido a un efecto sumado de diferencias en el fondo genético de los ratones deficientes para *Abcg5* y *Abcg8* utilizado en ambos estudios (ie, C57BL/6J en (Su, Sabeva et al. 2012) y 129S6/C57BL/6J en (Yu, York et al. 2003)). Consistentemente, los ratones deficientes de *Abcg5* y *Abcg8* (en fondo genético 129S6/C57BL/6J) no muestran cambios en el TRC-m en comparación con los ratones controles (Calpe-Berdiel, Rotllan et al. 2008). Por otro lado, estudios independientes demuestran que la secreción biliar de esteroides no se requiere para el TRC-m (Temel, Sawyer et al. 2010), mientras que en otro estudio se describe justo lo contrario (Nijstad, Gautier et al. 2011). Esta última evidencia sugiere que la excreción fecal de esteroides neutros no es una medida precisa del TRC-m lo que en parte podría deberse a que en su determinación no se distingue entre las aportaciones debidas al hígado y al intestino. Además, también se han evaluado las consecuencias producidas sobre el TRC-m por la inactivación del receptor responsable de la captación de holopartículas de HDL hepático. Así, en ratones deficientes de *P2y13*, el TRC-m se encuentra reducido (Fabre, Malaval et al. 2010, Lichtenstein, Serhan et al. 2013). Ambos estudios de

forma combinada indicarían que la captación selectiva de holopartículas es crítica en el TRC-m.

Por último la contribución del TICE sobre el TRC-m y el posible papel del intestino están pendientes de ser evaluada, en parte debido a que aun se desconoce el mecanismo preciso del TICE.

I.1.6.2 Propiedades antioxidantes de las HDL

Aparte de su bien caracterizada función en el transporte de colesterol, las HDL poseen varias otras propiedades (ver apartado I.1.1.5). Datos previos establecen que las HDL inhiben de forma efectiva la oxidación de las LDL. Dado que la modificación oxidativa de las LDL es proaterogénica, la capacidad de las HDL para inhibir el proceso es potencialmente antiaterogénico, previniendo la acumulación de colesterol en macrófagos y la formación de células espumosas, un fenómeno que parece esencial en el proceso aterogénico (Saemann, Poglitsch et al. 2010).

La actividad antioxidante de las HDL es típicamente determinada a través de su capacidad de inhibir la modificación oxidativa de las LDL. Dado el papel central de las LDL en el desarrollo de arteriosclerosis, se sugiere que estas lipoproteínas representarían la principal diana en la acción antioxidante de las HDL in vivo (Navab, Hama et al. 2000). En este contexto, las HDL presentarían una acción inhibitoria sobre la oxidación de LDL y la generación de especies de oxígeno reactivas tanto

in vitro como in vivo (Kontush and Chapman 2006). El mecanismo más aceptado de acción las HDL sobre las LDL sería a través de inhibir la acumulación de hidroperóxidos derivados de la vía de las lipooxigenasas los cuales son considerados como potenciales detonantes de la oxidación (Navab, Ananthramaiah et al. 2004). Además, las HDL previenen la apoptosis de macrófagos causada por uno de los principales constituyentes de las LDL oxidadas tales como el 7-cetocolesterol vía transporte de oxisteroles facilitado por ABCG1 (Terasaka, Wang et al. 2007). Cabe destacar que esta propiedad única de las HDL se pierde durante la respuesta de fase aguda, y que las HDL pueden incluso promover la inducción de *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) estimulada por LDL bajo estas circunstancias (Van Lenten, Hama et al. 1995). Además, los fosfolípidos oxidados de las LDL promueven la liberación de MCP-1 desde las células endoteliales permitiendo el reclutamiento de macrófagos/monocitos y a su vez la generación de células espumosas (Reddy, Hama et al. 2001). Ello alcanzó ser explicado tras encontrarse los niveles de actividad de dos enzimas clave de HDL, PON1 y Lp-PLA2, significativamente disminuidos en un contexto de respuesta de fase aguda (Wu, Hinds et al. 2004). La actividad PON1 previene la adhesión de monocitos a células endoteliales mientras que la Lp-PLA2 inactiva PAF y previene la oxidación de las LDL mediante la hidrólisis de fosfolípidos oxidados. De esta manera las HDL contribuyen a mitigar este círculo vicioso perjudicando la adhesión a células

endoteliales inducida por citoquinas y también previniendo la generación de células espumosas a través del estímulo del eflujo de colesterol desde macrófagos. Apoyando dicho papel por parte de las HDL durante las situaciones de inflamación aguda, ie, shock séptico, es que sus niveles plasmáticos disminuyen significativamente debido a una serie de mecanismos moleculares y dichos niveles de HDL no se recuperan hasta que no se resuelve la inflamación sistémica.

Las HDL previenen de la generación de lípidos oxidados derivados de LDL (Navab, Berliner et al. 2001), que a su vez son mediadores de la inflamación. Se han sugerido diferentes mecanismos por los que las HDL actúan. Por un lado, facilitan la extracción e inhibición de la actividad de los lípidos oxidados de las LDL; evitan que las células de la pared arterial transfieran más especies reactivas a las LDL retenidas; inactivan los fosfolípidos oxidados proinflamatorios que se hayan formado en estas LDL oxidadas, bloqueando la oxidación de las LDL a diferentes niveles (Van Lenten, Navab et al. 2001). Además, en estudios *in vitro* las HDL inhiben la trans migración de monocitos inducida por las LDL oxidadas (Navab, Imes et al. 1991), la citotoxicidad inducida por las LDL oxidadas (Suc, Escargueil-Blanc et al. 1997), y la adhesión inducida por las LDL oxidadas de monocitos a células endoteliales (Maier, Barenghi et al. 1994).

La actividad antioxidante de las HDL se ha atribuido a varias apolipoproteínas y enzimas asociadas a estas lipoproteínas que albergan propiedades antioxidantes. Entre

las apolipoproteínas con capacidad antioxidante se cuentan la apoA-I, apoE, apoA-IV y apoJ, aunque se considera que la apoA-I es el principal componente al que se le atribuye la mayor parte de la actividad antioxidante mostrada por las HDL (Garner, Waldeck et al. 1998). Las LDL contienen pequeñas cantidades de hidroperóxidos derivados de la vía de las lipoxigenasas que pueden ser potencialmente iniciadores de la oxidación. Se ha descrito que la apoA-I promueve la recolección de estos hidroperóxidos in vitro y también in vivo después de la infusión de apoA-I a ratones y en humanos (Navab, Hama et al. 2000). Basándose en estos datos y utilizando un modelo in vitro de pared arterial se demostró que el proceso de transferencia hidroperóxidos que provienen de las células de la pared a LDL parece estar mediado por ABCA1, ya que al bloquear la acción de esta proteína en células de la pared arterial, éstas no fueron capaces de inducir la oxidación de LDL (Reddy, Hama et al. 2002). Por otro lado, cuando hay un exceso de acumulación de lípidos oxidados en las LDL pueden producirse fosfolípidos oxidados derivados de la fosfatidilcolina con propiedades proinflamatorias (Navab, Hama et al. 2000). Se considera que la acumulación masiva de estos fosfolípidos oxidados en la pared arterial daría inicio a toda la cascada de eventos inflamatorios que conducirían a la formación de la estría grasa y a la lesión arteriosclerótica. Las LDL oxidadas presentan menor afinidad por el LDLR por lo que solo pueden ser aclaradas por los receptores *scavenger* de los macrófagos.

Además del papel de las apolipoproteínas también se ha atribuido una parte importante de la capacidad antioxidante de las HDL atribuida a enzimas asociados. Estos confieren a las HDL la capacidad de convertir productos de los ácidos grasos oxidados con propiedades inflamatorias en otras especies moleculares sin esta actividad biológica. Los enzimas a los que se les ha atribuido esta propiedad son la PON1 y la Lp-PLA2 (Watson, Berliner et al. 1995, Watson, Navab et al. 1995), aunque también se ha sugerido un papel para la LCAT (Vohl, Neville et al. 1999) y la glutatión selenoperoxidasa plasmática (Chen, Liu et al. 2000).

El número de evidencias que indican que la capacidad antioxidante de las HDL es defectiva en pacientes o modelos experimentales con dislipemias aterogénicas, siendo las anomalías en el proteoma y lipidoma de estas lipoproteínas en pacientes dislipémicos los que subyacen a tales deficiencias funcionales (Kontush and Chapman 2010).

I.1.6.3 Propiedades antiinflamatorias de las HDL

El concepto del potencial antiinflamatorio de las HDL se acuñó hace años cuando en un estudio se demostró que las HDL de origen humano o de conejo inhiben la capacidad de las LDL en inducir la actividad quimiotáctica de monocitos en células de la pared arterial (Van Lenten, Hama et al. 1995). En contraste, después de inducir la respuesta de fase aguda en ambos modelos, se observó que sus HDL promovieron la

capacidad de las LDL en inducir la actividad quimiotáctica de monocitos en el mismo modelo experimental, siendo esta actividad debida a la producción de la MCP-1 (Van Lenten, Hama et al. 1995). El análisis de las HDL proinflamatorias mostró alteraciones importantes en su composición proteica en comparación con las antiinflamatorias, encontrándose unos niveles aumentados de ceruloplasmina y SAA y disminuidos de apoA-I, PON1 y Lp-PLA2 (Van Lenten, Hama et al. 1995). Este trabajo desarrolló el concepto de “índice inflamatorio” para las HDL, el cual se basaba en la evaluación de la capacidad relativa de las HDL en inhibir la quimiotaxis de monocitos inducida por las LDL oxidadas in vitro (Van Lenten, Hama et al. 1995, Navab, Hama et al. 2000, Ansell, Navab et al. 2003). Este ensayo se ha utilizado para distinguir pacientes con enfermedad cardiovascular de sujetos no enfermos de enfermedad vascular, mostrando una exactitud mayor que la propia medida de los niveles plasmáticos de colesterol de HDL (Ansell, Navab et al. 2003).

Estos datos fueron consistentes con una serie de evidencias acumuladas a partir de diferentes estudios realizados con modelos experimentales (Vaisman, Klein et al. 1995, Berard, Foger et al. 1997, Dugi, Vaisman et al. 1997, Foger, Chase et al. 1999), según los cuales se pudo definir las HDL disfuncionales como aquellas capaces de promover un aumento en el riesgo de desarrollar arteriosclerosis, superando, de este modo, el concepto generado a partir de la relación inversa descrita entre los niveles plasmáticos de colesterol de HDL y el riesgo aterogénico.

Las moléculas bioactivas de las LDL mínimamente oxidadas son mayoritariamente fosfolípidos oxidados que contienen un ácido araquidónico en la posición sn-2 (Watson, Leitinger et al. 1997, Watson, Subbanagounder et al. 1999, Subbanagounder, Leitinger et al. 2000), formados por la acción de especies reactivas de oxígeno derivadas en parte de productos de la vía de las lipooxigenasas (Navab, Ananthramaiah et al. 2004). Estas especies reactivas de oxígeno pueden ser neutralizadas por la apoA-I (Navab, Hama et al. 2000) de HDL de sujetos normolipémicos sanos, o eliminados por la acción de enzimas asociados a estas HDL (ie, PON1 y Lp-PLA2) (Navab, Hama et al. 2000). La acción antiinflamatoria de las HDL implican la hidrólisis de lípidos oxidados, siendo esta propiedad similar a la actividad antioxidante de las HDL (Kontush and Chapman 2006). Estos enzimas pueden incluso destruir los fosfolípidos oxidados una vez se habían formado en estas HDL (Navab, Hama et al. 2000).

Existe una posible conexión entre el TRC-m y el contenido en fosfolípidos oxidados que se encuentran en las LDL mínimamente oxidadas y que se encuentra regulado en parte por los enzimas asociadas a las HDL (Reddy, Hama et al. 2002). En estos estudios se encontró que la formación de LDL mínimamente oxidadas por parte de cultivos de células de la pared arterial requería de la acción de ABCA1. También se demostró que el 22-hidroxicolesterol induce la producción de especies reactivas de oxígeno en células de la pared arterial humana, contribuyendo de este modo a

aumentar la formación de estas LDL modificadas. En este último estudio se hipotetizó que la carga de colesterol de las células endoteliales podría promover la formación de oxisteroles oxidados lo que a su vez aumentaría la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno e induciría la expresión de ABCA1, resultando en un aumento de la exportación de estos fosfolípidos oxidados a las lipoproteínas (Reddy, Hama et al. 2002). Resultados similares han sido obtenidos pero cargando las células con colesterol en lugar de oxisteroles (Reddy, Anantharamaiah et al. 2006).

Diferentes estudios sugieren que el estrés oxidativo severo en ratones alteran la apoA-I (Hedrick, Hassan et al. 2000). La apoA-I humana puede ser alterada mediante nitración y clorinación de sus aminoácidos (Fogelman 2004, Navab, Anantharamaiah et al. 2005, Nicholls, Zheng et al. 2005, Shao, Oda et al. 2006). En este sentido el contenido en Met(O) se encuentra elevado en la apoA-I de pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (Kontush and Chapman 2010), situación con un componente elevado de estrés oxidativo. Las consecuencias de tales alteraciones incluyen una pérdida de su capacidad de promover el eflujo de colesterol mediado por ABCA1, estando ello inversamente correlacionado con las propiedades inflamatorias de las HDL (ie, las HDL proinflamatorias presentaron una capacidad disminuida en promover el eflujo de colesterol en comparación con las HDL antiinflamatorias) (Navab, Ananthramaiah et al. 2005). Existen diferentes situaciones fisiopatológicas que pueden llevar a un estrés oxidativo aumentado y a la formación de fosfolípidos oxidados pueden provenir de

diferentes vías (Fogelman 2005). La complejidad de la respuesta de fase aguda en relación a los componentes de las HDL (SAA, apoA-I, y PON1) explicaría los cambios que ocurren en estas condiciones (Han, Chiba et al. 2006, Van Lenten, Reddy et al. 2006).

Las propiedades antiinflamatorias de las HDL están muy relacionadas con su potencial antiaterogénico (Han, Chiba et al. 2006, Van Lenten, Reddy et al. 2006), siendo la respuesta en fase aguda uno de los principales reguladores negativos de estas propiedades antiinflamatorias atribuidas a las HDL (Barter, Nicholls et al. 2004).

A nivel celular, las HDL afectan diferentes procesos inflamatorios, tales como la inhibición de la producción de citoquinas, la inducción de moléculas de adhesión, (ie, integrinas), mientras que a un nivel más molecular, interfiere con los factores de transcripción proinflamatorios clásicos, tales como el *nuclear factor kappa B* (NFκB), el cual es responsable de la producción de varias citoquinas proinflamatorias y quimioquinas. De acuerdo con estas propiedades, se ha sugerido que la actividad antiinflamatoria de las HDL pueda determinarse por la capacidad de las HDL en disminuir la producción de citoquinas.

La actividad antiinflamatoria de la HDL puede ser determinada ex vivo a través de su efecto sobre la [i] supresión de la expresión de moléculas de adhesión mediada por citoquinas; [ii] disminución de la infiltración de neutrófilos dentro de la pared arterial; y [iii] reducción en la generación de especies reactivas de oxígeno en un modelo

experimental de inflamación arterial (Barter, Kastelein et al. 2003, Nicholls, Dusting et al. 2005). De hecho, en ensayos utilizando células endoteliales in vitro, las HDL inhiben eficientemente la expresión de diferentes moléculas de adhesión cuya expresión se induce mediante la adición de diferentes estímulos, tales como TNFA, interleuquina-1 o endotoxina (Kontush and Chapman 2010). Se ha atribuido un papel principal en esta acción a las apolipoproteínas de HDL, en particular a la apoA-I, pero también a fosfolípidos, tales como la S1P (Nofer and Assmann 2005). Entre las diferentes estrategias para determinar la actividad antiinflamatoria se cuentan [i] la hidrólisis de lípidos oxidados proinflamatorios por parte de los enzimas antioxidantes asociados a HDL, cuya acción sería mecánicamente atribuida a la actividad antioxidante de las HDL (Barter, Kastelein et al. 2003, Kontush, Chantepie et al. 2003, Navab, Ananthramaiah et al. 2004); [ii] inhibición de la expresión de moléculas de adhesión inducida por citoquinas por parte de células endoteliales asociada con la inducción de *tumor growth factor* (TGF)- β (Norata, Callegari et al. 2005) disminución de la producción de IL-6 (Gomaraschi, Basilico et al. 2005); [iii] inhibición de la síntesis de PAF y disminución de la expresión de MCP-1 (Navab, Ananthramaiah et al. 2004); y [iv] supresión de la expresión de citoquinas (ie, TNFA) estimulada por LPS por parte de apoA-I en macrófagos (Yin, Deng et al. 2011). Aunque los mecanismos moleculares por los que actúa la HDL se desconocen, se ha propuesto que las HDL inhibirían la activación de NF κ B mediante la interrupción de una de las

vías activadas por el enzima esfingosina quinasa (Saemann, Poglitsch et al. 2010).

1.1.7 Impacto de la obesidad y sus complicaciones sobre el perfil lipídico y lipoproteico plasmático en pacientes y modelos animales

La obesidad como una enfermedad que se manifiesta con un aumento en la grasa corporal como consecuencia de un desequilibrio calórico atribuido a un número causas genéticas/epigenéticas y/o ambientales/nutricionales desfavorables (Hinney, Vogel et al. 2010, Bays, Jones et al. 2014).

La obesidad abdominal o visceral, forma parte de un fenotipo complejo que incluye, además de la acumulación excesiva de tejido adiposo intra-abdominal, una expansión desmedida de tejido adiposo subcutáneo disfuncional y una acumulación ectópica de lípidos en otros compartimentos, tales como el hígado (Despres 2011, Eckel, Kahn et al. 2011). Este fenotipo puede resultar ser patogénico y a su vez relacionado con un conjunto de factores de riesgo cardiometabólicos, tales como la resistencia a la insulina, dislipemia aterogénica (ie, niveles plasmáticos de triglicéridos elevados (>150 mg/dL), y de colesterol de HDL disminuidos (hombres: <40 mg/dL; mujeres: <50 mg/dL)) e hipertensión entre otros (Grundy, Cleeman et al. 2005, Tchernof and Despres 2013). Colectivamente estos componentes se encuentran relacionados con un riesgo cardiovascular aumentado y su manifestación combinada se ha definido como síndrome metabólico (Reaven 1988, Grundy, Cleeman et al. 2005), presentando los

individuos afectados dos veces más riesgo de sufrir un accidente cardiovascular o íctus, y cinco veces más riesgo en desarrollar DM2 (**Figura 4**).

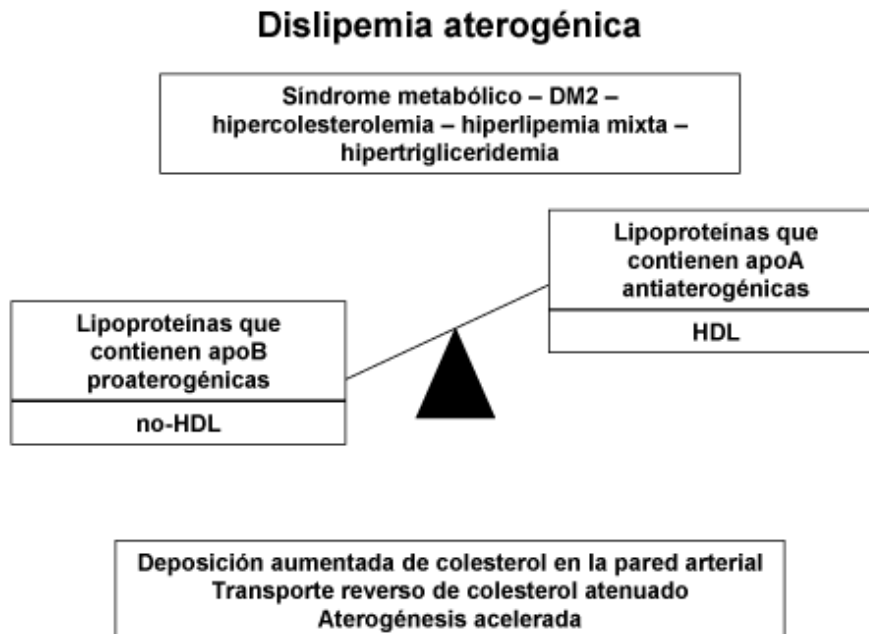


Figura 4 Dislipemia aterogénica. La dislipemia aterogénica se representa como un desequilibrio entre los niveles circulantes de lipoproteínas proaterogénicas no-HDL y las antiaterogénicas HDL.

Un análisis bioquímico más detallado ha permitido revelar además otras alteraciones lipoproteicas que son también consideradas factores de riesgo aterogénico independientes tales como unos niveles plasmáticos aumentados de apoB, lipoproteínas LDL pequeñas y HDL también pequeñas, respectivamente (Grundy, Cleeman et al. 2005). Los niveles plasmáticos de las LRT también se encuentran elevados y también son consideradas como aterogénicas (Bays, Jones et al. 2014). En este contexto, la medida de los niveles de colesterol de LDL sola puede no ser

adecuada para evaluar su riesgo aterogénico, siendo el motivo principalmente atribuido a que en su determinación no se contemplan las cifras de colesterol transportadas por las LRT. Es por ello que en práctica clínica suele considerarse la determinación de los niveles plasmáticos de colesterol de la fracción de lipoproteínas plasmáticas no-HDL al incorporar el colesterol transportado por todas las lipoproteínas aterogénicas, incluyendo las LRT (Bays, Jones et al. 2014, Nordestgaard, Langsted et al. 2016).

La dislipemia aterogénica suele estar frecuentemente asociada a cambios pronunciados no solo en los niveles plasmáticos y tamaño de partícula de las lipoproteínas HDL sino también alteraciones significativas en sus principales funciones ateroprotectoras (Grundy, Cleeman et al. 2005, Navab, Ananthramaiah et al. 2005, Kontush and Chapman 2006, Kontush and Chapman 2010).

El grado de pérdida de función comparado con la ausencia de función depende no sólo del contexto metabólico in vivo, sino también de las condiciones experimentales utilizadas en los ensayos para caracterizar su funcionalidad in vitro (p. ej., tipo de ensayo, temperatura, concentraciones de por-oxidantes, tiempo de incubación, relación entre las concentraciones de HDL y LDL). Las HDL pueden ser disfuncionales (ie, con total pérdida de función) en ensayos *cell-free* o *cell-based* diseñados para medir la actividad antiinflamatoria (Van Lenten, Navab et al. 2001, Ansell, Navab et al. 2003), y en aquellos otros ensayos diseñados para determinar la

actividad antioxidante (Hansel, Giral et al. 2004, Nobecourt, Jacqueminet et al. 2005) o capacidad de eflujo de colesterol (Cavallero, Brites et al. 1995, Brites, Bonavita et al. 2000).

Está establecido que los cambios cualitativos en las HDL en estas entidades fisopatológicas comprometerían la capacidad de estas HDL para inducir el eflujo de colesterol (Kontush and Chapman 2008). Se sugieren que la glicación de las HDL podría ser uno de los mecanismos por los que su función se encontraría comprometida en el TRC-m (Duell, Oram et al. 1990, Fievet, Theret et al. 1992). Por otro lado, cambios en las actividades plasmáticas (ie, proteínas transferidoras de lípidos y otros enzimas) implicadas en el metabolismo de HDL también pueden influir en el TRC-m (Tan 2009).

La actividad antioxidante de las HDL es deficiente en diferentes situaciones metabólicas como síndrome metabólico (Hansel, Giral et al. 2004), la DM2 (Nobecourt, Jacqueminet et al. 2005). Se ha sugerido que el contenido elevado en triglicéridos en estas lipoproteínas, debido a un aumento en la actividad PTEC (Hansel, Giral et al. 2004, Kontush, de Faria et al. 2005, Nobecourt, Jacqueminet et al. 2005), disminuirían la estabilidad estructural de la apoA-I y comprometerían su acción como aceptores de lípidos (Sparks, Davidson et al. 1995, Curtiss, Bonnet et al. 2000). La sustitución de apoA-I por SAA además de otras proteínas con actividad antioxidante asociadas a HDL podrían representar mecanismos adicionales que

comprometerían su capacidad de inactivar los fosfolípidos oxidados que se acumulan en las LDL (Navab, Ananthramaiah et al. 2004).

La actividad antiinflamatoria de las HDL podría también ser deficiente en estas entidades metabólicas y potencialmente pasar a ser proinflamatorias bajo condiciones proaterogénicas (Kontush and Chapman 2006). De igual manera que en el caso anterior es posible que la sustitución parcial de apoA-I por SAA represente uno de los mecanismos que comprometan la acción antiinflamatoria de las HDL.

El efecto favorable de niveles elevados de apoA-I sobre el desarrollo de arteriosclerosis en humanos fue originalmente demostrada mediante la administración de apoA-I_{MILANO} recombinante en pacientes con síndrome coronario agudo, la cual se asocia a una regresión de la arteriosclerosis coronaria monitorizada mediante ultrasonido intravascular (Nissen, Tardif et al. 2007). En un estudio más reciente, ERASE (ie, *Effect of Reconstituted HDL on Atherosclerosis Safety and Efficacy*), confirmó este efecto favorable aunque asociado a una hepatotoxicidad significativa en el grupo que recibió las dosis más elevadas de complejos HDL (Tardif, Gregoire et al. 2007). Siendo la apoA-I una proteína relativamente grande, su producción es muy costosa. Es por ello que se están actualmente desarrollando y evaluando la función de péptidos miméticos o estrategias de terapia génica como estrategias terapéuticas alternativas.

Existen diferentes modelos animales de obesidad frecuentemente utilizados para

estudiar las bases metabólicas de la obesidad (Lutz and Woods 2012). Los modelos disponibles para este propósito pueden ser divididos en diferentes categorías, según si estos son genéticos, ie, basados en mutaciones o modificaciones en uno o diferentes genes, o no genéticos expuestos a ambientes obesigénicos en los que la obesidad se induce alimentándolos con una dieta rica en grasas. Los modelos de ratones claramente difieren en muchos aspectos de la manifestación clínica en pacientes. Por ejemplo, parámetros tales como perímetro de cintura no pueden ser medidos en ratones. Por otro lado, los perfiles de lípidos plasmáticos en los ratones revelan la presencia principalmente de HDL (ateroprotectora) circulantes, mientras que las LDL son las lipoproteínas principales en plasma humano. Sin embargo, análogamente a los humanos, en ratones también se pueden estudiar los efectos metabólicos de elevaciones en la grasa abdominal y la insulinoresistencia sobre las propiedades cuantitativas y cualitativas de las lipoproteínas en modelos genéticos de síndrome metabólico y DM2 (Kennedy, Ellacott et al. 2010). En particular, el ratón db/db, que surge de una mutación espontánea en el gen *Lepr*, (ratones db/db) (Kennedy, Ellacott et al. 2010), ha sido el modelo utilizado para abordar los objetivos planteados en este trabajo. Aunque su fenotipo primario es la obesidad, estos ratones también desarrollan insulinoresistencia y cierto grado de dislipemia por lo que en cierto modo pueden ser también considerados modelos de diabetes. El grado de obesidad e insulinoresistencia en este modelo depende de su fondo genético (ie, C57BKS/J o

C57BL/6J). No solo eso, el fondo genético es muy importante a la hora de considerar su utilización en el estudio de determinados aspectos del síndrome metabólico. Por ejemplo, los ratones db/db en un fondo genético C57BKS/J desarrollan DM2, mientras que este mismo modelo en un fondo genético C57BL/6J solo llegan a desarrollar insulinoresistencia (Kennedy, Ellacott et al. 2010). En ambos casos, los ratones db/db son obesos, debido a que presentan hiperfagia y un gasto energético disminuido, hiperinsulinémicos, hiperglicémicos y presentan niveles plasmáticos elevados de colesterol, principalmente debido a un aumento en los niveles de lipoproteínas HDL y LDL.

I.1.7.1 Efectos de las HDL sobre el desarrollo de adiposidad y metabolismo de la glucosa

Existen diferentes evidencias que sugieren que un aumento en los niveles plasmáticos de HDL o apoA-I ejercen un efecto regulador sobre la adiposidad. En humanos, diferentes polimorfismos en el gen *APOA1* se han asociado con un riesgo aumentado a desarrollar obesidad (Chen, Mazzotti et al. 2009). Existen otras evidencias utilizando modelos experimentales genéticos que apoyarían un papel de las HDL sobre la regulación de la masa adiposa y en tratados con miméticos de apoA-I (Navab, Anantharamaiah et al. 2005, Van Lenten, Wagner et al. 2009) en los que se muestra un ganancia de masa grasa disminuida en ratones alimentados con una dieta rica en grasas (Ruan, Li et al. 2011). Tanto los ratones transgénicos de apoA-I como los

ratones tratados con miméticos de apoA-I presentan una sensibilidad a la insulina ligeramente mejorada en ratones alimentados con una dieta rica en grasas en comparación con la de los ratones control, estando ello asociado con un aumento en el gasto energético y un aumento en la expresión de la *uncoupling Protein* (UCP)-1 y de la fosforilación de la AMPK (Ruan, Li et al. 2011) o mediante inducción de lipólisis en tejido adiposo (Wei, Averill et al. 2014).

También se ha descrito que la apoA-I y las HDL podrían tener propiedades antiinflamatorias en adipocitos de manera similar a la que muestran en otros tipos celulares (ie, macrófagos, células endoteliales). En este sentido, tanto la apoA-I como las HDL inhiben la inducción de la expresión del gen que codifica para el factor quimiotáctico proinflamatorio (ie, MCP-1, SAA3) promovida por palmitato en cultivos de adipocitos (Umemoto, Han et al. 2013). Apoyando estas observaciones, la sobreexpresión de apoA-I en ratones transgénicos alimentados con una dieta rica en grasas se ha encontrado que inhibe la expresión del factor quimiotáctico y la acumulación de macrófagos en comparación con sus controles (Umemoto, Han et al. 2013). Dado que la acumulación de macrófagos y la inflamación de tejido adiposo se encuentran fuertemente asociados con la manifestación de resistencia a la insulina, estos hallazgos podrían ser de interés en el desarrollo de estrategias basadas en HDL dirigidas a la prevención y manejo de resistencia a la insulina. Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en el efecto antiobesidad por parte de la apoA-I

aun no están bien caracterizados.

Por otro lado, la apoA-I también tiene un papel activo en el control del metabolismo de la glucosa, mejorando su biodisponibilidad, en múltiples modelos experimentales (Han, Lai et al. 2007, Drew, Duffy et al. 2009, Fryirs, Barter et al. 2010, Dalla-Riva, Stenkula et al. 2013, Stenkula, Lindahl et al. 2014).

II - HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La obesidad es un factor independiente de riesgo cardiovascular y de diabetes mellitus. La insulinoresistencia y las dislipemias son consideradas uno de los principales mediadores de riesgo cardiovascular, al mismo tiempo que componentes principales del síndrome metabólico (Grundy, Cleeman et al. 2005). Diferentes estudios demuestran que en la diabetes se pueden identificar múltiples alteraciones del metabolismo lipoproteico.

Se han atribuido a las HDL un número de propiedades ateroprotectoras, las cuales pueden resultar comprometidas en varios estados fisiopatológicos, incluyendo la obesidad y diabetes. En este sentido, diferentes estudios sugieren que alteraciones en las características cuantitativas y cualitativas de las HDL modificarían su funcionalidad (Kontush and Chapman 2006, Kontush and Chapman 2008), disminuyendo su capacidad ateroprotectiva (Tan 2009, Verges 2009, Van Linthout, Foryst-Ludwig et al. 2010).

El avance en el conocimiento sobre las características funcionales de las HDL y su relación con el TRC-m in vivo u otras de sus propiedades antiaterogénicas es aún limitado en humanos. Existen varios modelos experimentales de obesidad y diabetes en los que se han estudiado estos aspectos funcionales, siendo los ratones db/db uno de los modelos más utilizados. A pesar de ello, los trabajos en los que se aborda el impacto de la obesidad y sus complicaciones sobre las características cuantitativas y funcionales de las HDL de este modelo aún son escasos.

En el presente trabajo se hipotetizó que la composición y metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas estarían alteradas en ratones db/db y que ello, en el caso de las HDL, podría estar relacionado con una disminución en tres de sus propiedades antiaterogénicas más importantes (TRC-m y capacidad antioxidante y antiinflamatoria).

Por otra parte, diferentes estudios apoyan que la hiperexpresión de apoA-I, principal proteína de HDL, estimula el TRC desde macrófagos a heces (revisados en (Escola-Gil, Rotllan et al. 2009)), sugiriendo que la función antioxidante y antiinflamatoria de las HDL depende en buena parte de apoA-I (Kontush and Chapman 2006). Sin embargo, ningún estudio ha evaluado directamente el impacto de terapias dirigidas a aumentar la funcionalidad de HDL en una condición en la que estas funciones son defectuosas. Por este motivo, **también se hipotetizó que la sobreexpresión de apoA-I en ratones db/db resultaría en una mejora de las tres actividades antiaterogénicas principales de las HDL, antes mencionadas.**

OBJETIVOS

I – Caracterizar las propiedades de las lipoproteínas circulantes de los ratones db/db y, en particular, las HDL, en cuanto a composición, metabolismo y capacidad aterogénica/antiaterogénica.

II – Determinar el impacto de la sobreexpresión de apoA-I humana en la capacidad antiaterogénica de HDL de ratones db/db.

III - MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Animales y condiciones de estabulación

III.1.1 Modelos experimentales

En este trabajo se ha utilizado una línea de ratón (B6.BKS(D)-*Lepr*db/J; db/db; The Jackson Laboratory) cuyos integrantes presentan un fenotipo obeso y representan un modelo de diabetes mellitus tipo 2 en un fondo genético C57BL/6J (<https://www.jax.org/strain/000697>) debido a una mutación en el gen *Lepr* (db). Para el desarrollo de los diferentes diseños experimentales dispusimos de parejas reproductoras heterocigotas para la mutación en el gen *Lepr* (db/+) cuyo cruzamiento generó ratones db/db, cuyo fenotipo obeso fue ya claramente identificable a partir de las 3-4 semanas, y controles portadores (heterocigotos) de la mutación (db/+) y no portadores (+/+) obtenidos en la misma camada. En ocasiones fue necesario refrescar el fondo genético C57BL/6J de la línea de ratones db/db mediante el cruce de ratones db/+ con ratones controles (<https://www.jax.org/strain/000664>) obtenidos comercialmente.

Para abordar la fase del estudio en la que se contempló estudiar el efecto de la hiperexpresión de la apoA-I humana sobre las propiedades cuantitativas y funcionales de las lipoproteínas de ratones db/db, también se emplearon ratones transgénicos de apoA-I humana (C57BL/6-Tg(APOA1)1Rub/J) (<https://www.jax.org/strain/001927>) en un fondo genético C57BL/6J y que en el presente trabajo nos referiremos abreviadamente como ratones hA-I. Estos ratones fueron cruzados con ratones db/+

para obtener ratones db/db con hiperexpresión de apoA-I humana (hA-I-db/db) y ratones db/+ o +/+ con hiperexpresión de apoA-I humana en la misma camada (hA-I-db/+ o hA-I-+/+), cuyo fenotipo no difirió del mostrado por los ratones hA-I.

III.1.2 Condiciones de estabulación

De acuerdo con la legislación vigente (Real Decreto 53/2013, BOE-A-2015-3574), los ratones se repartieron a razón de un máximo de 4 ratones por jaula. El mantenimiento de los ratones se realizó en condiciones controladas de luz (12 h de luz, 12 h de oscuridad) y temperatura (21-22°C). Todos los ratones se alimentaron *ad libitum* con dieta estándar de mantenimiento (Scientific Animal Food and Engineering, SAFE, A04/A04C/R04, 3% grasa, 2900 kcal/kg). La mayor parte de los análisis bioquímicos y estudios fueron realizados en condiciones de no privación de alimento, salvo en el momento de la evaluación del metabolismo de la glucosa, en cuyo caso los ratones fueron privados de comida durante un máximo de 5 h. Los protocolos de manipulación de animales para este estudio fueron aprobados por el Comité Ético del Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y autorizadas por el Departamento d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya.

III.1.3 Diseños experimentales

III.1.3.1 Estudio del efecto metabólico del fenotipo obeso sobre las propiedades de las lipoproteínas en ratones db/db

Se utilizaron ratones db/db y sus controles (db/+ o +/+, indistintamente) a partir de las 8 semanas de vida (**Figura 5**), momento en el que ya manifestaron el fenotipo obeso. Normalmente, el número de ratones utilizados fue no inferior a 4-5 animales por grupo experimental, siendo en ocasiones superior dependiendo de la descendencia acumulada mediante la sincronización de un número suficiente de parejas reproductoras dispuestas a este fin. Los análisis corporales y bioquímicos, así como las diferentes pruebas funcionales se realizaron entre las 9 y 12 semanas de vida. Cuando se precisó, los análisis de parámetros corporales y bioquímicos plasmáticos se realizaron a las 8 y a las 12 semanas de vida. Los experimentos metabólicos in vivo, incluyendo el TRC, fueron analizados a término, salvo las pruebas funcionales relativas al metabolismo de la glucosa que fueron realizadas entre las semanas 9 y 11. Los análisis funcionales ex vivo (ie, propiedades antiaterogénicas de las lipoproteínas, evaluación de actividades enzimáticas plasmáticas, otros análisis bioquímicos e histológicos) fueron realizados después de su sacrificio a partir de las 12 semanas de vida. En el momento de ser sacrificados los ratones de ambos grupos experimentales fueron previamente anestesiados con vapores de isoflurano (Forane®, Abbott) y seguidamente sacrificados mediante exsanguinación por punción cardiaca.

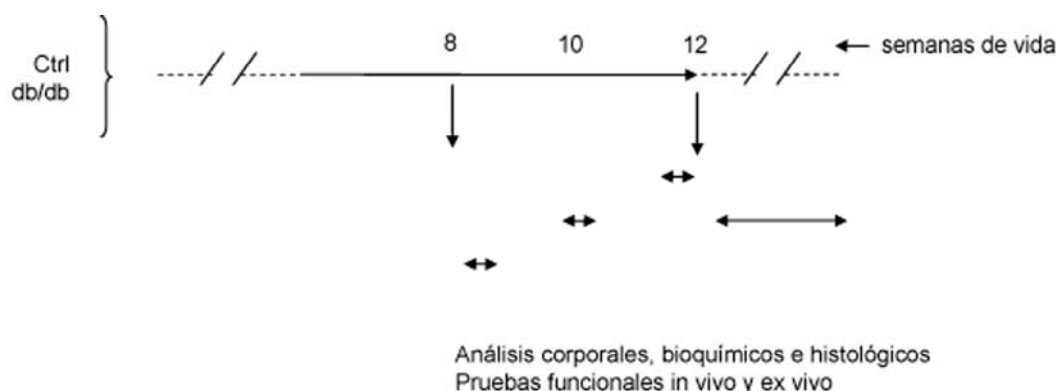


Figura 5 Estudio del efecto metabólico del fenotipo obeso sobre las propiedades de las lipoproteínas en ratones db/db. Se realizó el estudio de los diferentes parámetros corporales, bioquímicos e histológicos, así como la evaluación del impacto del fenotipo sobre diferentes pruebas funcionales in vivo y ex vivo en ratones machos db/db y sus controles entre 9-12 semanas. Los análisis corporales, bioquímicos e histológicos fueron realizados en muestras obtenidas a las 12 semanas de vida. Las pruebas funcionales in vivo que consistieron respectivamente en la evaluación del metabolismo de las lipoproteínas (ie, LDL y HDL), TRC-m y test postprandial de aceite de oliva conteniendo [^3H]-triglicérido o de [^{14}C]-colesterol fueron realizadas a término en grupos de ratones independientes. Las pruebas funcionales relacionadas con el metabolismo de la glucosa se realizaron entre las 9 y 12 semanas. Las pruebas funcionales de las lipoproteínas HDL ex vivo (ie, función antioxidante y antiinflamatoria) se realizaron utilizando las lipoproteínas plasmáticas aisladas por ultracentrifugación a partir de *pools* de 2-3 plasmas de diferentes individuos de cada grupo experimental. Simbología empleada: las flechas unidireccionales perpendiculares a la línea de tiempo indican el momento en que se realizaron las extracciones de sangre; las flechas horizontales bidireccionales pequeñas indican las fases en que se realizaron las pruebas funcionales in vivo, correspondiendo las dos primeras al metabolismo de la glucosa y la última a las relativas al metabolismo de lipoproteínas y TRC-m; flechas horizontales bidireccionales grandes indican pruebas funcionales ex vivo. Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db.

Los ratones estuvieron en todo momento *ad libitum*, salvo cuando se requirió privarlos de alimento, como en el caso de los tests funcionales del metabolismo de la glucosa o convino averiguar los niveles plasmáticos de alguno de los parámetros bioquímicos en esa condición. A partir de este momento se procedió con su autopsia y la obtención de los diferentes tejidos/órganos con el fin de ser analizados. Tras su obtención, los diferentes tejidos/órganos fueron pesados, inmediatamente congelados

en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta el momento de sus análisis, salvo en el caso de los aquellos tejidos dirigidos a su análisis histológico (ie, hígado).

En el caso de la sangre se obtuvieron las fracciones séricas y plasmáticas correspondientes a término; en ocasiones se realizaron extracciones a las 8 semanas para comprobar la evolución de algunos parámetros bioquímicos o para la puesta a punto de metodologías empleadas en el análisis de las pruebas de funcionalidad ex vivo. Según convino se procedió con la determinación de los diferentes parámetros bioquímicos de la fracción plasmática o su almacenamiento a -80°C hasta ser utilizadas.

En cuanto a las heces obtenidas al final de los procedimientos cinéticos (ie, TRC-m o metabolismo de HDL), estas fueron recolectadas, pesadas y procesadas inmediatamente mediante una extracción lípida para determinar su contenido en cuentas (ie, $[^3\text{H}]$ -colesterol y $[^3\text{H}]$ -ácidos biliares), tal y como se describe más adelante.

III.1.3.2 Evaluación de la inducción de LXR sobre la función antiaterogénica de las HDL plasmáticas de ratones db/db

En este caso se utilizaron ratones db/db y ratones controles (db/+ o +/+, indistintamente) que fueron tratados con un fármaco agonista específico de LXRA (T0901317; Cayman Chemical) (db/db-LXR y Ctrl-LXR, respectivamente) y se comparó su efecto sobre las propiedades de las HDL con las mostradas por los ratones

db/db y sus controles (db/+ o +/+, indistintamente) no tratados con el fármaco pero a los que se les administró el solvente (ie, vehículo) utilizado para disolver el fármaco. La administración del fármaco o vehículo (ie, 1% carboximetil celulosa) se realizó vía oral mediante sonda gástrica. Para la preparación del fármaco se requiere su disolución con etanol absoluto a una razón de 1 mg de fármaco/ μ L. Se administraron 20 mg de agonista por kg de peso corporal (ie, 20 mpk) por ratón. A los ratones que recibieron vehículo se les administró cantidades equivalentes de carboximetil celulosa en función de su peso corporal.

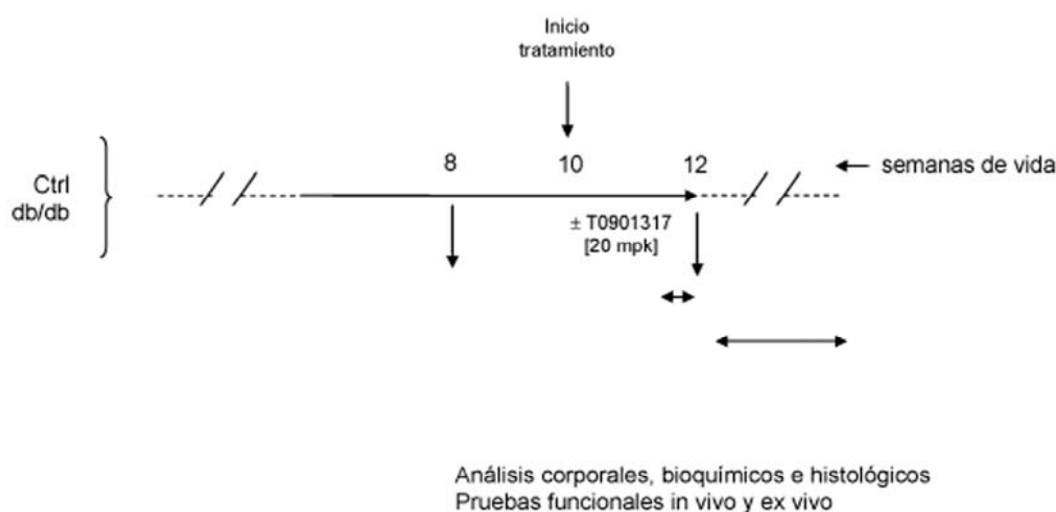


Figura 6 Estudio del efecto de la inducción de LXR sobre el TRC in vivo en ratones db/db. Se evaluó el impacto de la inducción de LXR sobre de los diferentes parámetros corporales y bioquímicos, y el TRC in vivo en ratones db/db a las 12 semanas de vida. El fármaco (ie, T0901317) se administró mediante sonda gástrica a una dosis de 20 mg por kg (mpk) durante 10 días consecutivos. En todos los análisis se incluyó además un grupo de ratones control tratado o no con el mismo agonista. Los análisis corporales y bioquímicos fueron realizados en muestras obtenidas a las 12 semanas de vida. La evaluación del TRC-m en los diferentes grupos de animales fue realizado a término. Simbología empleada: las flechas unidireccionales perpendiculares a la línea de tiempo indican cuando se realizaron las extracciones de sangre; la flecha horizontal bidireccional pequeña indica en que momento se realizó el TRC-m; la flecha horizontal bidireccional situadas después de la semana 12 indica el período en el que se realizaron las pruebas bioquímicas y funcionales ex vivo. Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control tratados con vehículo; db/db, ratones db/db.

Los ratones empleados entraron en el estudio a partir de las 8 semanas de vida (**Figura 6**). Tal y como se ha descrito en anteriores apartados, normalmente se utilizó un número de ratones no inferior a 4-5 animales por grupo experimental, siendo en ocasiones superior dependiendo de la descendencia.

Los análisis corporales y bioquímicos se realizaron entre las 10 y 12 semanas de vida, mientras que la evaluación del TRC-m se realizó a la semana 12 tras 10 días consecutivos de tratamiento farmacológico. Los análisis de parámetros corporales y bioquímicos plasmáticos se realizaron a las 8 y a las 12 semanas de vida. La evaluación del TRC-m fue evaluada al final del tratamiento con agonista al término del estudio. Otros análisis bioquímicos (ie, determinación de lípidos hepáticos) fueron realizados después de su sacrificio a partir de las 12 semanas de vida. Los ratones de los diferentes grupos experimentales fueron sacrificados mediante su completa exsanguinación mediante punción cardíaca tras haber sido previamente anestesiados con vapores de isoflurano.

En el momento del sacrificio se obtuvieron los diferentes tejidos/órganos, se registraron sus pesos, inmediatamente congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C hasta el momento de sus análisis. De igual modo que en anteriores diseños, a las fracciones séricas y plasmáticas correspondientes se les determinó los niveles de diferentes parámetros bioquímicos o fueron almacenadas a -80 °C hasta su utilización. Por último, las heces obtenidas tras completar el protocolo de TRC fueron recolectadas, pesadas y procesadas inmediatamente mediante una extracción lípidica

para cuantificar la actividad debida al [^3H] (ie, [^3H]-colesterol, [^3H]-ácidos biliares), tal y como se describe más adelante.

III.1.3.3 Análisis del efecto de la hiperexpresión de apoA-I humana sobre la función antiaterogénica de las HDL plasmáticas de ratones db/db

Para este fin se utilizaron ratones db/db y ratones controles (db/+ o +/+, indistintamente) que hiperexpresaron apoA-I humana (hA-I-db/db y hA-I, respectivamente) y se comparó el efecto de la expresión de elevadas cantidades de apoA-I humana sobre las propiedades de las HDL con las mostradas por los ratones db/db y sus controles (db/+ o +/+, indistintamente). Los ratones empleados entraron en el estudio a partir de las 8 semanas de vida (**Figura 7**). Igualmente que lo descrito en el apartado anterior, normalmente se utilizó un número de ratones no inferior a 4-5 animales por grupo experimental, siendo en ocasiones superior dependiendo de la descendencia acumulada mediante la sincronización de un número suficiente de parejas reproductoras. Los análisis corporales y bioquímicos, así como las diferentes pruebas funcionales se realizaron entre las 9 y 12 semanas de vida. Cuando se precisó, los análisis de parámetros corporales y bioquímicos plasmáticos se realizaron a las 8 y a las 12 semanas de vida. La evaluación del TRC in vivo fue analizada a término, salvo por el test de tolerancia a la glucosa (TTG) (ver más adelante) que fue realizado durante la semana 10. Los análisis funcionales ex vivo (ie, otras propiedades antiaterogénicas de las HDL, evaluación de actividades enzimáticas plasmáticas,

análisis bioquímicos) fueron realizados después de su sacrificio a partir de la semana 12 de vida.

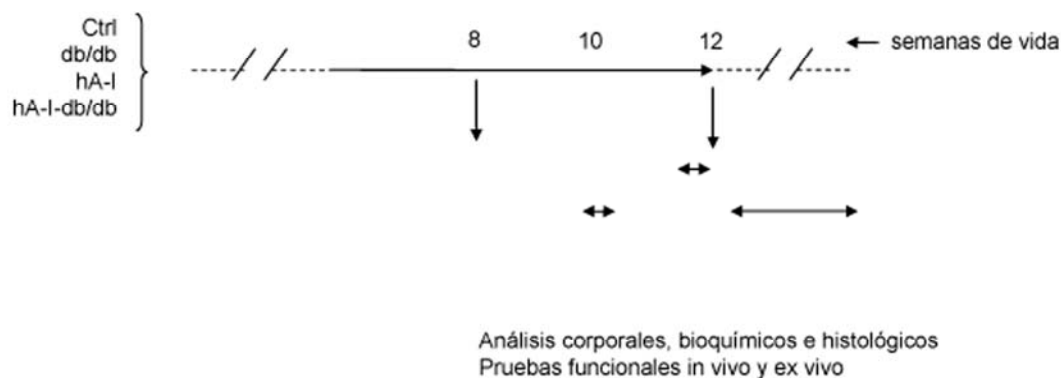


Figura 7 Estudio del efecto de la hiperexpresión de apoA-I sobre diferentes funciones antiaterogénicas de las HDL en ratones db/db. Se estudió el impacto de la expresión de apoA-I humana sobre de los diferentes parámetros corporales y bioquímicos, y el TRC-m en ratones db/db (hA-I-db/db) a las 12 semanas de vida y se compararon con los mostrados por ratones db/db y hA-I. En todos los análisis se incluyó además un grupo de ratones control. Los análisis corporales y bioquímicos fueron realizados en muestras obtenidas a las 12 semanas de vida. La evaluación del TRC-m en los diferentes grupos de animales fue realizado a término. Sobre las 10 semanas también se realizó un test funcional de tolerancia a la glucosa en estos mismos animales. Las pruebas funcionales de lipoproteínas HDL ex vivo (ie, función antioxidante y antiinflamatoria) se realizaron utilizando las lipoproteínas plasmáticas aisladas por ultracentrifugación a partir de *pools* de plasmas de diferentes individuos (2-3 cada uno) de cada grupo experimental. Simbología empleada: flechas unidireccionales perpendiculares a la línea de tiempo indican el momento en que se realizaron las extracciones de sangre; flechas horizontales bidireccionales pequeñas indican cuando se realizaron las pruebas funcionales in vivo; la flecha horizontal bidireccional situada después de la semana 12 indica el período en el que se realizaron las pruebas bioquímicas y funcionales ex vivo. Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db; hA-I, ratones transgénicos de apoA-I humana; hA-I-db/db, ratones db/db con hiperexpresión de apoA-I humana.

Los ratones de los diferentes grupos experimentales fueron sacrificados a través de su completa exsanguinación mediante punción cardiaca; para ello, los ratones fueron previamente anestesiados con vapores de isoflurano. Tras su sacrificio se procedió con su disección para obtener los diferentes tejidos/órganos. Tal como se ha descrito en apartados anteriores, los diferentes tejidos/órganos fueron pesados, inmediatamente

congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta el momento de sus análisis.

Las fracciones séricas y plasmáticas correspondientes se obtuvieron a partir de la sangre extraída. Inmediatamente después de su obtención, se determinaron los niveles plasmáticos de algunos de los parámetros bioquímicos a partir de la fracción plasmática. El resto de volumen se almacenó a -80°C hasta su utilización para el análisis de otros parámetros de interés o para el estudio de las propiedades de las lipoproteínas.

Por último, las heces fueron recolectadas, pesadas y procesadas inmediatamente mediante una extracción lipídica para obtener el $[^3\text{H}]$ -colesterol y $[^3\text{H}]$ -ácidos biliares, tal y como se describe más adelante.

III.2 Obtención de muestras biológicas

III.2.1 Sangre y tejidos/órganos

La sangre se obtuvo mediante punción de la vena de la cola o mediante punción cardíaca previa anestesia con isoflurano. El suero se obtuvo tras alojar la sangre en tubos sin anticoagulante que contienen un gel separador y un activador de la coagulación (Micro Tube 1.1 mL Z-Gel, Sarstedt). Por otro lado, el plasma se obtuvo tras introducir la sangre en tubos que contienen EDTA como anticoagulante (Micro Tube 1.3 mL K3E -16 mg EDTA/mL sangre-, Sarstedt).

En ambos casos, la sangre alojada en estos tubos se mantuvo en hielo hasta el momento de proceder con la separación del suero o plasma, según correspondiese. La separación del suero y plasma se realizó centrifugando a 10.000 rpm a 4 °C durante 10 min.

Tal y como ya se ha apuntado anteriormente, la obtención de los diferentes tejidos se realizó tras sacrificar el ratón mediante exsanguinación por punción cardiaca. Una vez sacrificado se procedió con la extracción de los diferentes tejidos (ie, hígado, tejido adiposo, intestino, entre otros). Los tejidos/órganos recolectados se pesaron y distribuyeron en tubos correspondientemente identificados. Los tubos con los diferentes especímenes se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y luego se almacenaron en un congelador a -80°C hasta el momento de ser utilizados.

Cuando se requirió tejido para el genotipaje de los ratones db/db, este se obtuvo a partir de un pequeño trozo del extremo de la cola. La obtención de esta muestra fue necesaria para la extracción y análisis de DNA genómico y normalmente se realizó a partir de las 4 semanas de vida del animal.

En algunos de los ensayos descritos en este trabajo se requirió utilizar la fracción de plasma humano libre de lipoproteínas como fuente de PTEC (apartado 2.7.1.4) o bien utilizar la fracción plasmática de LDL humanas en algunas de las técnicas in vitro dirigidas a evaluar diferentes propiedades antiaterogénicas de las HDL. Ambas fracciones se obtuvieron mediante la ultracentrifugación de un *pool* de plasmas

humanos normolipémicos (200 mL) obtenidos a partir del Banco de Sangre del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Las lipoproteínas LDL fueron utilizadas directamente en el ensayo correspondiente o bien fueron modificadas para generar LDL oxidadas (LDLox) o acetiladas (LDLac). Las LDLox se generaron mediante la incubación a 37°C de LDL predializadas en tampón fosfato salino (a una concentración final 1 mM de fosfolípidos) en presencia de 10 μ M Cu_2SO_4 como inductor de la oxidación. El grado de oxidación mediante la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 234 nm. Por otro lado, la obtención de LDL LDLac se consiguió mediante la adición de 1,5 μ L de anhídrido acético por mg de apoB de LDL en 50% una solución fría de acetato sódico saturado e incubación a 4°C durante 1 h. Seguidamente, las LDLac se dializaron en tampón fosfato salino suplementado con 0,3 M EDTA. Salvo por la fuente de PTEC que se almacenó a -80°C hasta el momento de ser utilizada, las LDL modificadas se conservaron a 4°C hasta su utilización.

III.3 Análisis bioquímicos

III.3.1 Parámetros plasmáticos

III.3.1.1 Lípidos y proteínas

La determinación de la concentración del colesterol, colesterol libre, triglicéridos, glicerol, fosfolípidos en plasma y fracciones lipoproteicas (ie, no-HDL y HDL) plasmáticas se realizó mediante kits enzimático-colorimétricos comerciales adaptados

a un autoanalizador COBAS 501C (Roche Diagnostics). De igual modo, también se determinaron otros parámetros bioquímicos tales como los ácidos grasos, glucosa y los enzimas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) en plasma total. Todos los kits de reactivos necesarios para la determinación de parámetros bioquímicos fueron adquiridos de la casa comercial Roche Diagnostics, salvo en el caso de los reactivos para determinar colesterol libre, fosfolípidos y ácidos grasos que fueron adquiridos de la casa comercial Wako diagnostics.

La concentración de lípidos de HDL (colesterol, colesterol libre y fosfolípidos) se determinó a partir de sobrenadantes de plasma obtenidos tras la precipitación de lipoproteínas que contienen apoB mediante su incubación con reactivo fosfotúngstico y cloruro de magnesio (Roche diagnostics) (2:1; v:v) (Roche Diagnostics).

La concentración plasmática de apoA-I humana (Roche Diagnostics) se determinó solo en aquellos modelos experimentales (ie, hA-I y db/db-hA-I) que expresaron esta proteína. Ello fue especialmente útil para la selección de ratones transgénicos de apoA-I humana de las diferentes progenies. Su determinación se realizó mediante la utilización de un método enzimático-colorimétrico comercial adaptado a un autoanalizador COBAS 501C (Roche Diagnostics).

La concentración de proteínas en el sobrenadante de los diferentes homogenizados resultantes se realizó por el método de Bradford (Bradford 1976) mediante la utilización del kit comercial BCA (Pierce BCA Protein Assay Kit; Thermofisher).

La determinación de 27-hidroxicolesterol plasmático se realizó mediante la utilización de un equipo HPLC-MS/MS (Baila-Rueda, Cenarro et al. 2013). Brevemente, en las muestras de suero (100 μ L) y calibradores se añadieron 6 μ L (10,5 μ M) de patrón interno ($[^2\text{H}_6]$ -colesterol). Seguidamente, las muestras y calibradores fueron saponificados mediante la adición de NaOH (0,71 M). Tras la hidrólisis alcalina a 60°C durante 20 min se añadieron 500 μ L de agua demonizada en cada uno de los tubos. A continuación la muestra se extrajo dos veces con 3 mL de hexano. El extracto lipídico se secó a 30°C bajo corriente de gas nitrógeno y se reconstituyó en 200 μ L de metanol, antes de pasarlos a través de cartuchos C^{18} antes de inyectarlos en el sistema HPLC-MS/MS.

El análisis de los niveles de proteína sérica amiloide A1 (SAA1) en muestras de plasma y lipoproteínas HDL plasmáticas se realizó mediante un ensayo ELISA en fase sólida (KMA0021, Tridelta Development Ltd). Brevemente, las muestras de plasma y lipoproteínas, previamente diluidas 1:200 (v:v) en tampón de dilución, así como los diferentes calibradores y controles incluidos en el propio kit, se incubaron a 37°C durante 1 h con una solución de anticuerpo anti-SAA1 conjugado a HRP. Tras la adición de sustrato TMB, la reacción se dejó cursar a temperatura ambiente durante unos 15 min y se paró mediante la adición de una solución de parada. Seguidamente se procedió con su lectura a una longitud de onda de 450 nm.

III.3.1.2 Actividades enzimáticas

III.3.1.2.1 Determinación de actividad LCAT

La actividad LCAT se determinó utilizando como sustrato las propias lipoproteínas de la muestra marcadas con [7(n)- ^3H]-colesterol (Perkin Elmer) (Dobiasova and Frohlich 1998). Brevemente, se incubó cada muestra de plasma (200 μL), prediluidas 1:3 (v:v) con Tris-HCL pH 7,4, con un disco de papel de filtro conteniendo 0,3 μCi de [^3H]-colesterol en tubos de borosilicato a 4°C entre 18-24 h. Al día siguiente tras descartar los discos, se recolectaron 50 μL de los 200 μL de cada muestra diluida y se traspasaron a un tubo de borosilicato (tiempo 0) cuyos lípidos fueron extraídos con 1 mL de etanol absoluto. El resto de muestra se incubó en un baño a 37 °C en agitación durante 30 min. Al final de la reacción se traspasaron otros 50 μL de cada muestra a otro tubo de borosilicato (tiempo 30 min) y sus lípidos fueron extraídos con 1 mL de etanol absoluto de igual modo que para el caso de los tubos del tiempo 0. En ambos casos, el sobrenadante del extracto lipídico resultante fue traspasado a nuevos tubos de borosilicato y secado bajo un flujo de gas nitrógeno en una campana de extracción de gases. El residuo resultante fue disuelto con 100 μL cloroformo y cargado en placas de silicagel especiales para cromatografía en capa fina (Whatman). La separación del colesterol libre y esterificado de cada muestra se realizó mediante esta técnica. Una vez obtenida la separación del colesterol libre y éster de colesterol se rascó la banda debida a una y otra forma molecular de colesterol y se dispuso en

viales de recuento con líquido de centelleo. La radiactividad asociada a la banda de ésteres de colesterol formados antes y después del período de reacción se cuantificó mediante un contador β (Perkin Elmer). La tasa de esterificación molar se expresó en [$\mu\text{M}/\text{h}$] a partir del producto entre la tasa fraccional de esterificación de colesterol y la concentración de colesterol libre en la fracción plasmática.

III.3.1.2.2 Determinación de actividad PLTP

El sistema de ensayo se basó en un sistema radiométrico consistió en la utilización de vesículas de fosfatidilcolina y subfracción HDL-3 (Jauhainen, Metso et al. 1993). Brevemente, la actividad PLTP fue determinada utilizando liposomas marcados con [^{14}C]-fosfatidilcolina (Perkin Elmer). Para el ensayo se incubó una muestra de plasma (100 μL) prediluida a una razón de 1:50 (v:v) en 400 μL de mezcla de reacción conteniendo HDL-3 (250 μg de proteína) y liposomas (75 nmol de fosfatidilcolina) e incubados a 37°C durante 30 min. Al término de la reacción, los liposomas fueron precipitados mediante la adición de 300 μL de una solución que contenía 230 mM NaCl, 92 mM MnCl_2 , 150 UI/L heparina, y la radiactividad presente en la fracción sobrenadante se determinó mediante un contador β (Perkin Elmer). La actividad PLTP se expresó como μmol de [^{14}C]-fosfatidilcolina transferida a HDL-3 por mL de plasma y por hora.

III.3.1.2.3 Determinación de actividad PON1

La determinación de la actividad PON1 se realizó a través de la medición de su actividad arilesterasa, utilizando fenilacetato como sustrato, en muestras de suero (Ribas, Sanchez-Quesada et al. 2004). La hidrólisis de este sustrato cursó en una incubación del suero con un tampón Tris-HCL 1 M pH 8, 3 mM de fenilacetato, CaCl_2 1 M y se monitorizó midiendo el aumento de absorbancia a una longitud de onda de 270 nm a 25°C durante 3 min en un espectrofotómetro BioTek Synergy. El ensayo se efectuó en placas de 96 pocillos (Nunc). La reacción catalizada por el enzima PON1 es calcio-dependiente, siendo inhibida irreversiblemente al adicionar EDTA. Dado que en el suero de ratón se encuentra la actividad arilesterasa EDTA-resistente que por tanto no sería atribuible a la PON1, la actividad PON1 en suero se calculó como la diferencia entre la actividad arilesterasa total y la arilesterasa EDTA-resistente. Esta última fue medida sustituyendo el CaCl_2 en el tampón de ensayo por 1 M de EDTA. La ϵ_{270} para la reacción fue $1,310 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Una unidad (U) de actividad arilesterasa equivale a 1 μmol de sustrato transformado por minuto.

III.3.1.2.4 Determinación de actividad Lp-PLA2

La determinación de la actividad Lp-PLA2 se realizó en muestras de plasma y sus fracciones lipoproteicas (ie, no-HDL y HDL) mediante la utilización de 2-tio-PAF como sustrato (Cayman Chemical) (Sanchez-Quesada, Vinagre et al. 2013). La determinación se basa en que la Lp-PLA2 de la muestra hidroliza el 2-tio-PAF (a 200

μM) en un tampón 1 M Tris-HCL pH 8,2, 100 mM EGTA y que como resultado genera acetato y lisofosfatidilcolina con un grupo sulfhidrilo libre, cuya presencia es detectada monitorizando su reacción con DTNB (5,5'-ditiobis del ácido 2-nitrobenzoico) midiendo el incremento de absorbancia a 405 nm a 37°C durante 10 min en un espectrofotómetro BioTek Synergy, siendo la ϵ_{405} para el DTNB de 12,800 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. La actividad Lp-PLA2 se expresó en μmol de sustrato transformado por mL y por minuto.

III.3.1.3 Separación de las lipoproteínas plasmáticas

III.3.1.3.1 Aislamiento de las lipoproteínas por ultracentrifugación secuencial

El aislamiento de las diferentes lipoproteínas plasmáticas se llevó a cabo mediante ultracentrifugación secuencial preparativa mediante un método descrito por Havel y colaboradores (Havel, Eder et al. 1955). Este método se basa en que todas las lipoproteínas se aislaron por flotación a una densidad inferior a aquella a la que le corresponde (lipoproteínas de muy baja densidad o VLDL, $d < 1,006 \text{ g/mL}$; lipoproteínas de baja densidad o LDL, $1,019 < d < 1,063 \text{ g/mL}$; lipoproteínas de alta densidad o HDL, $1,063 < d < 1,210 \text{ g/mL}$).

En el presente trabajo se consideró la fracción plasmática no-HDL (rango de densidad de flotación inferior a 1,063 g/mL), siendo sus lipoproteínas integrantes las lipoproteínas ricas en triglicéridos (LRT) y una fracción lipoproteica cuyo rango de densidad se correspondió al de las LDL). Por otro lado, la fracción HDL se obtuvo a

partir del plasma libre de lipoproteínas no-HDL, siendo el rango de densidad de flotación $1,063 < d < 1,210$ g/mL. Las diferentes lipoproteínas se obtuvieron a partir de *pools* independientes de plasma de un mínimo de 2-3 ratones/grupo experimental.

Las diferentes fracciones lipoproteicas (no-HDL y HDL) se obtuvieron ajustando la densidad de plasma con KBr a la densidad a la que flota la fracción lipoproteica de interés. Tras haber capturado la fracción lipoproteica flotante, se reajustó la densidad del volumen de plasma restante con KBr mediante la aplicación de la fórmula de Radding y Steinberg (Radding and Steinberg 1960) (**Figura 8**) y así sucesivamente hasta lograr aislar todas las lipoproteínas de interés. La fracción no-HDL se fraccionó a su vez en lipoproteínas ricas en triglicéridos (LRT) ($d < 1,006$ g/mL) y LDL ($1,006 < d < 1,063$ g/mL).

$$\text{KBr [g]} = \frac{\text{Volumen muestra [mL]} \cdot (\text{densidad final [g/mL]} - \text{densidad inicial [g/mL]})}{1 - (0,312 \cdot \text{densidad final [g/mL]})}$$

Figura 8 Fórmula de Radding y Steinberg. La densidad del plasma es aproximadamente 1,006 g/mL. El fraccionamiento secuencial de las diferentes fracciones lipoproteicas plasmáticas por ultracentrifugación se basa en ajustar con KBr y de forma escalonada la fracción plasmática a una densidad apropiada para cada una de las especies lipoproteicas plasmáticas. El cálculo de la cantidad de KBr necesaria para ajustar la densidad del plasma se realizó mediante esta fórmula.

En determinados experimentos, como los de marcaje de lipoproteínas (descrito más adelante), también se requirió una fuente de actividad PTEC. Dado que la PTEC se encuentra libre y abundantemente presente en plasma humano, en este caso se obtuvo la fracción libre de lipoproteínas de plasma humano (volumen original de 200 mL) mediante ultracentrifugación. Las ultracentrifugaciones se realizaron a 120.000 g en

un rotor TI-45.6 o TFT-55.3, según el volumen de muestra, en una ultracentrífuga Beckman Coulter; OPTIMA L-90K a 4°C durante 20 h.

Normalmente, una vez separadas las lipoproteínas se efectuó la medida de su composición bioquímica mediante el análisis de sus componentes bioquímicos mayoritarios (ie, colesterol, colesterol libre, fosfolípidos y triglicéridos) mediante técnicas enzimático-colorimétricas comerciales adaptadas a un autoanalizador COBAS 501C; la concentración de proteínas en estas fracciones se determinó por el método de Bradford (Bradford 1976) mediante la utilización del kit comercial BCA (Pierce BCA Protein Assay Kit; Thermofisher).

Finalmente, las diferentes fracciones lipoproteicas se dializaron utilizando tampón fosfato salino (10 mM Na₂HPO₄, 4 mM KH₂PO₄, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 2,7 mM KCl) para la ejecución de sus análisis funcionales. La diálisis se realizó mediante la utilización de columnas PD-10 comerciales (GE Healthcare).

III.3.1.3.2 Separación de lipoproteínas mediante sistema de filtración en gel

Las fracciones lipoproteicas también fueron separadas mediante un sistema de filtración en gel en un sistema Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) utilizando una columna de Superosa 6® (GE Healthcare) (Julve, Escola-Gil et al. 2010). Este sistema separa las partículas del plasma en función de su tamaño, eluyendo antes las partículas de gran tamaño y quedando retenidas las de menor tamaño. Para la separación de las lipoproteínas mediante este método se inyectó en la columna un

volumen de 0,5 mL de muestra y se eluyó a un flujo de 0,5 mL/min, recogiendo fracciones a cada minuto (fracciones de 0,5 mL) y siguiendo la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm para determinar los picos de proteína correspondientes a las diferentes lipoproteínas o proteínas plasmáticas. Los tampones utilizados en la cromatografía fue Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, 2 mM CaCl₂.

III.3.1.3.3 Electroforesis de lipoproteínas mediante gel en gradiente de densidad en condiciones nativas

El tamaño de las partículas de HDL se determinó en condiciones no desnaturizantes mediante su análisis tras electroforesis nativa utilizando geles en gradiente de densidad de poliacrilamida (GGE) (BioRad) del 2-16 % para separar las lipoproteínas a partir de plasma total o del 4-20%, para separar las HDL previamente aisladas por ultracentrifugación (Nichols, Krauss et al. 1986). En ambos casos, salvo los marcadores de tamaño molecular, las muestras fueron preteñidas con reactivo Negro Sudan, colorante con elevada afinidad por los lípidos que no interfiere en el tamaño de las lipoproteínas (Cheng, Staubus et al. 1988) como paso previo a su separación electroforética con la finalidad de visualizar las lipoproteínas.

Normalmente, los geles de poliacrilamida en gradiente fueron precondicionados en tampón de electroforesis no desnaturizante (90 mM Tris-HCl, pH 8,3, 80 mM ácido bórico, 3 mM NaN₃, 3 mM EDTA) a un voltaje de 125 V durante 30 min. Seguidamente, las muestras preteñidas (ie, plasma total o lipoproteínas aisladas) se

mezclaron en tampón de carga (12,5% sacarosa en tampón de electroforesis) y se cargaron en el gel de electroforesis a razón de 20 μ L por pocillo. El marcador de peso molecular se disolvió en tampón de carga de igual modo que las muestras, pero sin colorante Negro Sudan. Para determinar el tamaño de partícula de las lipoproteínas analizadas se utilizaron marcadores moleculares de diámetros de partícula conocidos en condiciones electroforéticas no desnaturizantes (tiroglobulina, 17 nm; ferritina, 12,2 nm; catalasa, 10,4 nm; lactato deshidrogenasa, 8,1 nm; albúmina sérica bovina, 7,1 nm) (GE Healthcare). La electroforesis cursó a un voltaje de 25 V durante 30 min, que se aumentó a 70 V durante 45 min, para acabar en 125 V en un baño María de hielo durante unas 6-8 h. El carril de marcador de pesos moleculares de diámetro conocido fue teñido con Azul Coomassie brillante R250.

III.3.1.3.4 Cuantificación de pre β -HDL

La concentración relativa de pre β -HDL se determinó mediante incubación de las muestras de plasma a 37°C en presencia de yodo-acetato para medir la formación de pre β -HDL in vitro. Brevemente, la electroforesis de lipoproteínas se llevó a cabo a partir de 2-5 μ L de plasma. La separación de lipoproteínas por su movilidad pre β , β y α consistió en una inmunoelectroforesis cruzada. Para ello, en una primera dimensión se realizó la electroforesis en un gel de agarosa 1% en tampón barbital (50 mM, pH 8,6) y en una segunda dimensión en un gel (GelBond; GE Healthcare) que contiene anti-apoA-I de ratón en un sistema LKB 2117 (4°C, 50 V, durante 20 h) en tampón

barbital. Al final del proceso el gel se tiñó con azul Coomassie brillante R250 y se secó para su análisis densitométrico. Para la medida de pre β -HDL se calcularon las áreas bajo la curva de los picos correspondientes a las pre β -HDL y a las α -HDL. La zona de pre- β -HDL se expresó como el porcentaje de la suma de las áreas de α -HDL y pre β -HDL. Las concentraciones de pre β -HDL también se expresaron en unidades absolutas multiplicando el valor relativo (%) de pre β -HDL por la concentración plasmática de apoA-I de ratón (g/L) de las mismas muestras.

III.3.1.3.4 Aislamiento de LDL electronegativa

La LDL electronegativa (LDL(-)) se separó de la LDL nativa (LDL(+)) mediante cromatografía de intercambio aniónico usando una columna HiLoad 26/10 Q-Sepharose High Performance (Amersham Biosciences) adaptada a un cromatógrafo ÄKTA-FPLC (ÄKTA-Fast Protein Liquid Chromatography, GE Healthcare).

Como tampón de unión a la columna se utilizó el mismo tampón que empleamos para la diálisis de la LDL (Tris-HDL 10 mM y EDTA 1 mM pH 7,4) y como tampón de elución se utilizó Tris-HDL 10 mM, NaCl, 1 M y EDTA 1 mM, pH 7,4. La separación de las dos fracciones de LDL en función de la carga se realizó utilizando un gradiente de sal escalonado. Con este método cromatográfico se consiguió aislar las fracciones LDL(+) y LDL(-) las cuales eluyeron respectivamente en los escalones de 26% (0,26 M NaCl) y 60% (0,6 M NaCl).

III.3.2 Parámetros tisulares

III.3.2.1 Lípidos

La determinación de lípidos en los diferentes tejidos se realizó mediante una extracción lipídica de las muestras de tejido con hexano e isopropanol (3:2; v:v) (isopropanol-hexano) (Hara and Radin 1978). Brevemente, la fracción lipídica (hexano) se secó mediante una corriente de gas nitrógeno y el extracto lipídico resultante fue emulsionado con una solución de 0,5% de colato sódico:isopropanol (2:1, v:v) por sonicación durante 1 h. La concentración de la composición lipídica de las muestras se determinó mediante métodos enzimático-colorimétricos adaptados a un autoanalizador COBAS 501C (Roche Diagnostics) tal y como se ha descrito previamente para el caso de los lípidos plasmáticos. Alternativamente, también se determinó la proporción relativa (%) de colesterol libre en extractos lipídicos de biopsias de hígado (50 mg) mediante cromatografía en capa fina (Whatman). Para ello, el extracto lipídico resuspendido en 50 μ L de cloroformo se aplicó en placas de silicagel. Dado que [i] el exceso de lípidos en las biopsias de hígado de ratones db/db podría comprometer una separación adecuada de las diferentes especies lipídicas por medio de este sistema y [ii] el objetivo que se persiguió fue determinar alteraciones en la proporción relativa de colesterol libre respecto del total, se trató de igualar la cantidad de lípidos de hígado cargada por carril en ambos grupos. El hecho de tener datos previos del contenido en lípidos por gramo de hígado de ambos grupos facilitó

el cálculo del factor de dilución aproximado que debíamos aplicar en el caso de los extractos lipídicos hepáticos de ratones db/db para lograr este objetivo. La separación cursó en una campana saturada de gases conteniendo una mezcla de disolventes (heptano:dietil éter:ácido acético; 74:21:4, v:v:v) hasta resolver las moléculas más polares de las más apolares. Para poder realizar el seguimiento de la migración relativa de las diferentes especies lipídicas de interés, en nuestro caso, colesterol libre y esterificado, se utilizó una estándar conteniendo una concentración conocida (1 g/L) de ambos lípidos. Al finalizar la cromatografía las placas se dejaron secar y se tiñeron con fosfomolibdato (Sigma) en una solución de etanol absoluto y ácido sulfúrico (4 g fosfomolibdato; 80 mL etanol absoluto; 4 mL H₂SO₄ 37% concentración) y se dejaron secar en una estufa a 100°C. La cuantificación de la intensidad de cada banda (debida a las diferentes especies lipídicas separadas), en especial las correspondientes al colesterol esterificado y libre en cada muestra, se determinó mediante la utilización del programa Image J.

III.3.2.2 Proteínas

La determinación de proteínas se realizó en homogenizados de hígado. Para ello, se tomaron aproximadamente 0,05 g de hígado y se homogenizaron por medio de un homogenizador Polytron™ en 0,5 mL de tampón de lisis RIPA (1 M Tris-HCl, pH 8,0, 5 M NaCl, 10% Triton/NP-40, 500 mM EDTA, 0,02% cocktail de inhibidores de proteasas (Calbiochem) de los diferentes grupos de ratones. La concentración de

proteínas en el sobrenadante de los diferentes homogenizados resultantes se realizó por el método de Bradford (Bradford 1976) mediante la utilización del kit comercial BCA (Thermofisher). Los sobrenadantes de homogenizados se mantuvieron congelados a -20°C hasta su utilización.

En el presente estudio también se analizó la expresión de las proteínas Abcg5 y Abcg8 en hígado de ratones mediante la técnica de western blot utilizando anticuerpos específicos. Primero se realizó la separación de las proteínas de los extractos proteicos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%. A cada pocillo se cargaron el equivalente a $100\ \mu\text{g}$ de proteína de homogenizado de tejido. Los homogenizados se diluyeron en tampón de carga Laemmli (Thermofisher) suplementado con β -mercaptoetanol 5%. Como marcador de peso molecular se empleó el marcador de pesos moleculares *Precision Plus* (Pierce). La electroforesis procedió a un voltaje constante (90 V). Al término de la electroforesis, las proteínas separadas en el gel se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa *Hybond*TM-N utilizando un tampón de transferencia (12 mM Tris-HCl, pH 8,3, 96 mM glicina, 20% metanol (v:v)). La transferencia se efectuó a un voltaje de 30 V a 4°C durante 1,5 h.

Las membranas resultantes se incubaron en tampón de bloqueo (20 mM tris-HCl, pH 7,5, 0,5 M NaCl, 0,5% caseína, 0,2% Tween20 (v/v)). El reconocimiento de las proteínas se alcanzó utilizando como anticuerpos policlonales unos purificados a partir de anitsuero de conejo contra Abcg5 (Santa Cruz Biothechnology) (1:200; v:v) y contra Abcg8 (conejo) (Santa Cruz Biothechnology) (1:200; v:v). La abundancia

relativa de ambas proteínas fue normalizada utilizando un anticuerpo policlonal, también de conejo, contra la β 3-Tubulina (1:1.000; v:v) conjugado a HRP (Sigma). La detección quimioluminiscente se consiguió exponiendo las membranas con el reactivo ECL (Bio-Rad). La cuantificación de las bandas correspondientes a las proteínas de interés confirmadas por peso molecular se realizó mediante la utilización del programa Image J.

III.4 Análisis histológicos

III.4.1 Análisis de la estructura parenquimal del hígado

Las biopsias de hígado fueron diseccionadas e inmediatamente fijados en solución de fijación de 10% formalina tamponada (Sigma) durante unas 24 h. Seguidamente, los especímenes se lavaron con tampón fosfato salino y se traspasaron a nuevos tubos conteniendo 70% etanol. Antes de su inclusión en bloques de parafina, los especímenes fueron lavados extensivamente en tampón fosfato salino. A continuación, las muestras fueron incluidas en parafina por parte personal especializado del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Se obtuvieron secciones de 10 μ m de grosor de los diferentes especímenes que fueron recolectados en porta-objetos silanizados y se tiñeron utilizando hematoxilina-eosina (Sigma) como colorante. Las preparaciones se montaron con glicerol-gelatina para su observación y conservación antes de ser analizadas bajo el microscopio. Para ello, la solución glicerol-gelatina (4 g de gelatina, 21 mL de agua, 25 mL de glicerol, 5 mL de

fenol) se calentó en agitación hasta su fusión, momento en que se añadió sobre la preparación, cubriéndola con un cubreobjetos. El análisis microscópico se realizó utilizando un microscopio convencional (Axiolab- Zeiss).

III.4.2 Análisis de la acumulación lipídica del hígado

Este análisis se realizó mediante la tinción de los especímenes con *Oil Red O* (ORO), colorante específico de lípidos neutros. Las biopsias de hígado fueron congeladas en OCT® (Tissue OCT, VWR Prolabo Chemicals) y conservadas a -80°C hasta su procesamiento.

Los bloques de OCT® fueron cortados en un criostato (Leica CM3000) generándose secciones de 10 µm de grosor. Las secciones fueron recogidas en porta-objetos pretratados con poli-L-lisina (Sigma). La tinción con ORO se llevó a cabo sumergiendo el corte en isopropanol durante 2 s siendo traspasada de inmediato a otra cubeta conteniendo solución ORO (1,5 g de ORO en 60% isopropanol) durante 10 min, lavando unos segundos en isopropanol y posteriormente en agua. Los portaobjetos teñidos con ORO se contratiñeron en hematoxilina-eosina durante 5 min y lavados con agua del grifo. Las tinciones ORO-hematoxilina-eosina también se montaron con glicerol-gelatina para su observación y conservación.

III.5 Análisis moleculares

III.5.1 Obtención de DNA genómico

Para el aislamiento de DNA se utilizó como muestra un trozo del extremo de la cola de un mm. Para la digestión, el trozo de cola se incubó en tampón de lisis (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM EDTA, 0,2 % SDS, 200 mM NaCl) y en presencia de 5 µL de proteinasa K (20 mg/mL en tampón de lisis) a 55°C durante toda la noche. Al día siguiente, tras la digestión, la muestra se centrifugó a 1.400 rpm a 4°C durante 10 min y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo (tubo Eppendorf de 1,5 mL) al que se añadieron 0,5 mL (v/v) de isopropanol. Tras agitar por inversión hasta su homogenización, se continuó con su centrifugación a 1.400 rpm a 4°C durante 10 min para obtener un precipitado de DNA. Seguidamente se efectuó un lavado del precipitado con 70% etanol y se centrifugó de nuevo a 1.400 rpm a 4°C durante 2 min. A continuación, se descartó el sobrenadante y el exceso de alcohol se eliminó dejando secar el etanol remanente. Una vez seco, el precipitado se resuspendió en 100 µL de agua desionizada grado 2 estéril. La muestra de DNA genómico se conservó a 4°C hasta su utilización.

Los ratones db/db (homocigotos para la mutación en el gen *Lepr*) no son fértiles así que para asegurar la generación de estos ratones fue preciso el cruce de ratones heterocigotos (db/+) para dicha mutación. Aunque como ya se ha descrito previamente los ratones db/db de las sucesivas camadas fueron fácilmente

distinguibles a simple vista a partir de las 3-4 semanas de edad, esto no fue así en el caso de los ratones db/+ y +/+, al no ser fenotípicamente no diferenciables. Aparte de su utilización como integrantes del grupo control en los diferentes análisis de este trabajo, la identificación de ratones db/+ fue necesaria para mantener la colonia. Ello obligó a genotipar sistemáticamente la descendencia según un método de discriminación alélica cuyo procedimiento se haya descrito en la página web de Jackson laboratory (<https://www.jax.org/strain/000697>).

III.5.2 Aislamiento de RNA mensajero y análisis de la expresión génica mediante RT-PCR a tiempo real

El aislamiento de RNA mensajero (RNAm) se realizó a partir de biopsias congeladas de diferentes tejidos (de unos 50-100 mg) utilizando normalmente dos métodos acoplados en serie para asegurar que el RNAm obtenido tuviera una calidad suficiente antes de proceder con su análisis mediante RT-PCR a tiempo real.

De este modo, en una primera fase se aisló RNA total a partir de homogenizados de tejido utilizando reactivo Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones de uso de dicho reactivo. Tras la extracción del RNA y sucesivos lavados con isopropanol, primero, y 70% etanol, después, contemplados, el precipitado insoluble detectado se sedimentó mediante su centrifugación y el exceso de etanol fue eliminado y secado dejándolo unos minutos a temperatura ambiente. El precipitado (RNA total) obtenido se resuspendió en 200 μ L de agua desionizada grado 2 pretratada con

dietilpirocarbonato. A continuación, el RNA total fue repurificado mediante la utilización de un kit de extracción (RNeasy mini kit, Qiagen). Este kit garantiza [i] la eliminación de DNA genómico de las muestras, cuya presencia podría interferir en los análisis subsiguientes de expresión génica mediante la técnica RT-PCR a tiempo real; y, además, [ii] la repurificación del RNAm aseguró una mejor reproducibilidad en los análisis de expresión.

La técnica RT-PCR a tiempo real requiere de la transcripción inversa de RNAm a cDNA como paso previo. Para ello, normalmente se utilizaron 2 µg de RNAm utilizando transcriptasa reversa M-MLV (H-) (Promega) y utilizando como cebador un oligodT (Sigma). El análisis cuantitativo de los diferentes RNA se realizó mediante RT-PCR a tiempo real en un aparato CFX96 (Biorad). La expresión relativa de los genes seleccionados se estudió utilizando ensayos que utilizan cebadores específicos marcados con fluorocromos. Estos ensayos son comerciales y están prediseñados y validados (Assays-on-Demand, Life Technologies) (**Tabla 4**). Para normalizar los análisis de expresión génica de las diferentes dianas moleculares estudiadas se utilizó *Gapdh* (Life Technologies).

Tabla 4 Listado de sondas específicas utilizadas para los análisis de expresión génica

Gen	Nombre completo del gen	Referencia
<i>APOA1</i>	<i>Apolipoprotein A1 (human)</i>	Hs00163641_m1
<i>TNFA</i>	<i>Tumor necrosis factor alpha (human)</i>	Hs01113624_g1
<i>GAPDH</i>	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>	Hs99999905_m1
<i>Actb</i>	<i>Beta-actin</i>	Mm00607939_s1
<i>Abca1</i>	<i>ATP-Binding Cassette transporter A, type 1</i>	Mm00442646_m1
<i>Abcg1</i>	<i>ATP-Binding Cassette transporter G, type 1</i>	Mm00437390_m1
<i>Abcg5</i>	<i>ATP-Binding Cassette transporter G, type 5</i>	Mm00446241_m1
<i>Abcg8</i>	<i>ATP-Binding Cassette transporter G, type 8</i>	Mm00445970_m1
<i>Acaca</i>	<i>Acetil-Coenzima A carboxilasa alfa</i>	Mm01304257_m1
<i>Apoa1</i>	<i>Apolipoprotein A-I (mouse)</i>	Mm00437569_m1
<i>Apob</i>	<i>Apolipoprotein B</i>	Mm01545159_m1
<i>Cd36</i>	<i>Cluster of Differentiation 36</i>	Mm01135198_m1
<i>Creb1</i>	<i>cAMP proteína 1 de unión al elemento de respuesta</i>	Mm00501607_m1
<i>Cyp27a1</i>	<i>cytochrome P450 family 27 subfamily a member 1</i>	Mm00470430_m1
<i>Cyp2e1</i>	<i>cytochrome P450 family 2 subfamily e member 1</i>	Mm00491127_m1
<i>Cyp7a1</i>	<i>cytochrome P450 family 7 subfamily a member 1</i>	Mm00484152_m1
<i>Cyp7b1</i>	<i>cytochrome P450 family 7 subfamily b member 1</i>	Mm00484157_m1
<i>Dgat1</i>	<i>Diacylglycerol O-acyltransferase 1</i>	Mm00515643_m1
<i>Fasn</i>	<i>Fatty acid synthase</i>	Mm00662319_m1
<i>Gapdh</i>	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>	Mm99999915_g1
<i>Lcat</i>	<i>Lecithin-cholesterol acyltransferase</i>	Mm00500505_m1

Tabla 4 (Cont.)

<i>Gen</i>	Nombre completo del gen	Referencia
<i>Ldlr</i>	<i>LDL receptor</i>	Mm00440169_m1
<i>Lpl</i>	<i>Lipoprotein lipase</i>	Mm00434764_m1
<i>Npc1l1</i>	<i>Niemann-Pick C1-like protein 1</i>	Mm01191972_m1
<i>Nr1h3</i>	<i>Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3 (LXR alpha) (LXRA)</i>	Mm00443451_m1
<i>Pla2g7</i>	<i>Phospholipase A2, group VII (PAF-AH)</i>	Mm00479105_m1
<i>Plin1</i>	<i>Perilipin 1</i>	Mm00558672_m1
<i>Pltp</i>	<i>Phospholipid transfer protein</i>	Mm00448202_m1
<i>Pon1</i>	<i>Paraoxonase-1</i>	Mm00599936_m1
<i>Ppara</i>	<i>Peroxisome proliferator activated receptor alpha</i>	Mm00440939_m1
<i>Pparg</i>	<i>Peroxisome proliferator activated receptor gamma</i>	Mm01184322_m1
<i>Scarb1</i>	<i>Scavenger receptor class B member 1(SR-BI)</i>	Mm00450236_m1
<i>Srebf1</i>	<i>Sterol regulatory element-binding transcription factor 1</i>	Mm01138344_m1

III.6 Análisis funcionales

III.6.1 Metabolismo de la glucosa

III.6.1.1 Test de sensibilidad a la insulina (TSI)

El test de sensibilidad a la insulina (TSI) permite medir la concentración plasmática de glucosa a lo largo del tiempo después de una inyección intraperitoneal de insulina (0,75 mU/g). Los niveles sanguíneos de glucosa plasmática se determinaron a través de una pequeña incisión en el extremo de la cola mediante un glucómetro (Accu-check, Aviva, Roche Diagnostics). La primera medida de glucosa se efectuó a tiempo cero habiendo

deprivado de alimento a los ratones durante 4 h y antes de la inyección de la insulina. Después de la inyección de insulina, los niveles de glucosa fueron monitorizados a los 15, 30, 60, 120 y 180 min. Se calculó el área bajo la curva dibujada gráficamente por los niveles de glucosa medidos a los diferentes tiempos.

III.6.1.2 Test de tolerancia a la glucosa (TTG)

El test de tolerancia a la glucosa (TTG) permite medir la concentración sanguínea de glucosa a lo largo del tiempo después de una inyección intraperitoneal de glucosa (2 mg/g). De igual modo que lo descrito en el caso del TSI los niveles sanguíneos de glucosa plasmática se determinaron a través de una pequeña incisión en el extremo de la cola mediante un glucómetro (Accu-check, Aviva, Roche Diagnostics). La primera medida de glucosa se efectuó a tiempo cero habiendo deprivado de alimento a los ratones durante 4 h y antes de la inyección de la glucosa. Después de la inyección de glucosa, los niveles de glucosa fueron monitorizados a los 15, 30, 60, 120 y 180 min. Se calculó el área bajo la curva dibujada gráficamente por los niveles de glucosa medidos a los diferentes tiempos.

III.6.1.3 Seguimiento del colesterol administrado vía oral

En experimentos independientes se monitorizaron los niveles plasmáticos de colesterol y su distribución en diferentes compartimentos tras la administración oral de 3 μCi /ratón de [^{14}C]-colesterol (Perkin Elmer) o 20 μCi /ratón de [^3H]-trioleína (Perkin Elmer) utilizando aceite de oliva vírgen (150 μL) como vehículo. Se determinaron los niveles de radiactividad derivada del [^{14}C]-colesterol o [^3H]-trioleína a las 3, 6, 24 y 48 h después de

su administración. Para este ensayo los animales fueron deprivados de alimento 4 h antes de la administración de aceite conteniendo el [^{14}C]-colesterol o [^3H]-trioleína. El alimento retirado fue repuesto en cada una de las jaulas a partir de las 6 h. Los niveles plasmáticos de [^{14}C] o [^3H] se recolectaron a través de una pequeña incisión en el extremo de la cola y su distribución en los diferentes tejidos/órganos y en heces de 48 h se determinó mediante un contador β (Perkin Elmer). El seguimiento de los niveles de [^{14}C] o [^3H] en plasma se realizó a partir de un volumen de 25 μL de muestra. Los datos se expresaron como porcentaje de actividad vs dosis administrada o bien en relación al valor promedio del grupo control en plasma (a los diferentes tiempos indicados) o en los diferentes tejidos/órganos y heces de 48 h, según correspondiese. También se calculó el área bajo la curva a partir de las curvas dibujadas por los niveles plasmáticos de radiactividad medidos para cada individuo. La extracción lipídica de los diferentes tejidos/órganos se realizó con isopropanol-hexano (Hara and Radin 1978). La fracción lipídica (hexano) se secó mediante una corriente de gas nitrógeno y el extracto lipídico resultante fue alojado en viales de recuento hasta que el disolvente se secase completamente antes de añadir un volumen de 4 mL de líquido de centelleo. La cantidad de radiactividad debida al [^{14}C] en ácidos biliares se determinó en la fracción acuosa de la extracción.

III.6.2 Metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas

III.6.2.1 Cinética catabólica in vivo de las LDL de ratón marcadas con [³H]-colesterol oleato

La cinética de aclaramiento de las LDL se realizó utilizando la fracción LDL aislada por ultracentrifugación a partir de plasma de ratones deficientes en *Ldlr* (con idéntico fondo genético) y marcada con [³H]-colesterol oleato ([³H]-LDL) se inició mediante su inyección por la vena de la cola de 500.000 cpm por ratón en un volumen final de 100 μ L de salino. La cantidad de [³H]-LDL inyectada por ratón fue siempre inferior al 5% de los niveles plasmáticos de LDL. Se monitorizaron los niveles plasmáticos de cuentas debidas a [³H] a los tiempos indicados tras la inyección. Para este ensayo los animales no fueron privados de alimento. Los niveles plasmáticos de [³H] se recolectaron a través de una pequeña incisión en el extremo de la cola y su distribución en los diferentes tejidos/órganos se determinó mediante un contador β (Perkin Elmer). El seguimiento de los niveles de [³H] en plasma se realizó a partir de un volumen de 25 μ L de muestra. Los datos se expresaron como porcentaje de actividad vs dosis administrada o bien en relación al valor promedio del grupo control en plasma (a los diferentes tiempos indicados) o en los diferentes tejidos/órganos, según correspondiese. También se calculó el área bajo la curva a partir de las curvas exponenciales dibujadas a partir de los niveles plasmáticos de radiactividad medidos para cada individuo. La tasa fraccional catabólica se calculó tomando como valor la inversa del área bajo la curva y se expresó como [h^{-1}]. La tasa de

secreción para cada fracción no-HDL se calculó multiplicando la tasa fraccional catabólica por los *pools* plasmáticos de sus no-HDL (ie, el producto de los niveles plasmáticos de colesterol de no-HDL y el volumen de plasma) considerando que el volumen de plasma fue un 4% de su peso corporal. Los valores se expresaron como μmol colesterol de HDL $\cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$. La extracción lipídica de los diferentes tejidos/órganos se realizó con isopropanol-hexano (Hara and Radin 1978). La fracción lipídica (hexano) se introdujo en viales de recuento hasta que el disolvente se secura completamente antes de añadir 4 mL de líquido de centelleo.

III.6.2.2 Cinética catabólica in vivo de las HDL de ratón marcadas con [³H]-colesterol oleato

El análisis del metabolismo de las HDL se realizó utilizando HDL aisladas por ultracentrifugación marcadas con [³H]-colesterol oleato ([³H]-HDL). La cinética se inició mediante su inyección por la vena de la cola de 500.000 cpm por ratón en un volumen final de 100 μL de salino. La cantidad de [³H]-HDL inyectada por ratón fue siempre inferior al 5% de los niveles plasmáticos de HDL. Se monitorizaron los niveles plasmáticos de cuentas debidas a [³H] a los tiempos indicados tras la inyección. Para este ensayo los animales no fueron deprivados de alimento. Los niveles plasmáticos de [³H] se recolectaron a través de una pequeña incisión en el extremo de la cola y su distribución en los diferentes tejidos/órganos y en heces de 48 h se determinó mediante un contador β (Perkin Elmer) (**Figura 9**).

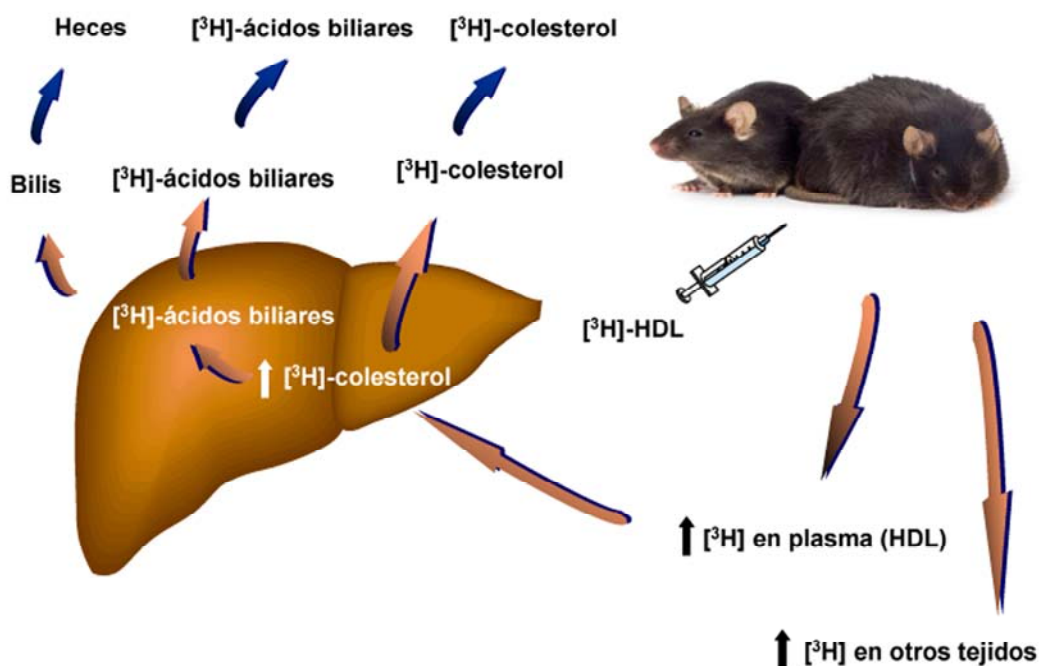


Figura 9 Distribución en diferentes compartimentos del marcaje radiactivo en un análisis metabólico estándar de HDL. La cinética catabólica se inició con la inyección por la vena de la cola de HDL marcadas con ^3H -colesterol oleato en ratones db/db y se comparó con la mostrada por los ratones db/db. Se monitorizaron los niveles plasmáticos de cuentas debidas a ^3H en plasma y HDL a los tiempos indicados, así como en hígado y heces a las 48 h de la inyección. El promedio de la radiactividad determinada en plasma a los 2 min de la inyección se definió como el 100% de la radiactividad inyectada.

El seguimiento de los niveles de ^3H en plasma se realizó a partir de un volumen de 25 μL de muestra. Los datos se expresaron como el porcentaje de actividad vs dosis inyectada en plasma a los tiempos indicados o en los diferentes tejidos/órganos y heces de 48 h, según correspondiese. Los valores también se expresaron en relación al valor promedio del grupo control en plasma (a los diferentes tiempos indicados). El área bajo la curva fue calculada a partir de las curvas dibujadas por los niveles plasmáticos de radiactividad medidos para cada individuo. La tasa fraccional catabólica se calculó

tomando como valor la inversa del área bajo la curva y se expresó como $[h^{-1}]$. La tasa de secreción para cada HDL se calculó multiplicando la tasa fraccional catabólica por los *pools* plasmáticos de sus HDL (ie, el producto de los niveles plasmáticos de colesterol de HDL y el volumen de plasma) considerando que el volumen de plasma fue un 4% de su peso corporal. Los valores se expresaron como $\mu\text{mol colesterol de HDL} \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$.

La extracción lipídica de los diferentes tejidos/órganos se realizó con isopropanol-hexano (Hara and Radin 1978). El extracto lipídico resultante (hexano) fue traspasado a viales de recuento hasta que el disolvente se secura completamente antes de añadir un volumen de 4 mL de líquido de centelleo. La cantidad de radiactividad debida al $[^3H]$ en ácidos biliares se determinó en la fracción acuosa obtenida a partir de la misma extracción.

III.6.3 Propiedades antiaterogénicas de las lipoproteínas HDL plasmáticas

III.6.3.1 Análisis in vitro del eflujo de colesterol desde macrófagos a la fracción plasmática de HDL

La capacidad exhibida por la fracción plasmática HDL para promover el eflujo de colesterol in vitro desde macrófagos a HDL es considerado como el primer paso del TRC (Escola-Gil, Lee-Rueckert et al. 2015). Su cuantificación se basó en la evaluación del eflujo de $[^3H]$ -colesterol desde células al medio de cultivo en presencia de un aceptor, en nuestro caso la fracción plasmática HDL, tal y como se ha descrito previamente (Escola-Gil, Lee-Rueckert et al. 2015). La línea de macrófagos utilizada para este ensayo fue la

J774.A1 (ATCC). Normalmente, el medio de cultivo empleado para su mantenimiento fue RPMI 1640 (Lonza) suplementado con antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina), 2 mM glutamina, 10% de suero bovino fetal (FBS) (Sigma).

En un ensayo clásico (**Figura 10**), los macrófagos J774.A1 se sembraron a una densidad celular de $1 \cdot 10^5$ células/cm² en placas de 12 pocillos (Corning). A las 24 h se descartó el medio de mantenimiento y se sustituyó por medio de marcaje (RPMI 1640 suplementado con 20 µg/mL de LDL acetilada, 4 µCi/mL de [³H]-colesterol, 5% FBS) durante 24 h. Seguidamente se descartó el medio de marcaje y tras un par de lavados con tampón fosfato salino estéril las células fueron equilibradas en medio RPMI 1640 base (sin FBS) suplementado con 0,2% de albúmina sérica bovina. La expresión del transportador Abca1 se indujo mediante la adición de 0,3 mM AMP cíclico (AMPC) en esta fase del procedimiento según correspondiese. Al día siguiente se descartó el medio de equilibrado y tras lavar un par de veces con tampón salino fosfato se añadió medio RPMI 1640 base en presencia/ausencia de la fracción HDL de los diferentes grupos experimentales durante 4 h.

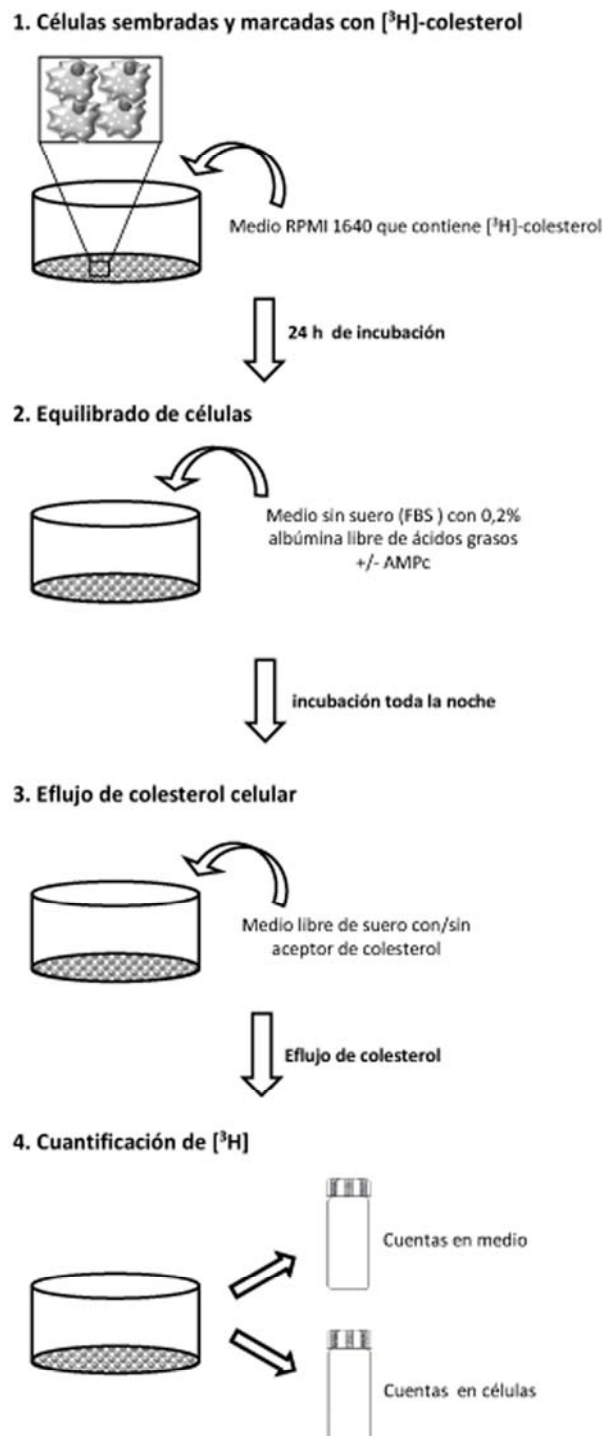


Figura 10 Diagrama representativo de un protocolo estándar de evaluación de la capacidad de eflujo de colesterol desde macrófagos a HDL. La capacidad de eflujo de colesterol por parte de HDL desde macrófagos J774.A1 se determinó tomando la radiactividad $[^3\text{H}]$ liberada al medio de cultivo al cabo de 4 h de incubación con la fracción plasmática de HDL de ratones. Los datos se expresaron en porcentaje de radiactividad liberada al medio en relación con la radiactividad total (que equivale a la suma de radiactividad contenida en células y medio).

El eflujo de colesterol se expresó como el porcentaje de radiactividad [^3H] en el medio en relación a la radiactividad total (células y medio).

III.6.3.2 Evaluación del TRC-m

En el presente trabajo ejecutamos el procedimiento estándar de TRC-m previamente descrito (Escola-Gil, Lee-Rueckert et al. 2015) (**Figura 11**). Las células J774.A1 (ATCC) se cultivaron en flascos de cultivo celular de 75 cm^2 a una razón de $5 \cdot 10^6$ células/flascón hasta alcanzar un 90% de confluencia en medio RPMI 1640 suplementado con 10% FBS. Las células fueron incubadas en presencia de $5\text{ }\mu\text{Ci/mL}$ de [$1\alpha,2\alpha(n)\text{-}^3\text{H}$]-colesterol, $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ de LDL acetilada, y 10% de plasma libre de lipoproteínas. Los macrófagos marcados fueron lavados con tampón fosfato salino, equilibrados en medio RPMI 1640 base, desadheridos y resuspendidos en 0,9% NaCl.

Antes de la inyección intraperitoneal, normalmente se realizó un conteo celular y análisis de la viabilidad utilizando azul tripano como colorante de exclusión vital. De acuerdo con el protocolo estándar los ratones fueron exsanguinados a las 48 h y sus hígados extraídos. La radiactividad en plasma se determinó mediante líquido de centelleo en un contador β (Perkin Elmer). La radiactividad debida al [^3H]-colesterol asociada a HDL se determinó después de precipitar las lipoproteínas que contienen apon con reactivo fosfotúngstico y cloruro de magnesio (Roche diagnostics). El [^3H]-colesterol asociado a HDL representó más del 80% plasma total.

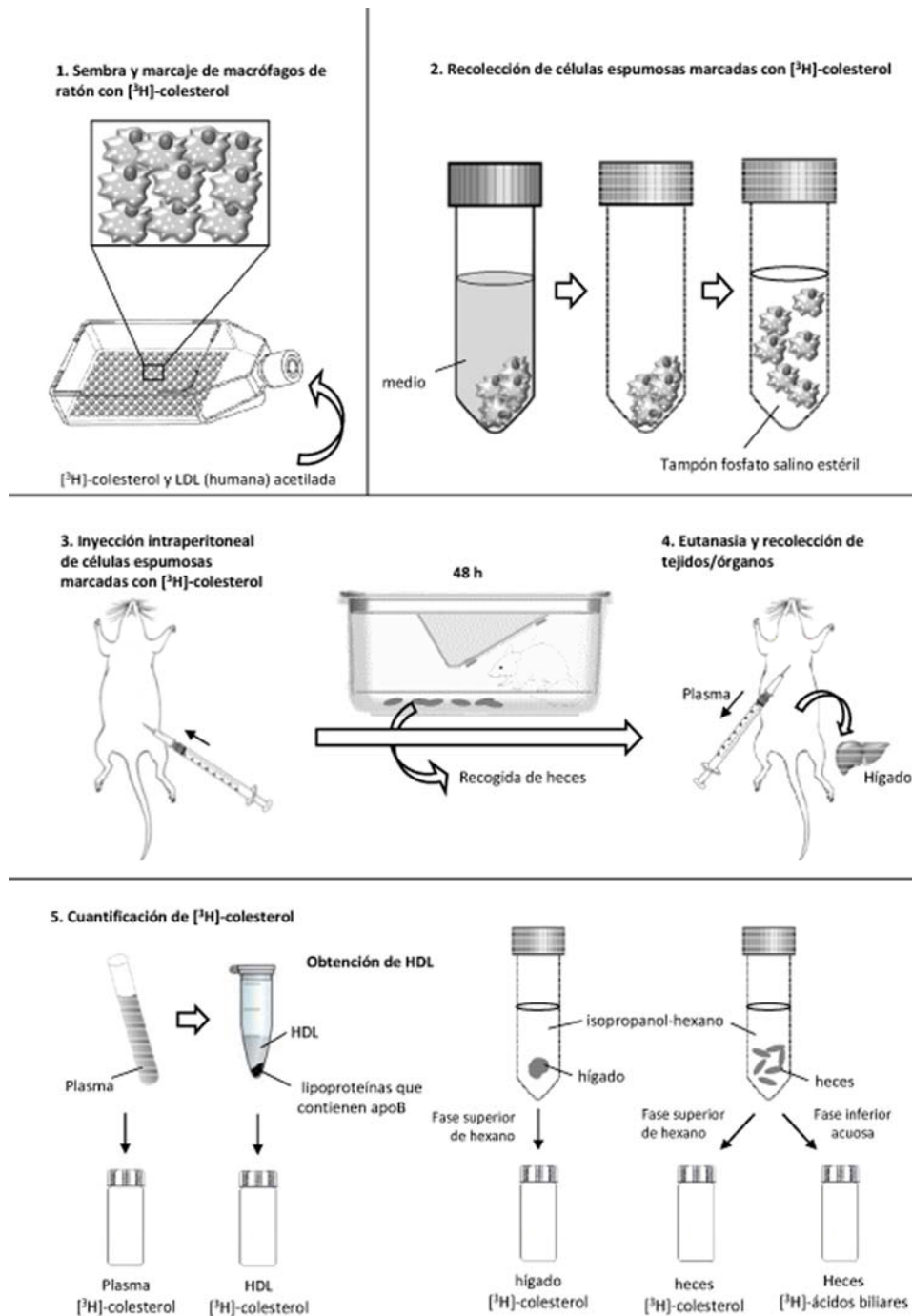


Figura 11 Diagrama representativo de un protocolo estándar de evaluación de TRC in vivo específico de macrófagos. Las células J774.A1 (ATCC) se cultivaron en flasks de cultivo celular de 75 cm² hasta alcanzar un 90% de confluencia en medio RPMI 1640 suplementado con 10% FBS. Las células fueron incubadas en presencia de medio de marcaje que contenía el $[^3\text{H}]$ -colesterol. Tras resuspender los macrófagos en 0,9% NaCl y comprobar que su número y viabilidad eran adecuados, estos se inyectaron ip en ratones. De acuerdo con el protocolo estándar, los ratones fueron exsanguinados a las 48 h y sus hígados extraídos para determinar el porcentaje de radiactividad vs dosis inyectada encontrada en plasma, HDL, hígado y heces a las 48 h. En el caso de las heces se determinó el porcentaje de radiactividad vs dosis inyectada en la fracción lipídica ($[^3\text{H}]$ -colesterol) y acuosa $[^3\text{H}]$ -ácidos biliares de las heces.

Los lípidos hepáticos fueron extraídos con isopropanol-hexano tal y como se ha descrito previamente. También se determinó la proporción relativa (%) de colesterol libre en extractos lipídicos de biopsias de hígado (50 mg) mediante cromatografía en capa fina (Whatman). Para ello, el extracto lipídico resuspendido en 50 μ L de cloroformo se aplicó en placas las placas de silicagel. Dado que [i] el exceso de lípidos en las biopsias de hígado de ratones db/db podría comprometer una separación adecuada de las diferentes especies lipídicas por medio de este sistema y [ii] el objetivo fue detectar alteraciones en la proporción relativa de colesterol libre respecto del total, se igualó la cantidad de lípidos de hígado cargada por carril en los diferentes grupos experimentales. La separación cursó en una campana saturada de gases conteniendo una mezcla de disolventes (hexano:dietil éter:etilacetato; 50:50:1,5, v:v:v) hasta resolver las moléculas más polares de las más apolares. Para poder realizar el seguimiento de la migración relativa de las diferentes especies lipídicas de interés, en nuestro caso, colesterol libre y esterificado, se utilizó una estándar conteniendo una concentración conocida (1 g/L) de ambos lípidos. Al finalizar la cromatografía las placas se dejaron secar en una campana de extracción de gases y se tiñeron con yodo. La cuantificación de la radioactividad asociada a cada banda (debida al colesterol esterificado y libre en cada muestra) se cuantificó mediante un contador β (Perkin Elmer) tras su resuspensión con líquido de centelleo. Para ello, las bandas reveladas por la sublimación de las escamas de yodo fueron extraídas y alojadas en viales de recuento apropiados.

El intestino delgado, desde el duodeno hasta el íleo, fue extraído para el análisis de expresión génica. El material fecal fue recolectado a las 48 h. La fracción lipídica fue recolectada, el solvente evaporado y la radiactividad debida al [³H]-colesterol medida en un contador β (Perkin Elmer) mediante su resuspensión con líquido de centelleo. La fracción de [³H] detectada en los ácidos biliares fecales se determinó a partir de la porción acuosa restante del extracto lipídico de heces. La distribución de la actividad debida al [³H] en los diferentes tejidos/muestras se expresó como el porcentaje de radiactividad vs la dosis inyectada.

III.6.3.3 Evaluación de las propiedades antioxidantes de HDL

La susceptibilidad a la oxidación de las HDL de las diferentes líneas de ratones y su capacidad antioxidante de LDL se evaluó in vitro en mezclas de LDL+HDL en presencia de un agente oxidante monitorizándose el grado de oxidación de las lipoproteínas (Julve, Escola-Gil et al. 2013). Al incubar lipoproteínas en presencia de un catalizador de la oxidación se produce una reestructuración de los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados que dan lugar a los dienos conjugados (dobles enlaces alternados con enlaces simples) y esta estructura puede ser detectada por su absorbancia a 234 nm. Durante la oxidación se pueden distinguir varias fases: la fase de latencia (*lag phase*) en la cual las defensas antioxidantes de la lipoproteína actúan y la oxidación es lenta, posteriormente hay una fase exponencial o de propagación donde la oxidación ocurre de manera rápida. Posteriormente al agotarse los sustratos

oxidables de la lipoproteína se llega a un máximo a partir del cual hay una fase de descomposición donde estos dobles enlaces se descomponen dando lugar a productos finales de la oxidación (peróxidos, hidróxidos, aldehídos y acetonas). Se define el tiempo de la fase lag (que denominaremos *lag time*) como la intersección entre la línea de la pendiente máxima y la prolongación horizontal del valor de la absorbancia inicial (Figura12).

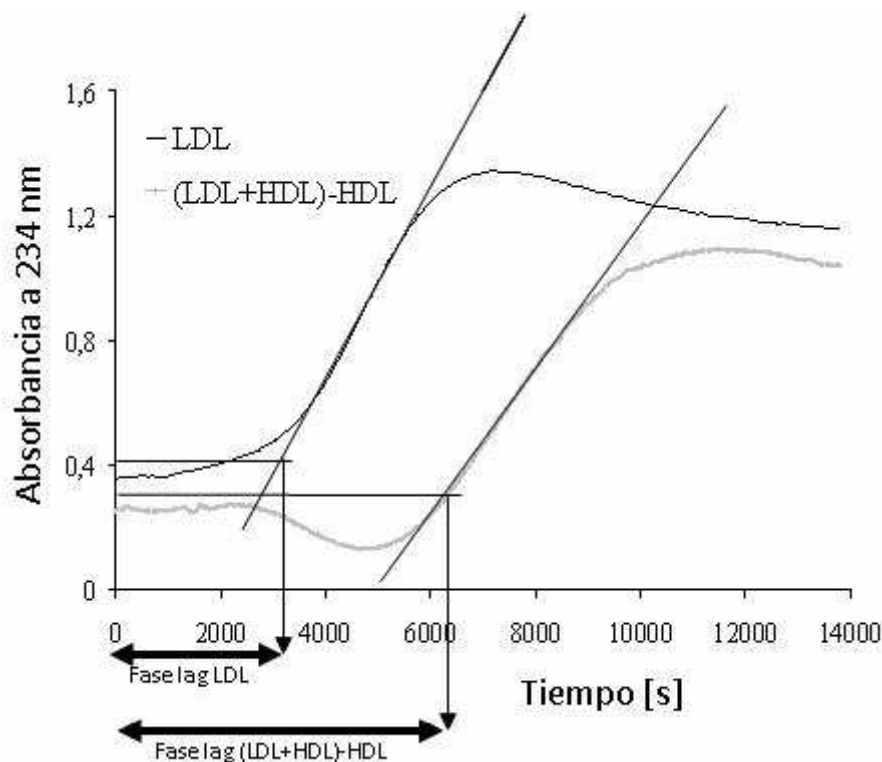


Figura 12 Monitorización de la formación de dienos conjugados: Gráfico representativo del ensayo de monitorización de la formación de dienos conjugados a lo largo del tiempo de LDL solàs y en una mezcla con HDL en presencia de CuSO_4 . Para eso se midió el tiempo de la fase lag que es la intersección entre la línea de la pendiente máxima y la prolongación horizontal del valor de la absorbancia inicial.

Las lipoproteínas aisladas a partir de mezclas de plasmas de ratones se dializaron en tampón fosfato salino mediante columnas PD-10 (GE Healthcare). La oxidación se inició al añadir 2,5 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 a LDL humanas (0,1 mM fosfolípidos) en ausencia/presencia de los diferentes tipos de HDL (0,1 mM de fosfolípidos). La formación de dienos conjugados se determinó en un lector de microplacas Synergy HT (BioTek Synergy) mediante la monitorización continua de la absorbancia a longitud de onda de 234 nm a una temperatura de 30°C durante no más de 5 h. El *lag time* se calculó tal como se ha descrito previamente. La cinética de oxidación de la LDL en las mezclas de HDL+LDL de cada condición se calculó mediante la sustracción de la cinética de oxidación de sus correspondientes HDL (**Figura 2.8**).

El porcentaje de protección por parte de las diferentes HDL contra la oxidación de LDL se calcularon a partir de los valores de *lag time* y se expresaron en relación con aquellos mostrados por las LDL en ausencia de HDL. El efecto antioxidante de LDL por parte de HDL y su susceptibilidad a la oxidación también se expresó relativos al promedio de valores del grupo control.

III.6.3.4 Actividad antiinflamatoria de HDL en un ensayo in vitro con una línea monocitos humanos (THP-1) diferenciados a macrófagos

La capacidad antiinflamatoria de las HDL de los diferentes grupos experimentales se abordó a través de su efecto sobre la inducción de la expresión de *TNFA* inducida por LDLox en macrófagos derivados de la línea monoclónica THP1 (ATCC) adaptando un

método ya publicado (Kume, Murase et al. 1998). Todos los procedimientos se realizaron en unas condiciones libres de endotoxinas. Brevemente, se sembraron los monocitos THP-1 a una densidad de $2 \cdot 10^6$ células/mL/pocillo en una placa de 12 pocillos (Corning) y se incubaron en medio RPMI 1640 suplementado con antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomina), 2 mM glutamina, 10% de suero bovino fetal (FBS) (Sigma) en presencia de un éster de forbol (*phorbol myristate-acetate*, PMA) (a una concentración final de 0,05 μ g/mL) para diferenciarlas a macrófagos durante 24 h. Trascurridas 72 h, se descartó el medio de cultivo diferenciador y, según la condición experimental, las células se incubaron con medio RPMI 1640 base en presencia/ausencia de LDLox humanas (a una concentración final de fosfolípidos de 0,05 mM) y en presencia/ausencia de HDL aisladas por ultracentrifugación (a una concentración final de fosfolípidos de 0,05 mM) a 37°C durante 2 h. Trascurrido este tiempo, se recolectó el medio de cultivo y tras lavar las células con tampón fosfato salino un par de veces se añadió solución de lisis de kit de extracción de RNA (RNeasy mini kit, Qiagen). La extracción y purificación de RNAm así como el análisis de la expresión génica de *TNFA* por RT-PCR a tiempo real se realizó según se ha descrito previamente. La capacidad antiinflamatoria por parte de las diferentes HDL se expresó en términos relativos en relación con el promedio de valores de expresión de *TNFA* obtenidos en presencia de LDLox en ausencia de HDL.

III.7 Análisis estadísticos

El análisis de los resultados experimentales se realizó mediante diferentes test dependiendo del [i] número de grupos experimentales y de [ii] si los datos se ajustaron a una distribución normal. En el caso de ajustarse los datos a una distribución normal el análisis de los resultados se realizó mediante un test t de Student si se compararon dos grupos experimentales o un one way-ANOVA, con un posttest de Tukey para comparar entre las diferentes grupos, si se compararon más de dos. En el caso de que la muestra no se ajustara a una distribución normal, se utilizó el tests no paramétrico de la U de Mann-Whitney, en caso de comparar dos grupos, o el test de Kruskal-Wallis, con un posttest de Dunns, para comparar dos o más grupos respectivamente. Los análisis se realizaron con el paquete estadístico GraphPad Prism (versión 6.0 para Windows) y Microsoft Excel. Se consideró estadísticamente significativo valores de $P < 0,05$.

IV – RESULTADOS

IV.I Caracterización metabólica y lipoproteica de ratones db/db

IV.I.1 Análisis de la adiposidad

Tal y como se muestra en la **Tabla 5**, en el período de estudio la ganancia de peso corporal observada en los ratones db/db fue superior (~1,5 veces; $P < 0.001$) a la que presentaron los ratones control.

Tabla 5 Parámetros corporales, ingesta y estimación de la eficiencia calórica.

	Ctrl	db/db	P
Peso inicial [g]	28,4 ± 1,3	34,1 ± 1,3	<0,001
Peso final [g]	29,3 ± 1,2	50,7 ± 1,2	<0,001
Incremento de peso diario [g/día]	0,03 ± 0,8	0,58 ± 1,1	<0,001
Consumo de comida [g/día]	3,5 ± 1,0	5,0 ± 0,4	<0,01
Consumo de bebida [mL/día]	8,4 ± 2,8	12,5 ± 2,6	<0,01
Eficiencia calórica [g/kcal ingerida]	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,02	ns

Valores expresados como el promedio ± desviación estándar (n=5 animales por grupo). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control. Abreviaciones: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db; ns, no significativo.

Consistentemente, el promedio de gramos adquiridos por día fue cerca de 20 veces superior en los ratones db/db (**Tabla 5**). Este hallazgo se encontró asociado con un consumo de comida (1,4 veces; $P < 0.01$) y bebida (1,6 veces; $P < 0.01$) significativamente aumentados por parte de los ratones db/db en comparación con los controles (**Tabla 5**). Habida cuenta que la eficiencia calórica del total ingerido

(expresada como ganancia de peso en gramos por cada kcal ingerida) no difirió en ambos grupos (**Tabla 5**), el aumento de adiposidad en los ratones db/db (**Figura 13; paneles A y B**) y el porcentaje de adiposidad en función del peso corporal (**Figura 13; panel C**) revelaron que la mayor parte de las calorías (kcal) ingeridas quedaron predominantemente almacenadas en forma de grasa.

De todos los depósitos adiposos analizados, la acumulación de grasa subcutánea fue el cuantitativamente más importante en los ratones db/db en comparación con los controles (**Tabla 6**). En relación con el peso corporal la grasa subcutánea fue la única masa adiposa que se encontró proporcionalmente más elevada (+41%; $P=0,001$).

Tabla 6 Regionalización de la adiposidad en los ratones db/db.

	Ctrl	db/db	P
Grasa total [g]	2,23 ± 0,15	13,45 ± 1,00	<0,001
Grasa epididimal [g]	0,67 ± 0,07	2,75 ± 0,23	<0,01
Grasa perirenal [g]	0,24 ± 0,03	1,24 ± 0,20	<0,01
Grasa visceral [g]	0,45 ± 0,03	2,17 ± 0,15	<0,001
Grasa subcutánea [g]	0,88 ± 0,06	7,29 ± 0,70	<0,001

Valores expresados como el promedio ± desviación estándar (n=8-12 animales por grupo). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control. Los datos de lípidos se han obtenido a tiempo final. Abreviaciones: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db.

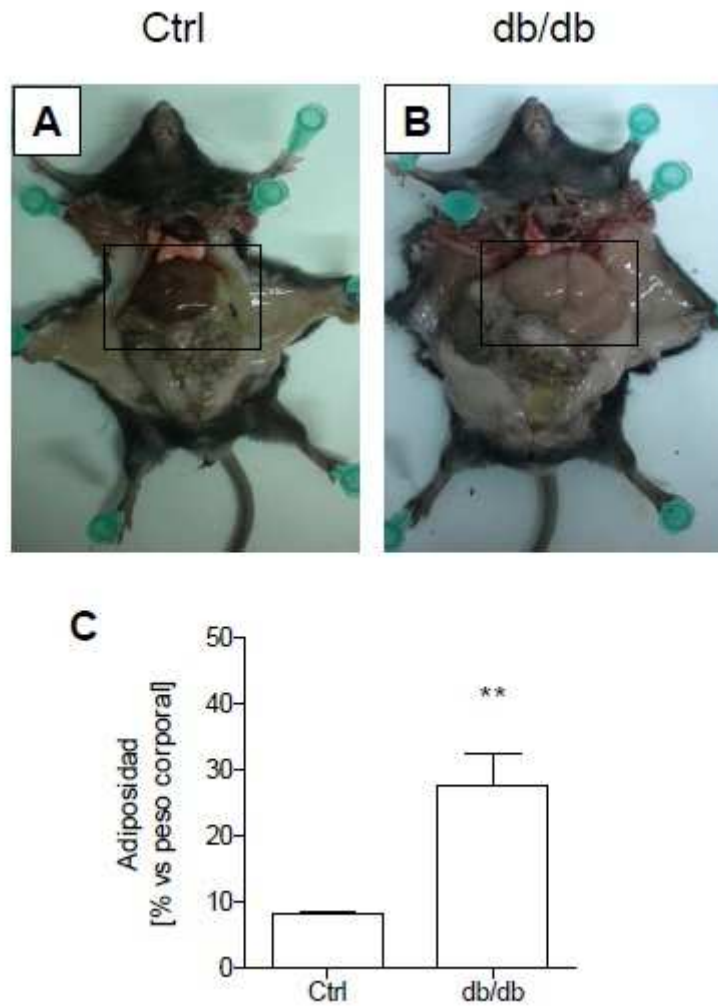


Figura 13 Adiposidad en los ratones db/db y sus controles. En los paneles superiores (A y B) se presenta una fotografía representativa mostrando la acumulación diferencial de adiposidad en ratones control (panel A) y db/db (panel B). Aparte de los depósitos de grasa claramente distinguibles (sobre todo grasa epididimal, visceral y subcutánea), la fotografía también mostró evidencias de acumulación de grasa ectópica en el hígado (rectángulo sobreimpresionado) a juzgar por su aspecto y coloración, amarillenta, en un representante de la línea db/db (panel B). En el panel C se muestra el porcentaje de adiposidad en relación al peso corporal calculado para ambos grupos de ratones. Barra de escala = 10 mm. Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db.

IV.I.2 Efecto de la adiposidad sobre el desarrollo de esteatosis hepática

El tamaño del hígado de los ratones diabéticos se encontró aumentado en comparación con el de los controles (**Tabla 7; Figura 13**). Dicho aumento fue proporcional al del peso corporal (**Tabla 7**).

Tabla 7 Pesos y parámetros bioquímicos hepáticos.

	Ctrl	db/db	P
<i>Peso y enzimas hepáticas plasmáticas</i>			
Peso del hígado [g]	1,6 ± 0,1	4,6 ± 0,3	<0,001
Relación peso del hígado/peso corporal [unidades relativas]	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	ns
ALT [U/L]	21,1 ± 1,7	119,1 ± 18,0	<0,001
AST [U/L]	68,7 ± 9,7	121,1 ± 34,0	<0,001
<i>Lípidos hepáticos</i>			
Colesterol [μmol/g de hígado]	2,2 ± 0,3	2,3 ± 0,2	ns
Colesterol libre [%]	89,5 ± 13,9	28,0 ± 3,8	<0,01
Fosfolípido [μmol/g de hígado]	5,2 ± 0,3	5,0 ± 3,0	ns
Triglicéridos [μmol g de hígado]	1,7 ± 0,6	47,0 ± 8,8	<0,001
Ácidos grasos [μmol/g de hígado]	2,8 ± 0,2	3,8 ± 0,3	<0,05

Valores expresados como el promedio ± desviación estándar (n=5 animales por grupo). Los valores plasmáticos Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control. Abreviaciones: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db; ALT, alanina transaminasa; AST, aspartato transaminasa; ns, no significativo.

Consistentemente, el aumento en el peso del hígado en los ratones db/db se encontró asociado a un aumento en los niveles plasmáticos de las enzimas plasmáticas ALT y AST en comparación con los niveles de los ratones controles (**Tabla 7**).

El aspecto general del hígado de los ratones db/db se correspondió con uno esteatótico (**Figura 13**). Aparte del aumento de tamaño, a simple vista mostró un viraje a colores más amarillo en comparación con el de los controles (**Figura 13; paneles A y B**).

La acumulación de lípidos en el hígado se pudo además evidenciar mediante su análisis microscópico y bioquímico. Las preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina (H&E) obtenidas a partir de cortes histológicos de biopsias de hígado incluidos en parafina revelaron que los hepatocitos de los ratones db/db presentaron un gran número de enormes vacuolas en su citosol (**Figura 14; panel B**). Las preparaciones obtenidas a partir de cortes histológicos de especímenes incluidos en OCT teñidas con ORO confirmaron una acumulación masiva de lípidos neutros en su interior (**Figura 14; panel C**). Los análisis bioquímicos mostraron que la acumulación de lípidos en el hígado de los ratones db/db se atribuyó fundamentalmente a un aumento en la acumulación sobretodo de triglicéridos y de ácidos grasos en este órgano (**Tabla 7**). El aumento en los niveles de triglicéridos y ácidos grasos hepáticos se encontró asociado con un aumento concomitante pero moderato en la expresión de *Acac* y *Fasn*, que codifican enzimas que catalizan pasos clave en la síntesis de ácidos grasos (**Tabla 8**). Sin embargo, no se alcanzaron

cambios significativos en la expresión de *Dgat1*, cuyo producto participa en la síntesis de triglicéridos.

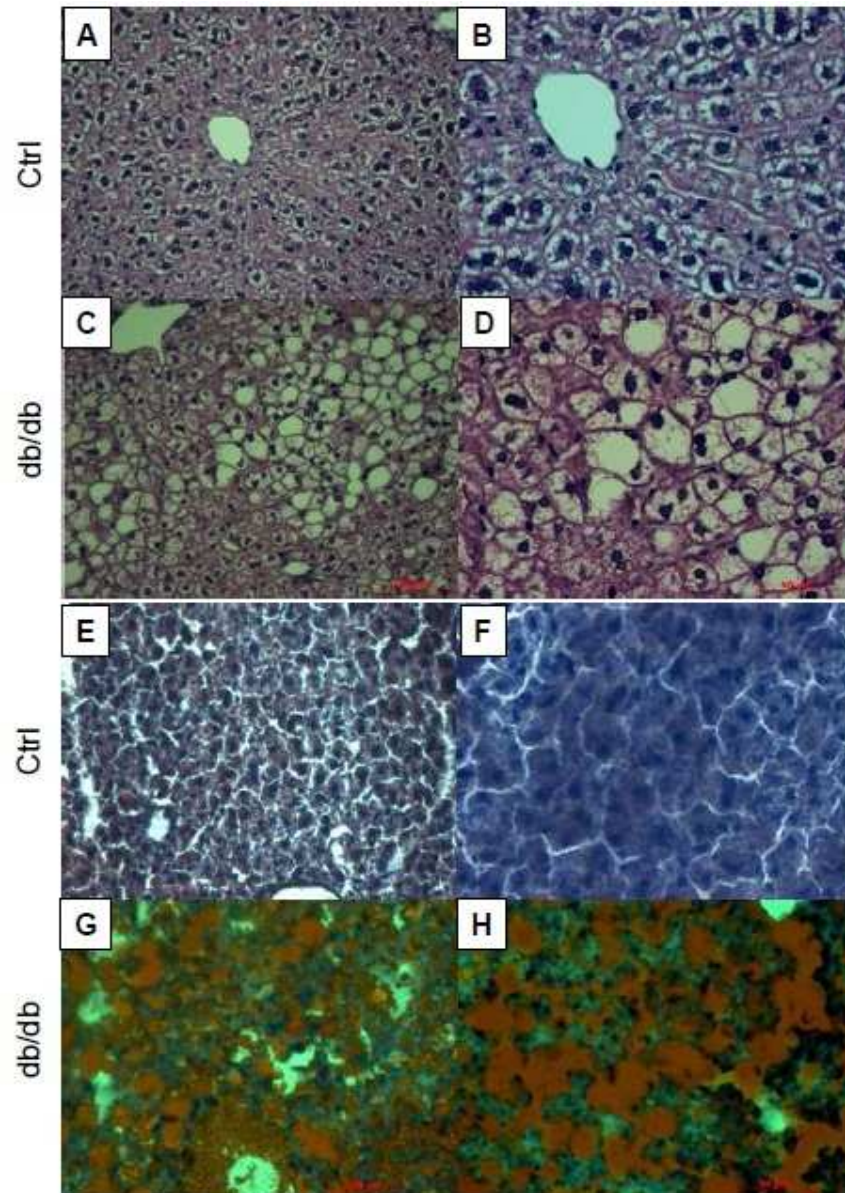


Figura 14 Análisis histológico de secciones de hígado de ratones db/db y sus controles. Las secciones histológicas fueron teñidas con H&E (paneles A, B, C y D) y ORO (paneles E, F, G y H). El grado de esteatosis hepática está aumentado en los ratones db/db y destaca por un elevada vacuolización en las imágenes teñidas con H&E (paneles C y D), el cual no se visualiza en los ratones Ctrl (paneles A, B). La esteatosis se distinguió también mediante tinción con ORO de los lípidos (vesículas rojas). Barras de escala = 100 μm (paneles A, C, E y G); y 50 μm (paneles B, D, F y H). Abreviaciones: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db; H&E, tinción con hematoxilina-eosina.

Tabla 8 Perfil de expresión génica de marcadores de esteatosis hepática.

	Ctrl	db/db	P
<i>Pparg</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	1,9 ± 0,1	<0,01
<i>Cd36</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	5,5 ± 0,5	<0,001
<i>Srebp1c</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	0,4 ± 0,1	<0,01
<i>Fasn</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,2	2,9 ± 0,8	<0,05
<i>Acac</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	2,0 ± 0,2	<0,01
<i>Dgat1</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	0,7 ± 0,0	ns
<i>Chrebp</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	0,4 ± 0,1	<0,01
<i>Lpl</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,3	0,3 ± 0,1	<0,05

Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar (n=5 animales por grupo). Los valores plasmáticos Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control. Abreviaciones: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db; *Acac*, gen que codifica el enzima acetilCoA carboxilasa; *Cd36*, gen que codifica el “cluster differentiation” 36, también conocida como traslocasa de ácidos grasos; *Chrebp*, gen que codifica la proteína de unión a elemento de respuesta a carbohidratos; *Dgat1*, gen que codifica el enzima diacilglicérido O-acyltransferasa; *Fasn*, gen que codifica el enzima sintasa de ácidos grasos; *Lpl*, gen que codifica el enzima lipoproteína lipasa; ns, no significativo; *Pparg*, gen que codifica el receptor activador de la proliferación peroxisomal, isoforma gamma; *Srebp1c*, gen que codifica la proteína de unión a elemento de respuesta a esteroides, isoforma 1c.

Además de los marcadores de esteatosis hepática antes mencionados también se encontró un aumento en la expresión de otros cuya expresión se encuentra inducida en esteatosis hepática, tales como *Pparg*, *Cd36* (**Tabla 8**). Por contra, la expresión de otros genes también marcadores de hígado graso, tales como *Srebp1c* y *Chrebp*, se encontró reprimida en los ratones db/db en comparación con los controles (**Tabla 8**). Contrariamente a lo esperado, la expresión de *Lpl* se halló también disminuida.

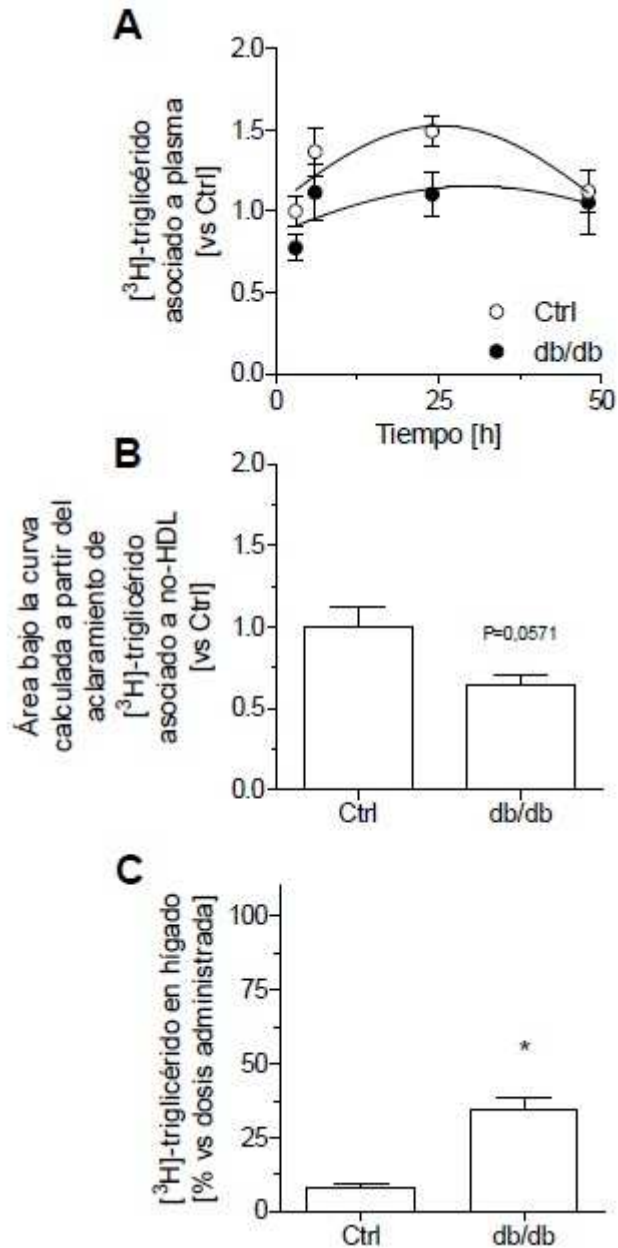


Figura 15 Destino metabólico del triglicérido de la dieta. Los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar (n=4). Se muestran los perfiles de actividad debida al [3 H]-triglicérido en plasma en un plazo de 48 h. Se analizaron los niveles de actividad para [3 H]-triglicérido en plasma y sus fracciones lipoproteicas a las 3, 6, 24 y 48 h tras su administración oral de aceite de oliva virgen. A. Distribución de [3 H]-triglicérido en plasma a los tiempos indicados. B. Promedio del área bajo la curva de las cinéticas de aclaramiento del [3 H]-triglicérido asociado a la fracción no-HDL plasmática. C. Porcentaje de [3 H]-triglicérido vs dosis administrada acumulado en el hígado en un plazo de 48 h. Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db; no-HDL, resto de fracciones lipoproteicas plasmáticas que se obtienen tras descontar las HDL del colesterol total.

Aunque el perfil de expresión génica sugiere una lipogénesis in vivo aumentada en el hígado, este proceso no fue estudiado directamente en el presente trabajo; principalmente porque este aspecto ya ha sido previamente resuelto por otros autores en el mismo modelo animal (Yen, Allan et al. 1976).

Alternativamente se estudió directamente el destino metabólico de los triglicéridos tras su ingesta mediante una sobrecarga oral y su posible contribución en el desarrollo de hígado graso en este modelo animal de obesidad. Para ello, se administró oralmente colesterol marcado con trioleína marcada con ^3H (^3H -triglicérido) mezclada en aceite de oliva virgen (típica actuación para evaluar experimentalmente su respuesta postprandial) y se monitorizaron los niveles de estas moléculas en el plasma, fracciones lipoproteicas, así como su acumulación en hígado en ambos grupos de ratones (**Figura 15**). El aclaramiento del ^3H -triglicérido medido en plasma y en la fracción no-HDL (principalmente involucrada en el transporte de este lípido en el plasma) no se observó significativamente cambiado ni en plasma total ni en la fracción plasmática no-HDL de los ratones db/db en comparación con los controles (**Figura 15; panel A y B**). Sin embargo, el ^3H -triglicérido se acumuló predominantemente en el hígado en el plazo de 48 h tras su administración (**Figura 15; panel C; $P < 0,05$**).

Otro de los componentes lipídicos frecuentemente aumentados en el hígado graso es el colesterol. Contrariamente a lo esperado, no se encontraron diferencias en los niveles de colesterol total expresado por gramo de hígado entre ambos grupos de

ratones. A pesar de ello, sí se observó una disminución significativa ($\sim 60\%$; $P < 0,01$) en el porcentaje de colesterol libre en el hígado de ratones db/db en comparación con el mostrado por los controles (**Tabla 8**). Resultados similares fueron alcanzados en relación al colesterol libre en el hígado utilizando una metodología diferente, la cromatografía en capa fina, en una muestra independiente (**Figura 16**). Los análisis densitométricos de las bandas identificadas como colesterol libre y esterificado confirmaron la disminución en la proporción de colesterol libre hepática en ratones db/db cercana al 40% ($P = 0,0079$) en comparación con la de los ratones control.

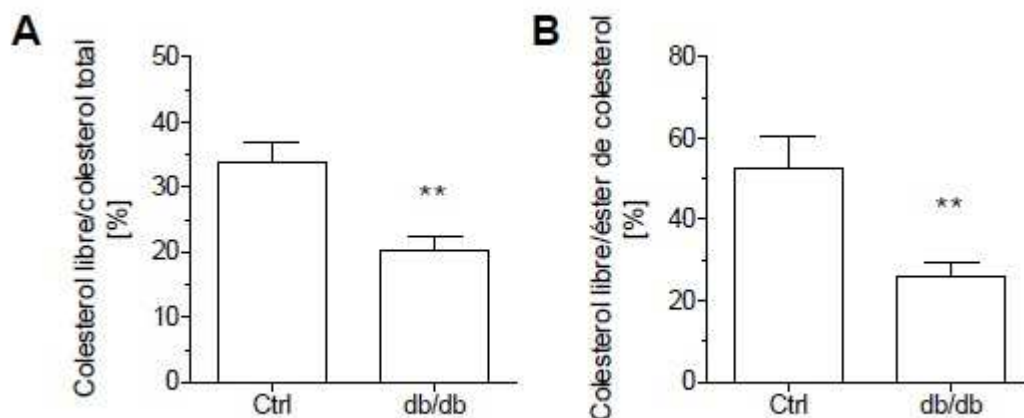


Figura 16 Análisis del porcentaje de colesterol libre en hígado de ratones db/db. Los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar ($n=5$). Se muestra el porcentaje de colesterol libre en relación al colesterol total (panel A) y al colesterol esterificado (Panel B) calculados a partir de los análisis densitométricos de las bandas correspondientes al colesterol libre y esterificado de extractos lipídicos de biopsias de hígado de ratones db/db y sus controles separadas por cromatografía en capa fina. ** $P < 0,01$ vs Ctrl. Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db.

IV.I.3 Efecto de la adiposidad sobre el metabolismo de la glucosa

Los niveles plasmáticos de glucosa alcanzaron niveles significativamente elevados tras deprivación de alimento (es decir, analizados a las 4 h después de la retirada de la comida). La concentración de glucosa plasmática también se encontró significativamente aumentada (~2 veces; $P < 0.001$) en los ratones db/db en comparación con los controles *ad libitum* (Tabla 9).

Tabla 9 Parámetros plasmáticos y pruebas funcionales relacionados con el metabolismo de la glucosa.

	Ctrl	db/db	P
<i>Ad libitum</i>			
Glucosa [mg/dL]	246,6 ± 5,5	540,2 ± 31,3	<0,001
Insulina [µg/L]	1,2 ± 0,2	55,9 ± 22,9	<0,001
HOMA IR	18,6 ± 3,5	1218,0 ± 72,8	<0,001
<i>Deprivación de alimento (4 h)</i>			
Glucosa [mg/dL]	76,3 ± 2,2	149,0 ± 19,6	<0,05
TTG [unidades relativas]	455,5 ± 60,0	1106,0 ± 416,2	<0,05
TSI [unidades relativas]	58,6 ± 12,0	164,7 ± 112,0	<0,05

Valores expresados como el promedio ± desviación estándar (n=5 animales por grupo). Los tests funcionales de la glucosa fueron efectuados tras 4 h de deprivación del alimento. Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control. Abreviaciones: Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db; ns, no significativo; TTG, test de tolerancia a la glucosa tras administración intraperitoneal de 1 g/kg de peso de glucosa; TSI, test de sensibilidad a la insulina tras administración intraperitoneal de 0,5 U/kg de peso de insulina porcina.

En paralelo, los niveles plasmáticos de insulina se encontraron aumentados (>40 veces; $P < 0.001$) en situación postprandial. Consistentemente, los indicadores de insulinoresistencia calculados también se observaron elevados en los ratones db/db (**Tabla 9**). Las pruebas funcionales del metabolismo de la glucosa revelaron una capacidad empeorada para aclarar la glucosa en los ratones db/db comparado con los ratones control (**Tabla 9**). Igualmente, la respuesta a la insulina por parte de los ratones db/db también se encontró alterada.

IV.I.4 Efecto de la adiposidad sobre los niveles plasmáticos de lípidos y características de las lipoproteínas plasmáticas

IV.I.4.1 Análisis de los niveles lipídicos plasmáticos y su distribución en lipoproteínas

La concentración plasmática de colesterol se encontró aumentada (+~3 y +~2 veces, respectivamente) en los ratones db/db en comparación con la de los controles (**Tabla 10**), principalmente debido a un aumento en concentración plasmática de colesterol de HDL y, aunque desde un punto de vista cuantitativo, en menor medida en la concentración del de no-HDL. Resultados similares al colesterol fueron observados en relación a los fosfolípidos y a su distribución en las fracciones lipoproteicas estudiadas (**Tabla 10**).

Tabla 10 Concentración de lípidos plasmáticos.

	Ctrl	db/db	P
Colesterol [mM]	2,2 ± 0,1	6,3 ± 0,1	<0,001
Colesterol libre [%]	30,8 ± 0,4	27,1 ± 0,3	ns
Colesterol de HDL [mM]	1,6 ± 0,0	5,1 ± 0,3	<0,001
Colesterol de no-HDL [mM]	0,6 ± 0,0	1,2 ± 0,1	<0,001
Fosfolípido [mM]	2,5 ± 0,1	5,5 ± 0,1	<0,001
Fosfolípido de HDL [mM]	2,1 ± 0,2	5,1 ± 0,3	<0,001
Fosfolípido de no-HDL [mM]	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,3	ns
Triglicéridos [mM]	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	ns

Los datos se expresan como el promedio ± desviación estándar (n=5 animales por grupo). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control. Los niveles de lípidos en las fracciones HDL fue determinado en los sobrenadantes tras precipitar con ácido fosfotúngstico, mientras la fracción no-HDL (lipoproteínas que contienen apoB) se obtuvo tras descontar los niveles del parámetro debidos a las HDL del total en plasma. Abreviaciones: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db; HDL, lipoproteínas de alta densidad; no-HDL, resto de fracciones lipoproteicas plasmáticas que se obtienen tras descontar las HDL del colesterol total; ns, no significativo.

El porcentaje de colesterol libre en plasma no difirió entre ambos grupos (**Tabla 10**).

Por último, no se observaron cambios substanciales en la concentración de triglicéridos entre ambos grupos experimentales.

Tabla 11 Masa circulante y composición de fracciones lipoproteicas plasmáticas.

	Ctrl	db/db	P
No-HDL			
Masa circulante [g/L]	0,8 ± 0,0	2,0 ± 0,0	<0,001
Colesterol esterificado [%]	6,5 ± 0,0	16,7 ± 0,4	<0,001
Colesterol libre [%]	4,6 ± 0,0	7,2 ± 0,0	<0,001
Fosfolípido [%]	16,2 ± 0,2	27,6 ± 0,5	<0,001
Triglicéridos [%]	21,5 ± 1,0	22,8 ± 1,2	ns
Proteínas [%]	21,5 ± 1,0	22,8 ± 1,3	ns
Relación componentes de superficie/núcleo	0,73 ± 0,03	1,35 ± 0,09	0,1
HDL			
Masa circulante [g/L]	2,9 ± 0,1	5,9 ± 0,3	<0,001
Colesterol esterificado [%]	11,9 ± 0,3	13,5 ± 0,1	<0,01
Colesterol libre [%]	4,2 ± 0,2	3,3 ± 0,1	<0,05
Fosfolípido [%]	28,9 ± 0,4	27,5 ± 0,6	ns
Triglicéridos [%]	4,9 ± 0,2	4,6 ± 0,2	ns
Proteínas [%]	50,0 ± 0,3	51,0 ± 0,5	ns
Relación componentes de superficie/núcleo	0,69 ± 0,06	0,46 ± 0,08	<0,05

Los datos se expresan como el promedio ± desviación estándar. Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control. Las lipoproteínas se aislaron mediante ultracentrifugación a partir de 4-5 *poles* de plasma de 2-3 ratones cada uno. Abreviaciones: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db; HDL, lipoproteína de alta densidad ($1,063 < d < 1,21$ g/mL); no-HDL, conjunto de fracciones lipoproteicas plasmáticas que se obtienen dentro del rango de densidad $1,006 < d < 1,063$ g/mL); ns, no significativo.

De acuerdo con los datos de lípidos antes descritos, la concentración plasmática de las fracciones lipoproteicas no-HDL y HDL circulantes aisladas mediante ultracentrifugación se encontraron consistentemente elevadas (no-HDL: >2 veces; $P < 0,001$; HDL: ~ +2 veces; $P < 0,001$) en los ratones db/db comparado con las de los ratones control (**Tabla 11**). El análisis bioquímico de las lipoproteínas plasmáticas de los ratones db/db reveló cambios también en su composición en comparación con la de los controles (**Tablas 11 y 12**).

El análisis de las lipoproteínas no-HDL (que contienen apoB) reveló además cambios significativos en diferentes componentes (**Tabla 11**). Así, su contenido relativo (%) en colesterol (~ +2,2 veces; $P < 0,001$) y fosfolípidos (~ +1,7 veces; $P < 0,001$) se encontró aumentado y asociado con una sorprendente disminución (-2 veces; $P < 0,001$) también significativa en el contenido relativo de triglicéridos.

Esto último llevó al estudio más exhaustivo de las especies de lipoproteínas plasmáticas que se recogen en la fracción no-HDL realizado mediante ultracentrifugación ($d < 1,006$ g/mL: lipoproteínas ricas en triglicéridos y a las que nos referiremos como LRT; $d > 1,006 - < 1,063$ g/mL; lipoproteínas ricas en colesterol; a las que nos referiremos como LDL) (**Tabla 12**).

Las lipoproteínas LRT presentaron un aumento mínimo (+16%; $P < 0,05$) aunque significativo en el porcentaje de triglicéridos, y una disminución en el porcentaje de colesterol libre (3 veces; $P < 0,05$) y fosfolípidos (2 veces; $P < 0,05$) (**Tabla 12**),

sugiriendo la presencia de partículas más grandes. La relación superficie/núcleo calculada a partir de los componentes de las lipoproteínas LRT aisladas a partir de plasma de los ratones db/db se encontró disminuida sugiriendo un aumento en su tamaño. Sin embargo, la relación entre los triglicéridos y las proteínas no confirmó esta hipótesis.

Por otro lado, el aumento en la concentración de las lipoproteínas LDL se asoció a un aumento relativo equivalente en su contenido de colesterol esterificado y fosfolípidos (en ambos lípidos $> +40\%$; $0,001$), mientras que el porcentaje de triglicéridos se encontró disminuido (-37% ; $P < 0,001$) (**Tabla 12**) en comparación con las de los controles, lo que en promedio sugeriría la presencia de partículas más pequeñas. La relación superficie/volumen calculada para las LDL pareció confirmar esta hipótesis. El cálculo de la relación lípidos/proteínas en estas lipoproteínas arrojó resultados similares siendo ello debido sobretudo a una disminución en su contenido relativo en triglicéridos (datos no mostrados).

Por último, las lipoproteínas HDL mostraron un aumento significativo sobretudo en su contenido en colesterol esterificado ($+23\%$; $P < 0,001$) (**Tabla 11**) lo que se traduciría en un aumento en su tamaño en promedio. La relación superficie/volumen calculada para las HDL pareció confirmar esta hipótesis. El cálculo de la relación lípidos/proteínas en estas lipoproteínas arrojó resultados similares (datos no mostrados).

Tabla 12 Masa circulante y composición de lipoproteínas que contienen apoB.

	Ctrl	db/db	P
LRT			
Masa circulante [g/L]	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1	ns
Colesterol esterificado [%]	3,5 ± 0,3	3,0 ± 0,2	ns
Colesterol libre [%]	3,5 ± 0,3	1,1 ± 0,1	<0,001
Fosfolípido [%]	11,8 ± 1,0	5,0 ± 0,6	<0,001
Triglicéridos [%]	56,1 ± 2,4	65,5 ± 2,0	<0,05
Proteínas [%]	25,1 ± 1,7	25,4 ± 1,3	ns
Relación componentes de superficie/núcleo	0,69 ± 0,06	0,46 ± 0,08	<0,05
LDL			
Masa circulante [g/L]	0,4 ± 0,0	2,1 ± 0,1	<0,001
Colesterol esterificado [%]	11,0 ± 0,4	15,6 ± 0,3	<0,001
Colesterol libre [%]	6,4 ± 0,2	7,2 ± 0,2	ns
Fosfolípido [%]	16,4 ± 0,3	23,4 ± 0,5	<0,001
Triglicéridos [%]	36,3 ± 0,5	22,6 ± 0,8	<0,001
Proteínas [%]	29,8 ± 0,4	31,2 ± 0,4	ns
Relación componentes de superficie/núcleo	1,11 ± 0,02	1,62 ± 0,04	<0,05

Los datos se expresan como el promedio ± desviación estándar. Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control. Las lipoproteínas se aislaron mediante ultracentrifugación a partir de 4-5 *pooles* de plasma de 2-3 ratones cada uno. Abreviaciones: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db; LDL, lipoproteínas de baja densidad ($1,006 < d < 1,063$ g/mL); LRT, lipoproteínas ricas en triglicéridos (se encontrarían mezcladas las lipoproteínas de muy baja densidad de origen hepático e intestinal; $d < 1,006$ g/mL); ns, no significativo.

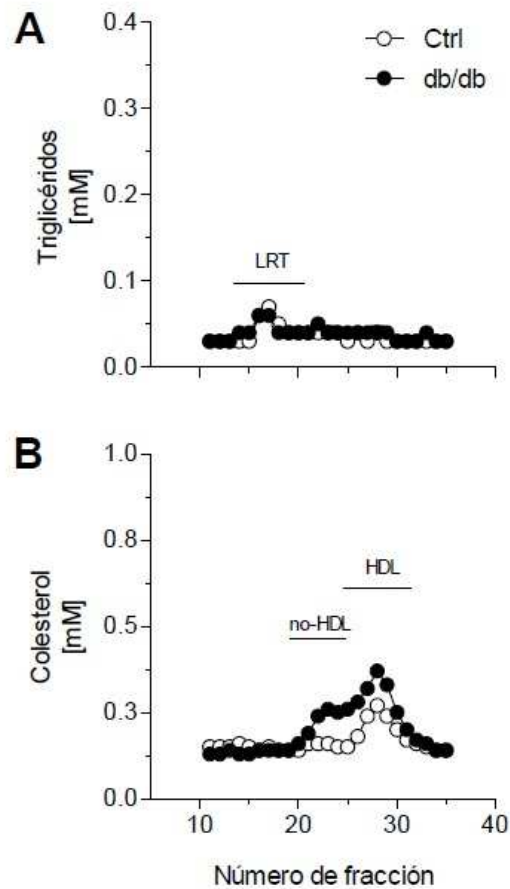


Figura 17 Perfiles de lipoproteínas plasmáticas separadas por FPLC. Las lipoproteínas plasmáticas se separaron en función de su tamaño en un sistema de dos columnas acopladas en serie de Superosa 6 adaptadas a un sistema FPLC. La separación se realizó en condiciones nativas a partir de plasmas (0,5 mL) de los grupos de ratones indicados. A. Perfil de triglicéridos. B. Perfil de colesterol. Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db; LDL, lipoproteínas de baja densidad; LRT, lipoproteínas ricas en triglicéridos; HDL, lipoproteínas de alta densidad.

Los niveles plasmáticos de las diferentes especies de lipoproteínas fueron también confirmados mediante un sistema de separación de lipoproteínas en función de su tamaño por FPLC (**Figura 17**). Consistentemente, el perfil lipoproteico definido mediante la medida de colesterol en las fracciones recogidas ratificó el aumento en la abundancia de lipoproteínas LDL y de HDL en plasma de los ratones db/db (**Tablas 11 y 12; Figura 17; panel A**).

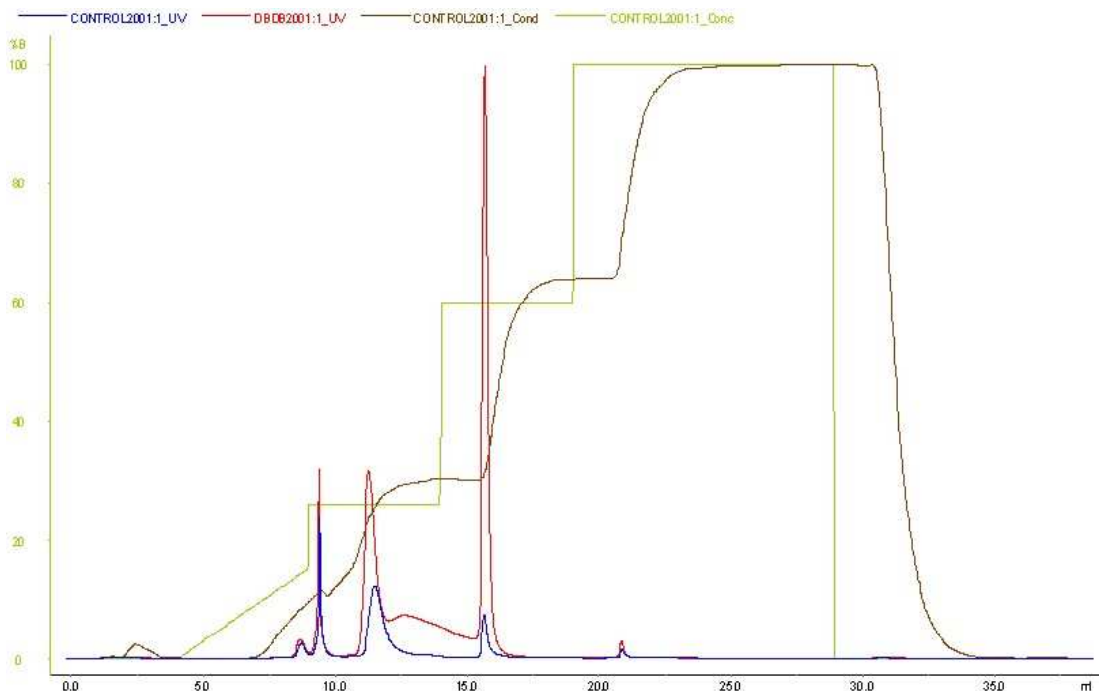


Figura 18 Perfil representativo de lipoproteínas LDL de ratones db/db separadas mediante cromatografía de intercambio aniónico. Se determinó el perfil cromatográfico de lipoproteínas aisladas por ultracentrifugación en el rango de densidades $1,006 < d < 1,063$ g/mL (ie, LDL) de hasta 3 *pooles* de plasmas. En color azul se representa el perfil cromatográfico de LDL de ratones control; en color rojo se muestra el perfil de las LDL de ratones db/db; en color verde se muestra el gradiente salino escalonado; y en color marrón se muestra conductividad (mS/cm). Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db.

El análisis de las lipoproteínas LDL de ratones db/db mediante cromatografía de intercambio aniónico mostró además un aumento relativo en la proporción de lipoproteínas LDL electronegativas ($\sim 51 \pm 5$ % vs LDL total) circulantes en comparación con la que presentaron los ratones control ($\sim 25 \pm 2$ % vs LDL total) (**Figura 18**; según se muestra en el pico que aparece a partir del minuto 15).

Pendiente de ser estudiado con mayor profundidad, unos niveles relativos de LDL con una mayor carga eléctrica negativa en los ratones db/db podrían estar en parte relacionados con un aumento en el contenido de ácidos grasos en esta subfracción lipoproteica. Consistentemente, el contenido en ácidos grasos mostraron una

tendencia a encontrarse aumentados ($\sim +32$ veces; $P=0,08$) en las lipoproteínas no-HDL de ratones db/db ($0,053 \pm 0,044$ mM; $n=3$ *pooles*) en comparación con la de los controles (Ctrl: $0,002 \pm 0,001$ mM) lo que podría contribuir en el aumento de la carga eléctrica negativa de las LDL aisladas a partir de esta fracción e incluso estar asociado con un aumento en su capacidad proinflamatoria. El origen del aumento en la electronegatividad de las LDL y su contribución, si alguna, en un empeoramiento de su funcionalidad no fue analizado en este trabajo al no ser uno de los objetivos de este trabajo, aun así merecería ser estudiado.

La separación de las lipoproteínas HDL aisladas por ultracentrifugación mediante electroforesis en gel en gradiente 4-20% y en condiciones no desnaturizantes confirmó el aumento en el tamaño de estas partículas en los ratones db/db

(Figura 19).

A pesar del aparente aumento tanto en el número de partículas HDL como en su tamaño promedio observado en los ratones db/db, la concentración plasmática de apoA-I no se encontró significativamente aumentada en estos mismos ratones

(Tabla 13).

Este dato contrastó con la concentración de proteínas de HDL calculada a partir de los estudios de composición de HDL de ambos grupos, cuyo valor casi se duplicó en los ratones db/db en comparación con el de los controles (**Tabla 13**), lo que quizás sugeriría la presencia de otras proteínas, además de la apoA-I, en estas lipoproteínas.

El análisis electroforético de estas lipoproteínas en función de su carga eléctrica en gel de agarosa reveló además cambios en cuanto a la proporción relativa de partículas pre β - y α -HDL de ambos grupos (**Tabla 13**). La fracción de partículas pre- β HDL constituye una población heterogénea de partículas HDL nacientes discoidales que transportan hasta un 25% del total de apoA-I plasmática. Consistentemente, el plasma de ratones control presentó un porcentaje de partículas pre β -HDL plasmáticas del 22,6%, que se correspondió con aproximadamente un 22,7% de la apoA-I circulante. Por otro lado, el porcentaje de pre β -HDL plasmáticas en ratones db/db (31,9%) se encontró aumentado ($\sim +40\%$; $P < 0,05$) en comparación con el de los controles. El equivalente en concentración plasmática de apoA-I asociado a esta fracción alcanzó un registro similar. Estos resultados sugirieron un aumento en la concentración plasmática de pre β -HDL en los ratones db/db.

En cuanto a la α -HDL, el cambio en su proporción relativa en plasma de db/db alcanzó ser un 10% inferior ($P < 0,05$) al de los controles. Curiosamente, el equivalente en concentración plasmática de apoA-I asociado a esta fracción en los ratones db/db no difirió del alcanzado por parte de los ratones control.

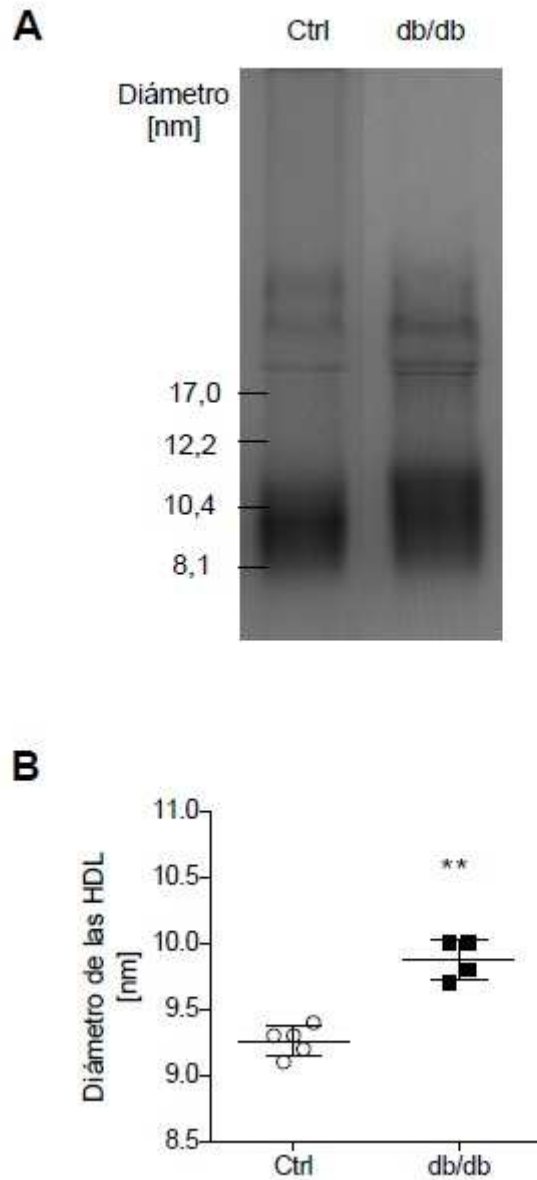


Figura 19 Tamaño de las HDL circulantes. A. Imagen representativa de la electroforesis de plasma en condiciones nativas para visualizar el tamaño de las HDL de ambos grupos. Las muestras de plasma fueron preteñidas con Negro Sudan B y separadas en un gel de poliacrilamida en gradiente 2-16%. B. Diámetro de las HDL calculado utilizando como referencia una estándar de proteínas de diámetros (nm) conocidos. Los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar (n=4-5 ratones). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control. Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db; HDL, lipoproteínas de alta densidad.

Sin embargo, cuando se tomaron los niveles plasmáticos de proteína de HDL estimados (en promedio) para cada grupo de animales en lugar de los de apoA-I para el cálculo de su equivalente en concentración asociado a pre β -HDL y α -HDL los niveles de proteína asociados a estas fracciones se encontraron aumentados (2,9 y 1,8 veces, respectivamente) en ratones db/db.

Tabla 13 Separación de HDL en función de su carga eléctrica y distribución de la apoA-I y proteína de HDL a partículas pre β - y α -HDL.

	Ctrl	db/db	P
Pre β -HDL [%]	22,6 \pm 0,9	31,9 \pm 1,2	<0,05
α -HDL [%]	77,4 \pm 0,9	68,1 \pm 1,2	<0,05
ApoA-I [g/L]	1,1 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	ns
Pre β -HDL (apoA-I) [g/L]	0,25 \pm 0,01	0,37 \pm 0,02	<0,05
α -HDL (apoA-I) [g/L]	0,85 \pm 0,03	0,79 \pm 0,04	ns
Proteína de HDL [g/L]	1,4 \pm 0,1	3,0 \pm 0,2	<0,05
Pre β -HDL (proteína) [g/L]	0,33 \pm 0,01	0,95 \pm 0,03	<0,05
α -HDL (proteína) [g/L]	1,12 \pm 0,01	2,04 \pm 0,03	<0,05

Los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar (n=4 por grupo). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control. El porcentaje de pre β -HDL se obtuvo tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos. Las concentraciones de apoA-I asociadas a pre β - y α -HDL se calcularon mediante el producto entre su valor relativo y la concentración de apoA-I en plasma. Por otro lado, se realizó el mismo cálculo pero considerando el promedio de la concentración de proteína de HDL aisladas a partir de *pools* de plasma mediante ultracentrifugación en lugar de la concentración plasmática de apoA-I. En este caso, el cálculo de la proteína de HDL se obtuvo mediante el producto de la masa circulante de HDL, obtenidas por ultracentrifugación a partir de 4-5 *pools* de plasma de 2-3 ratones cada uno, por su contenido relativo en proteínas. Abreviaciones empleadas: apo, apolipoproteína; Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db; ns, no significativo.

Tabla 14 Perfil de expresión de genes en hígado y niveles plasmáticos de actividad enzimática de dianas moleculares asociadas a HDL que intervienen en su maduración y remodelaje.

	Ctrl	db/db	P
Genes			
<i>Lcat</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	0,4 ± 0,0	<0,01
<i>Pltp</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,0	<0,01
<i>Lipc</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	0,2 ± 0,0	<0,01
Actividades enzimáticas			
LCAT [nmol·mL ⁻¹ ·h ⁻¹]	162,0 ± 10,2	236,5 ± 31,9	<0,05
PLTP [nmol·mL ⁻¹ ·h ⁻¹]	18,2 ± 0,7	33,3 ± 2,5	<0,05

Los datos se expresan como el promedio ± desviación estándar (n=5 por grupo). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control. Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db; LCAT, lecitina:colesterol aciltransferasa; *Lipc*, gen que codifica la lipasa hepática; PLTP, proteína transferidora de ésteres de colesterol.

La maduración de las partículas pre β -HDL en α -HDL esféricas es un proceso mediado por la LCAT. En el plasma, las HDL son también remodeladas, principalmente por la lipasa hepática y la PLTP.

En este contexto, los niveles de expresión de estos genes se encontraron disminuidos en el hígado de ratones db/db en comparación con los observados en los ratones control (**Tabla 14**). Sin embargo, salvo la lipasa hepática, cuyo análisis no se realizó, los niveles de las otras dos actividades enzimáticas se encontraron respectivamente elevados en plasma de ratones db/db, siendo este hallazgo posiblemente atribuido a su asociación a las HDL, cuyos niveles plasmáticos se encontraron más elevados en

los ratones db/db. En el caso particular de la PLTP, su actividad enzimática podría tener un papel relevante en la regeneración del *pool* de pre β -HDL circulantes en los ratones db/db (**Tabla 13**).

IV.I.4.2 Evaluación del metabolismo de las lipoproteínas y de sus principales determinantes metabólicos

Los niveles plasmáticos de las lipoproteínas se ven influenciados por un equilibrio constante entre su tasa de aclaramiento, su tasa de síntesis, o ambas a la vez. Este proceso se ve, a su vez, influenciado por determinados actores moleculares. Dado que los ratones db/db mostraron unos niveles elevados de las fracciones plasmáticas no-HDL, particularmente de las LDL, y HDL en los siguientes subapartados se diseccionará su metabolismo, respectivamente.

IV.I.4.2.1 Características metabólicas de la fracción lipoproteica LDL

El perfil de expresión hepático de diferentes dianas moleculares que modulan los niveles plasmáticos de las LDL se observó alterado en los ratones db/db (**Tabla 15**).

Así por ejemplo la expresión de *Ldlr* se encontró disminuida en los ratones db/db (2 veces; $P < 0,01$) (**Tabla 15**). Siendo este receptor el máximo responsable del aclaramiento hepático de LDL, este hallazgo sugeriría que el catabolismo de estas lipoproteínas podría estar disminuido en los ratones db/db.

Tabla 15 Perfil de expresión génica de determinantes metabólicos hepáticos de los niveles de LDL plasmáticas.

	Ctrl	db/db	P
<i>Ldlr</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,0	<0,01
<i>Apob</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,2	0,4 ± 0,1	<0,05

Los datos se expresan como el promedio ± desviación estándar (n=5 ratones por grupo). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control. Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db; ns, no significativo.

Sin embargo, la tasa catabólica de las lipoproteínas LDL en plasma de ratones db/db mostró una tendencia a la disminución aunque no significativa (P=0,11) en comparación con la de los controles (**Figura 20; Tabla 16**). Consistentemente, el porcentaje de [³H]-colesterol oleato en hígado tampoco se encontró aumentado en los ratones db/db.

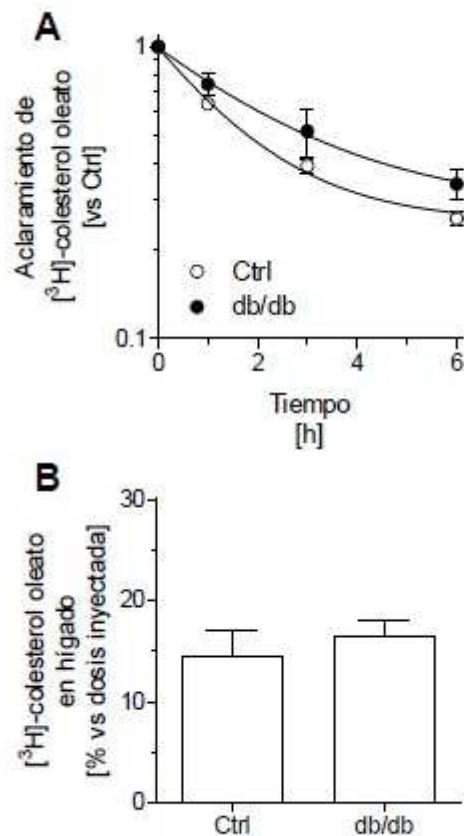


Figura 20 Cinética catabólica de las lipoproteínas LDL marcadas con colesterol tritiado. Los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar (n= 4-6 ratones por grupo). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control. Los ratones fueron inyectados intravenosamente con LDL cargadas con $[^3\text{H}]$ -colesterol oleato. A. Distribución de $[^3\text{H}]$ -colesterol oleato en plasma a los tiempos indicados. B. Porcentaje de actividad en hígado a las 48 h vs dosis inyectada. * $P < 0,05$ vs Ctrl. Abreviaciones empleadas: no-HDL, resto de fracciones lipoproteicas plasmáticas que se obtienen tras descontar las HDL del colesterol total.

Por otro lado, la expresión génica de *ApoB*, cuyo producto da lugar a la principal proteína de las lipoproteínas no-HDL, se encontró disminuida en hígado de ratones db/db (**Tabla 15**).

Tabla 16. Tasa catabólica fraccional y de secreción de colesterol de lipoproteínas LDL.

	Ctrl	db/db	P
Tasa catabólica fraccional [h^{-1}]	$0,36 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,03$	0,11
Tasa de secreción [$\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$]	$0,01 \pm 0,00$	$0,02 \pm 0,00$	0,06

Los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar (n=4-6 ratones por grupo). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control. Los ratones fueron inyectados intravenosamente con LDL cargadas con [^3H]-colesterol oleato. Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db; LDL, lipoproteínas de baja densidad.

Dado que la apoB desempeña un papel clave en la biogénesis hepática de lipoproteínas ricas en triglicéridos de origen hepático que contienen esta apolipoproteína (ie, LRT), nuestro resultado podría sugerir que su tasa de síntesis podría verse comprometida en los ratones db/db. Ello no coincidió con la tasa de secreción aumentada de estas partículas ($\sim +1,7$ veces), aunque no de forma significativa (P=0,06) (**Tabla 16**).

IV.I.4.2.2 Características metabólicas de la fracción lipoproteica HDL

Las lipoproteínas HDL mostraron una tasa catabólica significativamente reducida en el plasma de los ratones db/db ($\sim -45\%$; P<0,01) en comparación con la de los controles (**Figura 21; Tabla 17**). Por otro lado, su tasa de secreción se encontró aumentada en ratones db/db ($\sim +1,8$ veces; P<0,01) en comparación con los controles.

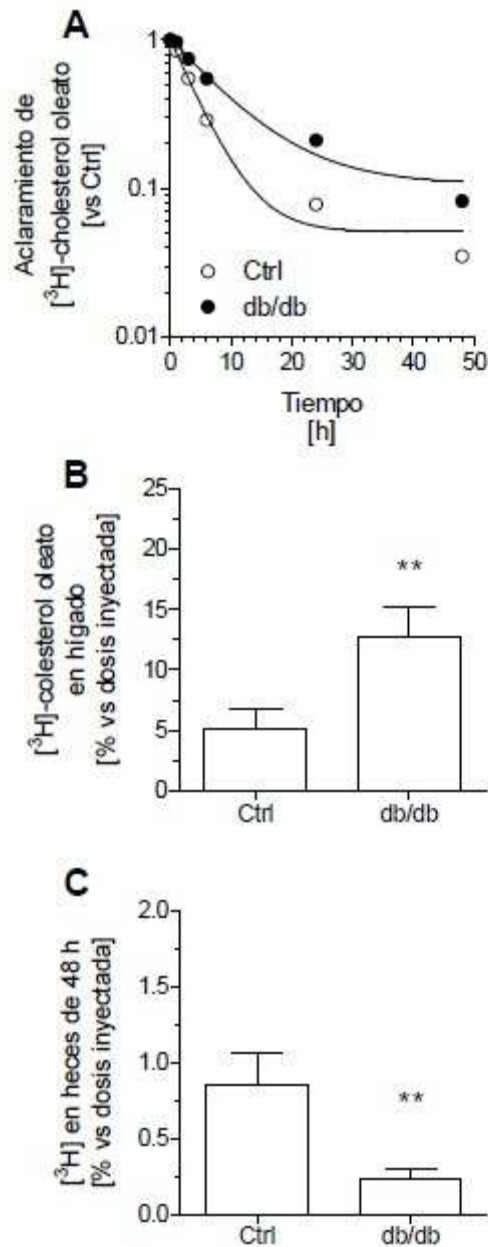


Figura 21 Cinética catabólica de las lipoproteínas HDL marcadas con colesterol tritiado. Los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar. Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control. A los ratones se les inyectó por vía intravenosa HDL cargadas con $[^3\text{H}]$ -colesterol oleato. El número de ratones empleados para cada grupo fue de 4-8 por grupo. A. Distribución de $[^3\text{H}]$ -colesterol oleato en plasma a los tiempos indicados. B. Porcentaje de radioactividad en hígado a las 48 h vs dosis inyectada. C. Porcentaje de radioactividad en heces recogidas en el período de 48 h vs dosis inyectada. ** $P < 0,01$ vs Ctrl. Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db; TFC, tasa fraccional catabólica; HDL, lipoproteínas de alta densidad.

Tabla 17 Tasa catabólica fraccional y de secreción de colesterol de lipoproteínas HDL.

	Ctrl	db/db	P
Tasa catabólica fraccional [h^{-1}]	$0,12 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,00$	<0,01
Tasa de secreción [$\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$]	$0,01 \pm 0,00$	$0,02 \pm 0,00$	<0,01

Los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar (n=4-8 ratones por grupo). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control. A los ratones se les inyectó HDL cargadas con [^3H]-colesterol oleato por vía intravenosa. Abreviaciones empleadas: HDL, lipoproteínas de alta densidad. Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db

Por su parte, la tasa de aclaramiento de las HDL observado en los db/db coincidió con una disminución significativa en la expresión hepática de *Scarb1* (Tabla 18).

Tabla 18 Perfil de expresión génica de determinantes metabólicos hepáticos de los niveles de HDL plasmáticas.

	Ctrl	db/db	P
<i>Scarb1</i> [unidades relativas vs Ctrl]	$1,0 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,0$	<0,001
<i>Abccl1</i> [unidades relativas vs Ctrl]	$1,0 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	<0,05
<i>Apcg1</i> [unidades relativas vs Ctrl]	$1,0 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1$	<0,05
<i>Apoal</i> [unidades relativas vs Ctrl]	$1,0 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,0$	<0,001

Los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar (n=5 ratones por grupo). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control. Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db; ns, no significativo.

Aunque no se analizó la abundancia relativa de dicho receptor en hígado de ratones db/db, siendo este receptor el mayor responsable en el aclaramiento hepático de las HDL, podría hipotetizarse que una disminución en el hígado de esta proteína podría comprometer la captación de las HDL plasmáticas por parte de este órgano en los ratones db/db. A pesar de encontrarse los niveles de expresión hepática de algunos

de los genes involucrados en la biogénesis de las HDL (ie, *Apoa1*, *Abca1* y *Abcg1*) significativamente disminuidos en ratones db/db (**Tabla 18**), la tasa de síntesis de [³H]-HDL calculada en ratones db/db se encontró aumentada (~ 2 veces; P=0,0095) en comparación con la calculada por las [³H]-HDL en los ratones controles (**Tabla 17**).

Contrariamente a lo esperado, la acumulación de [³H]-colesterol oleato en el hígado se encontró significativamente aumentada (>2 veces, P=0,0095) en los ratones db/db en comparación con la analizada en los ratones control en el plazo de 48 h (**Figura 21, Panel B**). Otro dato interesante encontrado fue que el tráfico de [³H]-colesterol a heces totales se encontró significativamente disminuido (> -3 veces; P=0,0095) en los ratones db/db en comparación con el de los controles en este mismo período de estudio (**Figura 21, Panel C**), siendo esto debido a una disminución (~ -4 veces; P<0,05) de [³H]-colesterol en el colesterol de estos ratones (db/db: 0,15 ± 0,03 % vs dosis inyectada; Ctrl: 0,64 ± 0,09 % vs dosis inyectada) y las sales biliares de heces (~ -2 veces; P<0,05; db/db: 0,09 ± 0,03 % vs dosis inyectada; Ctrl: 0,22 ± 0,03 % vs dosis inyectada).

Consistentemente con lo anteriormente expuesto, resultados similares fueron alcanzados en un experimento independiente en el que se administró [¹⁴C]-colesterol durante la ejecución de un test postprandial para estudiar su destino metabólico en ambos grupos (**Figura 22**).

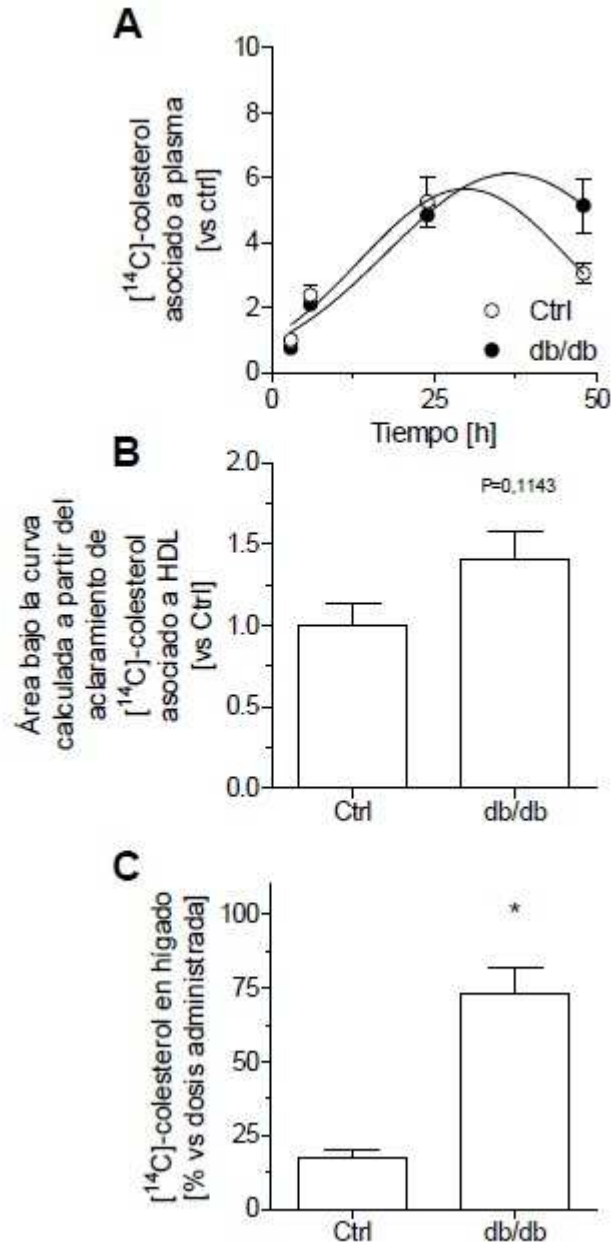


Figura 22 Destino metabólico del colesterol de la dieta. Los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar ($n=4$). Se muestran los perfiles de actividad debida al $[^{14}\text{C}]$ -colesterol en plasma en un plazo de 48 h. Se analizaron los niveles de actividad para $[^{14}\text{C}]$ -colesterol en plasma y sus fracciones lipoproteicas a las 3, 6, 24 y 48 h tras su administración oral de aceite de oliva virgen. A. Distribución de $[^{14}\text{C}]$ -colesterol en plasma a los tiempos indicados. B. Promedio del área bajo la curva de las cinéticas de aclaramiento del $[^{14}\text{C}]$ -colesterol asociado a la fracción HDL plasmática. C. Porcentaje de $[^{14}\text{C}]$ -colesterol vs dosis administrada acumulado en el hígado en un plazo de 48 h. Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db; HDL, fracción lipoproteica plasmática que se obtiene tras precipitar el colesterol no-HDL del colesterol total.

En este caso la cinética descrita por los niveles de [^{14}C]-colesterol en plasma de ratones db/db pareció mostrar un tiempo de residencia en plasma aumentado, aunque no significativamente ($P=0,34$), comparado con el de los ratones control (**Figura 22, Panel A**).

El análisis del área bajo la curva de los niveles plasmáticos de [^{14}C]-colesterol asociados a la fracción HDL mostró una tendencia, casi significativa ($P=0,11$), a estar más elevada en los ratones db/db en comparación con los controles (**Figura 22, Panel B**), apoyando en parte la desaceleración en su catabolismo descrita previamente (**Figura 21; Tabla 17**).

En este diseño experimental también se encontró una mayor acumulación de [^{14}C]-colesterol en el hígado de ratones db/db (>4 veces; $P=0,0286$) comparada con la mostrada por los ratones control (**Figura 22, Panel C**), alcanzando un porcentaje cercano al 75% de la dosis inicialmente administrada al cabo de 48 h. Analizados en conjunto, estos últimos datos (**Figura 22**), junto con los mostrados previamente en la **Figura 21**, apoyarían además una predisposición a la acumulación de colesterol de HDL en el hígado de ratones db/db en comparación con los controles.

Para comprobar si el aclaramiento del compartimento plasmático disminuido mostrado por las [^3H]-HDL de ratones db/db era debido a sus propias HDL, en la misma serie experimental en que se evaluaron las constantes cinéticas de las HDL de ambos grupos (**Figura 21**) también se incluyó el estudio en paralelo de la pauta de

aclaramiento mostrada por las [^3H]-HDL de ratones db/db ([^3H]-HDL_{db/db}) en ratones control. Los resultados obtenidos mostraron que la tasa catabólica fraccional de [^3H]-HDL_{db/db} en ratones control ($0,13 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$) no difirió ($P=0,76$) de la mostrada por las suyas propias [^3H]-HDL (autólogas; [^3H]-HDL_{Ctrl}) ($0,12 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$; **Tabla 17**). Consistentemente, la tasa de aclaramiento de las [^3H]-HDL_{db/db} analizada en ratones control se encontró aumentada ($P=0,03$) en comparación con la mostrada por estas mismas [^3H]-HDL_{db/db} analizadas en ratones db/db. Estos datos sugerirían que la causa principal en el metabolismo alterado de estas lipoproteínas estaría en las características moleculares de las células de los propios ratones db/db y no en sus HDL.

Consistentemente, la acumulación hepática de [^3H]-colesterol en ratones control a los que se inyectó con [^3H]-HDL_{db/db} no difirió ($4,88 \pm 0,54\%$) de la observada en ratones a los que se le inyectó con [^3H]-HDL_{Ctrl} ($5,13 \pm 0,69\%$; **Figura 21, Panel B**). Por último, también la excreción a heces de [^3H]-colesterol fue similar en ratones control tratados con [^3H]-HDL_{db/db} ($0,66 \pm 0,09\%$; $P=0,1143$) respecto a la observada en ratones a los que se inyectó [^3H]-HDL_{Ctrl} ($0,86 \pm 0,08\%$; **Figura 21, Panel C**).

IV.I.5 Propiedades antiaterogénicas de las HDL de ratones db/db

IV.I.5.1 Estudio del TRC-m en ratones db/db

IV.I.5.1.1 Análisis de la capacidad de eflujo de colesterol in vitro por parte de las HDL

La capacidad de eflujo de colesterol por parte de las HDL desde macrófagos es considerado el primer paso en el TRC in vivo. El análisis de este paso ex vivo mostró que la capacidad de eflujo por parte de la fracción plasmática de HDL de ratones db/db se encontró significativamente aumentada ($\sim +18\%$; $P < 0,01$) en comparación con la de las HDL de los controles (**Figura 23**). La adición de AMPc que induce la expresión de *AbcA1* en esta línea celular (Escola-Gil, Lee-Rueckert et al. 2015), produjo un aumento consistente en la capacidad de eflujo de las HDL en ambas líneas (**Figure 23, Panel A**). Sin embargo, el calibre de dicho aumento (Ctrl: $\sim +20\%$; $P < 0,01$; db/db: $\sim +17\%$; $P < 0,01$) no difirió entre ambos grupos. La tasa fraccional de eflujo normalizada en función del contenido de colesterol de las HDL redujo el eflujo fraccional mostrados por las HDL de ratones db/db ($\sim -40\%$; $P < 0,001$) (**Figure 23, Panel B**), revelando que una proporción significativa del eflujo fue debido a unos niveles elevados de HDL en estos ratones comparada con la de los ratones control.

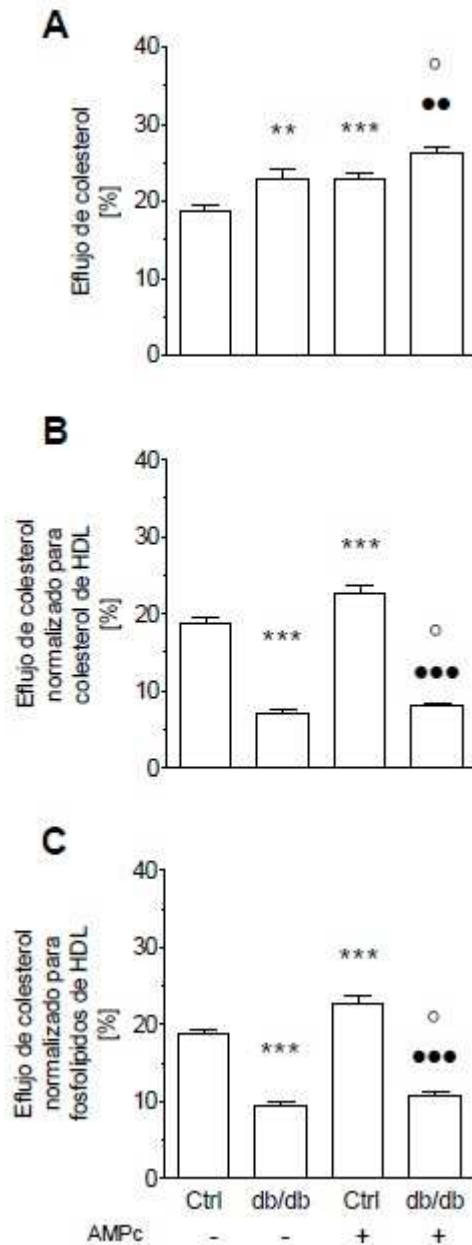


Figura 23 Capacidad de eflujo de colesterol por parte de la fracción plasmática de HDL (plasma de ratones db/db y sus controles desde macrófagos J774.A1. En el panel A se representa el promedio \pm desviación estándar del porcentaje de eflujo de colesterol a partir de macrófagos de la línea J774.A1 promovido por la fracción plasmática de HDL de ratones db/db y de sus controles en ausencia/presencia de AMPc (0,3 mM) a partir de macrófagos marcados con [3 H]-colesterol. Las células se incubaron durante 4 h con la fracción plasmática de HDL (a una concentración final en medio de cultivo de 2,8%) (n=10 en cada grupo). El eflujo de colesterol se expresó como la proporción de colesterol marcado liberado por las células al medio. En los paneles B y C se expresó el promedio \pm desviación estándar del porcentaje de eflujo normalizado en función del contenido en colesterol (Panel B) y de fosfolípidos de HDL (Panel C). ** P<0,01 vs Ctrl sin AMPc; *** P<0,001 vs Ctrl sin AMPc; ° P<0,05 vs db/db sin AMPc; ●● P<0,001 vs Ctrl con AMPc. Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db.

Este cálculo también parecería reflejar una menor capacidad de eflujo normalizada en función del contenido relativo de colesterol de HDL de ambas líneas. Resultados similares fueron alcanzados expresando los resultados de eflujo de colesterol derivados tras la adición de AMPc (**Figure 23, Panel B**) y después de normalizar la tasa de eflujo de colesterol en función de los niveles plasmáticos relativos de fosfolípidos de HDL (**Figure 23, Panel C**), respectivamente.

IV.I.5.1.2 Evaluación de TRC-m en ratones db/db

Para evaluar el TRC in vivo específico de macrófagos empleamos un método bien establecido en nuestro laboratorio (Escola-Gil, Lee-Rueckert et al. 2015) mediante el cual se analiza la distribución del [³H]-colesterol desde macrófagos J774 inyectados en la cavidad peritoneal a diferentes compartimentos en el plazo de 48 h (**Figura 24**).

La cantidad relativa de actividad [³H]-colesterol en plasma de ratones db/db se encontró aumentada (~+1,6 veces; P<0,05) en comparación con la determinada en ratones control (**Figura 24, panel A**), siendo la mayor parte atribuida a la fracción HDL (**Figura 24, panel B**). La proporción relativa de actividad derivada del [³H]-colesterol en hígado total de ratones db/db determinada al cabo de 48 h fue ~ +2,6 veces más elevada (P<0,01) respecto de la observada en hígado de ratones Ctrl (**Figura 24, panel C; Tabla 19**), siendo ello consistente con los niveles de actividad acumulada en hígado encontrados en los experimentos de catabolismo de HDL (**Figura 21, panel B**).

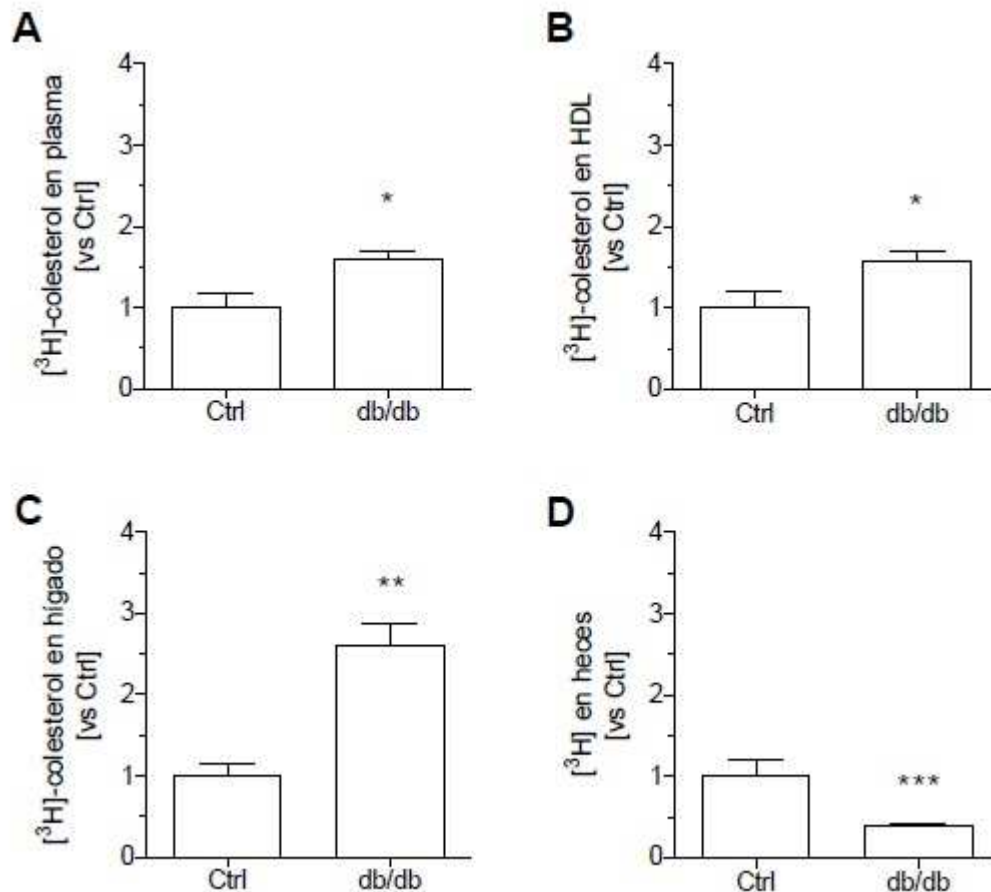


Figura 24 Evaluación de TRC-m en ratones db/db. Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar (n=5 animales por grupo). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control. Los macrófagos J774.A1 fueron marcados con $[^3\text{H}]$ -colesterol en presencia de LDL acetiladas e inyectados ip a los ratones (n=5 por grupo). Los datos se expresan en tanto por uno tomando como referencia los porcentajes vs dosis inyectada determinado en ratones control (vs Ctrl). A. Actividad debida al $[^3\text{H}]$ -colesterol residente en plasma (Ctrl: $0,91 \pm 0,11\%$ vs dosis inyectada). B. Actividad debida al $[^3\text{H}]$ -colesterol residente en HDL (Ctrl: $0,61 \pm 0,07\%$ vs dosis inyectada). C. Actividad debida al $[^3\text{H}]$ -colesterol residente en hígado (Ctrl: $1,90 \pm 0,27\%$ vs dosis inyectada). D. Actividad debida al $[^3\text{H}]$ residente en heces (Ctrl: $0,17 \pm 0,03\%$ vs dosis inyectada). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs Ctrl. Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db.

Esto último coincidió además con un aumento de colesterol libre ($\sim +2,3$ veces; $P=0,01$) y total ($\sim +3,4$ veces; $P=0,001$) determinadas en hígado total de ratones db/db (**Tabla 19**). El porcentaje de colesterol libre respecto la dosis inyectada determinada en hígado total se encontró reducido un $\sim -50\%$ ($P < 0,01$) en

comparación con el del colesterol total en ratones db/db (**Tabla 19**), siendo estos resultados en parte consistentes con la disminución porcentual de los niveles hepáticos de colesterol libre (~ -2 veces; $P < 0,01$) en estos ratones (**Tabla 19**).

Tabla 19 Análisis de la proporción relativa de colesterol libre y de [^3H]-colesterol en su forma libre y esterificada en hígado total calculada a partir de los datos de TRC-m.

	Ctrl	db/db	P
<i>Hígado total – medición bioquímica</i>			
Colesterol total [$\mu\text{mol/hígado}$]	$5,3 \pm 0,5$	$18,1 \pm 4,4$	$<0,001$
Colesterol libre [% vs colesterol total]	$75,2 \pm 5,8$	$36,5 \pm 7,8$	$<0,01$
<i>Hígado total – medición de actividad [^3H]</i>			
Actividad total [% vs dosis inyectada]	$1,7 \pm 0,4$	$5,7 \pm 0,8$	$0,004$
Colesterol libre [% vs dosis inyectada]	$1,2 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,3$	$0,0123$
Colesterol libre [% vs actividad total]	$71,5 \pm 3,8$	$49,1 \pm 3,6$	$0,0087$

Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar ($n=5$ animales por grupo). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control. La medición bioquímica del colesterol total y libre se realizó a partir de extractos lipídicos de hígado mediante kits comerciales adaptados a un robot autoanalizador COBAS. Los datos se expresan en relación al hígado total. El porcentaje de colesterol total se expresó respecto de la dosis inyectada que llega al hígado al cabo de 48 h desde el inicio del ensayo. Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db.

En el caso de las heces recolectadas en el período de 48 h, los niveles relativos de actividad debida al [^3H] se encontraron significativamente reducidos (~ -2,6 veces; $P < 0,001$) (**Figura 24, panel D**). Este hallazgo se atribuyó a una reducción en la eliminación a heces de colesterol y ácidos biliares (**Tabla 20**).

En comparación con los controles, la reducción en la eliminación de [^3H]-colesterol a heces en ratones db/db coincidió con una disminución significativa en la expresión

de *Abcg5* (~ -3 veces; $P < 0,01$) y *Abcg8* (~ -5 veces; $P < 0,001$) en hígado (**Tabla 21**),

cuyo papel resulta clave en el transporte hepatobiliar de colesterol.

Tabla 20 Proporción de la fracción de [³H] en sales bilares y de colesterol analizada en heces de 48 h.

	Ctrl	db/db	P
Total [% vs dosis inyectada]	0,173 ± 0,028	0,064 ± 0,008	0,0021
Colesterol [% vs dosis inyectada]	0,097 ± 0,019	0,028 ± 0,004	0,0009
Ácidos biliares [% vs dosis inyectada]	0,17 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,0167

Valores expresados como el promedio ± desviación estándar (n=5 animales por grupo). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control. El porcentaje de radiactividad debida al colesterol y a las sales biliares en heces de 48 h se expresó respecto de la dosis inyectada. Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db.

Tabla 21 Perfil de expresión hepático de genes involucrados en el TRC-m.

	Ctrl	db/db	P
<i>Abca1</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	0,3 ± 0,1	<0,01
<i>Abcg1</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,2	0,4 ± 0,1	<0,05
<i>Abcg5</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	0,3 ± 0,1	<0,01
<i>Abcg8</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	0,2 ± 0,1	<0,001
<i>Cyp7a1</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,4	0,4 ± 0,1	<0,01
<i>Cyp27a1</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,2	0,4 ± 0,0	<0,001
<i>Cyp7b1</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,3	0,0 ± 0,0	<0,001
<i>Nr1h3</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	0,4 ± 0,1	<0,001
<i>Bsep</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	0,1 ± 0,0	<0,001

Valores expresados como el promedio ± desviación estándar (n=5 animales por grupo). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control. Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db.

En este contexto, la expresión intestinal de los genes *Abcg5* y *Abcg8*, cuyos productos son clave en el paso de [³H]-colesterol a heces, se encontró significativamente disminuida (~ -50%; P<0,05) en ratones db/db en comparación con los ratones control (**Tabla 22**). Igualmente la expresión intestinal de *NcpIII*, se encontró reducida (-70%; P<0,05). En conjunto estos datos sugerirían que la salida del colesterol a través de los transportadores *Abcg5* y *Abcg8* podría estar comprometida en los ratones db/db. Del mismo modo, la represión en la expresión de *NcpIII* podría ser en respuesta a niveles disminuidos de colesterol en intestino en estos ratones.

Tabla 22 Perfil de expresión intestinal de genes involucrados en el TRC-m.

	Ctrl	db/db	P
<i>Abcg5</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,003
<i>Abcg8</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,003
<i>NpcIII</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,4	0,3 ± 0,1	0,004

Valores expresados como el promedio ± desviación estándar (n=5 animales por grupo). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control. Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db.

En este trabajo no se analizaron los niveles hepáticos de ácidos biliares. Sin embargo, una serie de evidencias sugirieron que su producción podría encontrarse comprometida en hígado de ratones db/db. De un lado, el porcentaje de colesterol libre se encontró significativamente disminuido (~ -51%) en hígado de ratones db/db (**Tabla 7; Tabla 19**).

Tabla 23. Niveles plasmáticos y hepáticos de 27-OH-colesterol.

	Ctrl	db/db	P
<i>Plasma</i>			
27-OH-colesterol [mg/dL]	0,095 ± 0,007	0,292 ± 0,058	0,0159
<i>Hígado</i>			
27-OH-colesterol [µg/g]	0,187 ± 0,046	0,627 ± 0,074	0,0159

Valores expresados como el promedio ± desviación estándar (n=4-5 animales por grupo). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control. Los niveles de 27-OH-colesterol se analizaron mediante cromatografía de gases. Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db.

Aunque expresado por hígado total sus niveles resultaron ser cuantitativamente superiores (**Tabla 19**), los niveles de colesterol libre normalizados por gramo de hígado resultaron ser la mitad de los presentes en ratones control (**Tabla 7**), por lo que su posible contribución en la síntesis de derivados del colesterol que son intermediarios en la síntesis de ácidos biliares (DuSell and McDonnell 2008) podría verse comprometida en los ratones db/db. Curiosamente los niveles hepáticos de 27-hidroxicolesterol (27-OH-colesterol) se encontraron significativamente elevados (~+6 veces; $P < 0,05$) en ratones db/db en comparación con los controles (**Tabla 23**). Similarmente, los niveles plasmáticos de esta molécula también se encontraron aumentados, posiblemente asociados a la fracción HDL, siendo esta la fracción de lipoproteínas mayoritaria en estos ratones. Desafortunadamente, no se pudieron medir los niveles hepáticos de 7-hidroxicolesterol (7-OH-colesterol), uno de los intermediarios principales en la vía de síntesis de ácidos biliares en el hígado.

La elevación en los niveles hepáticos 27-OH-colesterol podría estar asociada con un balance alterado entre su tasa de síntesis y/o degradación. La expresión relativa de *Cyp27a1* (**Tabla 21**), cuyo producto es un enzima clave que participa en la síntesis de 27-OH-colesterol, se encontró significativamente disminuida en hígado de ratones db/db, aunque no tanto como la de *Cyp7b1*, cuya expresión alcanzó niveles indetectables (**Tabla 21**). *Cyp7b1* codifica un enzima que cataliza el paso clave de una de las vías de síntesis de ácidos biliares utilizando 27-OH-colesterol como sustrato. Al menos en parte, la acumulación de 27-OH-colesterol determinada en hígado de ratones db/db bien pudiera deberse a una disminución en su metabolización a ácidos biliares a través de esta vía. Por otro lado, la expresión relativa de *Cyp7a1* (**Tabla 21**), que codifica para el enzima que participa en uno de los pasos clave en la síntesis de 7-OH-colesterol, otro de los intermediarios en la vía de síntesis de ácidos biliares en el hígado, se encontró significativamente disminuida en hígado de ratones db/db. En este trabajo quedó pendiente el análisis de los niveles hepáticos (por gramo de hígado) de ácidos biliares, los cuales se anticiparían disminuidos en ratones db/db en comparación con los controles.

Aparte de su papel como intermediario en la producción de ácidos biliares, el 27-OH-colesterol se cuenta también, junto con otros oxisteroles, como uno de los ligandos (agonistas) endógenos de LXRA (Wojcicka, Jamroz-Wisniewska et al. 2007), su acumulación podría conducir a una inducción de su actividad en hígado de ratones db/db. Sin embargo, de los genes analizados en la **Tabla 21** y que se cuentan

como dianas moleculares de LXRA se encontraron disminuidos en hígado de ratones db/db; incluso la propia expresión génica de LXRA (ie, *Nr1h3*), que se ha descrito que puede ser autoregulada por su propio producto, al menos en macrófagos (Laffitte, Joseph et al. 2001) y adipocitos (Juvet, Andresen et al. 2003), también se encontró disminuida. En conjunto, estos datos sugerirían que la vía de señalización de LXR podría encontrarse comprometida en los ratones db/db.

Tal y como se ha indicado previamente, el porcentaje de ácidos biliares respecto de la dosis inyectada también se encontró disminuido en heces en ratones db/db (**Tabla 20**). La disminución en los niveles porcentuales de ácidos biliares podrían ser en parte explicados por una reducción concomitante en la expresión de *Bsep* (~ -9 veces; $P < 0,001$), su principal transportador, en hígado de ratones db/db (**Tabla 21**).

IV.I.6 Inducción del TRC-m mediante agonistas de LXR

Tal y como se ha descrito en el apartado anterior, la vía de señalización de LXR podría estar alterada en el hígado de ratones db/db, comprometiendo de este modo el tráfico de colesterol hacia heces y por tanto el TRC a este nivel. Habida cuenta de que los niveles de HDL y por tanto su funcionalidad pueden inducirse mediante la activación de LXR mediante la administración de agonistas específicos de LXR, en el presente trabajo nos planteamos inducir esta vía con el fin de intentar rescatar el TRC en estos ratones. Para ello, se evaluó el efecto de la administración de T0901317, un panagonista de LXR, sobre este proceso en los ratones db/db.

La administración de T0901317 en ratones db/db (db/db-LXR) no resultó en cambios significativos en su peso corporal ni del hígado en comparación con los ratones db/db no tratados con este agonista (**Tabla 24**), manteniéndose los porcentajes de cambio en peso corporal e hígado en relación con sus respectivos controles.

El consumo de comida en los ratones db/db tratados con el agonista de LXR no se observó cambiado en comparación con el presentado por los ratones db/db (**Tabla 24**). Los ratones control tratados con el agonista presentó un aumento en la ingesta (>2 veces; $P < 0,01$) en comparación con la de los ratones control.

Tabla 24 Parámetros corporales y bioquímicos plasmáticos.

	Ctrl	db/db	Ctrl-LXR	db/db-LXR	P
<i>Parámetros corporales</i>					
Peso corporal [g]	29,4 ± 1,2	42,3 ± 2,0 **	28,8 ± 0,8	42,8 ± 1,7 •••	0,003
Peso del hígado [g]	1,5 ± 0,1	4,1 ± 0,4 **	1,3 ± 0,1	3,5 ± 0,5 ••	0,003
Relación peso del hígado/peso corporal [unidades relativas]	0,05 ± 0,04	0,1 ± 0,00 **	0,05 ± 0,01	0,08 ± 0,01 ••	0,001
Consumo de comida [g/día]	2,4 ± 0,1	9,5 ± 0,5 **	4,7 ± 0,1 **	9,2 ± 1,0 ••	<0,00 1
Consumo de agua [mL/día]	13,3 ± 0,9	26,8 ± 1,3 **	22,1 ± 1,8 **	36,4 ± 2,1 ° ••	<0,00 1
Eficiencia calórica [g/kcal ingerida]	0,024 ± 0,002	0,022 ± 0,003	0,030 ± 0,002	0,033 ± 0,005	0,1588
<i>Parámetros bioquímicos plasmáticos</i>					
Colesterol [mM]	2,6 ± 0,1	5,6 ± 0,3 **	3,8 ± 0,2 **	7,3 ± 0,9 ••	0,001
Colesterol libre [%]	16,0 ± 0,7	20,0 ± 3,1	11,9 ± 1,0 *	6,1 ± 0,1 °° •	0,0015
Colesterol de HDL [mM]	2,0 ± 0,2	4,3 ± 0,4 ***	3,0 ± 0,2 *	6,0 ± 0,7 ••	0,0001
Colesterol de no-HDL [mM]	0,7 ± 0,1	1,5 ± 0,4 *	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,4	0,09
Triglicéridos [mM]	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,2	2,5 ± 0,3 *	3,1 ± 0,2 °°	0,0015
Ácidos grasos [mM]	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,6 ± 0,1 *	1,6 ± 0,0 °	0,0061

Valores expresados como el promedio ± desviación estándar (n=4-15 animales por grupo). Los niveles de lípidos en las fracciones HDL fue determinado en el sobrenadante de plasma tras precipitar con ácido fosfotúngstico; la fracción de colesterol no-HDL se obtuvo tras descontar los niveles debidos a las HDL del total. Los ratones fueron tratados con el agonista de LXR (T0901317) a una dosis de 20 mg por kg de peso durante un plazo de dos semanas. Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control (* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001); db/db (° P<0,05; °° P<0,01); o control tratados con agonista de LXR (LXR) (• P<0,05; •• P<0,01; ••• P<0,001). La comparación entre los niveles promedio de colesterol de HDL de ratones db/db tratados y no tratados con el agonista se encontraron diferentes aunque no significativamente (P=0,0503). Abreviaciones: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db; Ctrl-LXR, ratones control tratados con el agonista de LXR; db/db-LXR, ratones db/db tratados con el agonista de LXR.

En el caso del consumo de agua se apreció un patrón similar, salvo en el caso de los ratones db/db-LXR que se encontró aumentado ($\sim +1,4$ veces; $P < 0,05$) en comparación con el observado en ratones db/db no tratados. Consistentemente, la eficiencia calórica del total ingerido (expresada como ganancia de peso en gramos por cada kcal ingerida) no difirió entre los diferentes grupos (**Tabla 24**).

El tratamiento con el agonista de LXR produjo un aumento esperable en los niveles de colesterol en los ratones no obesos, siendo ello atribuible a un aumento concomitante en los niveles plasmáticos de colesterol de HDL en estos ratones (**Tabla 24**).

El porcentaje de colesterol libre en plasma se encontró disminuido en respuesta al tratamiento ($\sim -25\%$; $P < 0,05$), siendo este efecto más acentuado ($\sim -70\%$; $P < 0,01$) en los ratones db/db tratados en comparación con los ratones db/db no tratados. También se encontró un aumento en los niveles plasmáticos de triglicéridos y de ácidos grasos en los grupos de ratones tratados con el agonista Ctrl-LXR y db/db-LXR en comparación con sus respectivos controles (**Tabla 24**).

La administración de T0901317 produjo un aumento significativo en los niveles de triglicéridos hepáticos (**Tabla 25**), siendo ello observado en ratones Ctrl y db/db e independientemente de si los niveles se expresaron por gramo de tejido o por órgano.

Tabla 25 Análisis de la proporción relativa de colesterol libre y de [³H]-colesterol en su forma libre y esterificada en hígado calculada a partir de los datos de TRC-m.

	Ctrl	db/db	Ctrl-LXR	db/db-LXR	P
Medición bioquímica					
Colesterol total [$\mu\text{mol/g}$]	4,1 \pm 0,5	5,0 \pm 1,1	5,9 \pm 0,3 *	6,0 \pm 0,6	0,098
Triglicérido total [$\mu\text{mol/g}$]	4,1 \pm 1,1	49,1 \pm 5,5 ***	58,0 \pm 10,3 **	84,1 \pm 12,1 °	<0,001
Colesterol total [$\mu\text{mol/hígado}$]	5,3 \pm 0,5	18,1 \pm 4,4 ***	9,1 \pm 0,3 **	24,0 \pm 4,5 •	<0,001
Colesterol libre [% vs colesterol total]	75,2 \pm 5,8	36,5 \pm 7,8 **	80,7 \pm 2,8	25,3 \pm 1,9 •	<0,0001
Triglicérido total [$\mu\text{mol/hígado}$]	5,1 \pm 1,0	185,5 \pm 24,1 ***	94,0 \pm 20,7 **	320,7 \pm 29,8 ° •	<0,0001
Medición de actividad [³H]					
Actividad total [% vs dosis inyectada]	1,7 \pm 0,4	5,7 \pm 0,8 **	2,2 \pm 0,2	4,7 \pm 0,7 •	0,005
Colesterol libre [% vs dosis inyectada]	1,2 \pm 0,3	2,7 \pm 0,3 *	1,7 \pm 0,2	3,1 \pm 0,3 •	0,04
Colesterol libre [% vs actividad total]	71,5 \pm 3,8	49,1 \pm 3,6 **	78,9 \pm 1,9	69,0 \pm 5,7 °	0,01

Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar (n=4-9 animales por grupo). La medición bioquímica del colesterol total y libre se realizó a partir de extractos lipídicos de hígado mediante kits comerciales adaptados a un robot autoanalizador COBAS. Los datos se expresan por gramo de tejido y en relación al hígado total. Por otro lado, la actividad total vs dosis inyectada representa la actividad derivada del [³H]-colesterol que se acumula en hígado en el plazo de 48 h desde el inicio del ensayo TRC-m. El porcentaje de colesterol libre vs actividad total se calculó a partir de los extractos lipídicos de las bandas de colesterol libre y esterificado separadas mediante un sistema TLC. Los datos (expresados en porcentaje) que se muestran se obtuvieron dividiendo la actividad ([³H]) en la banda donde se acumula el [³H]-colesterol libre por la actividad total (ie, suma de actividades en las bandas donde se acumula el [³H]-colesterol libre y [³H]-éster de colesterol). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control (* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001); ratones db/db (° P<0,05); o ratones Ctrl-LXR (• P<0,05). Abreviaciones: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db; Ctrl-LXR, ratones control tratados con el agonista de LXR; db/db-LXR, ratones db/db tratados con el agonista de LXR.

Por otro lado, los niveles de colesterol sólo se observaron aumentados por el agonista en hígados de ratones control tratados con el agonista, no alcanzándose un aumento aditivo significativo en el caso de los ratones db/db tratados en comparación con los no tratados (**Tabla 25**). Por otro lado, el tratamiento con el agonista de LXR no produjo efecto alguno sobre el porcentaje de colesterol libre determinado en hígado de los ratones db/db, cuyos niveles se mantuvieron disminuidos en comparación con los analizados en el de ratones control.

En cuanto a su papel sobre el TRC, el tratamiento con el agonista de LXR produjo un aumento en la actividad debida al [³H]-colesterol en plasma (**Figura 25, panel A**), siendo dicha elevación principalmente atribuida a la fracción de HDL (**Figura 25, panel B**).

Consistentemente con los datos de colesterol determinados en hígado (**Tabla 25**), los niveles relativos de radioactividad derivada del [³H]-colesterol en hígado se observaron aumentados en los grupos de ratones db/db tratados o no en comparación con sus respectivos controles. Sin embargo, la administración del agonista no indujo un aumento añadido en la acumulación de actividad derivada del [³H]-colesterol en los ratones db/db tratados en comparación con los no tratados (**Figura 25, panel C**). Los datos de porcentaje de colesterol libre en hígado de debido a la fracción de colesterol libre respecto la dosis inyectada revelaron que el tratamiento con el agonista de LXR produjo un aumento en dicho porcentaje en los ratones db/db tratados significativamente diferente del mostrado en los ratones db/db

no tratados (**Tabla 25**), alcanzándose niveles no diferentes de aquellos calculados en hígados de ratones controles.

En cuanto a las heces recolectadas en el período de 48 h, la administración de agonista de LXR produjo un aumento en el tráfico de [^3H] a heces tanto en ratones control como db/db en relación con aquellos no tratados con el agonista (vs Ctrl: ~ +2 veces; $P < 0,001$; vs db/db: ~ +2 veces; $P < 0,01$) (**Figura 25, panel D**). Los niveles relativos de actividad debida al [^3H] en ratones db/db alcanzaron los niveles determinados en ratones del grupo control.

El aumento en los niveles relativos de [^3H] en heces de 48 h se atribuyó fundamentalmente a un aumento en la eliminación de colesterol en heces (**Tabla 26**).

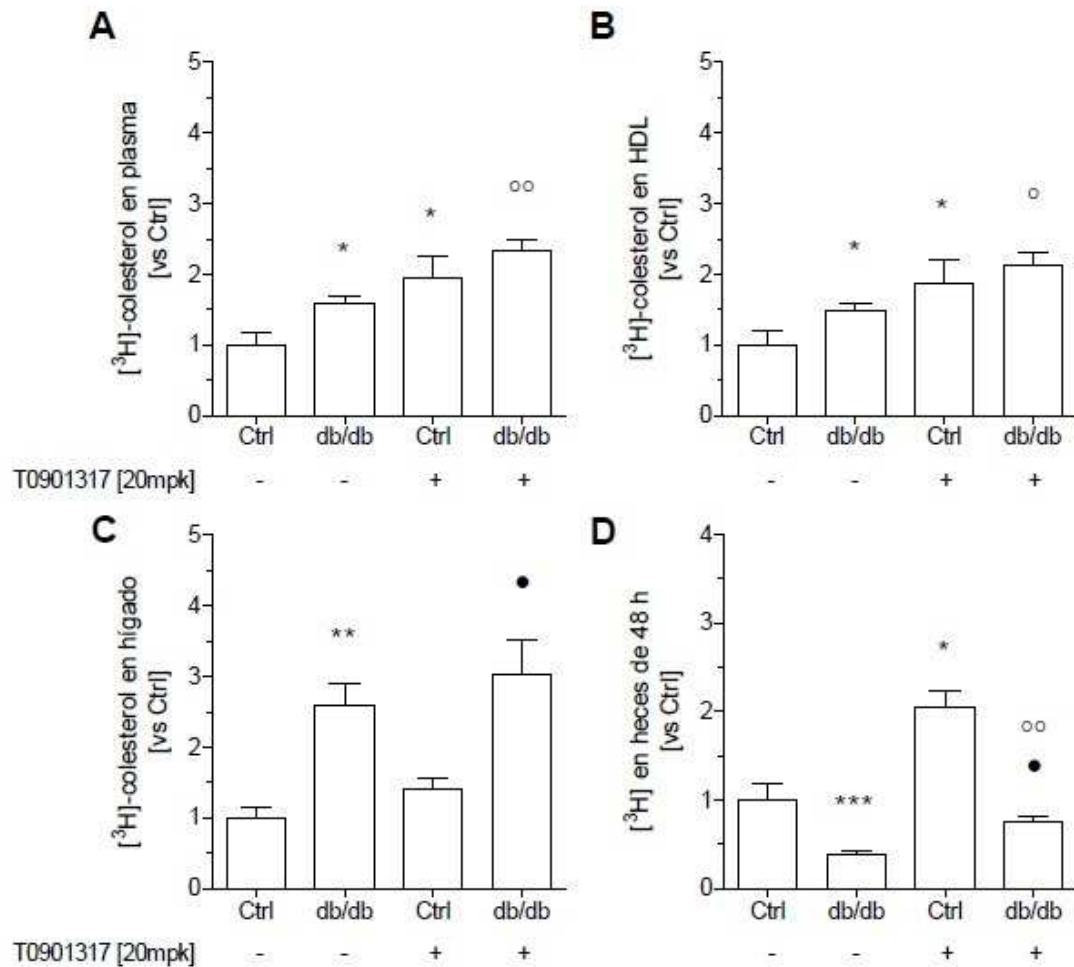


Figura 25 Efecto de la inducción de LXR sobre el TRC-m en ratones db/db. Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar (n=4-9 animales por grupo). Los macrófagos J774.A1 fueron marcados con [³H]-colesterol en presencia de LDL acetiladas e inyectados ip a los ratones (n=4-8 por grupo). Los datos se expresan en tanto por uno tomando como referencia el promedio de dos tandas de ensayo de los porcentajes vs dosis inyectada determinado en ratones control (vs Ctrl). A. Actividad debida a [³H]-colesterol residente en plasma (Ctrl: $1,3 \pm 0,2\%$ vs dosis inyectada). B. Actividad debida a [³H]-colesterol en HDL (Ctrl: $0,7 \pm 0,1\%$ vs dosis inyectada). C. Actividad debida a [³H]-colesterol en hígado (Ctrl: $2,5 \pm 0,4\%$ vs dosis inyectada). D. Actividad debida a [³H] en heces (Ctrl: $0,18 \pm 0,04\%$ vs dosis inyectada). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control (* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001); db/db (^{oo} P<0,01); o control tratados con agonista de LXR (LXR) ([•] P<0,05). Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db.

Tabla 26 Proporción de la fracción de [³H] en sales bilares y de colesterol analizada en heces de 48 h.

	Ctrl	db/db	Ctrl-LXR	db/db-LXR	P
Actividad total [% vs dosis inyectada]	0,180 ± 0,039	0,066 ± 0,008 **	0,263 ± 0,023	0,095 ± 0,004 •	0,03
Colesterol [% vs dosis inyectada]	0,109 ± 0,029	0,030 ± 0,003 ***	0,188 ± 0,029	0,073 ± 0,005 ^{oo} •	0,04
Ácidos biliares [% vs dosis inyectada]	0,071 ± 0,015	0,038 ± 0,007	0,078 ± 0,003	0,023 ± 0,005 •	0,002

Valores expresados como el promedio ± desviación estándar (n=4-9 animales por grupo). El porcentaje de colesterol y sales biliares en heces de 48 h se expresó respecto de la dosis inyectada. Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control (* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001); db/db (^{oo} P<0,01); o control tratados con agonista de LXR (• P<0,05). La comparación entre los niveles promedio de actividad total de ratones db/db tratados y no tratados con el agonista se encontraron diferentes aunque no significativamente (P=0,07); por otro lado, la comparación entre los niveles promedio de actividad debida al [³H]-colesterol de ratones Ctrl tratados y no tratados con el agonista se encontraron diferentes aunque no significativamente (P=0,06). Abreviaciones: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db; Ctrl-LXR, ratones control tratados con el agonista de LXR; db/db-LXR, ratones db/db tratados con el agonista de LXR.

En comparación con los ratones db/db, el perfil hepático de expresión de genes involucrados en el tráfico de colesterol en hígado reveló un aumento (recuperación) significativa en los niveles relativos de expresión de *Abcg5* y *Abcg8*, en el grupo de ratones db/db-LXR (**Tabla 27**), alcanzando niveles similares a los analizados en el grupo Ctrl. Resultados similares fueron alcanzados al comparar la abundancia relativa en los niveles de *Abcg5* y *Abcg8* mediante análisis western blot entre los diferentes grupos experimentales (**Figura 26**). Igualmente, los niveles de expresión génica de *Abca1* en hígado de ratones db/db también se encontraron elevados en comparación con los de ratones db/db; éstos aumentaron alcanzando niveles relativos similares a los de ratones del grupo control (**Tabla 27**).

Tabla 27 Perfil de expresión hepático de genes involucrados en el TRC-m.

	Ctrl	db/db	Ctrl-LXR	db/db-LXR	P
<i>Abca1</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,0 ***	1,4 ± 0,3	1,1 ± 0,1 oo	0,0003
<i>Abcg5</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	0,4 ± 0,0 ***	2,6 ± 0,4 **	1,1 ± 0,2 o•	<0,0001
<i>Abcg8</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,0	0,6 ± 0,0 ***	2,1 ± 0,3 ***	1,0 ± 0,1 oo••	<0,0001
<i>Scarb1</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1 ***	2,3 ± 0,3 **	0,7 ± 0,1 ••	0,0002
<i>Apoa1</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,2	0,4 ± 0,1 **	2,7 ± 0,4 **	0,4 ± 0,1 •••	0,0001

Valores expresados como el promedio ± desviación estándar (n=4-9 animales por grupo). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control (** P<0,01; *** P<0,001); db/db (oo P<0,01); db/db (o P<0,05; oo P<0,01); o control tratados con agonista de LXR (LXR) (• P<0,05; •• P<0,01; ••• P<0,001). Abreviaciones: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db; Ctrl-LXR, ratones control tratados con el agonista de LXR; db/db-LXR, ratones db/db tratados con el agonista de LXR.

Tabla 28 Perfil de expresión intestinal de genes involucrados en el TRC-m.

	Ctrl	db/db	Ctrl-LXR	db/db-LXR	P
<i>Abcg5</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,1 ± 0,1	0,5 ± 0,1 ***	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1 ooo•	0,0003
<i>Abcg8</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,1 ± 0,1	0,5 ± 0,1 ***	1,6 ± 0,2	1,1 ± 0,1 ooo•	<0,0001
<i>Ncp111</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1 **	0,9 ± 0,1	0,6 ± 0,1 o••	<0,0001

Valores expresados como el promedio ± desviación estándar (n=4-9 animales por grupo). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control (** P<0,01; *** P<0,001); db/db (oo P<0,01); db/db (o P<0,05; oo P<0,01; ooo P<0,001); o control tratados con agonista de LXR (LXR) (• P<0,05; •• P<0,01). La comparación entre los niveles promedio de actividad debida al [³H]-colesterol de ratones Ctrl tratados y no tratados con el agonista se encontraron diferentes aunque no significativamente (P=0,09). Abreviaciones: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db; Ctrl-LXR, ratones control tratados con el agonista de LXR; db/db-LXR, ratones db/db tratados con el agonista de LXR.

La administración con el agonista también resultó en un aumento en los niveles de expresión de *Scarb1* en ratones control tratados con el agonista en comparación con los no tratados (**Tabla 27**).

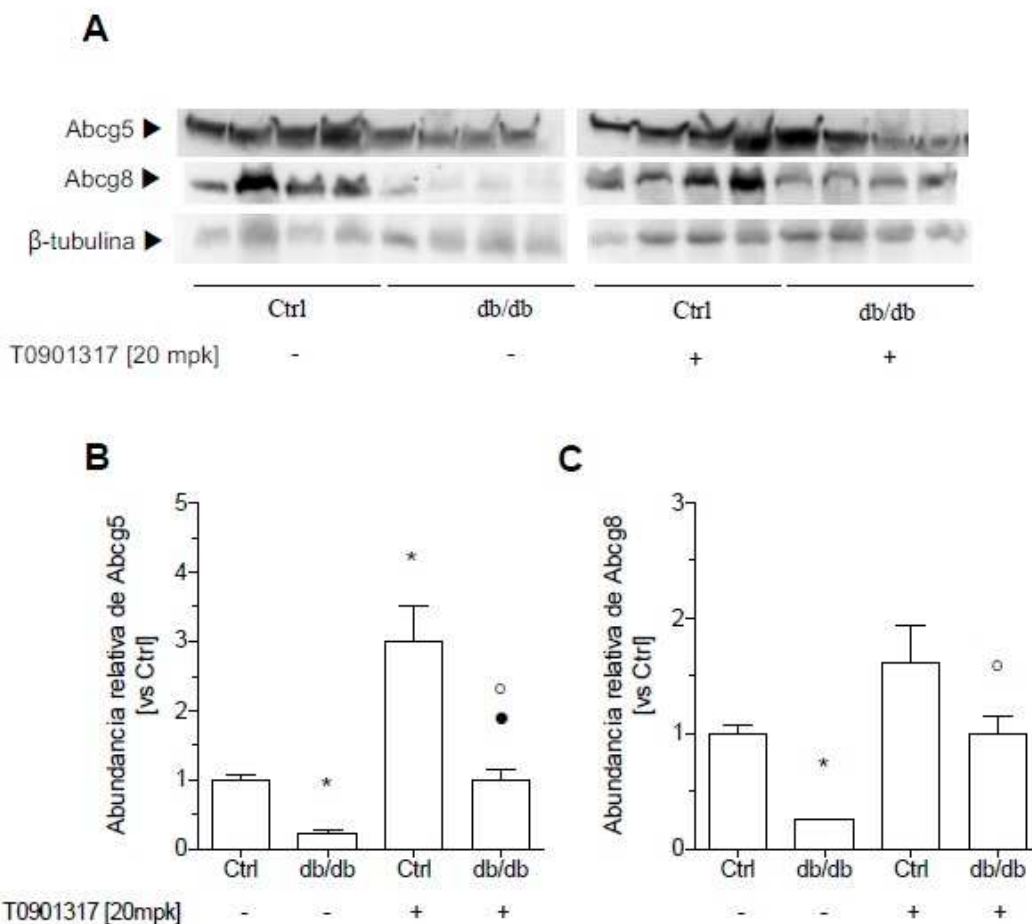


Figura 26 Análisis de la abundancia relativa de transportadores Abcg5 y Abcg8. Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar (n=4 animales por grupo). Los datos se expresan en tanto por uno tomando como referencia el peso de gris de las bandas debidas a Abcg5 o Abcg8, según corresponda, en extractos proteicos hepáticos de ratones control (vs Ctrl). A. Imagen representativa de inmunoblot de Abcg5, Abcg8 y β -tubulina tomada a partir de extractos proteicos de hígado de los diferentes grupos experimentales. B. Niveles relativos (vs grupo Ctrl) de la abundancia relativa de Abcg5 en extractos proteicos hepáticos de los diferentes grupos experimentales. C. Niveles relativos (vs grupo Ctrl) de la abundancia relativa de Abcg8 en extractos proteicos hepáticos de los diferentes grupos experimentales. Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control (* P<0,05); o ratones db/db (o P<0,05). Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db.

La administración de agonista de LXR en ratones db/db produjo sendos aumentos en los niveles relativos de expresión intestinal de *Abcg5* y *Abcg8* (**Tabla 28**), alcanzando los niveles de expresión génica determinada en ratones del grupo control. En cuanto a la expresión de *Ncp111* ésta no difirió de la mostrada por los ratones db/db.

IV.I.7 Análisis de la capacidad antioxidante de las HDL de ratones db/db

Como ya se ha descrito en el apartado I de resultados, el análisis del perfil lipoproteico reveló un aumento significativo ($\sim +2$ veces; $P < 0,001$) (**Tabla 10**) en la fracción plasmática no-HDL de los ratones db/db en comparación con la que presentaron los controles. En este trabajo se creyó oportuno analizar si la susceptibilidad a la oxidación de la fracción plasmática no-HDL de ratones db/db se encontró alterada. Los datos obtenidos mostraron que esta fracción aislada a partir de plasma de ratones db/db presentó una tendencia a la susceptibilidad a la oxidación aumentada, aunque no alcanzó cuotas significativas (posiblemente atribuido al bajo número (3) de *pooles* de fracción no-HDL ensayados), en comparación con la mostrada por la de los ratones control (**Figura 27, paneles A y B**).

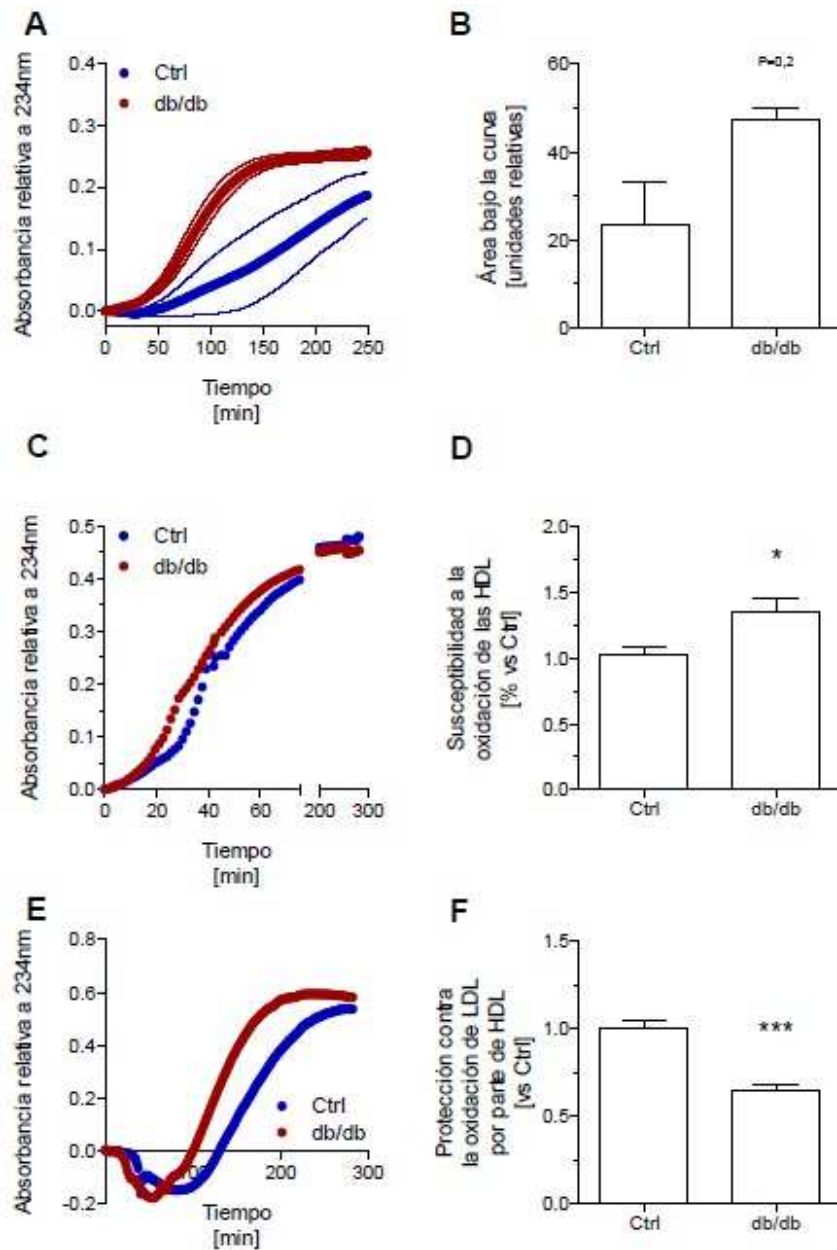


Figura 27 Propiedades antioxidantes de las lipoproteínas de ratones db/db. Se determinó la susceptibilidad a la oxidación de las fracciones lipoproteicas plasmáticas (no-HDL y HDL) y la capacidad antioxidante de las HDL de ambos grupos en mezclas de LDL y HDL. **A.** Susceptibilidad a la oxidación de no-HDL. **B.** Área bajo la curva calculada a partir de los datos de absorbancia obtenidos durante la monitorización de la susceptibilidad a la oxidación de las no-HDL. **C.** Susceptibilidad a la oxidación de HDL. **D.** Cambios relativos (vs Ctrl) en la susceptibilidad a la oxidación de HDL calculados a partir de los tiempos de fase lag. **E.** Protección contra la oxidación de LDL por parte de HDL. **F.** Protección relativa (vs Ctrl) contra la oxidación de LDL por parte de HDL. Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar. Las lipoproteínas fueron aisladas por ultracentrifugación a partir de 8-9 *pools* de plasma independientes obtenidos de 3-4 ratones cada uno, salvo en los paneles A y B, cuyos datos son representativos de tan solo 3 *pools* de plasmas. * $P < 0,05$ vs Ctrl; *** $P < 0,001$ vs Ctrl. Abreviaciones empleadas: Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db.

Por otro lado, la susceptibilidad a la oxidación de las HDL de ratones db/db sí se encontró significativamente aumentada ($\sim +1,3$ veces; $P=0,0477$) (**Figura 27, paneles C y D**), lo que a su vez se asoció con una capacidad protectora contra la oxidación de las LDL empeorada por parte de las HDL de estos ratones ($\sim -36\%$; $P=0,0004$) en comparación con la mostrada por las de los ratones control (**Figura 27, paneles E y F**).

Tales alteraciones en las propiedades oxidativas y antioxidantes de las lipoproteínas de ratones db/db se encontraron asociadas con un aumento significativo en los niveles plasmáticos de actividad Pon1 ($\sim +1,6$ veces; $P=0,0106$) y Lp-Pla2 ($\sim +1,7$ veces; $P<0,0001$) en ratones db/db en comparación con los ratones control (**Tabla 29**). Sin embargo esta actividad cuando viene relacionada a fosfolípidos se observó disminuida en acorde con sus niveles de expresión génica en hígado de ratones db/db ($\sim -60\%$; $P<0,05$) en comparación con los de los controles. Por otro lado, el análisis de la expresión de Lp-Pla2 (ie, *Pla2g7*) en hígado no reveló cambios significativos (**Tabla 29**).

En relación a los niveles totales de actividad enzimática Lp-Pla2 se observó un aumento significativo de la actividad con una tendencia a tener aumentada ($\sim +20\%$; $P=0,0313$) la proporción de esta actividad enzimática asociada a la fracción no-HDL de ratones db/db en comparación con la de ratones control (**Tabla 29**).

Tabla 29 Perfil de expresión de genes en hígado y niveles plasmáticos de actividad enzimática de dianas moleculares asociadas a HDL que intervienen en su actividad antioxidante y antiinflamatoria.

	Ctrl	db/db	P
Genes			
<i>Pon1</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	0,4 ± 0,2	<0,05
<i>Pla2g7</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	1,5 ± 0,5	ns
Actividades enzimáticas			
Totales y asociadas a fracciones lipoproteicas			
Pon1 [$\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]	35,5 ± 6,3	57,1 ± 5,1	0,0106
Pon1 [$\mu\text{mol}\cdot\mu\text{mol PL-HDL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]	27,06 ± 3,5	14,02 ± 0,7	0,028
Lp-Pla2 total [$\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]	112,3 ± 4,5	195,6 ± 14,0	<0,0001
Lp-Pla2 asociada a HDL [%]	86,2 ± 2,3	76,0 ± 8,0	0,2828
Lp-Pla2 asociada a no-HDL [%]	13,7 ± 2,2	34,0 ± 7,2	0,0313

Los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar (n=7-9 ratones por grupo). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control. Abreviaciones empleadas: Lp-Pla2, fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas; *Pla2g7*, gen que codifica la fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas; PL-HDL, fosfolípido de HDL; *Pon1*, gen que codifica la paraoxonasa-1; Pon1, actividad arilesterasa/paraoxonasa-1; nd, no determinado; ns, no significativo.

IV.II Efecto de la sobreexpresión de apoA-I en ratones db/db sobre los parámetros lipídicos.

La hiperexpresión de apoA-I humana en ratones db/db (hA-I-db/db) resultó en un aumento (1,3 veces; $p < 0,05$) en su peso corporal en comparación con los ratones db/db no transgénicos (**Tabla 30**). Igualmente, el peso de su hígado también se encontró aumentado. En este caso, la relación entre el peso del hígado y el peso corporal reveló un aumento no proporcional en el hígado de los ratones hA-I-db/db en comparación con el de los db/db (**Tabla 30**). Todo ello se encontró además asociado a un consumo más elevado de comida y bebida en estos ratones. Sin embargo, la eficiencia calórica del total ingerido (expresada como ganancia de peso en gramos por cada kcal ingerida) no difirió entre los diferentes grupos (**Tabla 30**).

Los niveles plasmáticos de colesterol se encontraron elevados tanto en los ratones con fondo genético C57BL/6J (hA-I) como en los ratones hA-I-db/db en comparación con sus ratones control respectivos (Ctrl y db/db, respectivamente), siendo ello atribuido sobretudo a una elevación concomitante en sus niveles de colesterol de HDL (**Tabla 30**). La hiperexpresión de apoA-I también resultó en un aumento en los niveles plasmáticos de triglicéridos y de ácidos grasos en los grupos de ratones hA-I y hA-I-db/db en comparación con sus respectivos controles (**Tabla 30**). Los niveles plasmáticos de triglicéridos se encontraron además asociados a un aumento en los de colesterol no-HDL, cuyos niveles se presentaron elevados en los ratones db/db con o sin expresión de apoA-I humana (hA-I-db/db o db/db, respectivamente).

Tabla 30 Efecto de la sobreexpresión de apoA-I humana sobre los parámetros corporales y bioquímicos plasmáticos en ratones db/db

	Ctrl	db/db	hA-I	hA-I-db/db	P
<i>Parámetros corporales</i>					
Peso corporal [g]	30,2 ± 2,5	44,1 ± 1,3 **	30,0 ± 1,6	55,7 ± 1,6 ° ●●	0,001
Peso del hígado [g]	1,4 ± 0,2	3,1 ± 0,2 **	1,5 ± 0,1	4,8 ± 0,2 ° ●●	0,001
Relación peso del hígado/peso corporal [unidades relativas]	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,00 **	0,05 ± 0,00	0,09 ± 0,01 ° ●●	0,001
Consumo de comida [g/día]	7,7 ± 0,1	10,2 ± 0,2 **	8,4 ± 0,1 **	13,4 ± 0,2 ° ●	0,0003
Consumo de agua [mL/día]	13,3 ± 1,1	26,0 ± 1,0 **	18,7 ± 0,8 **	30,0 ± 0,0 ° ●●	0,0003
Eficiencia calórica [g/kcal ingerida]	0,022 ± 0,002	0,024 ± 0,003	0,019 ± 0,006	0,019 ± 0,002	0,1574
<i>Parámetros bioquímicos plasmáticos</i>					
ApoA-I humana [g/L]	nd	nd	5,9 ± 0,5	6,9 ± 0,4	ns
Colesterol [mM]	2,6 ± 0,1	5,7 ± 0,2 ***	5,3 ± 0,3 ***	16,5 ± 0,1 °° ●	0,0008
Colesterol libre [%]	17,6 ± 0,02	16,2 ± 0,4	21,3 ± 0,6 **	22,4 ± 0,3 ° ●	0,0006
Colesterol de HDL [mM]	2,0 ± 0,2	4,3 ± 0,4 **	4,5 ± 0,4 **	13,6 ± 0,3 °° ●	0,0005
Colesterol de no-HDL [mM]	0,7 ± 0,1	1,2 ± 0,2 *	0,9 ± 0,2	3,0 ± 0,4 °° ●	0,0013
Triglicéridos [mM]	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,28	2,3 ± 0,1 **	3,4 ± 0,1 ° ●	0,0009
Ácidos grasos [mM]	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,0 *	0,7 ± 0,0 °	0,0005

Valores expresados como el promedio ± desviación estándar (n=4-15 animales por grupo). Los niveles de lípidos en las fracciones HDL fueron determinados en los sobrenadantes de plasma tras precipitar con ácido fosfotúngstico, mientras la fracción no-HDL se obtuvo tras descontar los niveles del parámetro debidos a las HDL del total en plasma. Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control (* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001); db/db (° P<0,05; °° P<0,01); o hA-I (● P<0,05; ●● P<0,01). Abreviaciones: hA-I, transgénico de apoA-I humana; hA-I-db/db, transgénico de apoA-I humana cruzado con db/db; nd, no determinado; ns, no significativo.

Como ya se ha mostrado previamente, la hiperexpresión de apoA-I humana produjo un aumento no solo en los niveles plasmáticos de lipoproteínas HDL sino también en los niveles plasmáticos de lipoproteínas LRT y LDL de ratones db/db en comparación con los de sus controles (hA-I) o db/db (**Tabla 30**). Un análisis más exhaustivo de las lipoproteínas confirmó la elevación de la concentración plasmática de la fracción lipoproteica no-HDL y de las HDL de estos ratones. Dicho análisis también evidenció alteraciones importantes en los niveles relativos de sus componentes aunque solo en las fracciones lipoproteicas LDL y HDL (**Tabla 31; Tabla 32**). La hiperexpresión de apoA-I en ratones db/db no produjo cambios relativos significativos en los componentes de las LRT, más allá del aumento en su masa circulante en el plasma de ratones hA-I-db/db en comparación con el mostrado por los ratones db/db (~ +3 veces; $P < 0,001$) (**Tabla 31**), siendo ello en parte atribuido a la propia expresión de la apoA-I humana, cuyo efecto también se observó en ratones hA-I en comparación con el de ratones control. En el caso de las lipoproteínas LDL, la hiperexpresión de apoA-I humana en ratones db/db resultó en un aumento (~ +5 veces; $P < 0,001$) en los niveles plasmáticos de LDL en comparación con los db/db. Las LDL de ratones h-A-I-db/db mostraron además cambios muy importantes en su composición en comparación con las de ratones db/db (**Tabla 31**). Su contenido relativo en colesterol (esterificado y libre) (colesterol esterificado: ~ +5 veces; $P < 0,001$; colesterol libre: ~ +1,5 veces; $P < 0,001$) y fosfolípidos (~ +1,6 veces; $P < 0,001$) se encontró aumentado en comparación con el mostrado por las LDL de ratones db/db. Por otro lado, su contenido relativo en triglicéridos (~ -6 veces; $P < 0,001$) y de proteínas (~ -1,2 veces; $P < 0,01$) se observó disminuido.

Tabla 31 Efecto de la sobreexpresión de apoA-I humana sobre la concentración y componentes de las lipoproteínas LRT y LDL plasmáticas en ratones db/db.

	Ctrl	db/db	hA-I	hA-I-db/db	P
LRT					
Masa circulante [g/L]	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1	1,5 ± 0,2 *	2,2 ± 0,4 ooo ***	0,0003
Colesterol esterificado [%]	3,5 ± 0,3	3,0 ± 0,2	5,0 ± 0,8	6,3 ± 0,8 o	0,0093
Colesterol libre [%]	3,5 ± 0,3	1,1 ± 0,1 ***	4,8 ± 0,2 *	4,7 ± 0,4 ooo	<0,0001
Fosfolípido [%]	11,8 ± 1,0	5,0 ± 0,6 ***	12,8 ± 0,4	12,8 ± 1,1 ooo	<0,0001
Triglicéridos [%]	56,1 ± 2,4	65,5 ± 2,0	50,4 ± 2,8	54,2 ± 4,2	0,0150
Proteínas [%]	25,1 ± 1,7	25,4 ± 1,3	27,0 ± 2,1	21,9 ± 3,1	0,4441
LDL					
Masa circulante [g/L]	0,4 ± 0,0	1,2 ± 0,1 **	0,8 ± 0,2	6,4 ± 0,2 *** ooo ●●●	<0,0001
Colesterol esterificado [%]	0,4 ± 0,0	1,2 ± 0,1 **	0,8 ± 0,2	6,4 ± 0,2 *** ooo ●●●	<0,0001
Colesterol libre [%]	6,4 ± 0,2	7,2 ± 0,2 ***	8,1 ± 0,5 **	10,5 ± 0,2 *** ooo ●●●	<0,0001
Fosfolípido [%]	16,4 ± 0,3	23,4 ± 0,5 ***	23,2 ± 1,1 ***	37,2 ± 0,7 *** ooo ●●●	<0,0001
Triglicéridos [%]	36,3 ± 0,5	22,6 ± 0,8 ***	17,6 ± 1,7 ***	3,7 ± 0,2 *** ooo ●●●	<0,0001
Proteínas [%]	29,8 ± 0,4	31,2 ± 0,4	36,8 ± 1,5 ***	25,8 ± 0,7 * oo ●●●	<0,0001

Valores expresados como el promedio ± desviación estándar (n=3-5 *pooles* de plasma de 2-3 ratones cada uno). Las lipoproteínas se aislaron mediante ultracentrifugación. Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control (* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001); db/db (o P<0,05; oo P<0,01; ooo P<0,001); o hA-I (●●● P<0,001). Abreviaciones: hA-I, transgénico de apoA-I humana; hA-I-db/db, transgénico de apoA-I humana cruzado con db/db; LDL, lipoproteínas de baja densidad (1,006<d<1,063 g/mL); LRT, lipoproteínas ricas en triglicéridos (d<1,006 g/mL).

Finalmente, la hiperexpresión de apoA-I humana en ratones db/db promovió una elevación significativa (1,5 veces; $P < 0,05$) en los niveles plasmáticos de lipoproteínas HDL en comparación con los de ratones db/db (**Tabla 32**).

Tabla 32 Efecto de la sobreexpresión de apoA-I humana sobre la concentración y componentes de las lipoproteínas HDL plasmáticas en ratones db/db.

	Ctrl	db/db	hA-I	hA-I-db/db	P
<i>HDL</i>					
Masa circulante [g/L]	2,9 ± 0,1	5,9 ± 0,3 **	6,4 ± 0,9 **	8,7 ± 0,7 *** ^o	<0,0001
Colesterol esterificado [%]	11,9 ± 0,3	13,5 ± 0,1 **	14,4 ± 1,4	17,0 ± 0,4 ** ^o	0,0043
Colesterol libre [%]	4,2 ± 0,2	3,3 ± 0,1	5,3 ± 0,5	5,9 ± 0,2 ** ^{ooo}	0,0002
Fosfolípido [%]	28,9 ± 0,4	27,5 ± 0,6	37,1 ± 2,8 *	45,8 ± 2,0 *** ^{ooo} ●	<0,0001
Triglicéridos [%]	4,9 ± 0,2	4,6 ± 0,2	0,7 ± 0,1 ***	0,6 ± 0,0 *** ^{ooo}	<0,0001
Proteínas [%]	50,0 ± 0,3	51,0 ± 0,5	42,6 ± 4,6	30,6 ± 2,4 *** ^{ooo} ●	<0,0001

Valores expresados como el promedio ± desviación estándar (n=3-5 *pools* de plasma de 2-3 ratones cada uno). Las lipoproteínas se aislaron mediante ultracentrifugación dentro del rango de densidad $1,063 < d < 1,21$ g/mL. Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$); db/db (oo $P < 0,001$; ooo $P < 0,001$); o hA-I (●●● $P < 0,001$). Abreviaciones: hA-I, transgénico de apoA-I humana; hA-I-db/db, transgénico de apoA-I humana cruzado con db/db; LDL, lipoproteínas de baja densidad ($1,006 < d < 1,063$ g/mL).

Similarmente a lo descrito para las LDL, el contenido relativo en colesterol esterificado (~ +1,3 veces; $P < 0,001$) y fosfolípidos (~ +1,7 veces; $P < 0,001$) se encontró elevado en comparación con el mostrado por las HDL de ratones db/db. Mientras que su contenido relativo en triglicéridos (> -7 veces; $P < 0,001$) y de proteínas (~ -1,7 veces; $P < 0,01$) se encontró disminuido.

IV.II.1 Efecto de la sobreexpresión de apoA-I en ratones db/db sobre el TRC-m

En cuanto a su papel sobre el TRC-m, la hiperexpresión de apoA-I resultó en un aumento en la actividad debida al [³H]-colesterol en plasma (**Figura 28, panel A**), siendo dicha elevación principalmente atribuida a la fracción de HDL (**Figura 28, panel B**).

Los niveles relativos de radioactividad derivada del [³H]-colesterol en hígado se observaron aumentados por la hiperexpresión de apoA-I siendo del orden de dos veces más elevada tanto en relación a los ratones control (vs hA-I) como db/db (vs hA-I-db/db) (**Figura 28, panel C**).

Cabe destacar además que el aumento relativo alcanzado en los ratones hA-I fue similar al alcanzado por los ratones db/db, siguiendo su acumulación un patrón aditivo cuando ambos factores coexistieron en el mismo animal (hA-I-db/db) (**Figura 28, panel C**).

Esto último se encontró también asociado con un aumento en los niveles de colesterol expresados por gramo de hígado (~ +3 veces; P=0,01) o hígado total (~ +7,8 veces; P=0,001) de ratones hA-I-db/db en comparación con el de ratones hA-I (**Tabla 33**), alcanzando niveles incluso superiores en comparación con los ratones del grupo Ctrl. En comparación con los ratones db/db y consistentemente con los datos metabólicos, la hiperexpresión de apoA-I resultó en un aumento (>3 veces) en los niveles hepáticos de colesterol expresados por gramo de hígado y por hígado total (**Tabla 33**). Similarmente, la sobreexpresión de apoA-I también produjo un aumento en los niveles hepáticos de triglicéridos expresados tanto por gramo de hígado (~ 2,8 veces; P<0,01) como por hígado total (~ 3,6 veces; P<0,01) (**Tabla 33**).

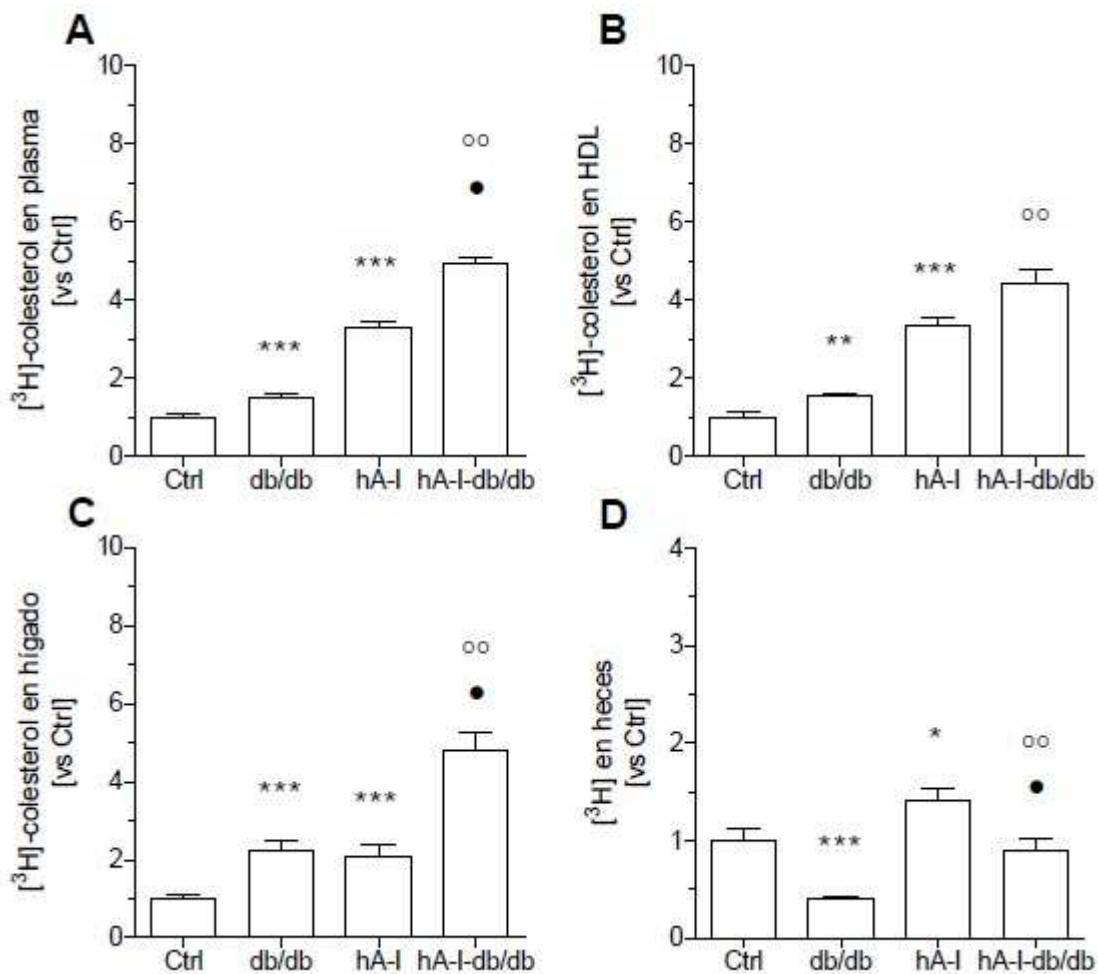


Figura 28 Efecto de la sobreexpresión de apoA-I humana sobre el TRC-m en ratones db/db. Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar (n=4-6 animales por grupo). Los macrófagos J774.A1 fueron marcados con [³H]-colesterol en presencia de LDL acetiladas e inyectados ip a los ratones (n=5 por grupo). Los datos se expresan en tanto por uno tomando como referencia los porcentajes vs dosis inyectada determinado en ratones control (vs Ctrl). A. Actividad debida a [³H]-colesterol residente en plasma (Ctrl-tanda 1: $0,91 \pm 0,11\%$ vs dosis inyectada; Ctrl-tanda 2: $0,71 \pm 0,09\%$ vs dosis inyectada). B. Actividad debida a [³H]-colesterol residente en HDL (Ctrl: $0,61 \pm 0,07\%$ vs dosis inyectada; Ctrl-tanda 2: $0,50 \pm 0,05\%$ vs dosis inyectada). C. Actividad debida a [³H]-colesterol residente en hígado (Ctrl: $1,90 \pm 0,27\%$ vs dosis inyectada; Ctrl-tanda 2: $1,6 \pm 0,14\%$ vs dosis inyectada). D. Actividad debida a [³H] residente en heces (Ctrl: $0,17 \pm 0,03\%$ vs dosis inyectada; Ctrl-tanda 2: $0,22 \pm 0,03\%$ vs dosis inyectada). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control (* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001); ratones db/db (o P<0,05; oo P<0,01); o ratones hA-I (• P<0,05; •• P<0,01). Abreviaciones: hA-I, transgénico de apoA-I humana; hA-I-db/db, transgénico de apoA-I humana cruzado con db/db; Ctrl, ratones control.

Tabla 33 Análisis de la proporción relativa de colesterol libre y de [³H]-colesterol en su forma libre y esterificada en hígado calculada a partir de los datos de TRC-m.

	Ctrl	db/db	hA-I	hA-I-db/db	P
<i>Medición bioquímica</i>					
Colesterol total [μmol/g]	4,1 ± 0,5	5,0 ± 1,1	5,5 ± 0,4	15,7 ± 1,6 ° ●●	<0,001
Triglicérido total [μmol/g]	4,1 ± 1,1	49,1 ± 5,5 ***	9,0 ± 1,3	137,6 ± 6,1 °°° ●●●	<0,001
Colesterol total [μmol/hígado]	5,3 ± 0,5	18,1 ± 4,4 ***	8,6 ± 0,9	67,3 ± 8,0 ° ●●	<0,001
Colesterol libre [% vs colesterol total]	75,2 ± 5,8	36,5 ± 7,8 **	nd	nd	<0,001
Triglicérido total [μmol/hígado]	5,1 ± 1,0	185,5 ± 24,1 ***	13,6 ± 1,8	661,3 ± 41,8 °°° ●●●	<0,001
<i>Medición de actividad [³H]</i>					
Colesterol total [% vs dosis inyectada]	1,7 ± 0,4	5,7 ± 0,8 **	3,0 ± 0,7	7,7 ± 0,8 ●	<0,01
Colesterol libre [% vs dosis inyectada]	1,2 ± 0,3	2,5 ± 0,3 **	1,8 ± 0,3	3,1 ± 0,2 ●	<0,01
Colesterol libre [% vs actividad total]	71,5 ± 3,8	49,1 ± 3,6 **	62,0 ± 5,2	41,1 ± 2,1 ●	<0,01

Valores expresados como el promedio ± desviación estándar (n=4-6 animales por grupo). La medición bioquímica del colesterol total y libre se realizó a partir de extractos lipídicos de hígado mediante kits comerciales adaptados a un robot autoanalizador COBAS. Los datos se expresan en relación al hígado total. El porcentaje de colesterol total se expresó respecto de la dosis inyectada que llega al hígado al cabo de 48 h desde el inicio del ensayo. El porcentaje de colesterol libre vs actividad total se calculó a partir de los extractos lipídicos de las bandas de colesterol libre y esterificado separadas mediante un sistema TLC. Los datos (expresados en porcentaje) que se muestran se obtuvieron dividiendo la actividad (³H) en la banda donde se acumula el [³H]-colesterol libre por la actividad total (ie, suma de actividades en las bandas donde se acumula el [³H]-colesterol libre y [³H]-éster de colesterol). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control (* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001); ratones db/db (o P<0,05; ooo P<0,001); o ratones hA-I (● P<0,05; ●● P<0,01; ●●● P<0,001). Abreviaciones: hA-I, transgénico de apoA-I humana; hA-I-db/db, transgénico de apoA-I humana cruzado con db/db; nd, no determinado.

Aunque el porcentaje de colesterol libre no pudo ser determinado y por tanto calculado en hígado de ratones hA-I-db/db, el porcentaje de colesterol libre vs actividad total se mantuvo

reducido ($\sim -22\%$; $P < 0,01$ y $\sim -21\%$; $P < 0,05$) en comparación con sus controles (ratones hA-I), de igual modo que lo estuvo el calculado en hígados de ratones db/db respecto de los suyos (ie, Ctrl) (**Tabla 33**).

Tabla 34 Proporción de la fracción de [^3H] en sales bilares y de colesterol analizada en heces de 48 h.

	Ctrl	db/db	hA-I	hA-I-db/db	P
Actividad total [% vs dosis inyectada]	$0,217 \pm 0,029$	$0,080 \pm 0,007$ **	$0,282 \pm 0,025$	$0,178 \pm 0,022$ ° •	0,002
Colesterol [% vs dosis inyectada]	$0,118 \pm 0,020$	$0,038 \pm 0,006$ **	$0,152 \pm 0,008$	$0,098 \pm 0,006$ ° •	0,002
Ácidos biliares [% vs dosis inyectada]	$0,097 \pm 0,011$	$0,046 \pm 0,004$ **	$0,130 \pm 0,020$	$0,083 \pm 0,009$ °	0,003

Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar ($n=4-6$ animales por grupo). El porcentaje de colesterol y sales biliares en heces de 48 h se expresó respecto de la dosis inyectada. Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control (** $P < 0,01$); ratones db/db (° $P < 0,05$) o ratones hA-I (• $P < 0,05$). Abreviaciones: hA-I, transgénico de apoA-I humana; hA-I-db/db, transgénico de apoA-I humana cruzado con db/db; Ctrl, ratones control.

En el caso de las heces recolectadas en el período de 48 h, los niveles relativos de actividad debida al [^3H] en ratones db/db se encontraron significativamente reducidos (> -2 veces; $P < 0,001$) en comparación con los de los ratones control (**Figura 28, panel D**). Como cabía esperar, la hiperexpresión de apoA-I resultó en un consabido aumento ($\sim 1,5$ veces, $P < 0,05$) en la niveles relativos de [^3H] en heces de 48 h e indujo un aumento relativo aun mayor (~ 2 veces, $P < 0,01$) en los niveles de cuentas en heces de 48 h de ratones hA-I-db/db en comparación con los medidos en heces de ratones db/db (**Figura 28, panel D**). Esto último se atribuyó fundamentalmente a un aumento en la eliminación a heces de colesterol y ácidos biliares (**Tabla 34**).

Tabla 35 Perfil de expresión hepático de genes involucrados en el TRC-m.

	Ctrl	db/db	hA-I	hA-I-db/db	P
<i>Abca1</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1 **	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,02
<i>Abcg5</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	0,3 ± 0,1 **	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,2 °	0,01
<i>Abcg8</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1 **	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1 °	0,01
<i>Scarb1</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1 **	1,3 ± 0,2	0,6 ± 0,1 •	0,03
<i>Apoa1</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,2	0,3 ± 0,1 **	1,0 ± 0,1	0,2 ± 0,1 ••	0,04
<i>APOA1</i> [unidades relativas vs Ctrl]	nd	nd	1,0 ± 0,1	0,3 ± 0,1 •	0,02

Valores expresados como el promedio ± desviación estándar (n=4-6 animales por grupo). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control (** P<0,01); ratones db/db (° P<0,05) o ratones hA-I (• P<0,05; •• P<0,01). Abreviaciones: hA-I, transgénico de apoA-I humana; hA-I-db/db, transgénico de apoA-I humana cruzado con db/db; Ctrl, ratones control.

En comparación con los ratones db/db, el perfil hepático de expresión de genes involucrados en el tráfico de colesterol en hígado reveló un aumento (recuperación) significativa en los niveles relativos de expresión de *Abcg5* y *Abcg8*, en el grupo de ratones hA-I-db/db (**Tabla 35**).

Resultados similares fueron alcanzados al comparar los niveles relativos de proteínas debidos a estos transportadores de colesterol mediante análisis western blot entre los diferentes grupos experimentales (**Figura 29**). Aunque los niveles de expresión génica de *Abca1* en hígado de ratones hA-I-db/db no difirieron significativamente de los de ratones db/db, estos aumentaron alcanzando niveles relativos similares a los presentes en ratones hA-I y Ctrl, respectivamente (**Tabla 35**).

Por otro lado, la hiperexpresión de apoA-I humana no ejerció ninguna influencia sobre los niveles relativos de expresión de *Scarb1* (**Tabla 35**), manteniéndose bajos en los ratones hA-I-db/db.

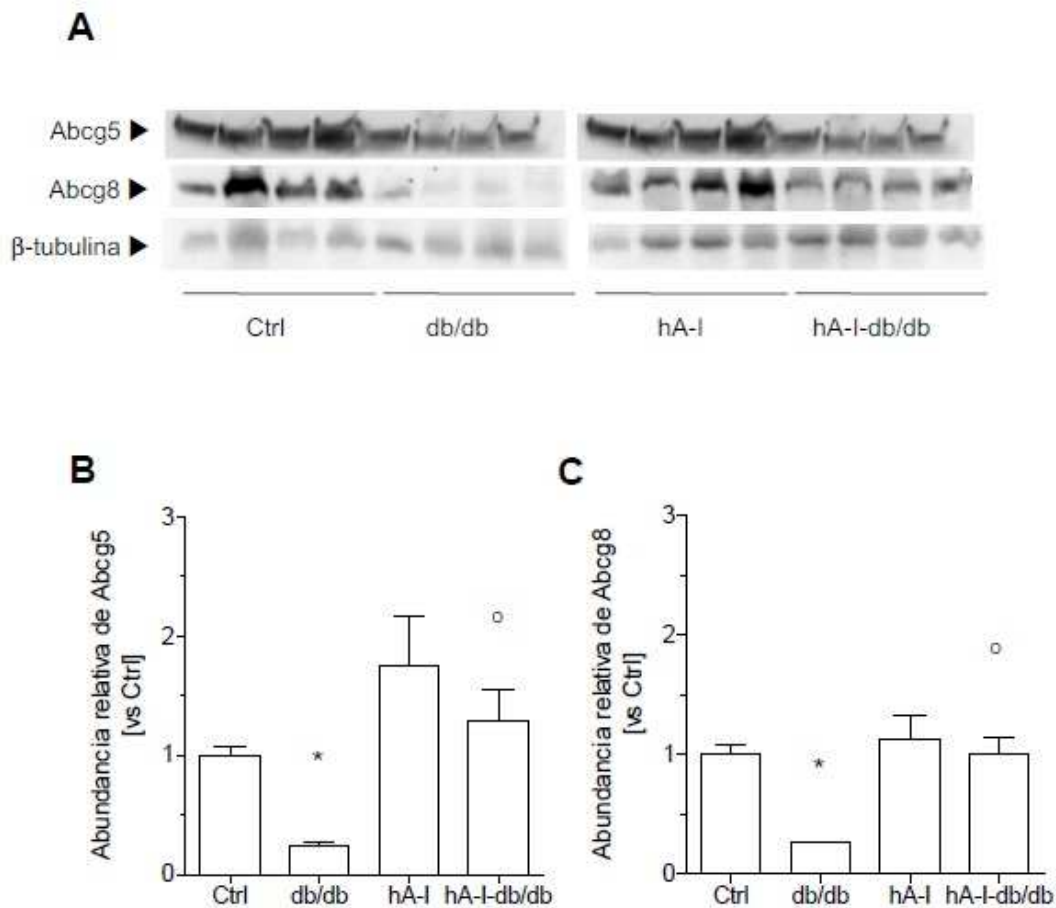


Figura 29 Análisis de la abundancia relativa de transportadores Abcg5 y Abcg8. Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar (n=4 animales por grupo). Los datos se expresan en tanto por uno tomando como referencia el peso de gris de las bandas debidas a Abcg5 o Abcg8, según corresponda, en extractos proteicos hepáticos de ratones control (vs Ctrl). A. Imagen representativa de inmunoblot de Abcg5, Abcg8 y β -tubulina tomada a partir de extractos proteicos de hígado de los diferentes grupos experimentales. B. Niveles relativos (vs grupo Ctrl) de la abundancia relativa de Abcg5 en extractos proteicos hepáticos de los diferentes grupos experimentales. C. Niveles relativos (vs grupo Ctrl) de la abundancia relativa de Abcg8 en extractos proteicos hepáticos de los diferentes grupos experimentales. Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control (* $P < 0,05$); o ratones db/db (o $P < 0,05$). Abreviaciones: hA-I, transgénico de apoA-I humana; hA-I-db/db, transgénico de apoA-I humana cruzado con db/db; Ctrl, ratones control.

La sobreexpresión de apoA-I humana en ratones db/db sobre el perfil de expresión génica intestinal reveló cambios relativos importantes en la expresión de *Abcg5* y *Abcg8* (**Tabla 36**). Aunque su expresión no alcanzó cuotas significativas, ésta presentó una tendencia a estar aumentada ($\sim +1,4$ veces para ambos) en ratones hA-I-db/db en comparación con los ratones db/db (**Tabla 36**), llegando a niveles de expresión relativa que no difirieron con los analizados en el grupo control. Igual argumentación fue aplicable para el caso la expresión de *NcpIII* cuya expresión relativa remontó ($\sim +2,7$ veces) en ratones hA-I-db/db en comparación con los ratones db/db (**Tabla 36**). El perfil de expresión de estos genes en intestino de ratones hA-I-db/db no difirió del mostrado por los ratones Ctrl y hA-I, respectivamente.

Tabla 36 Perfil de expresión intestinal de genes involucrados en el TRC-m.

	Ctrl	db/db	hA-I	hA-I-db/db	P
<i>Abcg5</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1 *	0,7 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	0,01
<i>Abcg8</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1 **	0,8 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	0,009
<i>NcpIII</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1 **	1,2 \pm 0,2	0,8 \pm 0,2	0,03
<i>ApoA1</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 \pm 0,1	0,6 \pm 0,2	2,1 \pm 0,3 **	2,4 \pm 0,4 o	0,03
<i>APOAI</i> [unidades relativas vs Ctrl]	nd	nd	1,0 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	0,59

Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar (n=4-6 animales por grupo). Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control (* P<0,05; ** P<0,01); o ratones db/db (o P<0,05). Abreviaciones: hA-I, transgénico de apoA-I humana; hA-I-db/db, transgénico de apoA-I humana cruzado con db/db; Ctrl, ratones control.

IV.II.2 Análisis del impacto de la sobreexpresión de apoA-I sobre la mejora de la capacidad antioxidante y antiinflamatoria de las HDL de ratones db/db

IV.II.2.1 Impacto de la sobreexpresión de apoA-I sobre la capacidad antioxidante de las HDL de ratones db/db

La hiperexpresión de apoA-I humana en ratones control (hA-I) produjo en sus HDL una tendencia, aunque no significativa, a la disminución (~ -32%) en la susceptibilidad a oxidarse en comparación con la mostrada por las de los ratones Ctrl (**Figura 30, paneles A y B**), posiblemente debido al [i] impacto negativo derivado de la dispersión en la medida de esta propiedad en el grupo de HDL de ratones Ctrl y [ii] al bajo número (3) de *pooles* de HDL analizados.

La presencia de apoA-I humana en las HDL de ratones db/db (h-A-I-db/db) confirió a estas lipoproteínas una menor susceptibilidad a la oxidación (~ -28,7%; $P < 0,05$) en comparación con las de las de ratones db/db (**Figura 30, paneles A y B**). Sin embargo, la hiperexpresión de apoA-I humana en un contexto genético de ratón control no se tradujo en una disminución en la susceptibilidad de sus HDL a oxidarse, observándose en cualquier caso una tendencia.

La prevención a oxidarse asociada con la presencia de apoA-I humana en las HDL de ratones h-A-I-db/db no coincidió en una capacidad protectora contra la oxidación de las LDL mejorada por parte de las HDL de estos ratones en comparación con la mostrada por las de los ratones db/db (**Figura 30, paneles C y D**).

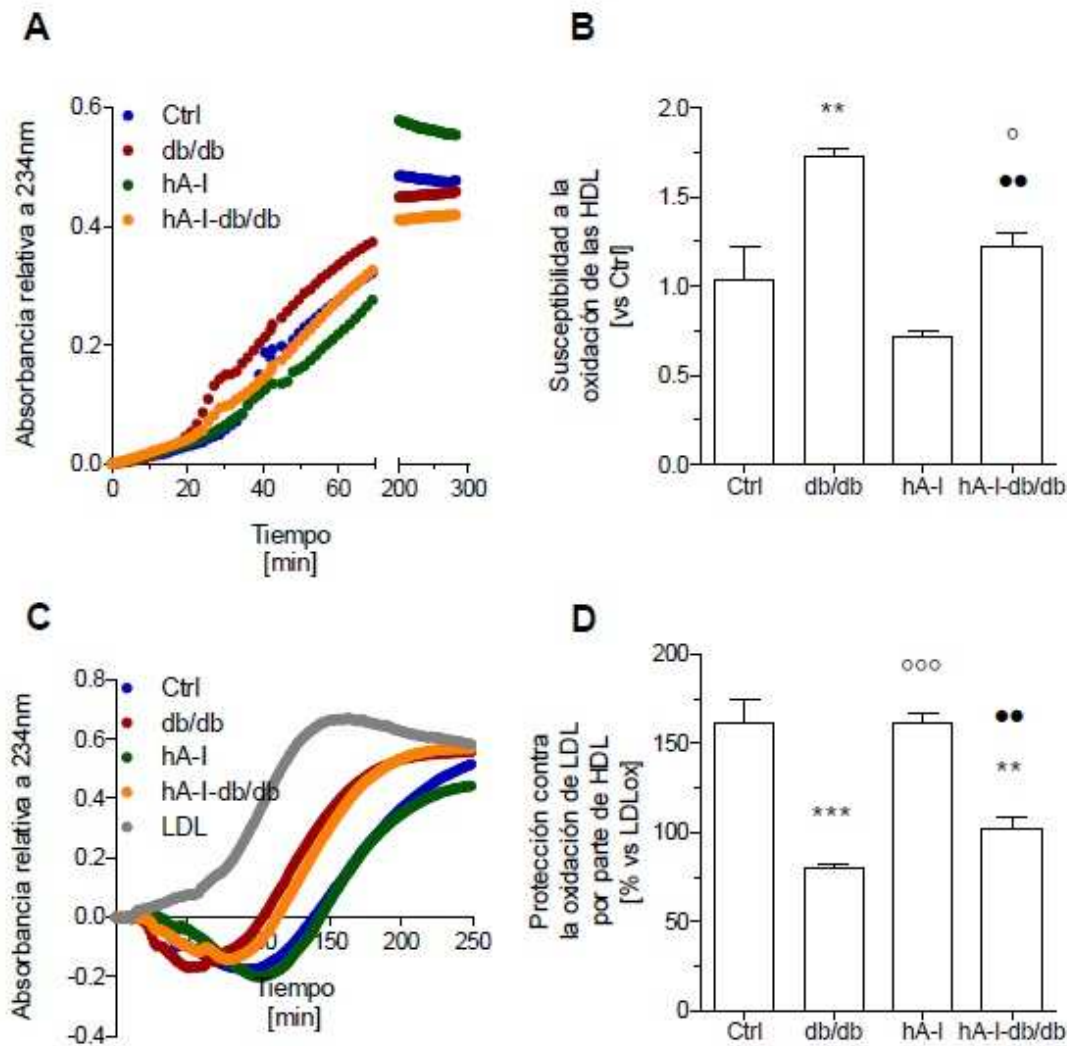


Figura 30 Efecto de la sobreexpresión de apoA-I humana sobre las propiedades antioxidantes de las lipoproteínas de ratones db/db. Se determinó la susceptibilidad a la oxidación de las HDL de los diferentes grupos y su capacidad antioxidante en mezclas de LDL y HDL. **A.** Susceptibilidad a la oxidación de HDL. **B.** Cambios relativos (vs Ctrl) en la susceptibilidad a la oxidación de HDL calculados a partir de los tiempos de fase lag. **C.** Protección contra la oxidación de LDL por parte de HDL. **D.** Protección relativa (% vs LDLox) contra la oxidación de LDL por parte de HDL. Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar. Las lipoproteínas fueron aisladas por ultracentrifugación a partir de 3 *pools* de plasma independientes obtenidos de 3-4 ratones cada uno. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs Ctrl; db/db (o $P < 0,05$; ooo $P < 0,001$); o hA-I (•• $P < 0,01$). Abreviaciones empleadas: hA-I, transgénico de apoA-I humana; hA-I-db/db, transgénico de apoA-I humana cruzado con db/db; Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db.

Tabla 37 Perfil de expresión de genes en hígado y niveles plasmáticos de actividad enzimática de dianas moleculares asociadas a HDL que intervienen en su actividad antioxidante y antiinflamatoria.

	Ctrl	db/db	hA-I	hA-I-db/db	P
Genes					
<i>Pon1</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1 **	1,2 ± 0,2	0,5 ± 0,1 * •	<0,004
<i>Pla2g7</i> [unidades relativas vs Ctrl]	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,2	0,9 ± 0,1	1,5 ± 0,4	0,1818
Actividades enzimáticas y SAA					
Totales y asociadas a fracciones lipoproteicas					
Pon1 [$\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]	31,3 ± 4,7	52,8 ± 4,0 ***	28,8 ± 1,4	33,0 ± 1,7 oo	0,0002
Pon1 [$\mu\text{mol}\cdot\mu\text{mol PL-HDL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]	27,06 ± 3,5	14,02 ± 0,7 *	8,00 ± 0,4 **	3,13 ± 0,2 *** oo ●●●	<0,0001
Lp-Pla2 total [$\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]	112,3 ± 4,5	195,6 ± 14,0 ***	144,5 ± 6,1 **	227,2 ± 25,7 •	0,001
Lp-Pla2 asociada a HDL [%]	86,2 ± 2,3	76,0 ± 8,0	92,4 ± 2,5	93,5 ± 2,0	0,0402
Lp-Pla2 asociada a no-HDL [%]	13,7 ± 2,2	34,0 ± 7,2 *	7,6 ± 2,5 *	6,5 ± 2,0 o	0,0026
Lp-Pla2 asociada a no-HDL [%]	13,7 ± 2,2	34,0 ± 7,2 *	7,6 ± 2,5 *	6,5 ± 2,0 o	0,0026
SAA total [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	20,5 ± 2,0	207,0 ± 26,4 ***	16,9 ± 1,5	198,4 ± 14,9 *** ●●●	<0,0001
SAA en HDL [$\mu\text{g}/\text{g HDL}$]	4,8 ± 0,7	25,6 ± 6,4 **	3,6 ± 0,4	7,2 ± 1,9 oo	0,0007

Los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar (n=7-15 ratones por grupo), salvo en el caso de la determinación de SAA en HDL que se realizó utilizando HDL aisladas de 6 *pooles* de plasma independientes. Las diferencias significativas se muestran en relación con el grupo de ratones control (* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001); db/db (oo P<0,001); o hA-I (●●● P<0,001). Abreviaciones empleadas: hA-I, transgénico de apoA-I humana; hA-I-db/db, transgénico de apoA-I humana cruzado con db/db; Lp-Pla2, fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas; *Pla2g7*, gen que codifica la fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas; *Pon1*, gen que codifica la paraoxonasa-1; Pon1, actividad arilesterasa/paraoxonasa-1; nd, no determinado; ns, no significativo.

Tampoco se observaron cambios en los niveles de expresión génica hepáticos de las dos actividades enzimáticas analizadas, Pon1 y Lp-Pla2 (**Tabla 37**). En este contexto, la expresión relativa de *Pon1* se encontró disminuida, mientras que la de *Pla2g7* no se observó alterada.

En cuanto a los niveles de actividad enzimática plasmáticos de estas dos enzimas plasmáticas, se confirmaron las diferencias encontradas previamente entre los grupos de ratones db/db y sus controles (**Tabla 29**), mientras que la hiperexpresión de apoA-I humana resultó en una reducción significativa ($\sim -38\%$; $P < 0,05$) en los niveles plasmáticos de actividad Pon1 en los ratones db/db-hA-I comparado con la determinada en plasma de ratones db/db (**Tabla 37**). Por otro lado, los niveles de esta actividad se encontraron disminuidos ($\sim -17\%$; $P < 0,01$) en plasma de ratones hA-I en comparación con el de los controles, estos no se observaron influenciados en ratones db/db por la hiperexpresión de apoA-I humana.

En el contexto de los ratones db/db se determinó el efecto de la hiperexpresión de apoA-I en la distribución relativa de la actividad Lp-Pla2 en las fracciones plasmáticas no-HDL y HDL. Las diferencias en los niveles de actividad plasmática de Lp-Pla2 encontradas previamente entre los ratones db/db y sus controles fueron confirmados (**Tabla 29**). La hiperexpresión de apoA-I humana en ratones no obesos resultó en un aumento significativo ($\sim +23\%$; $P = 0,0073$) en los niveles plasmáticos de actividad Lp-Pla2; similarmente los ratones db/db-hA-I también presentaron un aumento concomitante en los niveles de esta actividad enzimática comparado con los de ratones db/db ($\sim +13\%$; $P = 0,32$), aunque los cambios no llegaron a ser significativos (**Tabla 37**). En relación a los niveles de actividad enzimática Lp-Pla2 asociada a

la fracción no-HDL se confirmaron los cambios relativos determinados en plasma de ratones db/db y controles (**Tabla 29**). La hiperexpresión de apoA-I en ambos grupos (ie, h-apoA-I y db/db-hA-I) resultó en una disminución de la actividad asociada a la fracción plasmática no-HDL en comparación con la observada en sus propios controles ($\sim -7\%$; $P=0.0314$; y $\sim -25\%$; $P=0.0159$, respectivamente).

Aunque la expresión génica de SAA no fue determinada en el presente trabajo, la determinación de la proteína circulante debida a SAA reveló un aumento ($\sim +10$ veces; $P<0,001$) en su concentración plasmática en los ratones db/db en comparación con la de los controles (**Tabla 37**). La hiperexpresión de apoA-I humana en ratones db/db no produjo cambios en los niveles plasmáticos de SAA en comparación con los medidos en ratones db/db. Sin embargo, la determinación de SAA en ratones db/db-hA-I normalizada por la masa circulante de HDL reveló una disminución significativa (> -3 veces; $P<0,001$) de sus niveles en comparación con la de ratones db/db (**Tabla 37**).

IV.II.3 Impacto de la sobreexpresión de apoA-I sobre la capacidad antiinflamatoria de las HDL de ratones db/db

Para evaluar la capacidad antiinflamatoria in vitro por parte de HDL se empleó un método puesto a punto durante este trabajo de tesis (**Figura 31**). La determinación del impacto sobre la inflamación por parte de las HDL de los diferentes grupos experimentales se realizó mediante el análisis de su capacidad en modular la expresión del gen *TNFA* en macrófagos derivados de

monocitos de la línea THP-1 in vitro. En condiciones basales, ie, en ausencia de LDL oxidadas en el ensayo, los niveles relativos de expresión de *TNFA* en macrófagos diferenciados a partir de monocitos de la línea THP1 mostraron una clara tendencia ($\sim +5$ veces), aunque no significativa, a estar aumentados tras comparar el efecto de las HDL aisladas a partir de plasmas de ratones db/db con el de las de ratones control (**Figura 31; panel A**). De igual modo, la capacidad de las HDL aisladas a partir de *pools* de plasmas de ratones db/db-hA-I no pareció contribuir significativamente a reducir los niveles de expresión de *TNFA* promovidos tras la incubación de las células con HDL de ratones db/db, a pesar también de mostrar una clara tendencia a estar disminuidos. Es interesante destacar que la exposición de estas células a HDL aisladas a partir de plasmas de ratones hA-I produjo una disminución significativa ($\sim -7,7$ veces; $P < 0,05$) en la expresión de *TNFA* en comparación con la mostrada por las HDL aisladas de *pools* de plasmas independientes de ratones control. En el **panel B** de la **Figura 31** se muestra la capacidad de las HDL aisladas a partir de *pools* independientes de plasmas de los diferentes grupos experimentales en prevenir la inflamación (medida a través del cambio en los niveles de expresión relativa de *TNFA*) inducida tras exposición de estas células a LDL oxidadas. En estas condiciones de ensayo, la incubación de las HDL aisladas a partir de plasmas de ratones control no influyeron en los niveles de expresión génica de *TNFA* por parte de los macrófagos activados por las LDLox; sin embargo, las HDL de ratones db/db promovieron una inducción significativa ($\sim +2$ veces; $P < 0,05$) en la expresión de *TNFA* por parte de estas células.

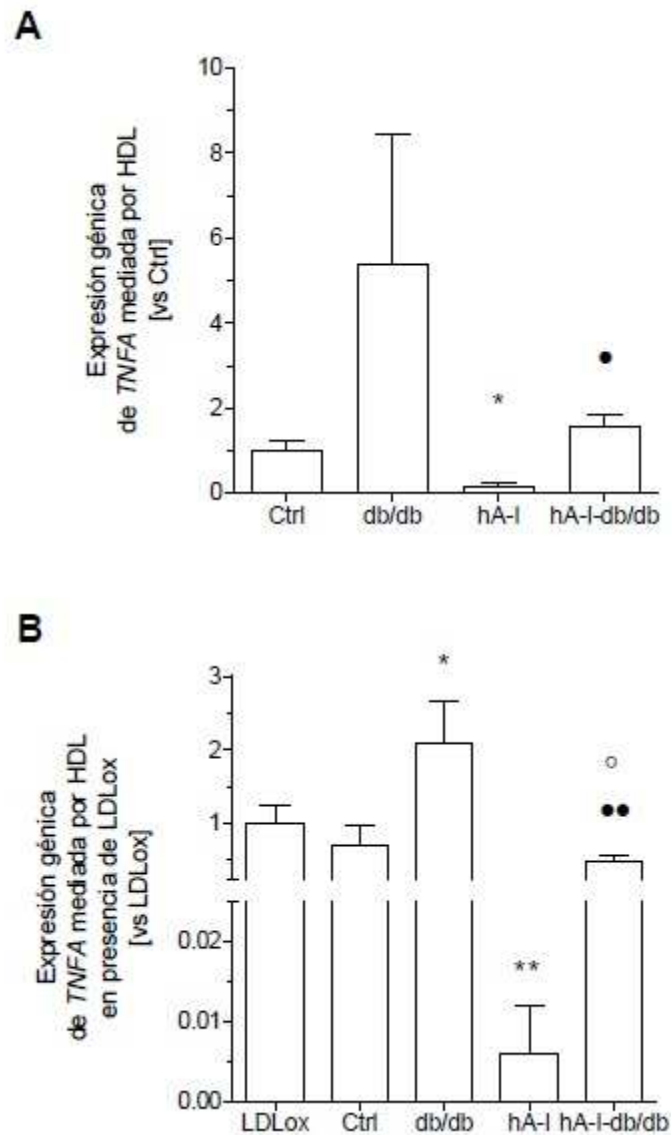


Figura 31 Efecto de la sobreexpresión de apoA-I humana sobre las propiedades antiinflamatorias de las lipoproteínas HDL de ratones db/db. Se determinó el potencial antiinflamatorio por parte de las HDL de los diferentes grupos (a una concentración de 0,5 mM de fosfolípidos) en ausencia (A) o presencia (B) de LDLox (a una concentración de 0,5 mM de fosfolípidos) a través de la medición de su efecto sobre la expresión de *TNFA* en macrófagos derivados de monocitos THP-1 humanos. **A.** Potencial antiinflamatorio de HDL. **B.** Potencial antiinflamatorio de HDL en presencia de LDLox. Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar. Las lipoproteínas fueron aisladas por ultracentrifugación a partir de 5 *pooles* de plasma independientes obtenidos de 3-4 ratones cada uno. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs Ctrl; db/db (o $P < 0,05$); o hA-I (• $P < 0,05$; •• $P < 0,01$). La inducción de *TNFA* por parte de las HDL de ratones db/db (Panel A) se encontró aumentada en comparación con la que muestran las de ratones Ctrl, aunque no significativamente ($P = 0,53$); posiblemente debido a la dispersión de datos en el grupo db/db. Abreviaciones empleadas: hA-I, transgénico de apoA-I humana; hA-I-db/db, transgénico de apoA-I humana cruzado con db/db; Ctrl, ratones control; db/db, ratones db/db; LDLox, lipoproteínas LDL oxidadas de origen humano.

La exposición de los macrófagos activados a HDL de ratones hA-I promovió una drástica reducción (~ -166 veces; $P < 0,01$) en los niveles de expresión relativos de *TNFA*; análogamente, las HDL de ratones db/db-hA-I previnieron la inducción de la expresión de *TNFA* en estas células, alcanzando niveles próximos a los observados en el caso del efecto de las HDL obtenidas a partir de ratones controles.

V - DISCUSIÓN

La obesidad, y una de sus mayores complicaciones, la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), son reconocidos factores independientes de riesgo cardiovascular. Estas patologías suelen presentar frecuentemente asociadas con unos niveles plasmáticos alterados de ciertos lípidos y lipoproteínas. En estas entidades no sólo suelen encontrarse alteradas las características cuantitativas de las lipoproteínas (Tchernof and Despres 2013, Bays, Jones et al. 2014), básicamente sus niveles plasmáticos, composición química, sino también las cualitativas, ie, atributos que les confieren ciertas propiedades biológicas potencialmente ateroprotectoras (Kontush and Chapman 2010, Camont, Chapman et al. 2011).

En particular, se ha atribuido a las HDL un amplio abanico de propiedades antiaterogénicas, la evaluación de una de ellas, el TRC-m, en humanos es un aspecto no completamente resuelto por motivos principalmente éticos y de práctica médica (Escola-Gil, Rotllan et al. 2009, Lee-Rueckert, Escola-Gil et al. 2016). En contraste, ya se tienen datos sobre su capacidad de estimular el eflujo de colesterol desde macrófagos *in vitro*, así como de sus potenciales antioxidante y antiinflamatorio (Barter, Nicholls et al. 2004, Navab, Anantharamaiah et al. 2005, Kontush and Chapman 2006, Navab, Reddy et al. 2007, Saemann, Poglitsch et al. 2010), cuya evaluación puede realizarse mediante ensayos *ex vivo*. Estas propiedades de HDL se han descrito comprometidas en pacientes obesos y diabéticos (Hansel, Giral et al. 2004, Nobecourt, Jacqueminet et al. 2005, Kontush and Chapman 2006, Kontush and Chapman 2006, Saemann, Poglitsch et al. 2010, Rosenson, Brewer et al. 2012,

Sampaio, Barbosa et al. 2013, Saleheen, Scott et al. 2015), que presentan unos niveles plasmáticos disminuidos de HDL que además son disfuncionales (Kontush and Chapman 2006, Kontush and Chapman 2006, Navab, Reddy et al. 2007, Rosenson, Brewer et al. 2013). La atenuación en la funcionalidad de las HDL observada en estas enfermedades metabólicas es en gran medida atribuida a alteraciones en sus apolipoproteínas y enzimas, las cuales derivan de procesos que implican su modificación como resultado de su interacción con moléculas reactivas derivados de células de la pared arterial o mediada procesos de glicación no enzimática (Kontush and Chapman 2006, Kontush and Chapman 2006). En este contexto, el análisis del impacto de diferentes estrategias terapéuticas dirigidas a elevar los niveles plasmáticos de HDL funcionales, o de su apolipoproteína principal, o desarrollo de terapias basadas en la administración exógena de apoA-I, HDL reconstituidas o miméticos de apoA-I es un campo activo para muchos laboratorios (Navab, Anantharamaiah et al. 2005, Tan 2009, Van Lenten, Wagner et al. 2009, Klancic, Woodward et al. 2016).

V.1 Características cuantitativas y metabólicas de las lipoproteínas

En nuestro trabajo utilizamos el modelo de ratón db/db en un fondo genético C57BL/6J, cuyo fenotipo manifestó varios de los componentes del síndrome metabólico (Grundy, Cleeman et al. 2005). En contraste con el fondo genético C57BLKS/J, que ha sido empleado en muchos trabajos para estudiar un fenotipo

obeso más agresivo y acelerado en la progresión a diabetes (Shafir, Ziv et al. 1999, King 2012), la elección del fondo genético C57BL/6J permitió la evaluación de las características funcionales de sus lipoproteínas plasmáticas en un modelo animal con un fenotipo menos severo.

Tal y como ya está descrito (<https://www.jax.org/strain/000697>), estos ratones son hiperfágicos y presentan un gasto energético reducido lo que resulta en el desarrollo temprano de obesidad debido a una mutación autosómico recesiva en el gen *Lepr* (King 2012, Lutz and Woods 2012). Consistentemente, en nuestro modelo, el cálculo de la eficiencia calórica de estos ratones demostró además que aunque su ingesta calórica fue mayor, el exceso de kilocalorías consumidas se acumuló en forma de grasa. Ello se pudo constatar en un aumento masivo de la adiposidad en diferentes compartimentos de tejido adiposo corporal y en otros órganos, ie, ectópica, como en el hígado y músculo esquelético, que a su vez predispone a desarrollar insulinoresistencia y dislipemia (Grundy, Cleeman et al. 2005). Este fenotipo se encontró a su vez asociado con un cuadro insulinoresistente definido por unos niveles plasmáticos elevados de insulina y glucosa.

Los ratones db/db también presentaron esteatosis hepática, en la cual predominó la acumulación de triglicéridos. En condiciones fisiológicas no patológicas se establece que los niveles hepáticos de triglicéridos basales son relativamente bajos, lo que se atribuye a un equilibrio preciso entre la captación y síntesis de novo de ácidos grasos y la biodisponibilidad de triglicéridos a través de la oxidación de ácidos grasos y la

secreción de TRLs (Kawano and Cohen 2013). Así que la acumulación masiva de ácidos grasos y de triglicéridos en el hígado graso de ratones db/db puede ser debida a una descompensación en su síntesis, utilización, o ambos procesos a la vez.

La insulinoresistencia puede producir esteatosis hepática por medio de diferentes mecanismos (Kawano and Cohen 2013). Uno de ellos resultaría de una captación aumentada de ácidos grasos atribuida a su liberación por parte de la gran masa de tejido adiposo como consecuencia de una respuesta a la insulina disminuida. Consistentemente, la expresión de *Cd36*, cuyo producto juega un papel clave en facilitar la captación de ácidos grasos del plasma (Jay and Hamilton 2016), se encontró elevada en el hígado de los ratones db/db. Ello concuerda con datos previos de otros según los cuales la expresión de *CD36* se encuentra frecuentemente elevada en hígado graso de pacientes obesos (Greco, Kotronen et al. 2008, Miquilena-Colina, Lima-Cabello et al. 2011) y en modelos experimentales de obesidad (Memon, Fuller et al. 1999, Koonen, Jacobs et al. 2007, Zhou, Febbraio et al. 2008). La hiperinsulinemia estimula la expresión hepática de *Cd36* en ratones (Steneberg, Sykaras et al. 2015). Se ha descrito que su hiperexpresión contribuiría en la iniciación de la inflamación en respuesta a la acumulación excesiva de grasa en el hígado (Love-Gregory and Abumrad 2011), lo que sugiere un posible papel en el desarrollo de esteatohepatitis para esta molécula.

El perfil de expresión génica en ratones db/db sugiere una lipogénesis in vivo aumentada en el hígado. La esteatosis hepática se encuentra frecuentemente en

ratones obesos con insulinoresistencia y es concomitante a una lipogénesis activa (Foufelle and Ferre 2002). Este proceso no fue estudiado directamente en el presente trabajo; principalmente porque ello ya ha sido previamente resuelto por otros autores utilizando el mismo modelo animal (Yen, Allan et al. 1976). Se ha propuesto que la hiperinsulinemia promueve la inducción de la expresión de genes cuyos productos controlan la lipogénesis de novo en el hígado (Kawano and Cohen 2013) y que la estimulación de la lipogénesis, a través de la inducción de genes involucrados en la síntesis de novo de ácidos grasos, depende de la activación inducida por la insulina del factor de transcripción *Srebp1c* (Foretz, Pacot et al. 1999, Shimomura, Bashmakov et al. 1999, Hegarty, Bobard et al. 2005). Además de *Cd36*, la activación de *Srebp1c* por parte de la insulina implicaría dos mecanismos: la inducción de su transcripción y su activación mediante proteólisis de su precursor. Además del impacto de la resistencia a la insulina, la actividad de *Srebp1c* puede también encontrarse elevada en hígados grasos de ratones obesos tanto genéticos como inducidos por una dieta rica en grasas (Shimomura, Bashmakov et al. 1999). Sin embargo, en nuestro modelo observamos que la expresión de este factor de transcripción se encontró disminuida. Nuestros datos no descartan sin embargo que ésta podría estar activada en nuestro modelo ni tampoco la participación de otros mecanismos diferentes. La lipogénesis no solo es un proceso insulino-dependiente, también se rige por mecanismos glucosa-dependientes bajo el control de *Chrebp* que actuaría en conjunción con *Srebp1c* (Ferre and Foufelle 2010). Aparte de estos

mecanismos, el estrés de retículo endoplasmático, que se manifiesta en modelos animales de hígado graso (Shimomura, Bashmakov et al. 1999), puede también promover la lipogénesis a través de la activación de *Srebp1c* (Werstuck, Lentz et al. 2001), mediante un mecanismo independiente de la insulina.

Nuestros datos también mostraron un aumento en la expresión de *Pparg* en el hígado de ratones db/db, siendo ello consistente con datos previos según los cuales la expresión de este factor de transcripción se encuentra aumentada en estados de resistencia a la insulina (Love-Gregory and Abumrad 2011) e hígado graso (Inoue, Ohtake et al. 2005, Pettinelli and Videla 2011), y que su inducción estimula la lipogénesis hepática y la expresión de *Cd36* (Zhou, Febbraio et al. 2008), como en nuestro modelo. Cabe añadir además que la esteatosis hepática podría verse agravada aun más tras la inducción de los mecanismos lipogénicos dependientes de una activación de *Pparg* vía su unión con ligandos lipofílicos de pequeño tamaño (Berthou, Duverger et al. 1996, Tontonoz and Spiegelman 2008), entre los que se incluirían derivados de ácidos grasos, cuyo contenido se encontró además elevado en el hígado de estos ratones.

Aunque la oxidación de ácidos grasos, no fue directamente determinado en hígado de ratones db/db; el análisis de la expresión de uno de sus determinantes, la *Cpt1a*, se observó significativamente disminuida en este órgano (datos no mostrados), lo que sugeriría que la actividad mitocondrial hepática podría encontrarse comprometida en estos ratones.

Por otro lado, la expresión génica de *Apob* en este modelo se encontró disminuida en el hígado de ratones db/db. La expresión de *Apob* se encuentra regulada por múltiples factores nucleares (Wang, Liu et al. 2003). En este contexto, se ha descrito que la expresión del factor nuclear hepático (HNF)1alfa (ie, *Hnfa*), que induce la expresión de *Apob* (Armendariz and Krauss 2009), se encuentra disminuida en el hígado graso de ratones obesos (Cheng, Aleksunes et al. 2008), lo que contribuiría a explicar, al menos en parte, la acumulación de triglicéridos en hígado. Aunque la síntesis de esta proteína es uno de los principales determinantes de la secreción de VLDL y de los niveles plasmáticos de triglicéridos, no podemos descartar la posibilidad de que pudieran intervenir además mecanismos postranscripcionales en la regulación de su producción (Fisher 2012). Además, la expresión génica de la proteína transferidora de triglicéridos microsomal (*Mttp*) (datos no mostrados) se encontró disminuida en el hígado de ratones db/db. La *Mttp* es esencial en la formación de TLR (ie, VLDL) en el hígado (Olofsson, Stillemark-Billton et al. 2000). Consistentemente, en ratones deficientes de *Mttp* la secreción de VLDL se ve bloqueada en el hígado, exhibiendo unos niveles plasmáticos reducidos de triglicéridos, y desarrollando esteatosis hepática (Raabe, Veniant et al. 1999, Bjorkegren, Beigneux et al. 2002). En esta misma línea conceptual, polimorfismos en el gen *MTTP* humano resultan en una actividad MTTP y exportación de VLDL disminuidas y están asociados con una mayor acumulación intracelular hepática de triglicéridos (Namikawa, Shu-Ping et al. 2004).

Nuestro estudio reveló además una vía adicional de acumulación de triglicéridos en el hígado de los ratones db/db. Los datos resultantes del seguimiento durante 48 h del destino metabólico de los triglicéridos radiactivos administrados por vía oral demostraron que los ácidos grasos derivados de la ingesta oral de triglicéridos se acumularon preferencialmente en el hígado, lo que sugeriría una captación aumentada de los ácidos grasos movilizados por la acción de las lipasas o quizás mediante internalización de las propias LRTs vía procesos endocíticos dependientes de receptores, o ambos procesos a la vez.

En humanos, la manifestación de hígado graso suele ir asociada con un aumento concomitante en la producción hepática de LRT (Fon Tacer and Rozman 2011). Sin embargo, los ratones db/db no mostraron tener unos niveles plasmáticos elevados ni de triglicéridos ni de TRLs circulantes.

En conjunto, estos datos sugerirían que tanto la síntesis de novo y la descarga de triglicéridos hepática al plasma podría estar comprometida en los ratones db/db. Además, esto coincidiría con una captación de ácidos grasos y/o triglicéridos circulantes aumentada por parte del hígado.

Consistentemente con otros estudios en los que se utiliza este modelo animal (Kobayashi, Forte et al. 2000, Gruen, Plummer et al. 2005, Sallam, Fisher et al. 2011), los ratones db/db presentaron unos niveles plasmáticos elevados de colesterol total atribuido a unos niveles elevados de las fracciones de lipoproteínas no-HDL y HDL,

respectivamente. En el caso de los niveles plasmáticos de colesterol, y a diferencia de los triglicéridos, no se han descrito diferencias atribuidas al fondo genético en este modelo.

En la fracción de lipoproteínas plasmáticas no-HDL identificamos una fracción plasmática que denominamos LDL, al poder ser aislada en el rango de densidades análogo para esta clase de lipoproteínas en humanos durante su separación mediante ultracentrifugación secuencial. Esta fracción ya ha sido reportada previamente por otros autores (Kobayashi, Forte et al. 2000, Gruen, Plummer et al. 2005, Sallam, Fisher et al. 2011) y su concentración plasmática se encontró aumentada en los ratones db/db. Además, el tamaño de las partículas inferido a partir de la relación entre sus componentes de superficie y núcleo reveló que éstas podrían ser de menor tamaño que las de los controles, siendo este dato coincidente con el publicado por otros autores (Gruen, Plummer et al. 2005). La causa del aumento de LDL plasmática en este modelo animal se desconoce. La evaluación in vivo del destino metabólico de las LDL no mostró cambios concluyentes en ninguna de las variables metabólicas analizadas aunque este resultado podría ser debido al número reducido de animales empleado para este análisis.

Un estudio más exhaustivo de estas LDL de ratones db/db reveló que una proporción elevada de ellas presentaban carga eléctrica negativa, siendo su proporción mucho mayor que la determinada en los ratones control. Tampoco se conoce la naturaleza química de esta subfracción única de LDL modificadas en ratones db/db. Estudios

previos en humanos sugieren que esta subfracción de LDL tiene un elevado componente aterogénico; consistentemente un aumento relativo en su concentración plasmática suele estar frecuentemente asociado con estados de insulinoresistencia y síndrome metabólico en pacientes (Sanchez-Quesada, Perez et al. 2001, Zhang, Maeda et al. 2006, Sanchez-Quesada, Vinagre et al. 2012). Nuestros datos coinciden con los de otro estudio en los que se identificó LDL(-) como característica general del conjunto LDL de ratones db/db (Lee, Chen et al. 2014). En este último estudio los autores no alcanzaron a cuantificar la proporción circulante de las LDL(-) en este modelo; y vincularon su electronegatividad con el aumento de su contenido en apoC-III (Lee, Chen et al. 2014).

Aparte de cambios en el contenido proteico de esta subclase de lipoproteínas, en cuya determinación no alcanzamos a entrar, esta fracción también presenta alteraciones en su fracción lipídica, en particular, su alto contenido en ácidos grasos y fosfolípidos (Sanchez-Quesada, Villegas et al. 2012). Aunque por falta de muestra no se pudo realizar un análisis más detallado de la composición lipídica en la fracción electronegativa de LDL de los ratones db/db, nuestros datos revelaron un aumento en los ácidos grasos circulantes totales y asociados a LDL, lo que podría contribuir al menos en parte en la formación de esta subfracción de LDL modificadas. Las LDL(-) no sólo tienen como característica diferencial un contenido relativo elevado de ácidos grasos, nuestro estudio también reveló unos niveles aumentados de actividad Lp-PLA2 asociados a la fracción no-HDL en los ratones db/db. Se ha descrito que la

acción de este enzima confiere una mayor labilidad a los fosfolípidos de las LDL(-) (Benitez, Sanchez-Quesada et al. 2003), lo que podría promover la generación de LDL(-) a partir de LDL en estos ratones. Aparte de su componente proaterogénico, se ha descrito que las LDL(-) también contribuyen en la acumulación de triglicéridos en cardiomiocitos in vitro (Revuelta-Lopez, Cal et al. 2015). Este y otros aspectos relativos a las características de esta clase de LDL modificadas de estos animales, así como su potencial aterogénico y su posible relación con el daño vascular de estos ratones (Sallam, Fisher et al. 2011) queda pendiente de futuros estudios.

En cuanto a las lipoproteínas HDL, sus niveles plasmáticos se encontraron elevados en ratones db/db, siendo ello consistente con estudios previos (Kobayashi, Forte et al. 2000, Sallam, Fisher et al. 2011, Low, Hoang et al. 2012, Lee, Chen et al. 2014).

La concentración plasmática de apoA-I en estos ratones no difirió de la determinada en ratones control. Aunque este hallazgo ya ha sido previamente publicado (Kobayashi, Forte et al. 2000), no deja de ser sorprendente al estar los niveles plasmáticos de HDL elevados y ser la apoA-I la principal apolipoproteína de HDL. Su expresión génica en el hígado, principal órgano productor de apoA-I, se encontró significativamente disminuida en los ratones db/db. PPARA es un conocido modulador de los niveles de expresión hepática de apoA-I (Berthou, Duverger et al. 1996). La actividad de este factor de transcripción puede ser inducida mediante su unión a ácidos grasos (Georgiadi and Kersten 2012), cuyo contenido se encuentra elevado en hígado de ratones db/db. Su activación inhibe la expresión de esta

apolipoproteína en hígado (Berthou, Duverger et al. 1996) lo que en parte explicaría los niveles reducidos de expresión de *Apoa1* en hígado de ratón db/db. En un estudio reciente se ha descrito que la expresión génica y secreción de la apoA-I humana, aunque por parte de hepatocitos in vitro, también se encuentra reprimida vía PPAR γ (Shavva, Mogilenko et al. 2016). Tal y como hemos tratado previamente, la expresión génica de *Pparg* se encontró aumentada en el hígado de ratones db/db. De la misma manera que se ha propuesto previamente cuando se ha tratado de explicar los niveles elevados de expresión hepática de *Cd36*, se podría hipotetizar que la expresión de *Apoa1* pudiera estar también bajo el paraguas regulador de esta otra vía de señalización.

Un estudio más detallado de las HDL reveló que su tamaño en ratones db/db fue en promedio superior al de las de ratones control. Este hallazgo coincidió con un aumento de su contenido relativo en ésteres de colesterol. Esta última característica podría estar relacionada con unos niveles plasmáticos elevados de actividad LCAT. Por otro lado, el análisis de HDL reveló además la presencia de unos niveles aumentados en las partículas pre β -HDL circulantes tanto en porcentaje, como relativos a sus niveles plasmáticos de apoA-I. La expresión de estos resultados relativos en relación a la proteína total asociada a las HDL, confirmó unas cifras aumentadas de pre β -HDL y, además, reveló niveles elevados de lipoproteínas α -HDL. Es interesante destacar que este hallazgo se asoció además con unos niveles de actividad PLTP elevados en el plasma de este modelo, cuya acción promovería la

formación de partículas HDL grandes y pequeñas (Tzotzas, Desrumaux et al. 2009). También los pacientes con insulinoresistencia y DM2 presentan unos niveles plasmáticos de actividad PLTP elevados, asociados con unos niveles plasmáticos aumentados de pre β -HDL (Borggreve, De Vries et al. 2003, Qin, Song et al. 2014, van Tienhoven-Wind, Perton et al. 2016).

A partir de los datos de composición de HDL se pudo inferir que la concentración plasmática de proteína asociada a HDL fue superior a los de apoA-I. Siendo la apoA-I el principal componente proteico de las HDL, esto podría sugerir que las HDL de ratones db/db presentan un proteoma alterado caracterizado por un contenido relativo disminuido de apoA-I y aumentado en otras proteínas. Uno de los mecanismos potencialmente involucrados en esta disminución en el contenido de apoA-I en las HDL podría ser atribuido, además de una disminución en su síntesis, a un desplazamiento de esta apolipoproteína por parte la proteína SAA1 y posiblemente también de otras proteínas de HDL. Las HDL de los ratones db/db presentaron unos niveles aumentados de esta proteína. Seguramente, este no sea el único cambio cuantitativamente importante en el proteoma de estas lipoproteínas. El análisis proteómico completo de estas partículas no pudo ser abordado en este trabajo, aunque merecería ser objeto de estudio ya que los niveles de SAA1 se encuentran elevados en enfermedades metabólicas asociadas con estado inflamatorio crónico, alterando de este modo sus propiedades antiaterogénicas a través del desplazamiento de las apoA-I de las HDL (Kontush and Chapman 2010).

El aumento en la concentración circulante de lipoproteínas HDL fue debido a la suma de alteraciones en los dos componentes metabólicos principales que determinan su concentración plasmática: una tasa catabólica disminuida y una tasa de secreción aumentada. Las alteraciones en estas variables metabólicas fueron principalmente debidas a las características de los ratones db/db, y no en las de sus HDL, ya que el aclaramiento de HDL de ratones db/db en ratones control no difirió del mostrado por sus propias HDL. La tasa de secreción de HDL en estos ratones coincidió con unos niveles disminuidos en la expresión génica hepática de diferentes dianas moleculares involucradas en la biogénesis y remodelaje de HDL (ie, *Abca1*, *Abcg1*), además de la *Apoa1*. Sin embargo, el único parámetro directamente analizado en estos ensayos es el decaimiento de la actividad debida a las HDL marcadas radiactivamente en el plasma. En cambio, la tasa de secreción que se determina de forma indirecta mediante un cálculo matemático tomando la tasa fraccional catabólica y la concentración de colesterol de HDL, podría verse influenciada por factores diferentes a los de su biogénesis, pero que influyen en los niveles de colesterol de HDL. La disminución en la tasa catabólica de HDL observada en los ratones db/db fue consistente con el catabolismo defectivo de apoA-I observado en ratones ob/ob (Silver, Jiang et al. 1999). En este otro estudio, los niveles de expresión génica de *Apoa1* se encontraron disminuidos en el hígado de estos ratones. El tratamiento con bajas dosis de leptina en este modelo restableció los niveles plasmáticos de HDL y la expresión hepática de *Apoa1* (Silver, Jiang et al. 1999), sugiriendo un posible papel para la leptina en la

estimulación del catabolismo de HDL. La disminución observada en la tasa de aclaramiento de estas lipoproteínas en los ratones db/db coincidió con unos niveles de expresión génica también disminuidos de su principal receptor, ie, SR-BI (*Scarb1*) (Silver and Tall 2001). Consistentemente, una disminución en la expresión de *Scarb1* ha sido atribuida a alteraciones en la vía de señalización de la leptina (Lundasen, Liao et al. 2003).

El análisis del contenido de [³H]-colesterol oleato de las lipoproteínas [³H]-HDL reveló además una acumulación de [³H] predominantemente en el hígado de los ratones db/db a las 48 h de la inyección iv de sus propias [³H]-HDL. Este estudio también reveló que la llegada de [³H] (ie, colesterol y ácidos biliares) a heces en este mismo plazo se encontró significativamente reducida, demostrando que el tráfico de colesterol desde HDL a heces está disminuido en estos ratones, y revelando que el componente de TRC-m mediado por las HDL está comprometido en este modelo animal. Esta acumulación de colesterol en el hígado fue confirmada mediante el seguimiento del destino metabólico de [¹⁴C]-colesterol administrado por vía oral en un análisis independiente. En este último estudio pudo confirmarse además [i] una disminución en la tasa catabólica de las HDL previamente observada en ratones db/db, al encontrarse una tendencia (P=0,06) a tener unos niveles plasmáticos de [¹⁴C]-colesterol de HDL aumentados a las 48 h tras su administración por vía oral; y [ii] la acumulación preferencial del colesterol proveniente de las HDL en el hígado de ratones db/db. Estos hallazgos se encontraron asociados además con [i] unos niveles

significativamente disminuidos de expresión génica de transportadores hepáticos de colesterol (ie *Abcg5* y *Abcg8*) y de ácidos biliares (ie, *Bsep*), principalmente involucrados en el transporte de estas moléculas desde los hepatocitos a bilis en su tránsito a heces (Sabeva, Liu et al. 2009); y [ii] una disminución de la expresión de *Cyp7a1*, que codifica para el enzima clave en la síntesis de ácidos biliares a partir del colesterol en el hígado; lo que podría traducirse en una síntesis disminuida de estas moléculas, resultando a su vez en un volcado menor a heces. La disminución de la expresión de *Ncp111* observada en el intestino delgado sugeriría sin que sea demostrativa una reabsorción intestinal del colesterol disminuida quizás compensatoria.

La expresión de los transportadores *Abcg5* y *Abcg8*, son junto con *Abca1* y *Abcg1*, y *Cyp7a1*, dianas moleculares de LXRA (Sabeva, Liu et al. 2009, Zhao and Dahlman-Wright 2010). En ratones deficientes de estos transportadores se ha observado que son necesarios para la eliminación de esteroides neutros y que también causan una reducción de absorción de colesterol (Wang, Patel et al. 2007, Calpe-Berdiel, Rotllan et al. 2008). Existe cierta controversia en relación al papel de *Abcg5* y *Abcg8* en la excreción de colesterol biliar. Por ejemplo, en ratones deficientes de *Lxra*, en cuyo caso la síntesis de *Abcg5* y *Abcg8* en respuesta a la ingesta de colesterol se encuentra comprometida, muestra una excreción biliar de colesterol similar a la de los ratones controles (van der Veen, Havinga et al. 2007). Sin embargo en ratones deficientes de estos transportadores la secreción biliar de colesterol se ha visto interrumpida (Su,

Sabeva et al. 2012). Diferentes estudios apoyan una conexión entre el metabolismo energético, los niveles hepáticos de *Abcg5* y *Abcg8* y la eliminación biliar de colesterol. Su deficiencia acelera el desarrollo de obesidad y esteatosis (Su, Sabeva et al. 2012) y ya ha sido descrita previamente en modelos experimentales con defectos en la vía de señalización de la leptina (Bouchard, Johnson et al. 2002, Tran, Graewin et al. 2003, Sabeva, Rouse et al. 2007, Su, Sabeva et al. 2014).

Por otro lado, *Bsep*, cuya expresión se encuentra modulada principalmente por FXRA (Ding, Yang et al. 2015), sería otra de las dianas cuya expresión se vería disminuida en ratones con deficiencia funcional de la leptina. FXRA se activa utilizando como ligandos a los ácidos biliares (Ding, Yang et al. 2015). Aunque los niveles de RNA podrían no corresponderse con los de proteínas o su actividad, estando la expresión de *Cyp7a1* y *Cyp27a1* disminuida en hígado de ratones db/db, ello podría estar relacionado con bajos niveles hepáticos de estas moléculas y por tanto con una baja actividad de este último factor de transcripción. Queda pendiente determinar directamente los niveles hepáticos de ácidos biliares en hígado, así como la actividad y/o expresión de *Cyp3a4* involucrado en la vía de síntesis principal de ácidos biliares (DuSell and McDonnell 2008). La expresión de *Cyp7b1*, que participa en una de las vías de síntesis de ácidos biliares, se encontró disminuida, sugiriendo que la producción de ácidos biliares se podría estar inhibida.

En ambos casos se desconoce el mecanismo por el cual la leptina modularía la expresión de estas moléculas, aunque se sugiere que dicho mecanismo podría

involucrar las vías de señalización LXRA y FXRA.

Siendo el colesterol libre el principal sustrato en la síntesis de diferentes activadores endógenos débiles de LXRA (ie, 22-OH-colesterol, 27-OH-colesterol) (Wojcicka, Jamroz-Wisniewska et al. 2007, Heverin, Ali et al. 2016) y teniendo en cuenta el porcentaje de colesterol libre se encontró significativamente disminuido en el hígado de ratones db/db, se hipotetizó que la síntesis de estos ligandos de LXRA se encontraría también disminuida en el hígado de estos ratones y por consiguiente la actividad de este factor de transcripción. Sin embargo, el análisis de los niveles hepáticos de 27-OH-colesterol se encontraron significativamente aumentados en ratones db/db, a pesar de encontrarse unos niveles de expresión génica hepáticos significativamente reducidos de las dianas que controlan su síntesis (ie, *Cyp27a1*) y degradación (ie, *Cyp7b1*), respectivamente. Este hidroxicolesterol es de hecho un débil activador de LXR in vitro al que se le ha atribuido un papel modesto como regulador de la expresión de genes regulados por LXR en condiciones basales (Heverin, Ali et al. 2016). Otro de los principales oxisteroles presentes en plasma, el 24S-OH-colesterol, es también un activador de LXR, aunque más eficiente que 27-OH-colesterol (Janowski, Grogan et al. 1999). Se ha descrito que la sobreexpresión del enzima principalmente involucrado en su síntesis (*Cyp46a1*), que resulta en unos niveles elevados de 24S-OH-colesterol, fracasó en activar LXR (Shafaati, Olin et al. 2011). Podría sugerirse que la vía de señalización mediada por LXRA pudiera estar potencialmente comprometida en el hígado de estos ratones por medio de un

mecanismo de resistencia a la activación de LXRA por estos ligandos, aunque la base de la misma sería desconocida. En determinadas situaciones patológicas asociadas con una formación de oxisteroles elevada se ha sugerido que podría acompañarse de un aumento en los niveles de oxisteroles sulfatados (Tamasawa, Tamasawa et al. 1993). Teniendo en cuenta que a estos últimos se les ha atribuido una acción antagonista de LXRA (Song, Hiipakka et al. 2001), su posible acumulación en hígado de ratones db/db podría explicar, al menos en parte, la atenuación de la señalización LXR. Consistentemente, la expresión hepática de otras dianas de LXRA, tales como el *Lpl* y *Pltp* (Hong and Tontonoz 2014), también se encontraron significativamente reducidas en estos ratones. Un razonamiento similar podría aplicarse incluso para *Scarb1*, cuyo promotor se encuentra también inducido por LXRA en hepatocitos in vitro (Malerod, Juvet et al. 2002).

Aunque se desconoce el mecanismo por el cual la leptina preserva los niveles de *Abcg5* y *Abcg8*, se ha descrito que la administración de leptina a ratones ob/ob restablece sus niveles hepáticos (Sabeva, Rouse et al. 2007). Ello sugiere que en ausencia de la vía de señalización de la leptina, prevalece la reducción los niveles de *Abcg5* y *Abcg8*. A diferencia de nuestro estudio, en este último trabajo (Sabeva, Rouse et al. 2007) se reportó que la modulación por parte de la leptina sobre la expresión de estos dos transportadores sería a nivel postranscripcional, y no transcripcional. Esta controversia podría deberse a diferencias fondo genético específicas; sin embargo, en su estudio también utilizaron ratones ob/ob con fondo

genético C57BL/6J para evaluar el efecto de la terapia de reemplazo con leptina. En este otro modelo la modulación de la expresión de estos dos transportadores confirmó el establecido para los ratones db/db con fondo genético C57BKS/J en este mismo estudio. Aunque no podemos descartar la posible participación de otros mecanismos moleculares dependientes de leptina e independientes de LXRA en la regulación de la expresión de estas dianas moleculares; el cambio de expresión a nivel transcripcional observado en nuestro modelo sugirió que la vía de señalización de LXRA se encontraría comprometida.

V.2 Características funcionales y fisiopatológicas de las lipoproteínas

V.2.1 TRC-m

La capacidad de estimular el eflujo de colesterol desde macrófagos in vitro por parte de las HDL de ambos grupos, obtenida por precipitación del plasma completo (y que por tanto incluiría todo el espectro de lipoproteínas HDL mencionado anteriormente ,ie, pre β - y α -HDL), se encontró consistentemente aumentada en ratones db/db. Resultados similares fueron alcanzados por otros autores utilizando el mismo modelo aunque con un fondo genético distinto (ie, C57BKS/J) (Low, Hoang et al. 2012). Esta medición no refleja necesariamente la eficacia en estimular el eflujo de colesterol por parte de cantidades de HDL igualadas por carga, sino que es indicador del eflujo de colesterol que el total de las HDL de cada muestra es capaz de estimular. Sin

embargo, la expresión de los datos de eflujo relativizados por un parámetro que es reconocido reflejo de la cantidad de HDL añadida en cada caso (ie, por su contenido en colesterol o fosfolípidos, respectivamente), permitió calcular, aunque fuera mediante una aproximación meramente teórica, la capacidad de eflujo relativa a partícula. Los datos corregidos de este modo revelaron que el eflujo de colesterol desde macrófagos promovido por el conjunto de HDL fue deficitario en ratones db/db. Siendo las pre β -HDL reconocidas como los aceptores de colesterol celular más eficientes (Marques-Vidal, Jauhiainen et al. 1997), y a pesar de que el porcentaje de esta subfracción se encontró elevada en plasma de ratones db/db, ello no resultó en un aumento del eflujo de colesterol mayor en condiciones de cultivo en las que se estimuló la síntesis de *AbcA1* (ie, en presencia de AMPc).

Consistentemente con nuestros datos previos sobre el metabolismo de HDL, la cantidad relativa de actividad debida al [3 H] en el hígado a las 48 h tras la inyección de los macrófagos cargados con [3 H]-colesterol se observó significativamente aumentada en los ratones db/db. Por otro lado, los niveles de [3 H] en heces se encontraron disminuidos en este modelo, sugiriendo un TRC-m hasta heces comprometido. Aunque globalmente nuestros datos en relación al TRC-m desde macrófagos a heces, coincidieron con los publicados en un estudio previo (Low, Hoang et al. 2012), la distribución de la actividad debida al [3 H] en diferentes compartimentos, ie, en el plasma e hígado, delató diferencias mecánísticas entre ambos modelos. En concreto, y contrariamente a lo observado en nuestro modelo,

estos autores encontraron unos niveles de actividad debida al [^3H] disminuidos en el compartimento plasmático e hígado, lo que delató la participación de mecanismos diferentes, quizás específicos de fondo genético, en sus ratones db/db. En este otro estudio los autores sugirieron que la deficiencia en el TRC-m podría ser debida a defectos en la capacidad de las células en estimular el eflujo de colesterol a aceptores plasmáticos y/o la captación reducida del colesterol de HDL o LDL por parte del hígado (Low, Hoang et al. 2012). Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual el eflujo de colesterol por parte de las células a aceptores plasmáticos se encontró disminuido en su modelo animal no fue determinado.

En nuestro estudio, el aumento en los niveles de actividad [^3H] en plasma, principalmente debidos a la fracción HDL, en ratones db/db podrían ser atribuidos a la los niveles plasmáticos elevados de HDL en este modelo. Su acumulación en este compartimento podría ser atribuido al menos en parte a un catabolismo defectuoso de estas partículas que se traduce en un tiempo de residencia más elevado en el plasma.

La acumulación de actividad [^3H] en el hígado podría ser en parte atribuida a una disminución en la síntesis de diferentes transportadores de colesterol desde hígado a plasma, tales como *AbcA1* y *AbcG1*, y transportadores de colesterol principalmente involucrados en el tráfico hepatobiliar de colesterol, tales como *AbcG5* y *AbcG8* (Hong and Tontonoz 2014). En nuestro estudio se observó disminución tanto en la expresión génica como en los niveles de estas dos últimas proteínas en el hígado de ratones db/db. Ello contrastó con lo descrito en otro estudio, según el cual la disminución de

ambos transportadores se atribuye exclusivamente a una deficiencia en sus niveles proteicos hepáticos, y no en los niveles de expresión del gen en estos ratones db/db (Sabeva, Rouse et al. 2007). La expresión de *Scarb1*, cuyo producto también puede mediar una secreción de colesterol biliar independientemente de *Abcg5* y *Abcg8* (Wiersma, Gatti et al. 2009), también se encontró disminuida en los ratones db/db, comprometiendo aun más el tráfico hepatobiliar de colesterol y promoviendo su acumulación en hígado. Por otro lado, la expresión génica de *Abcg5* y *Abcg8* también se observó disminuida en el intestino delgado de estos mismos ratones. En este órgano estos transportadores median el eflujo de colesterol desde el intestino a heces (Berge, Tian et al. 2000, Lee, Lu et al. 2001), por lo que una reducción en su expresión perjudicaría aun más la salida del [³H]-colesterol a heces y su retención en el organismo. Resultados similares han sido previamente descritos en un modelo metabólico independiente de diabetes mellitus tipo 1 (Bloks, Bakker-Van Waarde et al. 2004).

A diferencia del estudio de Low et al. (2012) (Low, Hoang et al. 2012), en los ratones db/db del presente estudio no sólo se encontró disminuida la eliminación de colesterol a heces, también la de ácidos biliares. Ello coincidió con una disminución de la expresión hepática de *Cyp7a1* y *Bsep*. Desafortunadamente, no se determinaron los niveles de ácidos biliares en hígado, bilis, o heces, por lo que no pudimos confirmar el impacto de una expresión deficiente de estas dianas sobre este parámetro en este compartimento aparte del determinado mediante la medida de la actividad debida a

[³H]-ácidos biliares a heces.

Como ya se ha indicado previamente, las alteraciones en el patrón de expresión una parte importante de las proteínas involucradas en el control del tráfico de colesterol desde hígado e intestino a heces sugieren que la vía de señalización de LXRA estaría comprometida en los ratones db/db. Aunque desconocemos el mecanismo preciso por el que la vía de señalización de LXRA se ve afectada en este modelo, se hipotetizó que dicha vía podría ser corregida mediante la administración de un agonista farmacológico específico de LXRA (Zhao and Dahlman-Wright 2010) con el objetivo de restablecer los niveles de expresión de *Abcg5* y *Abcg8*, entre otras dianas de este factor de transcripción, y con ello el tráfico hepatobiliar de colesterol y el TRC-m hasta heces en estos animales. Análogamente, la sobreexpresión de estos transportadores mediante otra estrategia diferente, ie, la inyección de un *cocktail* de partículas adenovíricas con los *cassettes* de expresión de *Abcg5* y *Abcg8*, corrigió la secreción biliar de colesterol en ratones db/db (Su, Sabeva et al. 2014).

Tal y como ha sido previamente descrito (Hong and Tontonoz 2014), la administración del agonista de LXRA produjo elevaciones en los niveles plasmáticos de colesterol, debido principalmente al colesterol de HDL, y de triglicéridos en los grupos de ratones tratados. Este perfil lipídico coincidió con un aumento en los niveles hepáticos de triglicéridos, siendo esto último posiblemente debido a un aumento en la expresión y activación de *Srebp1c* por parte de LXRA (Wojcicka, Jamroz-Wisniewska et al. 2007, Hong and Tontonoz 2014).

La administración del agonista de LXRA a los ratones db/db resultó en un aumento relativo en la llegada de actividad debida al [³H] a los aceptores del plasma, aumentados tras la inducción de LXRA (Zhao and Dahlman-Wright 2010), y a heces. Es interesante resaltar que el componente que mostró una llegada en heces significativamente mayor fue el [³H]-colesterol, observándose esto último asociado con unos niveles aumentados en la expresión de *Abcg5* y *Abcg8* en el hígado e intestino de los ratones db/db tratados con el agonista. En contraste, los [³H]-ácidos biliares fecales solo mostraron una tendencia a aumentar.

V.2.2 Capacidades antioxidante y antiinflamatoria

Aparte del papel de las HDL en el TRC-m, sus actividades antioxidantes y antiinflamatorias son otras de sus propiedades antiaterogénicas más reconocidas. Como ya se ha descrito previamente, estas se encuentran comprometidas en múltiples enfermedades inflamatorias y metabólicas (Nicholls, Zheng et al. 2005, Kontush and Chapman 2006, Navab, Reddy et al. 2007, Kontush and Chapman 2008).

La capacidad de las HDL de ratones db/db contra la oxidación de las LDL y antiinflamatoria, determinada a través de su capacidad de inhibir la síntesis de *Tnfa* en macrófagos, se encontraron comprometidas en los ratones db/db. Este modelo presenta una susceptibilidad aumentada a la disfunción vascular (Sallam, Fisher et al. 2011), estando ello asociado a unos niveles plasmáticos elevados de marcadores de estrés oxidativo e inflamación. Es posible que el aumento en los niveles plasmáticos

de subfracción de LDL modificadas (ie, LDL(-)) en combinación con la presencia de HDL disfuncionales pudiera contribuir en este fenotipo.

La susceptibilidad de las lipoproteínas a sufrir modificación oxidativa es una propiedad que se ha utilizado previamente para monitorizar la capacidad de las HDL en la protección contra la oxidación de las LDL (Sanchez-Quesada, Homs-Serradesanferm et al. 1995, Cordoba-Porras, Sanchez-Quesada et al. 1996, Sanchez-Quesada, Jorba et al. 1998, Burkitt 2001). La peroxidación de los lípidos en lipoproteínas generada por radicales libres se ha descrito que sucede a través de una secuencia de fases que comprende la iniciación, propagación y terminación de la reacción. La fase de latencia se ve influenciada por el contenido en antioxidantes que retrasan la iniciación y propagación de la oxidación (Parthasarathy, Auye et al. 1998) y refleja la capacidad antioxidante de las lipoproteínas. Utilizando esta metodología, las HDL de ratones db/db incubadas con LDL humanas demostraron tener una menor capacidad protectora frente a la oxidación que la que presentaron las HDL de ratones control. En este ensayo se igualó la carga de lipoproteínas de ambos grupos en el tubo de ensayo por su contenido en fosfolípidos para de este modo poder expresar dicho efecto en unas condiciones en las que se pudiera comparar la calidad de estas partículas y no meramente el efecto de su cantidad. Por otro lado, los fosfolípidos son el principal sustrato oxidable (Kontush and Chapman 2010).

Entre los diferentes factores implicados en la protección de las lipoproteínas contra la oxidación, se incluye la acción de ciertas apolipoproteínas y enzimas antioxidantes

asociados a LDL y, sobretodo, a HDL (Kontush and Chapman 2010). La capacidad de la apoA-I en la protección frente a la oxidación de LDL ha sido descrita previamente en detalle tanto in vivo como in vitro (Navab, Hama et al. 2000, Navab, Hama et al. 2000, Kontush and Chapman 2010). Esta apolipoproteína es uno de los principales componentes de la actividad antioxidante de las HDL y puede prevenir la oxidación de las LDL, o retrasarla, mediante la retirada de fosfolípidos oxidados de las LDL y/o de la pared arterial (Navab, Ananthramaiah et al. 2004). En los ratones db/db se encontró una deficiencia relativa en el contenido en apoA-I en función de su contenido en fosfolípidos. Como ya se ha indicado previamente, esta disminución relativa en el contenido en apoA-I de las HDL podría ser atribuido a una disminución en su expresión en el hígado en combinación con el desplazamiento posiblemente mediado por la proteína SAA1 (Kontush and Chapman 2010), cuyos niveles se encontraron aumentados en las HDL de ratones db/db. Consistentemente, la expresión hepática de SAA1 está aumentada en el hígado esteatótico (Levo, Shalit et al. 1982) y sus niveles plasmáticos se encuentran elevados en enfermedades metabólicas con un componente inflamatorio leve (Kontush and Chapman 2010). Es interesante destacar que la cantidad de SAA expresada por gramo de HDL se encontró aumentada en las HDL de ratones db/db en comparación con los controles, lo que podría contribuir en el empeoramiento observado también en su función antiinflamatoria.

Por otro lado, las actividades plasmáticas, tales como la PON1, Lp-PLA2 y LCAT, son consideradas antioxidantes y antiinflamatorias en tanto que pueden hidrolizar los

fosfolípidos oxidados de las LDL, asegurando su eliminación de la circulación y protegiendo de este modo a los tejidos del estrés oxidativo asociado a través de su retirada vía hígado. Existe cierta controversia en relación a la capacidad por parte de de la PON1 en la hidrólisis de fosfolípidos; considerándose la Lp-PLA2 como el principal enzima involucrado en su hidrólisis (Marathe, Zimmerman et al. 2003). En nuestro estudio, los niveles de actividad enzimática de PON1 en suero y Lp-PLA2 en plasma total se observaron aumentados en ratones db/db. Sin embargo, los niveles de estas actividades enzimáticas expresados en relación a los fosfolípidos de sus HDL mostraron unos niveles de actividad significativamente disminuidos solo en el caso de PON1 respecto de los los controles, no alcanzándose diferencias para la Lp-PLA2 ni para LCAT. En el caso de Lp-PLA2, estos resultados fueron consistentes con la ausencia de cambios en el porcentaje de ésta asociada a HDL entre ratones db/db y controles.

La actividad antiinflamatoria de la HDL puede ser determinada ex vivo a través de su efecto sobre la modulación de la expresión de diferentes moléculas de adhesión y/o citoquinas en modelos experimentales de inflamación arterial ex vivo (Barter, Kastelein et al. 2003, Nicholls, Dusting et al. 2005, Kontush and Chapman 2010). Una de las estrategias utilizadas para determinar la actividad antiinflamatoria de HDL es la supresión de la expresión de citoquinas (ie, TNFA) estimulada por LPS por parte de apoA-I en macrófagos (Yin, Deng et al. 2011). En el presente estudio se evaluó la capacidad por parte de las HDL de inhibir la expresión de TNFA por parte de HDL

adaptando esta última aproximación experimental, pero utilizando LDL oxidadas como factor inductor. Los resultados mostraron una capacidad antiinflamatoria mermada por parte de las HDL de ratones db/db. Aunque el mecanismo por el que las HDL promoverían la inhibición de la expresión de *Tnfa* inducida por LDL oxidadas en macrófagos se desconoce, en estudios previos en los que se utilizó una aproximación experimental similar se estableció que era debida a la inhibición de la vía de señalización NFκB (Robbesyn, Garcia et al. 2003, Purushothaman, Puru et al. 2010, Smoak, Aloor et al. 2010).

V.3 Impacto de la sobreexpresión in vivo de apoA-I humana sobre las propiedades antiaterogénicas de HDL

Existen numerosos estudios preclínicos que apoyan unos efectos vasculares favorables por parte de la [i] la sobreexpresión experimental de diferentes formas de apoA-I (ie, apoA-I_{MILANO} o apoA-I_{SALVAJE}) en modelos genéticos (ie, transgénicos) o mediante terapia génica utilizando vectores víricos; o [ii] administración (mediante infusión) de HDL sintéticas, apoA-I, o de péptidos miméticos de apoA-I. En contraposición a esta última estrategia, cuyo uso es limitado debido al alto coste que significa la producción a gran escala de estas moléculas y la necesidad de un régimen administraciones intravenosas repetitivas, la sobreexpresión de apoA-I mediante transgénesis o estrategias de terapia génica permiten evaluar los efectos ateroprotectores de estas moléculas a más largo plazo (Wong 2007, Tan 2009, Chyu

and Shah 2015).

Está establecido que los mecanismos antiaterogénicos se encuentran comprometidos en diferentes situaciones patológicas con un componente inflamatorio elevado como el caso de diferentes enfermedades metabólicas (Nobecourt, Jacqueminet et al. 2005, Kontush and Chapman 2006, Navab, Reddy et al. 2007, Rader and Daugherty 2008, Escola-Gil, Rotllan et al. 2009, Camont, Chapman et al. 2011, Rosenson, Brewer et al. 2011, Rosenson, Brewer et al. 2012, Rosenson, Brewer et al. 2013, Rohatgi, Khera et al. 2014). Sin embargo, los mecanismos moleculares potencialmente involucrados en el impacto favorable de la sobreexpresión de apoA-I sobre las propiedades antiaterogénicas de las HDL es un aspecto menos explorado.

La sobreexpresión de apoA-I en ratones db/db (hA-I-db/db) produjo un aumento imprevisto en su peso corporal, siendo ello debido principalmente a un aumento en la ingesta diaria de estos ratones. Lo cierto es que la ausencia de diferencias en la eficiencia calórica de la ingesta entre estos animales y los ratones db/db reveló que el exceso de calorías ingeridos por los ratones hA-I-db/db produjo una mayor ganancia de peso corporal en este modelo. Este hallazgo contrasta con datos previos según los cuales la sobreexpresión de apoA-I previene el desarrollo de obesidad en ratones alimentados con una dieta rica en grasas a través de un aumento en el gasto energético asociado con una inducción en la expresión de *Ucp1* en el tejido adiposo marrón (Ruan, Li et al. 2011). En otro estudio se ha atribuido este efecto antiadiposidad de la apoA-I a una disminución de la autofagia a través de la activación de la vía

señalización PI3K-Akt-mTORC1 (Wang and Peng 2012). Aunque se desconoce el mecanismo por el que la expresión de apoA-I humana produce este efecto, este hallazgo sugeriría un papel para esta apolipoproteína en la estimulación del apetito.

Tal y como cabía esperar, los ratones hA-I-db/db mostraron un aumento en los niveles plasmáticos de colesterol total, principalmente debido a un aumento en sus niveles de las HDL en comparación con los ratones db/db y, aunque en menor medida, a un aumento en la fracción plasmática de lipoproteínas no-HDL. Esto último coincidió con unos niveles plasmáticos aumentados de triglicéridos en ratones hA-I-db/db. En relación con el aumento de triglicéridos, los ratones hA-I ya presentaron un aumento moderado de este parámetro, siendo este hallazgo consistente con datos previos utilizando modelos de sobreexpresión de apoA-I in vivo (Tsukamoto, Hiester et al. 1997). En este último trabajo se hipotetiza que este hallazgo podría deberse a una inhibición de la lipólisis de las lipoproteínas TRL de estos ratones, de su aclaramiento, o bien a un aumento en la secreción hepática de TRL.

El hígado del modelo hA-I-db/db presentó una esteatosis aún más exacerbada que el de los ratones db/db, con unos niveles alrededor de unas tres veces más elevados de colesterol y de triglicéridos. Aunque se desconocen las causas o mecanismos involucrados en este fenotipo, se podría sugerir la participación de mecanismos relacionados con un aumento en la retención de colesterol en ese tejido o una lipogénesis activada, o ambas procesos a la vez.

El perfil de lipoproteínas plasmáticas no-HDL (ie, LRT y LDL) y HDL de los ratones hA-I-db/db reflejó múltiples alteraciones importantes en la composición relativa de su contenido lipídico. En particular, la composición de las HDL de los ratones hA-I-db/db, presentaron un contenido proporcionalmente elevado en ésteres de colesterol y fosfolípidos en comparación con las de los ratones db/db. El aumento en su contenido en ésteres de colesterol podría ser debido a una actividad LCAT aumentada, posiblemente asociado al incremento de apoA-I humana, su principal activador en HDL. Sin embargo, queda pendiente determinar la actividad LCAT en este modelo. Por otro lado, la sobreexpresión de apoA-I en ratones db/db también resultó en una disminución en el contenido relativo de proteínas en sus HDL. Estas modificaciones en la composición sugieren no sólo cambios en la estructura de estas lipoproteínas, sino implicaciones en su función biológica.

Consistentemente con datos previos (Zhang, Zanotti et al. 2003), la sobreexpresión de apoA-I humana indujo el TRC-m hasta heces en comparación con los controles. De acuerdo con este último estudio los niveles de actividad acumulados en plasma e hígado de ratones hA-I también alcanzaron cifras superiores a las de los controles. La sobreexpresión de apoA-I en ratones db/db también mostró una elevación en los niveles de actividad debida al [^3H] en ambos compartimentos y un aumento significativo en los niveles relativos de [^3H] en heces, tanto por aumento de colesterol como de ácidos biliares. La estimulación en el eflujo hepatobiliar de colesterol mediada por la sobreexpresión de apoA-I coincidió con una inducción de la expresión

hepática de genes diana en este proceso, ie, *Abcg5* y *Abcg8*. Estos genes, junto con *Abca1*, se encuentran regulados por LXRA. Aunque queda pendiente el análisis del contenido en colesterol libre y oxisteroles, siendo estos últimos agonistas de LXRA, en este tejido, sus niveles podrían encontrarse elevados en el hígado de ratones hA-I-db/db en comparación con los de db/db, ofreciendo una posible explicación para la inducción de la expresión hepática de estos transportadores en los ratones hA-I-db/db. El análisis de la expresión génica de otros genes diana de LXRA quizás podría haber ayudado a apoyar la activación de esta vía en el hígado de este modelo, aunque no podemos descartar la participación de otros mecanismos moleculares.

Sorprendentemente, los niveles plasmáticos de apoA-I humana no se encontraron, en consonancia con los niveles de colesterol de HDL, más elevados en los ratones hA-I-db/db en comparación con los hA-I. Este hallazgo confirmaría las alteraciones en composición de estas partículas en estos ratones. Ello en parte podría ser atribuido a una disminución en su expresión mediada por la activación de PPARG (Shavva, Mogilenko et al. 2016). Como ya se ha apuntado previamente, la expresión y quizás actividad hepática de *Pparg* podría encontrarse aumentada en ratones hA-I-db/db en comparación con los db/db (Inoue, Ohtake et al. 2005, Pettinelli and Videla 2011, Gross, Pawlak et al. 2016). No se determinó la expresión de *Cd36*, diana de PPARG (Zhou, Febbraio et al. 2008), en hígado de estos ratones aunque se sugiere esta podría encontrarse claramente elevada (Koonen, Jacobs et al. 2007, Miquilena-Colina, Lima-Cabello et al. 2011).

Además de un efecto favorable en la inducción del TRC-m, también se analizó el efecto de la sobreexpresión de apoA-I humana en las otras dos funciones ateroprotectoras más importantes de las HDL analizadas ex vivo en ratones db/db.

La susceptibilidad a la oxidación de las HDL de ratones hA-I disminuyó en comparación con las de ratones control. Ello se asoció a un aumento en la capacidad protectora contra la oxidación de las LDL. Sin embargo, aunque la sobreexpresión de apoA-I en db/db confirió una menor susceptibilidad a la oxidación a sus HDL en comparación con las de los db/db, ello no se asoció a una capacidad protectora aumentada frente a la oxidación de las LDL ex vivo. En nuestro caso la incapacidad por parte de la apoA-I humana de mejorar la deficiencia antioxidante mostrada por parte de las HDL de ratones db/db podría ser atribuido a las alteraciones observadas en la composición lipoproteica de sus HDL. La glicación de las apolipoproteínas de HDL representaría uno de los mecanismos que conferirían disfuncionalidad a las HDL en ratones hA-I-db/db (Kontush and Chapman 2010). Aparte de este mecanismo, la apoA-I humana tiene dos residuos Met (Met112 y Met148) con el potencial de reducir hidroperóxidos lipídicos en hidróxidos lipídicos redox-inactivos (Kontush and Chapman 2010). Mediante esta propiedad, la apoA-I puede atenuar la oxidación de las LDL mediante la recolección de estas moléculas de las LDL (Barter, Kastelein et al. 2003). Es posible que en el contexto de ratón db/db, con un componente de estrés oxidativo elevado (Noguchi-Sasaki, Sasaki et al. 2016), la modificación oxidativa de la apoA-I pudiera comprometer su capacidad antioxidante. El reemplazamiento de la

apoA-I por la SAA en condiciones con un componente inflamatorio podría representar otro de los mecanismos que podrían comprometer la actividad antioxidante de las HDL en este modelo (Kontush and Chapman 2010). En los ratones hA-I-db/db, los niveles plasmáticos de actividad enzimática PON1 y Lp-PLA2 no se encontraron aumentados de manera significativa en comparación con los determinados en ratones db/db, lo que ayudaría también a explicar la ausencia de diferencias entre ambas en cuanto a su función antioxidante de LDL.

En cuanto a su función antiinflamatoria, las HDL de ratones hA-I probablemente indujeron un menor grado de inflamación y promovieron una mayor protección contra la inflamación que los ratones control, siendo este hallazgo consistente con la propiedad antiinflamatoria atribuida a apoA-I (Robbesyn, Garcia et al. 2003, Yin, Deng et al. 2011). Las HDL de ratones hA-I-db/db también mostraron un grado de protección contra la inflamación más elevado que las de ratones db/db. Ya se ha sugerido que el proteoma de las HDL puede verse alterado en enfermedades metabólicas frecuentemente asociadas con un componente inflamatorio (Kontush and Chapman 2010) y que en estas condiciones las HDL plasmáticas se cargan con cantidades elevadas de SAA1, lo que se ha asociado con una atenuación significativa en su actividad antiinflamatoria (Navab, Ananthramiah et al. 2004). El análisis de los niveles de SAA1 por gramo de HDL reveló una disminución relativa de esta proteína en las HDL de ratones hA-I-db/db en comparación con los ratones db/db, lo que explicaría al menos en parte el aumento del potencial antiinflamatorio de sus HDL.

VI - CONCLUSIONES

VI Análisis de las características cuantitativas y funcionales de las lipoproteínas plasmáticas de ratones db/db.

VI.1 Características cuantitativas de las lipoproteínas

1. Los niveles plasmáticos de colesterol total se encontraron aumentados lo que se atribuyó a unos niveles circulantes aumentados principalmente de sus HDL y, aunque en menor medida, del resto de lipoproteínas, incluyendo un aumento en su fracción LDL.
2. El análisis de las HDL aisladas por ultracentrifugación secuencial reveló el aumento de sus niveles plasmáticos. También aumentó su tamaño, sobretodo por el aumento en su contenido relativo de ésteres de colesterol que fue concomitante con la elevación de actividad LCAT.
3. Los niveles relativos de pre β -HDL se encontraron aumentados, estando ello asociado a unos niveles plasmáticos aumentados de actividad PLTP.

VI.2 Características metabólicas de las lipoproteínas

1. La tasa de aclaramiento de las HDL se encontró disminuida, mientras que el cálculo de su tasa de secreción reveló también un aumento asociado en su producción, sugiriendo que los niveles plasmáticos elevados de HDL podrían ser debidos a ambos mecanismos.

- 2 A pesar de presentar una tasa catabólica disminuida, la retención de colesterol marcado se encontró aumentada en el hígado, mientras que su tránsito a heces se observó disminuido. Esto último coincidió con una disminución en la expresión hepática de determinantes críticos del transporte del colesterol (ie, *Abcg5/g8*) a bilis, enzimas clave en la síntesis ácidos biliares (ie, *Cyp7a1/27a1*) desde hígado a heces y de *Abcg5/g8* en intestino delgado, sugiriendo una alteración en la vía de señalización de LXR en este modelo.

VI.3 Características funcionales y fisiopatológicas de las lipoproteínas

- 1 La proporción relativa de LDL(-) se aumentó en la fracción LDL de ratones db/db en comparación con la de controles.
- 2 La capacidad de eflujo de colesterol in vitro por parte de HDL se observó aumentada en comparación con la de los controles.
- 3 La evaluación del TRC-m in vivo reveló un aumento en el tráfico de colesterol de macrófagos a HDL, un aumento de colesterol en hígado y un tráfico del mismo a heces disminuido.
- 4 La estimulación de la vía de señalización de LXR mediante la administración de un agonista específico (ie, T0901317) resultó en una inducción del TRC-m, siendo esto último concomitante con el aumento de la expresión hepática e intestinal de *Abcg5/g8*.

- 5 Las HDL de ratones db/db proporcionaron una menor capacidad de protección frente a la oxidación de LDL; esto último coincidió con una disminución relativa de actividad PON1 y de apoA-I en sus HDL.
- 6 Las HDL de ratones db/db mostraron una capacidad disminuida de protección frente a la inflamación inducida por LDL oxidadas respecto de las de ratones control; esto último coincidió con unos niveles aumentados de SAA1 en HDL.

VI.4 Impacto de la sobreexpresión in vivo de apoA-I humana sobre las propiedades antiaterogénicas de HDL

- 1 La sobreexpresión de apoA-I humana en los ratones db/db resultó en un aumento en los niveles circulantes de HDL y unos niveles relativos de ésteres de colesterol elevados, posiblemente debidos a un aumento en la actividad LCAT, de la que apoA-I es su principal activador.
- 2 La sobreexpresión de apoA-I humana promovió un aumento del TRC-m en los ratones db/db, estando ello posiblemente asociado a una inducción de LXR a juzgar por el aumento en los niveles de expresión hepático e intestinal de *Abcg5/g8*.
- 3 Aunque la sobreexpresión de apoA-I humana disminuyó la susceptibilidad a la oxidación de las HDL de ratones db/db, ello no resultó en una mejor protección contra la oxidación de las LDL ex vivo.

- 4 La sobreexpresión de apoA-I humana en ratones db/db mejoró la capacidad antiinflamatoria de las HDL de ratones db/db, siendo ello posiblemente debido al aumento de su contenido en HDL, así como a una disminución de la proteína SAA1 en las mismas.

Abreviaciones

ABCA1:	ATP binding cassette transporter A1
ABCG1:	ATP binding cassette transporter G1
ABCG5:	ATP binding cassette transporter G5
ABCG8:	ATP binding cassette transporter G8
apo:	apolipoproteína
BMI:	<i>body mass index</i>
cDNA:	ácido desoxiribonucleico complementario
Ci:	Curie
cpm:	cuentas por minuto
HDL:	fracción plasmática de lipoproteínas de alta densidad
HRP:	<i>horseradish peroxidase</i>
H&E:	tinción con mezcla de colorantes hematoxilina-eosina
HOMA IR:	<i>homeostasis model assessment for insulin resistance</i>
FPLC:	<i>fast protein liquid chromatography</i>
Kb:	kilobases
kDa:	kilodáltons
LCAT:	lecitina:colesterol aciltransferasa
LDL:	fracción plasmática de lipoproteínas de baja densidad
LDLac:	LDL acetiladas
LDLox:	LDL oxidadas
Lp-PLA2:	fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas

LRT:	fracción plasmática de lipoproteínas ricas en triglicéridos
LXR:	liver X receptor
no-HDL:	fracción plasmática de lipoproteínas que no son de alta densidad
PAF:	factor activador plaquetario
PBS:	tampón fosfato salino
PLTP:	proteína transferidora de fosfolípidos
PMA:	phorbol myristate acetate
PON-1:	paraoxonasa-1
PTEC:	proteína transferidora de ésteres de colesterol
RNA:	ácido ribonucleico
TTG:	test de tolerancia a la glucosa
TRC:	transporte reverso de colesterol
TSI:	test de sensibilidad a la insulina
UI:	unidades internacionales
VLDL:	fracción plasmática de lipoproteínas de muy baja densidad

Bibliografía

- Adorni, M. P., F. Zimetti, J. T. Billheimer, N. Wang, D. J. Rader, M. C. Phillips and G. H. Rothblat (2007). "The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages." J Lipid Res 48(11): 2453-2462.
- Agellon, L. B., A. Walsh, T. Hayek, P. Moulin, X. C. Jiang, S. A. Shelanski, J. L. Breslow and A. R. Tall (1991). "Reduced high density lipoprotein cholesterol in human cholesteryl ester transfer protein transgenic mice." J Biol Chem 266(17): 10796-10801.
- Aiello, R. J., D. Brees, P. A. Bourassa, L. Royer, S. Lindsey, T. Coskran, M. Haghpassand and O. L. Francone (2002). "Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages." Arterioscler Thromb Vasc Biol 22(4): 630-637.
- Albers, J. J. and M. C. Cheung (2004). "Emerging roles for phospholipid transfer protein in lipid and lipoprotein metabolism." Curr Opin Lipidol 15(3): 255-260.
- Annema, W. and U. J. Tietge (2012). "Regulation of reverse cholesterol transport - a comprehensive appraisal of available animal studies." Nutr Metab (Lond) 9(1): 25.
- Ansell, B. J., M. Navab, S. Hama, N. Kamranpour, G. Fonarow, G. Hough, S. Rahmani, R. Mottahedeh, R. Dave, S. T. Reddy and A. M. Fogelman (2003). "Inflammatory/antiinflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favorably affected by simvastatin treatment." Circulation 108(22): 2751-2756.
- Armendariz, A. D. and R. M. Krauss (2009). "Hepatic nuclear factor 1-alpha: inflammation, genetics, and atherosclerosis." Curr Opin Lipidol 20(2): 106-111.
- Aron, L., S. Jones and C. J. Fielding (1978). "Human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. Characterization of cofactor-dependent phospholipase activity." J Biol Chem 253(20): 7220-7226.
- Assmann, G., A. von Eckardstein and H. B. Brewer, Jr. (2001). Familial analphalipoproteinemia: Tangier disease. The metabolic and molecular basis of inherited disease. C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly and D. Valle. New York, McGraw-Hill: 2937-2960.
- Asztalos, B., W. Zhang, P. S. Roheim and L. Wong (1997). "Role of free apolipoprotein A-I in cholesterol efflux. Formation of pre-alpha-migrating high-density lipoprotein particles." Arterioscler Thromb Vasc Biol 17(9): 1630-1636.
- Asztalos, B. F., M. de la Llera-Moya, G. E. Dallal, K. V. Horvath, E. J. Schaefer and G. H. Rothblat (2005). "Differential effects of HDL subpopulations on cellular ABCA1- and SR-BI-mediated cholesterol efflux." J Lipid Res 46(10): 2246-2253.

Asztalos, B. F. and E. J. Schaefer (2003). "HDL in atherosclerosis: actor or bystander?" Atheroscler Suppl 4(1): 21-29.

Asztalos, B. F. and E. J. Schaefer (2003). "High-density lipoprotein subpopulations in pathologic conditions." Am J Cardiol 91(7A): 12E-17E.

Asztalos, B. F., M. Tani and E. J. Schaefer (2011). "Metabolic and functional relevance of HDL subspecies." Curr Opin Lipidol 22(3): 176-185.

Aviram, M., M. Rosenblat, C. L. Bisgaier, R. S. Newton, S. L. Primo-Parmo and B. N. La Du (1998). "Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase." J Clin Invest 101(8): 1581-1590.

Badimon, J. J., L. Badimon and V. Fuster (1990). "Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit." J Clin Invest 85(4): 1234-1241.

Baila-Rueda, L., A. Cenarro, Montserrat Cofán, Irene Orera, Silvia Barcelo-Batllori, Miguel Pocoví, Emilio Ros, Fernando Civeira, C. Nerín, C. Domeño and F. Civeira (2013). "Simultaneous determination of oxysterols, phytosterols and cholesterol precursors by high performance liquid

chromatography tandem mass spectrometry in human serum." Anal. Methods, 2249: 5.

Barrans, A., B. Jaspard, R. Barbaras, H. Chap, B. Perret and X. Collet (1996). "Pre-beta HDL: structure and metabolism." Biochim Biophys Acta 1300(2): 73-85.

Barter, P., J. Kastelein, A. Nunn and R. Hobbs (2003). "High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions." Atherosclerosis 168(2): 195-211.

Barter, P. J., H. B. Brewer, Jr., M. J. Chapman, C. H. Hennekens, D. J. Rader and A. R. Tall (2003). "Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol 23(2): 160-167.

Barter, P. J., M. Caulfield, M. Eriksson, S. M. Grundy, J. J. Kastelein, M. Komajda, J. Lopez-Sendon, L. Mosca, J. C. Tardif, D. D. Waters, C. L. Shear, J. H. Revkin, K. A. Buhr, M. R. Fisher, A. R. Tall and B. Brewer (2007). "Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events." N Engl J Med 357(21): 2109-2122.

Barter, P. J., S. Nicholls, K. A. Rye, G. M. Anantharamaiah, M. Navab and A. M. Fogelman (2004). "Antiinflammatory properties of HDL." Circ Res 95(8): 764-772.

Bays, H. E., P. H. Jones, W. V. Brown and T. A. Jacobson (2014). "National Lipid Association Annual Summary of Clinical Lipidology 2015." J Clin Lipidol 8(6 Suppl): S1-36.

Benditt, E. P., J. S. Hoffman, N. Eriksen, D. C. Parmelee and K. A. Walsh (1982). "SAA, an apoprotein of HDL: its structure and function." Ann N Y Acad Sci 389: 183-189.

- Benitez, S., J. L. Sanchez-Quesada, V. Ribas, O. Jorba, F. Blanco-Vaca, F. Gonzalez-Sastre and J. Ordonez-Llanos (2003). "Platelet-activating factor acetylhydrolase is mainly associated with electronegative low-density lipoprotein subfraction." Circulation 108(1): 92-96.
- Berard, A. M., B. Foger, A. Remaley, R. Shamburek, B. L. Vaisman, G. Talley, B. Paigen, R. F. Hoyt, Jr., S. Marcovina, H. B. Brewer, Jr. and S. Santamarina-Fojo (1997). "High plasma HDL concentrations associated with enhanced atherosclerosis in transgenic mice overexpressing lecithin-cholesterol acyltransferase." Nat Med 3(7): 744-749.
- Berge, K. E., H. Tian, G. A. Graf, L. Yu, N. V. Grishin, J. Schultz, P. Kwiterovich, B. Shan, R. Barnes and H. H. Hobbs (2000). "Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters." Science 290(5497): 1771-1775.
- Berthou, L., N. Duverger, F. Emmanuel, S. Langouet, J. Auwerx, A. Guillouzo, J. C. Fruchart, E. Rubin, P. Deneffe, B. Staels and D. Branellec (1996). "Opposite regulation of human versus mouse apolipoprotein A-I by fibrates in human apolipoprotein A-I transgenic mice." J Clin Invest 97(11): 2408-2416.
- Bjorkegren, J., A. Beigneux, M. O. Bergo, J. J. Maher and S. G. Young (2002). "Blocking the secretion of hepatic very low density lipoproteins renders the liver more susceptible to toxin-induced injury." J Biol Chem 277(7): 5476-5483.
- Bloks, V. W., W. M. Bakker-Van Waarde, H. J. Verkade, I. P. Kema, H. Wolters, E. Vink, A. K. Groen and F. Kuipers (2004). "Down-regulation of hepatic and intestinal Abcg5 and Abcg8 expression associated with altered sterol fluxes in rats with streptozotocin-induced diabetes." Diabetologia 47(1): 104-112.
- Boden, W. E., J. L. Probstfield, T. Anderson, B. R. Chaitman, P. Desvignes-Nickens, K. Koprowicz, R. McBride, K. Teo and W. Weintraub (2011). "Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy." N Engl J Med 365(24): 2255-2267.
- Borggreve, S. E., R. De Vries and R. P. Dullaart (2003). "Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins." Eur J Clin Invest 33(12): 1051-1069.
- Bouchard, G., D. Johnson, T. Carver, B. Paigen and M. C. Carey (2002). "Cholesterol gallstone formation in overweight mice establishes that obesity per se is not linked directly to cholelithiasis risk." J Lipid Res 43(7): 1105-1113.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem 72: 248-254.

Breckenridge, W. C., J. A. Little, P. Alaupovic, C. S. Wang, A. Kuksis, G. Kakis, F. Lindgren and G. Gardiner (1982). "Lipoprotein abnormalities associated with a familial deficiency of hepatic lipase." Atherosclerosis 45(2): 161-179.

Brewer, H. B., Jr., S. E. Lux, R. Ronan and K. M. John (1972). "Amino acid sequence of human apoLp-Gln-II (apoA-II), an apolipoprotein isolated from the high-density lipoprotein complex." Proc Natl Acad Sci U S A 69(5): 1304-1308.

Brites, F. D., C. D. Bonavita, C. De Geitere, M. Cloes, B. Delfly, M. J. Yael, J. Fruchart, R. W. Wikinski and G. R. Castro (2000). "Alterations in the main steps of reverse cholesterol transport in male patients with primary hypertriglyceridemia and low HDL-cholesterol levels." Atherosclerosis 152(1): 181-192.

Brousseau, M. E., M. Bodzioch, E. J. Schaefer, A. L. Goldkamp, D. Kielar, M. Probst, J. M. Ordovas, C. Aslanidis, K. J. Lackner, H. Bloomfield Rubins, D. Collins, S. J. Robins, P. W. Wilson and G. Schmitz (2001). "Common variants in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 in men with low HDL cholesterol levels and coronary heart disease." Atherosclerosis 154(3): 607-611.

Brown, M. A., L. Zhang, V. W. Levering, J. H. Wu, L. L. Satterwhite, L. Brian, N. J. Freedman and G. A. Truskey (2010). "Human umbilical cord blood-derived endothelial cells reendothelialize vein grafts and prevent thrombosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol 30(11): 2150-2155.

Brown, R. J. and D. J. Rader (2007). "Lipases as modulators of atherosclerosis in murine models." Curr Drug Targets 8(12): 1307-1319.

Brunham, L. R., J. K. Kruit, J. Iqbal, C. Fievet, J. M. Timmins, T. D. Pape, B. A. Coburn, N. Bissada, B. Staels, A. K. Groen, M. M. Hussain, J. S. Parks, F. Kuipers and M. R. Hayden (2006). "Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo." J Clin Invest 116(4): 1052-1062.

Brunzell, J. D. and S. S. Deeb (2001). Familial lipoprotein lipase deficiency, apoC-II deficiency, and hepatic lipase deficiency. The metabolic and molecular bases of inherited disease. C. R. Scriver, A. L. Beaudet, D. Valle and W. S. Sly. New York, McGraw-Hill: 2789-2816.

Burkitt, M. J. (2001). "A critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides, alpha-tocopherol, thiols, and ceruloplasmin." Arch Biochem Biophys 394(1): 117-135.

Cabana, V. G., N. Feng, C. A. Reardon, J. Lukens, N. R. Webb, F. C. de Beer and G. S. Getz (2004). "Influence of apoA-I and apoE on the formation of serum amyloid A-containing lipoproteins in vivo and in vitro." J Lipid Res 45(2): 317-325.

Cabana, V. G., J. R. Lukens, K. S. Rice, T. J. Hawkins and G. S. Getz (1996). "HDL content and composition in acute phase response in three species: triglyceride enrichment of HDL a factor in its decrease." J Lipid Res 37(12): 2662-2674.

Calabresi, L., D. Baldassarre, S. Castelnuovo, P. Conca, L. Bocchi, C. Candini, B. Frigerio, M. Amato, C. R. Sirtori, P. Alessandrini, M. Arca, G. Boscutti, L. Cattin, L. Gesualdo, T. Sampietro, G. Vaudo, F. Veglia, S. Calandra and G. Franceschini (2009). "Functional lecithin: cholesterol acyltransferase is not required for efficient atheroprotection in humans." Circulation 120(7): 628-635.

Calpe-Berdiel, L., N. Rotllan, C. Fievet, R. Roig, F. Blanco-Vaca and J. C. Escola-Gil (2008). "Liver X receptor-mediated activation of reverse cholesterol transport from macrophages to feces in vivo requires ABCG5/G8." J Lipid Res 49(9): 1904-1911.

Camont, L., M. J. Chapman and A. Kontush (2011). "Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease." Trends Mol Med 17(10): 594-603.

Camont, L., M. Lhomme, F. Rached, W. Le Goff, A. Negre-Salvayre, R. Salvayre, C. Calzada, M. Lagarde, M. J. Chapman and A. Kontush (2013). "Small, dense high-density lipoprotein-3 particles are enriched in negatively charged phospholipids: relevance to cellular cholesterol efflux, antioxidative, antithrombotic, anti-inflammatory, and antiapoptotic functionalities." Arterioscler Thromb Vasc Biol 33(12): 2715-2723.

Cavallero, E., F. Brites, B. Delfly, N. Nicolaiew, C. Decossin, C. De Geitere, J. C. Fruchart, R. Wikinski, B. Jacotot and G. Castro (1995). "Abnormal reverse cholesterol transport in controlled type II diabetic patients. Studies on fasting and postprandial LpA-I particles." Arterioscler Thromb Vasc Biol 15(12): 2130-2135.

Clay, M. A. and P. J. Barter (1996). "Formation of new HDL particles from lipid-free apolipoprotein A-I." J Lipid Res 37(8): 1722-1732.

Cordoba-Porras, A., J. L. Sanchez-Quesada, F. Gonzalez-Sastre, J. Ordonez-Llanos and F. Blanco-Vaca (1996). "Susceptibility of plasma low- and high-density lipoproteins to oxidation in patients with severe hyperhomocysteinemia." J Mol Med (Berl) 74(12): 771-776.

Curtiss, L. K., D. J. Bonnet and K. A. Rye (2000). "The conformation of apolipoprotein A-I in high-density lipoproteins is influenced by core lipid composition and particle size: a surface plasmon resonance study." Biochemistry 39(19): 5712-5721.

Champagne, E., L. O. Martinez, X. Collet and R. Barbaras (2006). "Ecto-F1Fo ATP synthase/F1 ATPase: metabolic and immunological functions." Curr Opin Lipidol 17(3): 279-284.

Chen, E. S., D. R. Mazzotti, T. K. Furuya, M. S. Cendoroglo, L. R. Ramos, L. Q. Araujo, R. R. Burbano and M. de Arruda Cardoso Smith (2009). "Apolipoprotein A1 gene polymorphisms as risk factors for hypertension and obesity." Clin Exp Med 9(4): 319-325.

- Chen, N., Y. Liu, C. D. Greiner and J. L. Holtzman (2000). "Physiologic concentrations of homocysteine inhibit the human plasma GSH peroxidase that reduces organic hydroperoxides." J Lab Clin Med 136(1): 58-65.
- Cheng, H., A. E. Staubus and L. Shum (1988). "An area function method for estimating the apparent absorption rate constant." Pharm Res 5(1): 57-60.
- Cheng, Q., L. M. Aleksunes, J. E. Manautou, N. J. Cherrington, G. L. Scheffer, H. Yamasaki and A. L. Slitt (2008). "Drug-metabolizing enzyme and transporter expression in a mouse model of diabetes and obesity." Mol Pharm 5(1): 77-91.
- Chyu, K. Y. and P. K. Shah (2015). "HDL/ApoA-1 infusion and ApoA-1 gene therapy in atherosclerosis." Front Pharmacol 6: 187.
- Dalla-Riva, J., K. G. Stenkula, J. Petrlova and J. O. Lagerstedt (2013). "Discoidal HDL and apoA-I-derived peptides improve glucose uptake in skeletal muscle." J Lipid Res 54(5): 1275-1282.
- Daniil, G., A. A. Phedonos, A. G. Holleboom, M. M. Motazacker, L. Argyri, J. A. Kuivenhoven and A. Chroni (2011). "Characterization of antioxidant/anti-inflammatory properties and apoA-I-containing subpopulations of HDL from family subjects with monogenic low HDL disorders." Clin Chim Acta 412(13-14): 1213-1220.
- Daugherty, A. (2002). "Mouse models of atherosclerosis." Am J Med Sci 323(1): 3-10.
- Davidson, W. S., R. A. Silva, S. Chantepie, W. R. Lagor, M. J. Chapman and A. Kontush (2009). "Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function." Arterioscler Thromb Vasc Biol 29(6): 870-876.
- Davidsson, P., J. Hulthe, B. Fagerberg and G. Camejo (2010). "Proteomics of apolipoproteins and associated proteins from plasma high-density lipoproteins." Arterioscler Thromb Vasc Biol 30(2): 156-163.
- Dawson, P. A. (2011). "Role of the intestinal bile acid transporters in bile acid and drug disposition." Handb Exp Pharmacol(201): 169-203.
- de Beer, M. C., D. M. Durbin, L. Cai, A. Jonas, F. C. de Beer and D. R. van der Westhuyzen (2001). "Apolipoprotein A-I conformation markedly influences HDL interaction with scavenger receptor BI." J Lipid Res 42(2): 309-313.
- De Lalla, O. F. and J. W. Gofman (1954). "Ultracentrifugal analysis of serum lipoproteins." Methods Biochem Anal 1: 459-478.
- de Silva, H. V., J. Mas-Oliva, J. M. Taylor and R. W. Mahley (1994). "Identification of apolipoprotein B-100 low density lipoproteins, apolipoprotein B-48 remnants, and apolipoprotein E-rich high density lipoproteins in the mouse." J Lipid Res 35(7): 1297-1310.

- Delalla, O. F., H. A. Elliott and J. W. Gofman (1954). "Ultracentrifugal studies of high density serum lipoproteins in clinically healthy adults." Am J Physiol 179(2): 333-337.
- Despres, J. P. (2011). "Excess visceral adipose tissue/ectopic fat the missing link in the obesity paradox?" J Am Coll Cardiol 57(19): 1887-1889.
- Dijkers, A., J. Freak de Boer, W. Annema, A. K. Groen and U. J. Tietge (2013). "Scavenger receptor BI and ABCG5/G8 differentially impact biliary sterol secretion and reverse cholesterol transport in mice." Hepatology 58(1): 293-303.
- Dijkers, A. and U. J. Tietge (2010). "Biliary cholesterol secretion: more than a simple ABC." World J Gastroenterol 16(47): 5936-5945.
- Ding, L., L. Yang, Z. Wang and W. Huang (2015). "Bile acid nuclear receptor FXR and digestive system diseases." Acta Pharm Sin B 5(2): 135-144.
- Dobiasova, M. and J. J. Frohlich (1998). "Assays of lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT)." Methods Mol Biol 110: 217-230.
- Drew, B. G., S. J. Duffy, M. F. Formosa, A. K. Natoli, D. C. Henstridge, S. A. Penfold, W. G. Thomas, N. Mukhamedova, B. de Courten, J. M. Forbes, F. Y. Yap, D. M. Kaye, G. van Hall, M. A. Febbraio, B. E. Kemp, D. Sviridov, G. R. Steinberg and B. A. Kingwell (2009). "High-density lipoprotein modulates glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus." Circulation 119(15): 2103-2111.
- Duell, P. B., J. F. Oram and E. L. Bierman (1990). "Nonenzymatic glycosylation of HDL resulting in inhibition of high-affinity binding to cultured human fibroblasts." Diabetes 39(10): 1257-1263.
- Dugi, K. A., B. L. Vaisman, N. Sakai, C. L. Knapper, S. M. Meyn, H. B. Brewer, Jr. and S. Santamarina-Fojo (1997). "Adenovirus-mediated expression of hepatic lipase in LCAT transgenic mice." J Lipid Res 38(9): 1822-1832.
- Duriez, P. and J. C. Fruchart (1999). "High-density lipoprotein subclasses and apolipoprotein A-I." Clin Chim Acta 286(1-2): 97-114.
- DuSell, C. D. and D. P. McDonnell (2008). "27-Hydroxycholesterol: a potential endogenous regulator of estrogen receptor signaling." Trends Pharmacol Sci 29(10): 510-514.
- Eckel, R. H., S. E. Kahn, E. Ferrannini, A. B. Goldfine, D. M. Nathan, M. W. Schwartz, R. J. Smith and S. R. Smith (2011). "Obesity and type 2 diabetes: what can be unified and what needs to be individualized?" J Clin Endocrinol Metab 96(6): 1654-1663.
- El Bouhassani, M., S. Gilibert, M. Moreau, F. Saint-Charles, M. Treguier, F. Poti, M. J. Chapman, W. Le Goff, P. Lesnik and T. Huby (2011). "Cholesteryl ester transfer protein

expression partially attenuates the adverse effects of SR-BI receptor deficiency on cholesterol metabolism and atherosclerosis." J Biol Chem 286(19): 17227-17238.

Errico, T. L., X. Chen, J. M. Martin Campos, J. Julve, J. C. Escola-Gil and F. Blanco-Vaca (2013). "[Basic mechanisms: structure, function and metabolism of plasma lipoproteins]." Clin Investig Arterioscler 25(2): 98-103.

Escola-Gil, J. C., X. Chen, J. Julve, H. Quesada, D. Santos, J. Metso, M. Tous, M. Jauhiainen and F. Blanco-Vaca (2013). "Hepatic lipase- and endothelial lipase-deficiency in mice promotes macrophage-to-feces RCT and HDL antioxidant properties." Biochim Biophys Acta 1831(4): 691-697.

Escola-Gil, J. C., M. Lee-Rueckert, D. Santos, L. Cedo, F. Blanco-Vaca and J. Julve (2015). "Quantification of In Vitro Macrophage Cholesterol Efflux and In Vivo Macrophage-Specific Reverse Cholesterol Transport." Methods Mol Biol 1339: 211-233.

Escola-Gil, J. C., N. Rotllan, J. Julve and F. Blanco-Vaca (2009). "In vivo macrophage-specific RCT and antioxidant and antiinflammatory HDL activity measurements: New tools for predicting HDL atheroprotection." Atherosclerosis 206(2): 321-327.

Fabre, A. C., C. Malaval, A. Ben Addi, C. Verdier, V. Pons, N. Serhan, L. Lichtenstein, G. Combes, T. Huby, F. Briand, X. Collet, N. Nijstad, U. J. Tietge, B. Robaye, B. Perret, J. M. Boeynaems and L. O. Martinez (2010). "P2Y13 receptor is critical for reverse cholesterol transport." Hepatology 52(4): 1477-1483.

Favari, E., M. Lee, L. Calabresi, G. Franceschini, F. Zimetti, F. Bernini and P. T. Kovanen (2004). "Depletion of pre-beta-high density lipoprotein by human chymase impairs ATP-binding cassette transporter A1- but not scavenger receptor class B type I-mediated lipid efflux to high density lipoprotein." J Biol Chem 279(11): 9930-9936.

Ferre, P. and F. Foufelle (2010). "Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c." Diabetes Obes Metab 12 Suppl 2: 83-92.

Fielding, C. J. and P. E. Fielding (2007). Reverse cholesterol transport - new roles for preb1-HDL and lecithin:cholesterol acyltransferase. High density lipoproteins: from basic biology to clinical aspects. C. J. Fielding. Weinheim, Wiley: 143-162.

Fielding, C. J., V. G. Shore and P. E. Fielding (1972). "Lecithin: cholesterol acyltransferase: effects of substrate composition upon enzyme activity." Biochim Biophys Acta 270(4): 513-518.

Fielding, C. J., V. G. Shore and P. E. Fielding (1972). "A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase." Biochem Biophys Res Commun 46(4): 1493-1498.

- Fievet, C., N. Theret, N. Shojaee, P. Duchateau, G. Castro, G. Ailhaud, P. Drouin and J. C. Fruchart (1992). "Apolipoprotein A-I-containing particles and reverse cholesterol transport in IDDM." Diabetes 41 Suppl 2: 81-85.
- Fisher, E. A. (2012). "The degradation of apolipoprotein B100: multiple opportunities to regulate VLDL triglyceride production by different proteolytic pathways." Biochim Biophys Acta 1821(5): 778-781.
- Fogelman, A. M. (2004). "When good cholesterol goes bad." Nat Med 10(9): 902-903.
- Fogelman, A. M. (2005). "When pouring water on the fire makes it burn brighter." Cell Metab 2(1): 6-8.
- Foger, B., M. Chase, M. J. Amar, B. L. Vaisman, R. D. Shamburek, B. Paigen, J. Fruchart-Najib, J. A. Paiz, C. A. Koch, R. F. Hoyt, H. B. Brewer, Jr. and S. Santamarina-Fojo (1999). "Cholesteryl ester transfer protein corrects dysfunctional high density lipoproteins and reduces aortic atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase transgenic mice." J Biol Chem 274(52): 36912-36920.
- Fon Tacer, K. and D. Rozman (2011). "Nonalcoholic Fatty liver disease: focus on lipoprotein and lipid deregulation." J Lipids 2011: 783976.
- Foretz, M., C. Pacot, I. Dugail, P. Lemarchand, C. Guichard, X. Le Liepvre, C. Berthelie-Lubrano, B. Spiegelman, J. B. Kim, P. Ferre and F. Foufelle (1999). "ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose." Mol Cell Biol 19(5): 3760-3768.
- Forte, T. M., M. N. Oda, L. Knoff, B. Frei, J. Suh, J. A. Harmony, W. D. Stuart, E. M. Rubin and D. S. Ng (1999). "Targeted disruption of the murine lecithin:cholesterol acyltransferase gene is associated with reductions in plasma paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase activities but not in apolipoprotein J concentration." J Lipid Res 40(7): 1276-1283.
- Foufelle, F. and P. Ferre (2002). "New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c." Biochem J 366(Pt 2): 377-391.
- Franceschini, G., L. Calabresi, C. Colombo, E. Favari, F. Bernini and C. R. Sirtori (2007). "Effects of fenofibrate and simvastatin on HDL-related biomarkers in low-HDL patients." Atherosclerosis 195(2): 385-391.
- Friedewald, W. T., R. I. Levy and D. S. Fredrickson (1972). "Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge." Clin Chem 18(6): 499-502.

Frikke-Schmidt, R., B. G. Nordestgaard, M. C. Stene, A. A. Sethi, A. T. Remaley, P. Schnohr, P. Grande and A. Tybjaerg-Hansen (2008). "Association of loss-of-function mutations in the ABCA1 gene with high-density lipoprotein cholesterol levels and risk of ischemic heart disease." JAMA 299(21): 2524-2532.

Fryirs, M. A., P. J. Barter, M. Appavoo, B. E. Tuch, F. Tabet, A. K. Heather and K. A. Rye (2010). "Effects of high-density lipoproteins on pancreatic beta-cell insulin secretion." Arterioscler Thromb Vasc Biol 30(8): 1642-1648.

Gargalovic, P. and L. Dory (2003). "Caveolins and macrophage lipid metabolism." J Lipid Res 44(1): 11-21.

Garner, B., A. R. Waldeck, P. K. Witting, K. A. Rye and R. Stocker (1998). "Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII." J Biol Chem 273(11): 6088-6095.

Georgiadi, A. and S. Kersten (2012). "Mechanisms of gene regulation by fatty acids." Adv Nutr 3(2): 127-134.

Glomset, J. A. (1968). "The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction." J Lipid Res 9(2): 155-167.

Gomaschi, M., N. Basilico, F. Sisto, D. Taramelli, S. Eligini, S. Colli, C. R. Sirtori, G. Franceschini and L. Calabresi (2005). "High-density lipoproteins attenuate interleukin-6 production in endothelial cells exposed to pro-inflammatory stimuli." Biochim Biophys Acta 1736(2): 136-143.

Gordon, J. I., K. A. Budelier, H. F. Sims, C. Edelstein, A. M. Scanu and A. W. Strauss (1983). "Biosynthesis of human preproapolipoprotein A-II." J Biol Chem 258(22): 14054-14059.

Gordon, S. M., H. Li, X. Zhu, A. S. Shah, L. J. Lu and W. S. Davidson (2015). "A comparison of the mouse and human lipoproteome: suitability of the mouse model for studies of human lipoproteins." J Proteome Res 14(6): 2686-2695.

Goswami, B., D. Tayal, N. Gupta and V. Mallika (2009). "Paraoxonase: a multifaceted biomolecule." Clin Chim Acta 410(1-2): 1-12.

Greco, D., A. Kotronen, J. Westerbacka, O. Puig, P. Arkkila, T. Kiviluoto, S. Laitinen, M. Kolak, R. M. Fisher, A. Hamsten, P. Auvinen and H. Yki-Jarvinen (2008). "Gene expression in human NAFLD." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 294(5): G1281-1287.

Gross, B., M. Pawlak, P. Lefebvre and B. Staels (2016). "PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD." Nat Rev Endocrinol.

- Gruen, M. L., M. R. Plummer, W. Zhang, K. A. Posey, M. F. Linton, S. Fazio and A. H. Hasty (2005). "Persistence of high density lipoprotein particles in obese mice lacking apolipoprotein A-I." J Lipid Res 46(9): 2007-2014.
- Grundey, S. M., J. I. Cleeman, S. R. Daniels, K. A. Donato, R. H. Eckel, B. A. Franklin, D. J. Gordon, R. M. Krauss, P. J. Savage, S. C. Smith, Jr., J. A. Spertus and F. Costa (2005). "Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement." Circulation 112(17): 2735-2752.
- Gu, X., B. Trigatti, S. Xu, S. Acton, J. Babitt and M. Krieger (1998). "The efficient cellular uptake of high density lipoprotein lipids via scavenger receptor class B type I requires not only receptor-mediated surface binding but also receptor-specific lipid transfer mediated by its extracellular domain." J Biol Chem 273(41): 26338-26348.
- Ha, Y. C. and P. J. Barter (1982). "Differences in plasma cholesteryl ester transfer activity in sixteen vertebrate species." Comp Biochem Physiol B 71(2): 265-269.
- Haghighpassand, M., P. A. Bourassa, O. L. Francone and R. J. Aiello (2001). "Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels." J Clin Invest 108(9): 1315-1320.
- Hailman, E., J. J. Albers, G. Wolfbauer, A. Y. Tu and S. D. Wright (1996). "Neutralization and transfer of lipopolysaccharide by phospholipid transfer protein." J Biol Chem 271(21): 12172-12178.
- Han, C. Y., T. Chiba, J. S. Campbell, N. Fausto, M. Chaisson, G. Orasanu, J. Plutzky and A. Chait (2006). "Reciprocal and coordinate regulation of serum amyloid A versus apolipoprotein A-I and paraoxonase-1 by inflammation in murine hepatocytes." Arterioscler Thromb Vasc Biol 26(8): 1806-1813.
- Han, R., R. Lai, Q. Ding, Z. Wang, X. Luo, Y. Zhang, G. Cui, J. He, W. Liu and Y. Chen (2007). "Apolipoprotein A-I stimulates AMP-activated protein kinase and improves glucose metabolism." Diabetologia 50(9): 1960-1968.
- Hansel, B., P. Giral, E. Nobecourt, S. Chantepie, E. Bruckert, M. J. Chapman and A. Kontush (2004). "Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity." J Clin Endocrinol Metab 89(10): 4963-4971.
- Hara, A. and N. S. Radin (1978). "Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent." Anal Biochem 90(1): 420-426.
- Havel, R. J., H. A. Eder and J. H. Bragdon (1955). "The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum." J Clin Invest 34(9): 1345-1353.

Hedrick, C. C., K. Hassan, G. P. Hough, J. H. Yoo, S. Simzar, C. R. Quinto, S. M. Kim, A. Dooley, S. Langi, S. Y. Hama, M. Navab, J. L. Witztum and A. M. Fogelman (2000). "Short-term feeding of atherogenic diet to mice results in reduction of HDL and paraoxonase that may be mediated by an immune mechanism." Arterioscler Thromb Vasc Biol 20(8): 1946-1952.

Hegarty, B. D., A. Bobard, I. Hainault, P. Ferre, P. Bossard and F. Foufelle (2005). "Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c." Proc Natl Acad Sci U S A 102(3): 791-796.

Hegele, R. A. (2009). "Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications." Nat Rev Genet 10(2): 109-121.

Heinecke, J. W. (2009). "The HDL proteome: a marker--and perhaps mediator--of coronary artery disease." J Lipid Res 50 Suppl: S167-171.

Hennessy, L. K., S. T. Kunitake, M. Jarvis, R. L. Hamilton, G. Endeman, A. Protter and J. P. Kane (1997). "Isolation of subpopulations of high density lipoproteins: three particle species containing apoE and two species devoid of apoE that have affinity for heparin." J Lipid Res 38(9): 1859-1868.

Heverin, M., Z. Ali, M. Olin, V. Tillander, M. M. Joibari, E. Makoveichuk, E. Leitersdorf, M. Warner, G. Olivercrona, J. A. Gustafsson and I. Bjorkhem (2016). "On the regulatory importance of 27-hydroxycholesterol in mouse liver." J Steroid Biochem Mol Biol.

Hinney, A., C. I. Vogel and J. Hebebrand (2010). "From monogenic to polygenic obesity: recent advances." Eur Child Adolesc Psychiatry 19(3): 297-310.

Hoffman, J. S. and E. P. Benditt (1982). "Changes in high density lipoprotein content following endotoxin administration in the mouse. Formation of serum amyloid protein-rich subfractions." J Biol Chem 257(17): 10510-10517.

Holmquist, L. (2002). "Selective extraction of lecithin:cholesterol acyltransferase (EC 2.3.1.43) from human plasma." J Biochem Biophys Methods 52(1): 63-68.

Hong, C. and P. Tontonoz (2014). "Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery." Nat Rev Drug Discov 13(6): 433-444.

Hoofnagle, A. N. and J. W. Heinecke (2009). "Lipoproteomics: using mass spectrometry-based proteomics to explore the assembly, structure, and function of lipoproteins." J Lipid Res 50(10): 1967-1975.

Hopkins, G. J. and P. J. Barter (1980). "Transfers of esterified cholesterol and triglyceride between high density and very low density lipoproteins: in vitro studies of rabbits and humans." Metabolism 29(6): 546-550.

- Huang, Y., A. von Eckardstein and G. Assmann (1993). "Cell-derived unesterified cholesterol cycles between different HDLs and LDL for its effective esterification in plasma." Arterioscler Thromb 13(3): 445-458.
- Huang, Z. H., D. Gu, Y. Lange and T. Mazzone (2003). "Expression of scavenger receptor BI facilitates sterol movement between the plasma membrane and the endoplasmic reticulum in macrophages." Biochemistry 42(13): 3949-3955.
- Inazu, A., M. L. Brown, C. B. Hesler, L. B. Agellon, J. Koizumi, K. Takata, Y. Maruhama, H. Mabuchi and A. R. Tall (1990). "Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation." N Engl J Med 323(18): 1234-1238.
- Inoue, M., T. Ohtake, W. Motomura, N. Takahashi, Y. Hosoki, S. Miyoshi, Y. Suzuki, H. Saito, Y. Kohgo and T. Okumura (2005). "Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice." Biochem Biophys Res Commun 336(1): 215-222.
- Ishida, T., S. Choi, R. K. Kundu, K. Hirata, E. M. Rubin, A. D. Cooper and T. Quertermous (2003). "Endothelial lipase is a major determinant of HDL level." J Clin Invest 111(3): 347-355.
- Jakubowski, H. (2000). "Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation." J Biol Chem 275(6): 3957-3962.
- Janowski, B. A., M. J. Grogan, S. A. Jones, G. B. Wisely, S. A. Kliewer, E. J. Corey and D. J. Mangelsdorf (1999). "Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta." Proc Natl Acad Sci U S A 96(1): 266-271.
- Jauhiainen, M., J. Metso, R. Pahlman, S. Blomqvist, A. van Tol and C. Ehnholm (1993). "Human plasma phospholipid transfer protein causes high density lipoprotein conversion." J Biol Chem 268(6): 4032-4036.
- Jay, A. G. and J. A. Hamilton (2016). "The enigmatic membrane fatty acid transporter CD36: New insights into fatty acid binding and their effects on uptake of oxidized LDL." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.
- Jaye, M., K. J. Lynch, J. Krawiec, D. Marchadier, C. Maugeais, K. Doan, V. South, D. Amin, M. Perrone and D. J. Rader (1999). "A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism." Nat Genet 21(4): 424-428.
- Jiang, X. C., S. Qin, C. Qiao, K. Kawano, M. Lin, A. Skold, X. Xiao and A. R. Tall (2001). "Apolipoprotein B secretion and atherosclerosis are decreased in mice with phospholipid-transfer protein deficiency." Nat Med 7(7): 847-852.
- Jonas, A. (2000). "Lecithin cholesterol acyltransferase." Biochim Biophys Acta 1529(1-3): 245-256.

- Jones, M. K., A. Catta, L. Li and J. P. Segrest (2009). "Dynamics of activation of lecithin:cholesterol acyltransferase by apolipoprotein A-I." Biochemistry 48(47): 11196-11210.
- Julve, J., J. C. Escola-Gil, E. Rodriguez-Millan, J. M. Martin-Campos, M. Jauhiainen, H. Quesada, I. M. Renteria-Obregon, J. Osada, J. L. Sanchez-Quesada and F. Blanco-Vaca (2013). "Methionine-induced hyperhomocysteinemia impairs the antioxidant ability of high-density lipoproteins without reducing in vivo macrophage-specific reverse cholesterol transport." Mol Nutr Food Res 57(10): 1814-1824.
- Julve, J., J. C. Escola-Gil, N. Rotllan, C. Fievet, E. Vallez, C. de la Torre, V. Ribas, J. H. Sloan and F. Blanco-Vaca (2010). "Human apolipoprotein A-II determines plasma triglycerides by regulating lipoprotein lipase activity and high-density lipoprotein proteome." Arterioscler Thromb Vasc Biol 30(2): 232-238.
- Julve, J., J. M. Martin-Campos, J. C. Escola-Gil and F. Blanco-Vaca (2016). "Chylomicrons: Advances in biology, pathology, laboratory testing, and therapeutics." Clin Chim Acta 455: 134-148.
- Juvet, L. K., S. M. Andresen, G. U. Schuster, K. T. Dalen, K. A. Tobin, K. Hollung, F. Haugen, S. Jacinto, S. M. Ulven, K. Bamberg, J. A. Gustafsson and H. I. Nebb (2003). "On the role of liver X receptors in lipid accumulation in adipocytes." Mol Endocrinol 17(2): 172-182.
- Kawano, Y. and D. E. Cohen (2013). "Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease." J Gastroenterol 48(4): 434-441.
- Kennedy, A. J., K. L. Ellacott, V. L. King and A. H. Hasty (2010). "Mouse models of the metabolic syndrome." Dis Model Mech 3(3-4): 156-166.
- Khalil, M. F., W. D. Wagner and I. J. Goldberg (2004). "Molecular interactions leading to lipoprotein retention and the initiation of atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol 24(12): 2211-2218.
- Khera, A. V., M. Cuchel, M. de la Llera-Moya, A. Rodrigues, M. F. Burke, K. Jafri, B. C. French, J. A. Phillips, M. L. Mucksavage, R. L. Wilensky, E. R. Mohler, G. H. Rothblat and D. J. Rader (2011). "Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis." N Engl J Med 364(2): 127-135.
- Khovidhunkit, W., M. S. Kim, R. A. Memon, J. K. Shigenaga, A. H. Moser, K. R. Feingold and C. Grunfeld (2004). "Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host." J Lipid Res 45(7): 1169-1196.
- King, A. J. (2012). "The use of animal models in diabetes research." Br J Pharmacol 166(3): 877-894.

- Klancic, T., L. Woodward, S. M. Hofmann and E. A. Fisher (2016). "High density lipoprotein and metabolic disease: Potential benefits of restoring its functional properties." Mol Metab 5(5): 321-327.
- Kobayashi, K., T. M. Forte, S. Taniguchi, B. Y. Ishida, K. Oka and L. Chan (2000). "The db/db mouse, a model for diabetic dyslipidemia: molecular characterization and effects of Western diet feeding." Metabolism 49(1): 22-31.
- Kontush, A., S. Chantepie and M. J. Chapman (2003). "Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress." Arterioscler Thromb Vasc Biol 23(10): 1881-1888.
- Kontush, A. and C. A. Chapman, Eds. (2012). High-density lipoproteins: structure, metabolism, function, and therapeutics. New York, Wiley.
- Kontush, A. and M. J. Chapman (2006). "Antiatherogenic small, dense HDL--guardian angel of the arterial wall?" Nat Clin Pract Cardiovasc Med 3(3): 144-153.
- Kontush, A. and M. J. Chapman (2006). "Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis." Pharmacol Rev 58(3): 342-374.
- Kontush, A. and M. J. Chapman (2008). "Why is HDL functionally deficient in type 2 diabetes?" Curr Diab Rep 8(1): 51-59.
- Kontush, A. and M. J. Chapman (2010). "Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities." Curr Opin Lipidol 21(4): 312-318.
- Kontush, A., E. C. de Faria, S. Chantepie and M. J. Chapman (2005). "A normotriglyceridemic, low HDL-cholesterol phenotype is characterised by elevated oxidative stress and HDL particles with attenuated antioxidative activity." Atherosclerosis 182(2): 277-285.
- Kontush, A., M. Lindahl, M. Lhome, L. Calabresi, M. J. Chapman and W. S. Davidson, Eds. (2015). Structure of HDL: particle subclasses and molecular components. High Density Lipoproteins, Handbook of Experimental Pharmacology 224.
- Kontush, A., P. Therond, A. Zerrad, M. Couturier, A. Negre-Salvayre, J. A. de Souza, S. Chantepie and M. J. Chapman (2007). "Preferential sphingosine-1-phosphate enrichment and sphingomyelin depletion are key features of small dense HDL3 particles: relevance to antiapoptotic and antioxidative activities." Arterioscler Thromb Vasc Biol 27(8): 1843-1849.
- Koonen, D. P., R. L. Jacobs, M. Febbraio, M. E. Young, C. L. Soltys, H. Ong, D. E. Vance and J. R. Dyck (2007). "Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity." Diabetes 56(12): 2863-2871.

Kopec, K. O., V. Alva and A. N. Lupas (2011). "Bioinformatics of the TULIP domain superfamily." Biochem Soc Trans 39(4): 1033-1038.

Kostner, G. M., K. Oettl, M. Jauhiainen, C. Ehnholm, H. Esterbauer and H. Dieplinger (1995). "Human plasma phospholipid transfer protein accelerates exchange/transfer of alpha-tocopherol between lipoproteins and cells." Biochem J 305 (Pt 2): 659-667.

Krieger, M. (1999). "Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI." Annu Rev Biochem 68: 523-558.

Krieger, M. and K. Kozarsky (1999). "Influence of the HDL receptor SR-BI on atherosclerosis." Curr Opin Lipidol 10(6): 491-497.

Laffitte, B. A., S. B. Joseph, R. Walczak, L. Pei, D. C. Wilpitz, J. L. Collins and P. Tontonoz (2001). "Autoregulation of the human liver X receptor alpha promoter." Mol Cell Biol 21(22): 7558-7568.

Lambert, G., N. Sakai, B. L. Vaisman, E. B. Neufeld, B. Marteyn, C. C. Chan, B. Paigen, E. Lupia, A. Thomas, L. J. Striker, J. Blanchette-Mackie, G. Csako, J. N. Brady, R. Costello, G. E. Striker, A. T. Remaley, H. B. Brewer, Jr. and S. Santamarina-Fojo (2001). "Analysis of glomerulosclerosis and atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase-deficient mice." J Biol Chem 276(18): 15090-15098.

Landray, M. J., R. Haynes, J. C. Hopewell, S. Parish, T. Aung, J. Tomson, K. Wallendszus, M. Craig, L. Jiang, R. Collins and J. Armitage (2014). "Effects of extended-release niacin with laropiprant in high-risk patients." N Engl J Med 371(3): 203-212.

Landry, Y. D., M. Denis, S. Nandi, S. Bell, A. M. Vaughan and X. Zha (2006). "ATP-binding cassette transporter A1 expression disrupts raft membrane microdomains through its ATPase-related functions." J Biol Chem 281(47): 36091-36101.

Langmann, T., J. Klucken, M. Reil, G. Liebisch, M. F. Luciani, G. Chimini, W. E. Kaminski and G. Schmitz (1999). "Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages." Biochem Biophys Res Commun 257(1): 29-33.

Larrede, S., C. M. Quinn, W. Jessup, E. Frisdal, M. Olivier, V. Hsieh, M. J. Kim, M. Van Eck, P. Couvert, A. Carrie, P. Giral, M. J. Chapman, M. Guerin and W. Le Goff (2009). "Stimulation of cholesterol efflux by LXR agonists in cholesterol-loaded human macrophages is ABCA1-dependent but ABCG1-independent." Arterioscler Thromb Vasc Biol 29(11): 1930-1936.

Lee-Rueckert, M., F. Blanco-Vaca, P. T. Kovanen and J. C. Escola-Gil (2013). "The role of the gut in reverse cholesterol transport--focus on the enterocyte." Prog Lipid Res 52(3): 317-328.

- Lee-Rueckert, M., J. C. Escola-Gil and P. T. Kovanen (2016). "HDL functionality in reverse cholesterol transport--Challenges in translating data emerging from mouse models to human disease." Biochim Biophys Acta 1861(7): 566-583.
- Lee, A. S., W. Y. Chen, H. C. Chan, J. F. Hsu, M. Y. Shen, C. M. Chang, H. Bair, M. J. Su, K. C. Chang and C. H. Chen (2014). "Gender disparity in LDL-induced cardiovascular damage and the protective role of estrogens against electronegative LDL." Cardiovasc Diabetol 13: 64.
- Lee, M. H., K. Lu, S. Hazard, H. Yu, S. Shulenin, H. Hidaka, H. Kojima, R. Allikmets, N. Sakuma, R. Pegoraro, A. K. Srivastava, G. Salen, M. Dean and S. B. Patel (2001). "Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption." Nat Genet 27(1): 79-83.
- Levels, J. H., J. A. Marquart, P. R. Abraham, A. E. van den Ende, H. O. Molhuizen, S. J. van Deventer and J. C. Meijers (2005). "Lipopolysaccharide is transferred from high-density to low-density lipoproteins by lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein." Infect Immun 73(4): 2321-2326.
- Levo, Y., M. Shalit and R. Tur-Kaspa (1982). "Serum amyloid P-component as a marker of liver disease." Am J Gastroenterol 77(6): 427-430.
- Lhomme, M. (2012). Lipidomics in lipoprotein biology. Lipidomics: technologies and applications. K. e. Ekroos. Weinheim, Wiley: pp. 197-231.
- Lichtenstein, L., N. Serhan, W. Annema, G. Combes, B. Robaye, J. M. Boeynaems, B. Perret, U. J. Tietge, M. Laffargue and L. O. Martinez (2013). "Lack of P2Y13 in mice fed a high cholesterol diet results in decreased hepatic cholesterol content, biliary lipid secretion and reverse cholesterol transport." Nutr Metab (Lond) 10(1): 67.
- Lipina, C. and H. S. Hundal (2011). "Sphingolipids: agents provocateurs in the pathogenesis of insulin resistance." Diabetologia 54(7): 1596-1607.
- Love-Gregory, L. and N. A. Abumrad (2011). "CD36 genetics and the metabolic complications of obesity." Curr Opin Clin Nutr Metab Care 14(6): 527-534.
- Low, H., A. Hoang, J. Forbes, M. Thomas, J. G. Lyons, P. Nestel, L. A. Bach and D. Sviridov (2012). "Advanced glycation end-products (AGEs) and functionality of reverse cholesterol transport in patients with type 2 diabetes and in mouse models." Diabetologia 55(9): 2513-2521.
- Lucke, S. and B. Levkau (2010). "Endothelial functions of sphingosine-1-phosphate." Cell Physiol Biochem 26(1): 87-96.
- Lundasen, T., W. Liao, B. Angelin and M. Rudling (2003). "Leptin induces the hepatic high density lipoprotein receptor scavenger receptor B type I (SR-BI) but not cholesterol 7alpha-hydroxylase (Cyp7a1) in leptin-deficient (ob/ob) mice." J Biol Chem 278(44): 43224-43228.

- Lusa, S., M. Jauhiainen, J. Metso, P. Somerharju and C. Ehnholm (1996). "The mechanism of human plasma phospholipid transfer protein-induced enlargement of high-density lipoprotein particles: evidence for particle fusion." Biochem J 313 (Pt 1): 275-282.
- Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." Nature 407(6801): 233-241.
- Lutz, T. A. and S. C. Woods (2012). "Overview of animal models of obesity." Curr Protoc Pharmacol Chapter 5: Unit5 61.
- Mackness, B. and M. Mackness (2010). "Anti-inflammatory properties of paraoxonase-1 in atherosclerosis." Adv Exp Med Biol 660: 143-151.
- Mackness, M. I., S. Arrol, C. Abbott and P. N. Durrington (1993). "Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase." Atherosclerosis 104(1-2): 129-135.
- Maier, J. A., L. Barenghi, F. Pagani, S. Bradamante, P. Comi and G. Ragnotti (1994). "The protective role of high-density lipoprotein on oxidized-low-density-lipoprotein-induced U937/endothelial cell interactions." Eur J Biochem 221(1): 35-41.
- Malerod, L., L. K. Juvet, A. Hanssen-Bauer, W. Eskild and T. Berg (2002). "Oxysterol-activated LXRalpha/RXR induces hSR-BI-promoter activity in hepatoma cells and preadipocytes." Biochem Biophys Res Commun 299(5): 916-923.
- Mallat, Z., G. Lambeau and A. Tedgui (2010). "Lipoprotein-associated and secreted phospholipases A(2) in cardiovascular disease: roles as biological effectors and biomarkers." Circulation 122(21): 2183-2200.
- Manninen, V., M. O. Elo, M. H. Frick, K. Haapa, O. P. Heinonen, P. Heinsalmi, P. Helo, J. K. Huttunen, P. Kaitaniemi, P. Koskinen and et al. (1988). "Lipid alterations and decline in the incidence of coronary heart disease in the Helsinki Heart Study." JAMA 260(5): 641-651.
- Marathe, G. K., G. A. Zimmerman and T. M. McIntyre (2003). "Platelet-activating factor acetylhydrolase, and not paraoxonase-1, is the oxidized phospholipid hydrolase of high density lipoprotein particles." J Biol Chem 278(6): 3937-3947.
- Marhaug, G., K. Sletten and G. Husby (1982). "Characterization of amyloid related protein SAA complexed with serum lipoproteins (apoSAA)." Clin Exp Immunol 50(2): 382-389.
- Marotti, K. R., C. K. Castle, T. P. Boyle, A. H. Lin, R. W. Murray and G. W. Melchior (1993). "Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein." Nature 364(6432): 73-75.
- Marques-Vidal, P., M. Jauhiainen, J. Metso and C. Ehnholm (1997). "Transformation of high density lipoprotein 2 particles by hepatic lipase and phospholipid transfer protein." Atherosclerosis 133(1): 87-95.

- Martinez, L. O., S. Jacquet, J. P. Esteve, C. Rolland, E. Cabezon, E. Champagne, T. Pineau, V. Georgeaud, J. E. Walker, F. Terce, X. Collet, B. Perret and R. Barbaras (2003). "Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis." Nature 421(6918): 75-79.
- Martinez, L. O., S. Najib, B. Perret, C. Cabou and L. Lichtenstein (2015). "Ecto-F1-ATPase/P2Y pathways in metabolic and vascular functions of high density lipoproteins." Atherosclerosis 238(1): 89-100.
- Martinez, L. O., B. Perret, R. Barbaras, F. Terce and X. Collet (2007). Hepatic and renal HDL receptors. High-density lipoproteins. From basic biology to clinical aspects. C. J. Fielding. Weinheim, Wiley: 307-338.
- Maugeais, C., U. J. Tietge, U. C. Broedl, D. Marchadier, W. Cain, M. G. McCoy, S. Lund-Katz, J. M. Glick and D. J. Rader (2003). "Dose-dependent acceleration of high-density lipoprotein catabolism by endothelial lipase." Circulation 108(17): 2121-2126.
- Maxfield, F. R. and I. Tabas (2005). "Role of cholesterol and lipid organization in disease." Nature 438(7068): 612-621.
- McIntyre, T. M., S. M. Prescott and D. M. Stafforini (2009). "The emerging roles of PAF acetylhydrolase." J Lipid Res 50 Suppl: S255-259.
- McNeish, J., R. J. Aiello, D. Guyot, T. Turi, C. Gabel, C. Aldinger, K. L. Hoppe, M. L. Roach, L. J. Royer, J. de Wet, C. Broccardo, G. Chimini and O. L. Francone (2000). "High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1." Proc Natl Acad Sci U S A 97(8): 4245-4250.
- Memon, R. A., J. Fuller, A. H. Moser, P. J. Smith, C. Grunfeld and K. R. Feingold (1999). "Regulation of putative fatty acid transporters and Acyl-CoA synthetase in liver and adipose tissue in ob/ob mice." Diabetes 48(1): 121-127.
- Mineo, C. and P. W. Shaul (2012). "Novel biological functions of high-density lipoprotein cholesterol." Circ Res 111(8): 1079-1090.
- Miquilena-Colina, M. E., E. Lima-Cabello, S. Sanchez-Campos, M. V. Garcia-Mediavilla, M. Fernandez-Bermejo, T. Lozano-Rodriguez, J. Vargas-Castrillon, X. Buque, B. Ochoa, P. Aspichueta, J. Gonzalez-Gallego and C. Garcia-Monzon (2011). "Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C." Gut 60(10): 1394-1402.
- Murakami, Y., S. Kamiyama, Z. H. Howlader, T. Yamato, M. Komai and Y. Furukawa (2002). "Lecithin: cholesterol acyltransferase is insufficient to prevent oxidative modification of low-density lipoprotein." J Biochem 131(1): 17-19.

- Nakamura, K., M. A. Kennedy, A. Baldan, D. D. Bojanic, K. Lyons and P. A. Edwards (2004). "Expression and regulation of multiple murine ATP-binding cassette transporter G1 mRNAs/isoforms that stimulate cellular cholesterol efflux to high density lipoprotein." J Biol Chem 279(44): 45980-45989.
- Namikawa, C., Z. Shu-Ping, J. R. Vyselaar, Y. Nozaki, Y. Nemoto, M. Ono, N. Akisawa, T. Saibara, M. Hiroi, H. Enzan and S. Onishi (2004). "Polymorphisms of microsomal triglyceride transfer protein gene and manganese superoxide dismutase gene in non-alcoholic steatohepatitis." J Hepatol 40(5): 781-786.
- Navab, M., G. M. Anantharamaiah and A. M. Fogelman (2005). "The role of high-density lipoprotein in inflammation." Trends Cardiovasc Med 15(4): 158-161.
- Navab, M., G. M. Anantharamaiah, S. T. Reddy, S. Hama, G. Hough, V. R. Grijalva, N. Yu, B. J. Ansell, G. Datta, D. W. Garber and A. M. Fogelman (2005). "Apolipoprotein A-I mimetic peptides." Arterioscler Thromb Vasc Biol 25(7): 1325-1331.
- Navab, M., G. M. Anantharamaiah, S. T. Reddy, B. J. Van Lenten, B. J. Ansell, G. C. Fonarow, K. Vahabzadeh, S. Hama, G. Hough, N. Kamranpour, J. A. Berliner, A. J. Lusis and A. M. Fogelman (2004). "The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL." J Lipid Res 45(6): 993-1007.
- Navab, M., G. M. Anantharamaiah, S. T. Reddy, B. J. Van Lenten, B. J. Ansell, S. Hama, G. Hough, E. Bachini, V. R. Grijalva, A. C. Wagner, Z. Shaposhnik and A. M. Fogelman (2005). "The double jeopardy of HDL." Ann Med 37(3): 173-178.
- Navab, M., J. A. Berliner, G. Subbanagounder, S. Hama, A. J. Lusis, L. W. Castellani, S. Reddy, D. Shih, W. Shi, A. D. Watson, B. J. Van Lenten, D. Vora and A. M. Fogelman (2001). "HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids." Arterioscler Thromb Vasc Biol 21(4): 481-488.
- Navab, M., S. Y. Hama, G. M. Anantharamaiah, K. Hassan, G. P. Hough, A. D. Watson, S. T. Reddy, A. Sevanian, G. C. Fonarow and A. M. Fogelman (2000). "Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3." J Lipid Res 41(9): 1495-1508.
- Navab, M., S. Y. Hama, C. J. Cooke, G. M. Anantharamaiah, M. Chaddha, L. Jin, G. Subbanagounder, K. F. Faull, S. T. Reddy, N. E. Miller and A. M. Fogelman (2000). "Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1." J Lipid Res 41(9): 1481-1494.
- Navab, M., S. S. Imes, S. Y. Hama, G. P. Hough, L. A. Ross, R. W. Bork, A. J. Valente, J. A. Berliner, D. C. Drinkwater, H. Laks and et al. (1991). "Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to

induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein." J Clin Invest 88(6): 2039-2046.

Navab, M., S. T. Reddy, B. J. van Lenten, G. M. Buga, G. M. Anantharamaiah and A. M. Fogelman (2007). HDL and inflammation. High-density lipoproteins. From basic biology to clinical aspects. C. J. Fielding. Weinheim, Wiley: 341-354.

Neufeld, E. B., S. J. Demosky, Jr., J. A. Stonik, C. Combs, A. T. Remaley, N. Duverger, S. Santamarina-Fojo and H. B. Brewer, Jr. (2002). "The ABCA1 transporter functions on the basolateral surface of hepatocytes." Biochem Biophys Res Commun 297(4): 974-979.

Neufeld, E. B., A. T. Remaley, S. J. Demosky, J. A. Stonik, A. M. Cooney, M. Comly, N. K. Dwyer, M. Zhang, J. Blanchette-Mackie, S. Santamarina-Fojo and H. B. Brewer, Jr. (2001). "Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter." J Biol Chem 276(29): 27584-27590.

Nichols, A. V., R. M. Krauss and T. A. Musliner (1986). "Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis." Methods Enzymol 128: 417-431.

Nicholls, S. J., G. J. Dusting, B. Cutri, S. Bao, G. R. Drummond, K. A. Rye and P. J. Barter (2005). "Reconstituted high-density lipoproteins inhibit the acute pro-oxidant and proinflammatory vascular changes induced by a periarterial collar in normocholesterolemic rabbits." Circulation 111(12): 1543-1550.

Nicholls, S. J., L. Zheng and S. L. Hazen (2005). "Formation of dysfunctional high-density lipoprotein by myeloperoxidase." Trends Cardiovasc Med 15(6): 212-219.

Nijstad, N., T. Gautier, F. Briand, D. J. Rader and U. J. Tietge (2011). "Biliary sterol secretion is required for functional in vivo reverse cholesterol transport in mice." Gastroenterology 140(3): 1043-1051.

Nishida, H. I. and T. Nishida (1997). "Phospholipid transfer protein mediates transfer of not only phosphatidylcholine but also cholesterol from phosphatidylcholine-cholesterol vesicles to high density lipoproteins." J Biol Chem 272(11): 6959-6964.

Nissen, S. E., J. C. Tardif, S. J. Nicholls, J. H. Revkin, C. L. Shear, W. T. Duggan, W. Ruzyllo, W. B. Bachinsky, G. P. Lasala and E. M. Tuzcu (2007). "Effect of torcetrapib on the progression of coronary atherosclerosis." N Engl J Med 356(13): 1304-1316.

Nobecourt, E., S. Jacqueminet, B. Hansel, S. Chantepie, A. Grimaldi, M. J. Chapman and A. Kontush (2005). "Defective antioxidative activity of small dense HDL3 particles in type 2 diabetes: relationship to elevated oxidative stress and hyperglycaemia." Diabetologia 48(3): 529-538.

Nofer, J. R. and G. Assmann (2005). "Atheroprotective effects of high-density lipoprotein-associated lysosphingolipids." Trends Cardiovasc Med 15(7): 265-271.

Noguchi-Sasaki, M., Y. Sasaki, Y. Matsuo-Tezuka, H. Yasuno, M. Kurasawa, K. Yoroze and Y. Shimonaka (2016). "Reduction of a marker of oxidative stress with enhancement of iron utilization by erythropoiesis activation following epoetin beta pegol administration in iron-loaded db/db mice." Int J Hematol 103(3): 262-273.

Norata, G. D., E. Callegari, M. Marchesi, G. Chiesa, P. Eriksson and A. L. Catapano (2005). "High-density lipoproteins induce transforming growth factor-beta2 expression in endothelial cells." Circulation 111(21): 2805-2811.

Nordestgaard, B. G., A. Langsted, S. Mora, G. Kolovou, H. Baum, E. Bruckert, G. F. Watts, G. Sypniewska, O. Wiklund, J. Boren, M. J. Chapman, C. Cobbaert, O. S. Descamps, A. von Eckardstein, P. R. Kamstrup, K. Pulkki, F. Kronenberg, A. T. Remaley, N. Rifai, E. Ros and M. Langlois (2016). "Fasting Is Not Routinely Required for Determination of a Lipid Profile: Clinical and Laboratory Implications Including Flagging at Desirable Concentration Cutpoints-A Joint Consensus Statement from the European Atherosclerosis Society and European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine." Clin Chem 62(7): 930-946.

Olivecrona, G. and T. Olivecrona (1995). "Triglyceride lipases and atherosclerosis." Curr Opin Lipidol 6(5): 291-305.

Olofsson, S. O., P. Stillemark-Billton and L. Asp (2000). "Intracellular assembly of VLDL: two major steps in separate cell compartments." Trends Cardiovasc Med 10(8): 338-345.

Oram, J. F. (2002). "The cholesterol mobilizing transporter ABCA1 as a new therapeutic target for cardiovascular disease." Trends Cardiovasc Med 12(4): 170-175.

Orso, E., C. Broccardo, W. E. Kaminski, A. Bottcher, G. Liebisch, W. Drobnik, A. Gotz, O. Chambenoit, W. Diederich, T. Langmann, T. Spruss, M. F. Luciani, G. Rothe, K. J. Lackner, G. Chimini and G. Schmitz (2000). "Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abc1-deficient mice." Nat Genet 24(2): 192-196.

Otvos, J. D., E. J. Jeyarajah, D. W. Bennett and R. M. Krauss (1992). "Development of a proton nuclear magnetic resonance spectroscopic method for determining plasma lipoprotein concentrations and subspecies distributions from a single, rapid measurement." Clin Chem 38(9): 1632-1638.

Out, R., W. Jessup, W. Le Goff, M. Hoekstra, I. C. Gelissen, Y. Zhao, L. Kritharides, G. Chimini, J. Kuiper, M. J. Chapman, T. Huby, T. J. Van Berkel and M. Van Eck (2008). "Coexistence of foam cells and hypocholesterolemia in mice lacking the ABC transporters A1 and G1." Circ Res 102(1): 113-120.

- Pagler, T. A., S. Rhode, A. Neuhofer, H. Laggner, W. Strobl, C. Hinterndorfer, I. Volf, M. Pavelka, E. R. Eckhardt, D. R. van der Westhuyzen, G. J. Schutz and H. Stangl (2006). "SR-BI-mediated high density lipoprotein (HDL) endocytosis leads to HDL resecretion facilitating cholesterol efflux." J Biol Chem 281(16): 11193-11204.
- Paigen, B. (1995). "Genetics of responsiveness to high-fat and high-cholesterol diets in the mouse." Am J Clin Nutr 62(2): 458S-462S.
- Parthasarathy, S., N. Auge and N. Santanam (1998). "Implications of lag time concept in the oxidation of LDL." Free Radic Res 28(6): 583-591.
- Paszy, C., N. Maeda, J. Verstuyft and E. M. Rubin (1994). "Apolipoprotein AI transgene corrects apolipoprotein E deficiency-induced atherosclerosis in mice." J Clin Invest 94(2): 899-903.
- Patsch, J. (1998). "Influence of lipolysis on chylomicron clearance and HDL cholesterol levels." Eur Heart J 19 Suppl H: H2-6.
- Patsch, J. R., S. Prasad, A. M. Gotto, Jr. and W. Patsch (1987). "High density lipoprotein2. Relationship of the plasma levels of this lipoprotein species to its composition, to the magnitude of postprandial lipemia, and to the activities of lipoprotein lipase and hepatic lipase." J Clin Invest 80(2): 341-347.
- Pettinelli, P. and L. A. Videla (2011). "Up-regulation of PPAR-gamma mRNA expression in the liver of obese patients: an additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction." J Clin Endocrinol Metab 96(5): 1424-1430.
- Plump, A. S., C. J. Scott and J. L. Breslow (1994). "Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse." Proc Natl Acad Sci U S A 91(20): 9607-9611.
- Purushothaman, M., P. Puru, G. Cimmino and J. J. Badimon (2010). "Antioxidant and anti-inflammatory properties of apoA-I milano." FASEB J 24(1): 589.518.
- Qin, S., G. Song and Y. Yu (2014). "Phospholipid transfer protein in diabetes, metabolic syndrome and obesity." Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets 14(2): 149-153.
- Qiu, X., A. Mistry, M. J. Ammirati, B. A. Chrnyk, R. W. Clark, Y. Cong, J. S. Culp, D. E. Danley, T. B. Freeman, K. F. Geoghegan, M. C. Griffor, S. J. Hawrylik, C. M. Hayward, P. Hensley, L. R. Hoth, G. A. Karam, M. E. Lira, D. B. Lloyd, K. M. McGrath, K. J. Stutzman-Engwall, A. K. Subashi, T. A. Subashi, J. F. Thompson, I. K. Wang, H. Zhao and A. P. Seddon (2007). "Crystal structure of cholesteryl ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules." Nat Struct Mol Biol 14(2): 106-113.
- Quarck, R., B. De Geest, D. Stengel, A. Mertens, M. Lox, G. Theilmeier, C. Michiels, M. Raes, H. Bult, D. Collen, P. Van Veldhoven, E. Ninio and P. Holvoet (2001). "Adenovirus-mediated

gene transfer of human platelet-activating factor-acetylhydrolase prevents injury-induced neointima formation and reduces spontaneous atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." Circulation 103(20): 2495-2500.

Raabe, M., M. M. Veniant, M. A. Sullivan, C. H. Zlot, J. Bjorkegren, L. B. Nielsen, J. S. Wong, R. L. Hamilton and S. G. Young (1999). "Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice." J Clin Invest 103(9): 1287-1298.

Radding, C. M. and D. Steinberg (1960). "Studies on the synthesis and secretion of serum lipoproteins by rat liver slices." J Clin Invest 39: 1560-1569.

Rader, D. J. and A. Daugherty (2008). "Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis." Nature 451(7181): 904-913.

Rao, R., J. J. Albers, G. Wolfbauer and H. J. Pownall (1997). "Molecular and macromolecular specificity of human plasma phospholipid transfer protein." Biochemistry 36(12): 3645-3653.

Reaven, G. M. (1988). "Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease." Diabetes 37(12): 1595-1607.

Reddy, S., S. Hama, V. Grijalva, K. Hassan, R. Mottahedeh, G. Hough, D. J. Wadleigh, M. Navab and A. M. Fogelman (2001). "Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 activity is necessary for oxidized phospholipids to induce monocyte chemotactic activity in human aortic endothelial cells." J Biol Chem 276(20): 17030-17035.

Reddy, S. T., G. M. Anantharamaiah, M. Navab, S. Hama, G. Hough, V. Grijalva, D. W. Garber, G. Datta and A. M. Fogelman (2006). "Oral amphipathic peptides as therapeutic agents." Expert Opin Investig Drugs 15(1): 13-21.

Reddy, S. T., S. Hama, C. Ng, V. Grijalva, M. Navab and A. M. Fogelman (2002). "ATP-binding cassette transporter 1 participates in LDL oxidation by artery wall cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol 22(11): 1877-1883.

Remaley, A. T., J. A. Stonik, S. J. Demosky, E. B. Neufeld, A. V. Bocharov, T. G. Vishnyakova, T. L. Eggerman, A. P. Patterson, N. J. Duverger, S. Santamarina-Fojo and H. B. Brewer, Jr. (2001). "Apolipoprotein specificity for lipid efflux by the human ABCAI transporter." Biochem Biophys Res Commun 280(3): 818-823.

Revuelta-Lopez, E., R. Cal, J. Julve, A. Rull, M. Martinez-Bujidos, M. Perez-Cuellar, J. Ordonez-Llanos, L. Badimon, J. L. Sanchez-Quesada and V. Llorente-Cortes (2015). "Hypoxia worsens the impact of intracellular triglyceride accumulation promoted by electronegative low-density lipoprotein in cardiomyocytes by impairing perilipin 5 upregulation." Int J Biochem Cell Biol 65: 257-267.

Ribas, V., J. L. Sanchez-Quesada, R. Anton, M. Camacho, J. Julve, J. C. Escola-Gil, L. Vila, J. Ordóñez-Llanos and F. Blanco-Vaca (2004). "Human apolipoprotein A-II enrichment displaces paraoxonase from HDL and impairs its antioxidant properties: a new mechanism linking HDL protein composition and antiatherogenic potential." *Circ Res* 95(8): 789-797.

Rigotti, A., H. E. Miettinen and M. Krieger (2003). "The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues." *Endocr Rev* 24(3): 357-387.

Robbesyn, F., V. Garcia, N. Auge, O. Vieira, M. F. Frisach, R. Salvayre and A. Negre-Salvayre (2003). "HDL counterbalance the proinflammatory effect of oxidized LDL by inhibiting intracellular reactive oxygen species rise, proteasome activation, and subsequent NF-kappaB activation in smooth muscle cells." *FASEB J* 17(6): 743-745.

Rohatgi, A., A. Khera, J. D. Berry, E. G. Givens, C. R. Ayers, K. E. Wedin, I. J. Neeland, I. S. Yuhanna, D. R. Rader, J. A. de Lemos and P. W. Shaul (2014). "HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events." *N Engl J Med* 371(25): 2383-2393.

Rohrl, C. and H. Stangl (2013). "HDL endocytosis and resecretion." *Biochim Biophys Acta* 1831(11): 1626-1633.

Rosenson, R. S., H. B. Brewer, Jr., B. Ansell, P. Barter, M. J. Chapman, J. W. Heinecke, A. Kontush, A. R. Tall and N. R. Webb (2013). "Translation of high-density lipoprotein function into clinical practice: current prospects and future challenges." *Circulation* 128(11): 1256-1267.

Rosenson, R. S., H. B. Brewer, Jr., B. J. Ansell, P. Barter, M. J. Chapman, J. W. Heinecke, A. Kontush, A. R. Tall and N. R. Webb (2016). "Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease." *Nat Rev Cardiol* 13(1): 48-60.

Rosenson, R. S., H. B. Brewer, Jr., M. J. Chapman, S. Fazio, M. M. Hussain, A. Kontush, R. M. Krauss, J. D. Otvos, A. T. Remaley and E. J. Schaefer (2011). "HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events." *Clin Chem* 57(3): 392-410.

Rosenson, R. S., H. B. Brewer, Jr., W. S. Davidson, Z. A. Fayad, V. Fuster, J. Goldstein, M. Hellerstein, X. C. Jiang, M. C. Phillips, D. J. Rader, A. T. Remaley, G. H. Rothblat, A. R. Tall and L. Yvan-Charvet (2012). "Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport." *Circulation* 125(15): 1905-1919.

Rothblat, G. H., M. de la Llera-Moya, V. Atger, G. Kellner-Weibel, D. L. Williams and M. C. Phillips (1999). "Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights." *J Lipid Res* 40(5): 781-796.

Rothblat, G. H. and M. C. Phillips (2010). "High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport." *Curr Opin Lipidol* 21(3): 229-238.

- Rotllan, N., L. Calpe-Berdiel, A. Guillaumet-Adkins, S. Suren-Castillo, F. Blanco-Vaca and J. C. Escola-Gil (2008). "CETP activity variation in mice does not affect two major HDL antiatherogenic properties: macrophage-specific reverse cholesterol transport and LDL antioxidant protection." *Atherosclerosis* 196(2): 505-513.
- Rousset, X., B. Vaisman, M. Amar, A. A. Sethi and A. T. Remaley (2009). "Lecithin: cholesterol acyltransferase--from biochemistry to role in cardiovascular disease." *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 16(2): 163-171.
- Ruan, X., Z. Li, Y. Zhang, L. Yang, Y. Pan, Z. Wang, G. S. Feng and Y. Chen (2011). "Apolipoprotein A-I possesses an anti-obesity effect associated with increase of energy expenditure and up-regulation of UCP1 in brown fat." *J Cell Mol Med* 15(4): 763-772.
- Rubin, E. M., R. M. Krauss, E. A. Spangler, J. G. Verstyft and S. M. Clift (1991). "Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI." *Nature* 353(6341): 265-267.
- Rye, K. A., N. J. Hime and P. J. Barter (1996). "The influence of sphingomyelin on the structure and function of reconstituted high density lipoproteins." *J Biol Chem* 271(8): 4243-4250.
- Sabeva, N. S., J. Liu and G. A. Graf (2009). "The ABCG5 ABCG8 sterol transporter and phytosterols: implications for cardiometabolic disease." *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 16(2): 172-177.
- Sabeva, N. S., E. J. Rouse and G. A. Graf (2007). "Defects in the leptin axis reduce abundance of the ABCG5-ABCG8 sterol transporter in liver." *J Biol Chem* 282(31): 22397-22405.
- Saemann, M. D., M. Poglitsch, C. Kopecky, M. Haidinger, W. H. Horl and T. Weichhart (2010). "The versatility of HDL: a crucial anti-inflammatory regulator." *Eur J Clin Invest* 40(12): 1131-1143.
- Saleheen, D., R. Scott, S. Javad, W. Zhao, A. Rodrigues, A. Picataggi, D. Lukmanova, M. L. Mucksavage, R. Luben, J. Billheimer, J. J. Kastelein, S. M. Boekholdt, K. T. Khaw, N. Wareham and D. J. Rader (2015). "Association of HDL cholesterol efflux capacity with incident coronary heart disease events: a prospective case-control study." *Lancet Diabetes Endocrinol* 3(7): 507-513.
- Sallam, N., A. Fisher, S. Golbidi and I. Laher (2011). "Weight and inflammation are the major determinants of vascular dysfunction in the aortae of db/db mice." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 383(5): 483-492.
- Samanta, U. and B. J. Bahnson (2008). "Crystal structure of human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: structural implication to lipoprotein binding and catalysis." *J Biol Chem* 283(46): 31617-31624.

Sampaio, E., D. S. Barbosa, T. L. Mazzuco, V. S. Nunes, M. Passarelli, E. R. Nakandakare and A. J. Carrilho (2013). "Impaired antioxidant action of high density lipoprotein in patients with type 1 diabetes with normoalbuminuria and microalbuminuria." Diabetes Res Clin Pract 99(3): 321-326.

Samyn, H., M. Moerland, T. van Gent, R. van Haperen, F. Grosveld, A. van Tol and R. de Crom (2009). "Elevation of systemic PLTP, but not macrophage-PLTP, impairs macrophage reverse cholesterol transport in transgenic mice." Atherosclerosis 204(2): 429-434.

Sanchez-Quesada, J. L., R. Homs-Serradesanferm, J. Serrat-Serrat, J. R. Serra-Grima, F. Gonzalez-Sastre and J. Ordonez-Llanos (1995). "Increase of LDL susceptibility to oxidation occurring after intense, long duration aerobic exercise." Atherosclerosis 118(2): 297-305.

Sanchez-Quesada, J. L., O. Jorba, A. Payes, C. Otal, R. Serra-Grima, F. Gonzalez-Sastre and J. Ordonez-Llanos (1998). "Ascorbic acid inhibits the increase in low-density lipoprotein (LDL) susceptibility to oxidation and the proportion of electronegative LDL induced by intense aerobic exercise." Coron Artery Dis 9(5): 249-255.

Sanchez-Quesada, J. L., A. Perez, A. Caixas, M. Rigla, A. Payes, S. Benitez and J. Ordonez-Llanos (2001). "Effect of glycemic optimization on electronegative low-density lipoprotein in diabetes: relation to nonenzymatic glycosylation and oxidative modification." J Clin Endocrinol Metab 86(7): 3243-3249.

Sanchez-Quesada, J. L., S. Villegas and J. Ordonez-Llanos (2012). "Electronegative low-density lipoprotein. A link between apolipoprotein B misfolding, lipoprotein aggregation and proteoglycan binding." Curr Opin Lipidol 23(5): 479-486.

Sanchez-Quesada, J. L., I. Vinagre, E. de Juan-Franco, J. Sanchez-Hernandez, F. Blanco-Vaca, J. Ordonez-Llanos and A. Perez (2012). "Effect of improving glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus on low-density lipoprotein size, electronegative low-density lipoprotein and lipoprotein-associated phospholipase A2 distribution." Am J Cardiol 110(1): 67-71.

Sanchez-Quesada, J. L., I. Vinagre, E. De Juan-Franco, J. Sanchez-Hernandez, R. Bonet-Marques, F. Blanco-Vaca, J. Ordonez-Llanos and A. Perez (2013). "Impact of the LDL subfraction phenotype on Lp-PLA2 distribution, LDL modification and HDL composition in type 2 diabetes." Cardiovasc Diabetol 12: 112.

Santamarina-Fojo, S., H. Gonzalez-Navarro, L. Freeman, E. Wagner and Z. Nong (2004). "Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol 24(10): 1750-1754.

Santamarina-Fojo, S., J. M. Hoeg, G. Assmann and H. B. Brewer, Jr. (2001). Lecithin cholesterol acyltransferase deficiency and fish eye disease. The metabolic and molecular basis of inherited diseases. C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly and D. Valle. New York, McGraw-Hill: 2817-2834.

Schaefer, E. J., R. D. Santos and B. F. Asztalos (2010). "Marked HDL deficiency and premature coronary heart disease." Curr Opin Lipidol 21(4): 289-297.

Schiefner, A. and A. Skerra (2015). "The menagerie of human lipocalins: a natural protein scaffold for molecular recognition of physiological compounds." Acc Chem Res 48(4): 976-985.

Schwartz, G. G., A. G. Olsson, M. Abt, C. M. Ballantyne, P. J. Barter, J. Brumm, B. R. Chaitman, I. M. Holme, D. Kallend, L. A. Leiter, E. Leitersdorf, J. J. McMurray, H. Mundl, S. J. Nicholls, P. K. Shah, J. C. Tardif and R. S. Wright (2012). "Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome." N Engl J Med 367(22): 2089-2099.

Shafaati, M., M. Olin, A. Bavner, H. Pettersson, B. Rozell, S. Meaney, P. Parini and I. Bjorkhem (2011). "Enhanced production of 24S-hydroxycholesterol is not sufficient to drive liver X receptor target genes in vivo." J Intern Med 270(4): 377-387.

Shafir, E., E. Ziv and L. Mosthaf (1999). "Nutritionally induced insulin resistance and receptor defect leading to beta-cell failure in animal models." Ann N Y Acad Sci 892: 223-246.

Shah, A. S., L. Tan, J. L. Long and W. S. Davidson (2013). "Proteomic diversity of high density lipoproteins: our emerging understanding of its importance in lipid transport and beyond." J Lipid Res 54(10): 2575-2585.

Shao, B., M. N. Oda, J. F. Oram and J. W. Heinecke (2006). "Myeloperoxidase: an inflammatory enzyme for generating dysfunctional high density lipoprotein." Curr Opin Cardiol 21(4): 322-328.

Shavva, V. S., D. A. Mogilenko, A. M. Bogomolova, A. A. Nikitin, E. B. Dizhe, A. M. Efremov, G. N. Oleinikova, A. P. Perevozchikov and S. V. Orlov (2016). "PPARgamma Represses Apolipoprotein A-I Gene but Impedes TNFalpha-Mediated ApoA-I Downregulation in HepG2 Cells." J Cell Biochem 117(9): 2010-2022.

Shih, D. M., L. Gu, Y. R. Xia, M. Navab, W. F. Li, S. Hama, L. W. Castellani, C. E. Furlong, L. G. Costa, A. M. Fogelman and A. J. Lusis (1998). "Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis." Nature 394(6690): 284-287.

Shih, D. M., Y. R. Xia, X. P. Wang, E. Miller, L. W. Castellani, G. Subbanagounder, H. Cheroutre, K. F. Faull, J. A. Berliner, J. L. Witztum and A. J. Lusis (2000). "Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis." J Biol Chem 275(23): 17527-17535.

Shimomura, I., Y. Bashmakov and J. D. Horton (1999). "Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus." J Biol Chem 274(42): 30028-30032.

- Shimomura, I., Y. Bashmakov, S. Ikemoto, J. D. Horton, M. S. Brown and J. L. Goldstein (1999). "Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes." Proc Natl Acad Sci U S A 96(24): 13656-13661.
- Siggins, S., I. Bykov, M. Hermansson, P. Somerharju, K. Lindros, T. A. Miettinen, M. Jauhiainen, V. M. Olkkonen and C. Ehnholm (2007). "Altered hepatic lipid status and apolipoprotein A-I metabolism in mice lacking phospholipid transfer protein." Atherosclerosis 190(1): 114-123.
- Silver, D. L., X. C. Jiang and A. R. Tall (1999). "Increased high density lipoprotein (HDL), defective hepatic catabolism of ApoA-I and ApoA-II, and decreased ApoA-I mRNA in ob/ob mice. Possible role of leptin in stimulation of HDL turnover." J Biol Chem 274(7): 4140-4146.
- Silver, D. L. and A. R. Tall (2001). "The cellular biology of scavenger receptor class B type I." Curr Opin Lipidol 12(5): 497-504.
- Singaraja, R. R., L. R. Brunham, H. Visscher, J. J. Kastelein and M. R. Hayden (2003). "Efflux and atherosclerosis: the clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene." Arterioscler Thromb Vasc Biol 23(8): 1322-1332.
- Singaraja, R. R., B. Stahmer, M. Brundert, M. Merkel, J. Heeren, N. Bissada, M. Kang, J. M. Timmins, R. Ramakrishnan, J. S. Parks, M. R. Hayden and F. Rinninger (2006). "Hepatic ATP-binding cassette transporter A1 is a key molecule in high-density lipoprotein cholesteryl ester metabolism in mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol 26(8): 1821-1827.
- Smoak, K. A., J. J. Aloor, J. Madenspacher, B. A. Merrick, J. B. Collins, X. Zhu, G. Cavigliolo, M. N. Oda, J. S. Parks and M. B. Fessler (2010). "Myeloid differentiation primary response protein 88 couples reverse cholesterol transport to inflammation." Cell Metab 11(6): 493-502.
- Song, C., R. A. Hiipakka and S. Liao (2001). "Auto-oxidized cholesterol sulfates are antagonistic ligands of liver X receptors: implications for the development and treatment of atherosclerosis." Steroids 66(6): 473-479.
- Sparks, D. L., W. S. Davidson, S. Lund-Katz and M. C. Phillips (1995). "Effects of the neutral lipid content of high density lipoprotein on apolipoprotein A-I structure and particle stability." J Biol Chem 270(45): 26910-26917.
- Stafforini, D. M., L. W. Tjoelker, S. P. McCormick, D. Vaitkus, T. M. McIntyre, P. W. Gray, S. G. Young and S. M. Prescott (1999). "Molecular basis of the interaction between plasma platelet-activating factor acetylhydrolase and low density lipoprotein." J Biol Chem 274(11): 7018-7024.
- Stahlman, M., B. Fagerberg, M. Adiels, K. Ekroos, J. M. Chapman, A. Kontush and J. Boren (2013). "Dyslipidemia, but not hyperglycemia and insulin resistance, is associated with marked alterations in the HDL lipidome in type 2 diabetic subjects in the DIWA cohort: impact on small HDL particles." Biochim Biophys Acta 1831(11): 1609-1617.

Steinberg, D., S. Parthasarathy, T. E. Carew, J. C. Khoo and J. L. Witztum (1989). "Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity." N Engl J Med 320(14): 915-924.

Steneberg, P., A. G. Sykaras, F. Backlund, J. Straseviciene, I. Soderstrom and H. Edlund (2015). "Hyperinsulinemia Enhances Hepatic Expression of the Fatty Acid Transporter Cd36 and Provokes Hepatosteatosis and Hepatic Insulin Resistance." J Biol Chem 290(31): 19034-19043.

Stenkula, K. G., M. Lindahl, J. Petrlova, J. Dalla-Riva, O. Goransson, S. W. Cushman, E. Krupinska, H. A. Jones and J. O. Lagerstedt (2014). "Single injections of apoA-I acutely improve in vivo glucose tolerance in insulin-resistant mice." Diabetologia 57(4): 797-800.

Stremler, K. E., D. M. Stafforini, S. M. Prescott and T. M. McIntyre (1991). "Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Oxidatively fragmented phospholipids as substrates." J Biol Chem 266(17): 11095-11103.

Su, K., N. S. Sabeva, J. Liu, Y. Wang, S. Bhatnagar, D. R. van der Westhuyzen and G. A. Graf (2012). "The ABCG5 ABCG8 sterol transporter opposes the development of fatty liver disease and loss of glycemic control independently of phytosterol accumulation." J Biol Chem 287(34): 28564-28575.

Su, K., N. S. Sabeva, Y. Wang, X. Liu, J. D. Lester, J. Liu, S. Liang and G. A. Graf (2014). "Acceleration of biliary cholesterol secretion restores glycemic control and alleviates hypertriglyceridemia in obese db/db mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol 34(1): 26-33.

Subbaiah, P. V., J. J. Albers, C. H. Chen and J. D. Bagdade (1980). "Low density lipoprotein-activated lysolecithin acylation by human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. Identity of lysolecithin acyltransferase and lecithin-cholesterol acyltransferase." J Biol Chem 255(19): 9275-9280.

Subbanagounder, G., N. Leitinger, D. C. Schwenke, J. W. Wong, H. Lee, C. Rizza, A. D. Watson, K. F. Faull, A. M. Fogelman and J. A. Berliner (2000). "Determinants of bioactivity of oxidized phospholipids. Specific oxidized fatty acyl groups at the sn-2 position." Arterioscler Thromb Vasc Biol 20(10): 2248-2254.

Suc, I., I. Escargueil-Blanc, M. Trolly, R. Salvayre and A. Negre-Salvayre (1997). "HDL and ApoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL." Arterioscler Thromb Vasc Biol 17(10): 2158-2166.

Sun, D., J. Zhang, J. Xie, W. Wei, M. Chen and X. Zhao (2012). "MiR-26 controls LXR-dependent cholesterol efflux by targeting ABCA1 and ARL7." FEBS Lett 586(10): 1472-1479.

Tall, A. R., E. Abreu and J. Shuman (1983). "Separation of a plasma phospholipid transfer protein from cholesterol ester/phospholipid exchange protein." J Biol Chem 258(4): 2174-2180.

- Tamasawa, N., A. Tamasawa and K. Takebe (1993). "Higher levels of plasma cholesterol sulfate in patients with liver cirrhosis and hypercholesterolemia." Lipids 28(9): 833-836.
- Tan, K. C. (2009). "Reverse cholesterol transport in type 2 diabetes mellitus." Diabetes Obes Metab 11(6): 534-543.
- Tangirala, R. K., K. Tsukamoto, S. H. Chun, D. Usher, E. Pure and D. J. Rader (1999). "Regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of apolipoprotein A-I in mice." Circulation 100(17): 1816-1822.
- Tanigawa, H., J. T. Billheimer, J. Tohyama, I. V. Fuki, D. S. Ng, G. H. Rothblat and D. J. Rader (2009). "Lecithin: cholesterol acyltransferase expression has minimal effects on macrophage reverse cholesterol transport in vivo." Circulation 120(2): 160-169.
- Tanigawa, H., J. T. Billheimer, J. Tohyama, Y. Zhang, G. Rothblat and D. J. Rader (2007). "Expression of cholesteryl ester transfer protein in mice promotes macrophage reverse cholesterol transport." Circulation 116(11): 1267-1273.
- Tardif, J. C., J. Gregoire, P. L. L'Allier, R. Ibrahim, J. Lesperance, T. M. Heinonen, S. Kouz, C. Berry, R. Basser, M. A. Lavoie, M. C. Guertin and J. Rodes-Cabau (2007). "Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial." JAMA 297(15): 1675-1682.
- Tchernof, A. and J. P. Despres (2013). "Pathophysiology of human visceral obesity: an update." Physiol Rev 93(1): 359-404.
- Tchoua, U., W. D'Souza, N. Mukhamedova, D. Blum, E. Niesor, J. Mizrahi, C. Maugeais and D. Sviridov (2008). "The effect of cholesteryl ester transfer protein overexpression and inhibition on reverse cholesterol transport." Cardiovasc Res 77(4): 732-739.
- Temel, R. E., J. K. Sawyer, L. Yu, C. Lord, C. Degirolamo, A. McDaniel, S. Marshall, N. Wang, R. Shah, L. L. Rudel and J. M. Brown (2010). "Biliary sterol secretion is not required for macrophage reverse cholesterol transport." Cell Metab 12(1): 96-102.
- Terasaka, N., N. Wang, L. Yvan-Charvet and A. R. Tall (2007). "High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1." Proc Natl Acad Sci U S A 104(38): 15093-15098.
- Thuahnai, S. T., S. Lund-Katz, P. Dhanasekaran, M. de la Llera-Moya, M. A. Connelly, D. L. Williams, G. H. Rothblat and M. C. Phillips (2004). "Scavenger receptor class B type I-mediated cholesteryl ester-selective uptake and efflux of unesterified cholesterol. Influence of high density lipoprotein size and structure." J Biol Chem 279(13): 12448-12455.
- Tietge, U. J. and A. K. Groen (2013). "Role the TICE?: advancing the concept of transintestinal cholesterol excretion." Arterioscler Thromb Vasc Biol 33(7): 1452-1453.

Timmins, J. M., J. Y. Lee, E. Boudyguina, K. D. Kluckman, L. R. Brunham, A. Mulya, A. K. Gebre, J. M. Coutinho, P. L. Colvin, T. L. Smith, M. R. Hayden, N. Maeda and J. S. Parks (2005). "Targeted inactivation of hepatic *ApoA1* causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I." J Clin Invest 115(5): 1333-1342.

Tontonoz, P. and B. M. Spiegelman (2008). "Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma." Annu Rev Biochem 77: 289-312.

Tran, K. Q., S. J. Graewin, D. A. Swartz-Basile, A. Nakeeb, C. L. Svatek and H. A. Pitt (2003). "Leptin-resistant obese mice have paradoxically low biliary cholesterol saturation." Surgery 134(2): 372-377.

Tselepis, A. D., C. Dentan, S. A. Karabina, M. J. Chapman and E. Ninio (1995). "PAF-degrading acetylhydrolase is preferentially associated with dense LDL and VLDL-1 in human plasma. Catalytic characteristics and relation to the monocyte-derived enzyme." Arterioscler Thromb Vasc Biol 15(10): 1764-1773.

Tsukamoto, K., K. G. Hiester, P. Smith, D. C. Usher, J. M. Glick and D. J. Rader (1997). "Comparison of human apoA-I expression in mouse models of atherosclerosis after gene transfer using a second generation adenovirus." J Lipid Res 38(9): 1869-1876.

Tzotzas, T., C. Desrumaux and L. Lagrost (2009). "Plasma phospholipid transfer protein (PLTP): review of an emerging cardiometabolic risk factor." Obes Rev 10(4): 403-411.

Umamoto, T., C. Y. Han, P. Mitra, M. M. Averill, C. Tang, L. Goodspeed, M. Omer, S. Subramanian, S. Wang, L. J. Den Hartigh, H. Wei, E. J. Kim, J. Kim, K. D. O'Brien and A. Chait (2013). "Apolipoprotein AI and high-density lipoprotein have anti-inflammatory effects on adipocytes via cholesterol transporters: ATP-binding cassette A-1, ATP-binding cassette G-1, and scavenger receptor B-1." Circ Res 112(10): 1345-1354.

Undurti, A., Y. Huang, J. A. Lupica, J. D. Smith, J. A. DiDonato and S. L. Hazen (2009). "Modification of high density lipoprotein by myeloperoxidase generates a pro-inflammatory particle." J Biol Chem 284(45): 30825-30835.

Vaisar, T., S. Pennathur, P. S. Green, S. A. Gharib, A. N. Hoofnagle, M. C. Cheung, J. Byun, S. Vuletic, S. Kassim, P. Singh, H. Chea, R. H. Knopp, J. Brunzell, R. Geary, A. Chait, X. Q. Zhao, K. Elkon, S. Marcovina, P. Ridker, J. F. Oram and J. W. Heinecke (2007). "Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL." J Clin Invest 117(3): 746-756.

Vaisman, B. L., H. G. Klein, M. Rouis, A. M. Berard, M. R. Kindt, G. D. Talley, S. M. Meyn, R. F. Hoyt, Jr., S. M. Marcovina, J. J. Albers and et al. (1995). "Overexpression of human lecithin cholesterol acyltransferase leads to hyperalphalipoproteinemia in transgenic mice." J Biol Chem 270(20): 12269-12275.

van Beek, A. P., H. H. van Barlingen, F. C. de Ruijter-Heijstek, H. Jansen, D. W. Erkelens, G. M. Dallinga-Thie and T. W. de Bruin (1998). "Preferential clearance of apoB-48-containing lipoproteins after heparin-induced lipolysis is modulated by lipoprotein lipase activity." J Lipid Res 39(2): 322-332.

van der Veen, J. N., R. Havinga, V. W. Bloks, A. K. Groen and F. Kuipers (2007). "Cholesterol feeding strongly reduces hepatic VLDL-triglyceride production in mice lacking the liver X receptor alpha." J Lipid Res 48(2): 337-347.

van Eck, M., I. S. Bos, W. E. Kaminski, E. Orso, G. Rothe, J. Twisk, A. Bottcher, E. S. Van Amersfoort, T. A. Christiansen-Weber, W. P. Fung-Leung, T. J. Van Berkel and G. Schmitz (2002). "Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues." Proc Natl Acad Sci U S A 99(9): 6298-6303.

Van Lenten, B. J., S. Y. Hama, F. C. de Beer, D. M. Stafforini, T. M. McIntyre, S. M. Prescott, B. N. La Du, A. M. Fogelman and M. Navab (1995). "Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures." J Clin Invest 96(6): 2758-2767.

Van Lenten, B. J., M. Navab, D. Shih, A. M. Fogelman and A. J. Lusis (2001). "The role of high-density lipoproteins in oxidation and inflammation." Trends Cardiovasc Med 11(3-4): 155-161.

Van Lenten, B. J., S. T. Reddy, M. Navab and A. M. Fogelman (2006). "Understanding changes in high density lipoproteins during the acute phase response." Arterioscler Thromb Vasc Biol 26(8): 1687-1688.

Van Lenten, B. J., A. C. Wagner, G. M. Anantharamaiah, M. Navab, S. T. Reddy, G. M. Buga and A. M. Fogelman (2009). "Apolipoprotein A-I mimetic peptides." Curr Atheroscler Rep 11(1): 52-57.

Van Linthout, S., A. Foryst-Ludwig, F. Spillmann, J. Peng, Y. Feng, M. Meloni, E. Van Craeyveld, U. Kintscher, H. P. Schultheiss, B. De Geest and C. Tschope (2010). "Impact of HDL on adipose tissue metabolism and adiponectin expression." Atherosclerosis 210(2): 438-444.

van Tienhoven-Wind, L. J., F. G. Perton and R. P. Dullaart (2016). "Pre-beta-HDL formation relates to high-normal free thyroxine in type 2 diabetes mellitus." Clin Biochem 49(1-2): 41-46.

Vantourout, P., C. Radojkovic, L. Lichtenstein, V. Pons, E. Champagne and L. O. Martinez (2010). "Ecto-F(1)-ATPase: a moonlighting protein complex and an unexpected apoA-I receptor." World J Gastroenterol 16(47): 5925-5935.

Vaughan, A. M. and J. F. Oram (2005). "ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high density lipoprotein but not by lipid-depleted apolipoproteins." J Biol Chem 280(34): 30150-30157.

Veniant, M. M., C. H. Zlot, R. L. Walzem, V. Pierotti, R. Driscoll, D. Dichek, J. Herz and S. G. Young (1998). "Lipoprotein clearance mechanisms in LDL receptor-deficient "Apo-B48-only" and "Apo-B100-only" mice." J Clin Invest 102(8): 1559-1568.

Verges, B. (2009). "Lipid modification in type 2 diabetes: the role of LDL and HDL." Fundam Clin Pharmacol 23(6): 681-685.

Vieu, C., B. Jaspard, R. Barbaras, J. Manent, H. Chap, B. Perret and X. Collet (1996). "Identification and quantification of diacylglycerols in HDL and accessibility to lipase." J Lipid Res 37(5): 1153-1161.

Vikstedt, R., J. Metso, J. Hakala, V. M. Olkkonen, C. Ehnholm and M. Jauhiainen (2007). "Cholesterol efflux from macrophage foam cells is enhanced by active phospholipid transfer protein through generation of two types of acceptor particles." Biochemistry 46(42): 11979-11986.

Vohl, M. C., T. A. Neville, R. Kumarathasan, S. Braschi and D. L. Sparks (1999). "A novel lecithin-cholesterol acyltransferase antioxidant activity prevents the formation of oxidized lipids during lipoprotein oxidation." Biochemistry 38(19): 5976-5981.

Voight, B. F., G. M. Peloso, M. Orho-Melander, R. Frikke-Schmidt, M. Barbalic, M. K. Jensen, G. Hindy, H. Holm, E. L. Ding, T. Johnson, H. Schunkert, N. J. Samani, R. Clarke, J. C. Hopewell, J. F. Thompson, M. Li, G. Thorleifsson, C. Newton-Cheh, K. Musunuru, J. P. Pirruccello, D. Saleheen, L. Chen, A. Stewart, A. Schillert, U. Thorsteinsdottir, G. Thorgeirsson, S. Anand, J. C. Engert, T. Morgan, J. Spertus, M. Stoll, K. Berger, N. Martinelli, D. Girelli, P. P. McKeown, C. C. Patterson, S. E. Epstein, J. Devaney, M. S. Burnett, V. Mooser, S. Ripatti, I. Surakka, M. S. Nieminen, J. Sinisalo, M. L. Lokki, M. Perola, A. Havulinna, U. de Faire, B. Gigante, E. Ingelsson, T. Zeller, P. Wild, P. I. de Bakker, O. H. Klungel, A. H. Maitland-van der Zee, B. J. Peters, A. de Boer, D. E. Grobbee, P. W. Kamphuisen, V. H. Deneer, C. C. Elbers, N. C. Onland-Moret, M. H. Hofker, C. Wijmenga, W. M. Verschuren, J. M. Boer, Y. T. van der Schouw, A. Rasheed, P. Frossard, S. Demissie, C. Willer, R. Do, J. M. Ordovas, G. R. Abecasis, M. Boehnke, K. L. Mohlke, M. J. Daly, C. Guiducci, N. P. Burt, A. Surti, E. Gonzalez, S. Purcell, S. Gabriel, J. Marrugat, J. Peden, J. Erdmann, P. Diemert, C. Willenborg, I. R. Konig, M. Fischer, C. Hengstenberg, A. Ziegler, I. Buyschaert, D. Lambrechts, F. Van de Werf, K. A. Fox, N. E. El Mokhtari, D. Rubin, J. Schrezenmeier, S. Schreiber, A. Schafer, J. Danesh, S. Blankenberg, R. Roberts, R. McPherson, H. Watkins, A. S. Hall, K. Overvad, E. Rimm, E. Boerwinkle, A. Tybjaerg-Hansen, L. A. Cupples, M. P. Reilly, O. Melander, P. M. Mannucci, D. Ardissino, D. Siscovick, R. Elosua, K. Stefansson, C. J. O'Donnell, V. Salomaa, D. J. Rader, L. Peltonen, S. M. Schwartz, D. Altshuler and S. Kathiresan (2012). "Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study." Lancet 380(9841): 572-580.

von Eckardstein, A., M. Jauhiainen, Y. Huang, J. Metso, C. Langer, P. Pussinen, S. Wu, C. Ehnholm and G. Assmann (1996). "Phospholipid transfer protein mediated conversion of high density lipoproteins generates pre beta 1-HDL." Biochim Biophys Acta 1301(3): 255-262.

von Eckardstein, A., J. R. Nofer and G. Assmann (2001). "High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport." Arterioscler Thromb Vasc Biol 21(1): 13-27.

Wang, A. B., D. P. Liu and C. C. Liang (2003). "Regulation of human apolipoprotein B gene expression at multiple levels." Exp Cell Res 290(1): 1-12.

Wang, H. H., S. B. Patel, M. C. Carey and D. Q. Wang (2007). "Quantifying anomalous intestinal sterol uptake, lymphatic transport, and biliary secretion in Abcg8(-/-) mice." Hepatology 45(4): 998-1006.

Wang, M. D., V. Franklin and Y. L. Marcel (2007). "In vivo reverse cholesterol transport from macrophages lacking ABCA1 expression is impaired." Arterioscler Thromb Vasc Biol 27(8): 1837-1842.

Wang, N., D. L. Silver, P. Costet and A. R. Tall (2000). "Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1." J Biol Chem 275(42): 33053-33058.

Wang, S. and D. Peng (2012). "Regulation of adipocyte autophagy--the potential anti-obesity mechanism of high density lipoprotein and ApolipoproteinA-I." Lipids Health Dis 11: 131.

Wang, X., H. L. Collins, M. Ranalletta, I. V. Fuki, J. T. Billheimer, G. H. Rothblat, A. R. Tall and D. J. Rader (2007). "Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo." J Clin Invest 117(8): 2216-2224.

Watson, A. D., J. A. Berliner, S. Y. Hama, B. N. La Du, K. F. Faull, A. M. Fogelman and M. Navab (1995). "Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein." J Clin Invest 96(6): 2882-2891.

Watson, A. D., N. Leitinger, M. Navab, K. F. Faull, S. Horkko, J. L. Witztum, W. Palinski, D. Schwenke, R. G. Salomon, W. Sha, G. Subbanagounder, A. M. Fogelman and J. A. Berliner (1997). "Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo." J Biol Chem 272(21): 13597-13607.

Watson, A. D., M. Navab, S. Y. Hama, A. Sevanian, S. M. Prescott, D. M. Stafforini, T. M. McIntyre, B. N. Du, A. M. Fogelman and J. A. Berliner (1995). "Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein." J Clin Invest 95(2): 774-782.

Watson, A. D., G. Subbanagounder, D. S. Welsbie, K. F. Faull, M. Navab, M. E. Jung, A. M. Fogelman and J. A. Berliner (1999). "Structural identification of a novel pro-inflammatory

epoxyisoprostane phospholipid in mildly oxidized low density lipoprotein." J Biol Chem 274(35): 24787-24798.

Wei, H., M. M. Averill, T. S. McMillen, F. Dastvan, P. Mitra, S. Subramanian, C. Tang, A. Chait and R. C. Leboeuf (2014). "Modulation of adipose tissue lipolysis and body weight by high-density lipoproteins in mice." Nutr Diabetes 4: e108.

Werstuck, G. H., S. R. Lentz, S. Dayal, G. S. Hossain, S. K. Sood, Y. Y. Shi, J. Zhou, N. Maeda, S. K. Krisans, M. R. Malinow and R. C. Austin (2001). "Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways." J Clin Invest 107(10): 1263-1273.

Wiersma, H., A. Gatti, N. Nijstad, R. P. Oude Elferink, F. Kuipers and U. J. Tietge (2009). "Scavenger receptor class B type I mediates biliary cholesterol secretion independent of ATP-binding cassette transporter g5/g8 in mice." Hepatology 50(4): 1263-1272.

Wiesner, P., K. Leidl, A. Boettcher, G. Schmitz and G. Liebisch (2009). "Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry." J Lipid Res 50(3): 574-585.

Wilson, J. M. and J. R. Chowdhury (1990). "Prospects for gene therapy of familial hypercholesterolemia." Mol Biol Med 7(3): 223-232.

Williams, D. L., M. A. Connelly, R. E. Temel, S. Swarnakar, M. C. Phillips, M. de la Llera-Moya and G. H. Rothblat (1999). "Scavenger receptor BI and cholesterol trafficking." Curr Opin Lipidol 10(4): 329-339.

Wojcicka, G., A. Jamroz-Wisniewska, K. Horoszewicz and J. Beltowski (2007). "Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism." Postepy Hig Med Dosw (Online) 61: 736-759.

Wolfrum, C., M. N. Poy and M. Stoffel (2005). "Apolipoprotein M is required for prebeta-HDL formation and cholesterol efflux to HDL and protects against atherosclerosis." Nat Med 11(4): 418-422.

Wong, N. C. (2007). "Novel therapies to increase apolipoprotein AI and HDL for the treatment of atherosclerosis." Curr Opin Investig Drugs 8(9): 718-728.

Wu, A., C. J. Hinds and C. Thiemermann (2004). "High-density lipoproteins in sepsis and septic shock: metabolism, actions, and therapeutic applications." Shock 21(3): 210-221.

Wu, J. E., F. Basso, R. D. Shamburek, M. J. Amar, B. Vaisman, G. Szakacs, C. Joyce, T. Tansey, L. Freeman, B. J. Paigen, F. Thomas, H. B. Brewer, Jr. and S. Santamarina-Fojo (2004). "Hepatic ABCG5 and ABCG8 overexpression increases hepatobiliary sterol transport but does not alter aortic atherosclerosis in transgenic mice." J Biol Chem 279(22): 22913-22925.

- Wynn, T. A., A. Chawla and J. W. Pollard (2013). "Macrophage biology in development, homeostasis and disease." Nature 496(7446): 445-455.
- Yancey, P. G., A. E. Bortnick, G. Kellner-Weibel, M. de la Llera-Moya, M. C. Phillips and G. H. Rothblat (2003). "Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux." Arterioscler Thromb Vasc Biol 23(5): 712-719.
- Yang, C. Y., D. Manoogian, Q. Pao, F. S. Lee, R. D. Knapp, A. M. Gotto, Jr. and H. J. Pownall (1987). "Lecithin:cholesterol acyltransferase. Functional regions and a structural model of the enzyme." J Biol Chem 262(7): 3086-3091.
- Yen, T. T., J. A. Allan, P. L. Yu, M. A. Acton and D. V. Pearson (1976). "Triacylglycerol contents and in vivo lipogenesis of ob/ob, db/db and Avy/a mice." Biochim Biophys Acta 441(2): 213-220.
- Yin, K., X. Deng, Z. C. Mo, G. J. Zhao, J. Jiang, L. B. Cui, C. Z. Tan, G. B. Wen, Y. Fu and C. K. Tang (2011). "Tristetraprolin-dependent post-transcriptional regulation of inflammatory cytokine mRNA expression by apolipoprotein A-I: role of ATP-binding membrane cassette transporter A1 and signal transducer and activator of transcription 3." J Biol Chem 286(16): 13834-13845.
- Yokoyama, S. (2006). "ABCA1 and biogenesis of HDL." J Atheroscler Thromb 13(1): 1-15.
- Yu, L., J. York, K. von Bergmann, D. Lutjohann, J. C. Cohen and H. H. Hobbs (2003). "Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8." J Biol Chem 278(18): 15565-15570.
- Yu, R., B. Yekta, L. Vakili, N. Gharavi, M. Navab, D. Marelli and A. Ardehali (2008). "Proatherogenic high-density lipoprotein, vascular inflammation, and mimetic peptides." Curr Atheroscler Rep 10(2): 171-176.
- Zambon, A., S. S. Deeb, P. Pauletto, G. Crepaldi and J. D. Brunzell (2003). "Hepatic lipase: a marker for cardiovascular disease risk and response to therapy." Curr Opin Lipidol 14(2): 179-189.
- Zannis, V. I., P. Fotakis, G. Koukos, D. Kardassis, C. Ehnholm, M. Jauhiainen and A. Chroni (2015). HDL biogenesis, remodeling, and catabolism. High density lipoproteins, Handbook of Experimental Pharmacology. A. Von Eckardstein and D. Kardassis, Springer. 224: 53-111.
- Zanotti, I., E. Favari and F. Bernini (2012). "Cellular cholesterol efflux pathways: impact on intracellular lipid trafficking and methodological considerations." Curr Pharm Biotechnol 13(2): 292-302.
- Zanotti, I., M. Pedrelli, F. Poti, G. Stomeo, M. Gomaschi, L. Calabresi and F. Bernini (2011). "Macrophage, but not systemic, apolipoprotein E is necessary for macrophage reverse cholesterol transport in vivo." Arterioscler Thromb Vasc Biol 31(1): 74-80.

Zhang, B., N. Maeda, K. Okada, M. Tatsukawa, Y. Sawayama, A. Matsunaga, K. Kumagai, S. Miura, T. Nagao, J. Hayashi and K. Saku (2006). "Association between fast-migrating low-density lipoprotein subfraction as characterized by capillary isotachopheresis and intima-media thickness of carotid artery." Atherosclerosis 187(1): 205-212.

Zhang, Y., J. R. Da Silva, M. Reilly, J. T. Billheimer, G. H. Rothblat and D. J. Rader (2005). "Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo." J Clin Invest 115(10): 2870-2874.

Zhang, Y., I. Zanotti, M. P. Reilly, J. M. Glick, G. H. Rothblat and D. J. Rader (2003). "Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo." Circulation 108(6): 661-663.

Zhao, C. and K. Dahlman-Wright (2010). "Liver X receptor in cholesterol metabolism." J Endocrinol 204(3): 233-240.

Zhao, Y., M. Pennings, C. L. Vrans, L. Calpe-Berdiel, M. Hoekstra, J. K. Kruijt, R. Ottenhoff, R. B. Hildebrand, R. van der Sluis, W. Jessup, W. Le Goff, M. J. Chapman, T. Huby, A. K. Groen, T. J. Van Berkel and M. Van Eck (2011). "Hypocholesterolemia, foam cell accumulation, but no atherosclerosis in mice lacking ABC-transporter A1 and scavenger receptor BI." Atherosclerosis 218(2): 314-322.

Zheng, C., K. Ikewaki, B. W. Walsh and F. M. Sacks (2006). "Metabolism of apoB lipoproteins of intestinal and hepatic origin during constant feeding of small amounts of fat." J Lipid Res 47(8): 1771-1779.

Zhou, J., M. Febbraio, T. Wada, Y. Zhai, R. Kuruba, J. He, J. H. Lee, S. Khadem, S. Ren, S. Li, R. L. Silverstein and W. Xie (2008). "Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPARgamma in promoting steatosis." Gastroenterology 134(2): 556-567.

Agradecimientos

Al finalizar un trabajo tan arduo y lleno de dificultades como el desarrollo de una tesis Doctoral es inevitable que te asalte un muy humano egocentrismo que te lleva a concentrar la mayor parte del mérito en el aporte que has hecho. Sin embargo, el análisis objetivo te muestra inmediatamente que la magnitud de ese aporte hubiese sido imposible sin la participación de personas e instituciones que han facilitado las cosas para que este trabajo llegue a un feliz término.

Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para ser justo y consecuente con ellas, expresándoles mis agradecimientos. Debo agradecer de manera especial y sincera al *Profesor Francisco Blanco Vaca* por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigadora. Las ideas propias, siempre enmarcadas en su orientación y rigurosidad, han sido la clave del buen trabajo que hemos realizado juntos, el cual no se puede concebir sin su siempre oportuna participación. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis. Muchas gracias! Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento al *Dr. Josep Julve* su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis. Debo destacar, por encima de todo, su disponibilidad y paciencia que hizo que nuestras siempre acaloradas discusiones redundaran benéficamente tanto a

nivel científico como personal. No cabe duda que su participación ha enriquecido el trabajo realizado.

Me gustaría agradecer al *Profesor Ricardo Casaroli* por su siempre atenta y efectiva colaboración, durante nuestras colaboraciones.

Entre los Jefes e IP miembros de nuestro grupo de investigación, a pesar que con todos he tenido una excelente relación, debo destacar el caso del *Doctor Jordi Ordoñez, el Doctor Juan Carles Escóla, Jose Luis Sanchez Quesada, Jesús Martín y la Doctora Sonia Benitez*, para quien va un agradecimiento especial. Las veces que sostuvimos discusiones de carácter científico y personal, se vieron claramente compensadas por la calidad de las mismas, altamente enriquecedoras en los dos ámbitos.

Para mis compañeros de grupo, doctorandos/as, posdocs y técnicos tengo sólo palabras de agradecimiento, especialmente por aquellos momentos en los que pude ser inferior a sus expectativas: ha sido un camino largo y duro en el que, algunas veces, la fijación por lograr tus objetivos te hace olvidar la importancia del contacto humano. Sin embargo, como en todas las actividades de la vida, siempre al final hay algunos criterios que te permiten priorizar y es por ello que debo resaltar mis agradecimientos para algunas personas. Quiero expresar mis agradecimientos especiales a *Sheila y Karen*, compañeras siempre generosas y adorables como pocas, que compartieron conocimientos y experiencias de tipo profesional y personal que fueron de gran valor, sus consejos han sido para mi un empujón diario para seguir con mi trabajo de tesis y sobretodo para mirar siempre la vida con una sonrisa, que en cada momento me han sabido regalar. Para el

resto de compañeros: *Núria, David, Andrea, Anabel, Chen, Helena* a todos mis compañeros del Pavelló17 y del Hospital Sant Pau...mil y mil gracias! Gracias también por las pachangas, comidas y cervezas, han sido momentos inolvidables de muchas risas!!!

Quiero recordar también a los estudiantes que realizaron sus proyectos de fin de carrera conmigo como *Valericola*, las chicas de master Sonia, Melanie y Alejandra y todos los chicos/as de practica; Su colaboración y amistad también ha sido importante para que esta tesis llegara a buen puerto. Un gracias especial va para todo el personal del estabulario en particular a Margarita para su ayuda y disponibilidad en el trabajo con mis ratoncitos.

Para aquellos amigos que han compartido conmigo los “ires y venires” en el plano personal durante estos años en mi ciudad adoptiva Barcelona (mi familia en Barcelona). A mis mejores amigos de Napoles, Federica, Kekko y Anto, de quienes siempre he recibido palabras de aliento.

Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido va para mi familia. Sin su apoyo, colaboración e inspiración habría sido imposible llevar a cabo esta dura empresa.

A mis padres, Rosaria y Gerardo, por su ejemplo de lucha y honestidad por el apoyo inmenso que cada día me brindan; a mi hermana Kekka por su tenacidad y superación, por su paciencia, inteligencia y generosidad y por ser un ejemplo de valentía, capacidad y superación...por ellos y para ellos!

Certamente non posso non dare il mio ringraziamento piú profondo e sentito alla mia famiglia. Senza il loro sostegno, collaborazione e ispirazione sarebbe stato impossibile portare a termine questa dura impresa.

Ai miei genitori, Rosaria e Gerardo, per il loro esempio di lotta e onestá e per l' immenso appoggio che ogni giorno mi regalano;

Finalmente, debo agradecer al Instituto Carlos III por haber financiado mis estudios doctorales otorgándome una beca condonable a partir de la convocatoria PFIS del año 2012, y también agradezco a la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) para ofrecerme la posibilidad de conseguir un Master y el Doctorado.

A mis padres

A mi hermana

Nunca dejes de Soñar....

Solo quien sueña aprende a Volar!!!

