

Regulació de l'expressió gènica en monòcits/macròfags per factors pro-aterogènics. Modulació farmacològica

Jordi Pou Sánchez

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Universitat de Barcelona

Facultat de Farmàcia

Departament de Farmacologia i Química Terapèutica

Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia

***“REGULACIÓ DE L’EXPRESSIÓ GÈNICA EN
MONÒCITS/MACRÒFAGS PER FACTORS
PRO-ATEROGÈNICS. MODULACIÓ
FARMACOLÒGICA”***

JORDI POU SÁNCHEZ

2011



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Universitat de Barcelona

Facultat de Farmàcia

Departament de Farmacologia i Química Terapèutica

PROGRAMA DE DOCTORAT: RECERCA, DESENVOLUPAMENT I
CONTROL DE MEDICAMENTS (BIENNI: 2008-10)

***“REGULACIÓ DE L’EXPRESSIÓ GÈNICA EN
MONÒCITS/MACRÒFAGS PER FACTORS
PRO-ATEROGÈNICS. MODULACIÓ
FARMACOLÒGICA”***

Memòria presentada per

Jordi Pou Sánchez,

per a optar al títol de doctor per la Universitat de Barcelona.

La directora,

El doctorand,

Dra. Marta Alegret Jordà

Jordi Pou Sánchez

“REGULACIÓ DE L’EXPRESSIÓ GÈNICA EN MONÒCITS/MACRÒFAGS PER FACTORS PRO- ATEROGÈNICS. MODULACIÓ FARMACOLÒGICA”

Universitat de Barcelona

Facultat de Farmàcia

Departament de Farmacologia i Química Terapèutica

Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia

Memòria presentada per Jordi Pou Sánchez per optar al títol de doctor per la Universitat de Barcelona i dirigida per la Dra. Marta Alegret Jordà, investigadora membre de l’IBUB (Institut de Biomedicina de la UB) i del CIBEROBN (CIBER de Fisiopatologia de l’Obesitat i Nutrició, ISCIII).



Aquesta tesi doctoral s’ha realitzat amb l’ajut d’una “Beca de col·laboració en projectes de recerca” de la Universitat de Barcelona, i els projectes d’investigació PI060247 i PI070875, finançats per l’Institut de Salut Carlos III” (Ministerio de Sanidad y Consumo)

AGRAÏMENTS

En memòria del meu avi

Bé, sembla que arriba el moment de dedicar un temps a la part més personal, que no pas fàcil, de la meva tesi. Ha passat molt de temps des de l'inici d'aquesta aventura, així que crec que toca reflexionar llargament.

En primer lloc, voldria agrair sincerament al Dr. Joan Carles Laguna, i a la Dra. Marta Alegret, el fet d'haver-me donat l'oportunitat d'incorporar-me al seu grup d'investigació primer, per a realitzar el Màster Experimental, on vaig poder tenir el meu primer contacte real amb la ciència, i posteriorment, per allargar la meva formació científica amb la tesi doctoral. Novament, m'agradaria destacar la Dra. Marta Alegret per la seva perfecta direcció des que vaig arribar a la Unitat de Farmacologia. Han estat molts anys de suport, de paciència, de dedicació i de confiança en mi, que finalment han donat el seu fruit. Gràcies, Marta.

Així mateix, vull donar les gràcies als altres membres del meu grup d'investigació, la Dra. Rosa Maria Sánchez i la Dra. Núria Roglans, pel tracte rebut durant tot aquest temps. També a la Dra. Gemma Llaverias, que va ser capaç de fer malabarismes per treure temps, i un carregament de paciència, i ensenyar aquell desastre en potència que va arribar a Farmacologia, poc abans de creuar l'Atlàntic. Per extensió, agrair a la resta de doctors i personal de la Unitat, en especial a la Mar, el Xevi, l'Ester i el Fèlix, per la seva ajuda, consells, i bon humor sempre que ha calgut.

No voldria oblidar-me tampoc del personal del servei de Genòmica del Parc Científic, el Ramon, l'Amaia i l'Agustí, que tantes vegades m'han atès, tantes hores m'han reservat, i tant m'han ajudat amb les PCRs que no volien sortir, sempre amb un somriure. Igualment, gràcies al Jaume, del Servei de Citometria, per ensenyar-me, deixar-me fer, i tanta paciència quan ha estat necessari. I sobre tot, moltíssimes gràcies a la Montse Cofàn i el Dani Closa, de l'Hospital Clínic, per donar-me sempre un cop de mà, per trobar sempre un moment, i per la seva col·laboració desinteressada, que m'ha permès estar avui escrivint aquestes línies.

Està clar, però, que hi ha tanta gent a la que vull donar les gràcies, que em fa por oblidar-me a ningú. I sóc incapaç de no fer-ho de forma una mica més “personal” amb molts d’ells. Des que vaig entrar a aquest laboratori, he tingut moltíssims companys i, afortunadament, molts d’ells s’han convertit en grans amics. Quasi m’atreviria a dir que en una gran família. Hem compartit innumerables hores a poiata, als passadissos de la Unitat, als cafès/dinars del museu i de la sala 3... però també hem passat un bon grapat d’hores en sopars, men’s nights, tardes de birres+kebab+xerrada, sessions de cine, gravacions de vídeos, èxits blaugranes... escapades a Astúries, a Calaceit i Alacón, a l’Ametlla, a Campdevàrol i Montserrat, a Cork... diverses edicions de Villa Aurelios (quant mèrit que continuïis convidant-nos!), concerts a Saragossa... i podria continuar fent una llista que no acabaria l’any que ve.

Per aquest motiu, no puc menys que enrecordar-me d’ells, i demanar perdó a les víctimes de la meva fràgil memòria que no apareguin en les següents línies.

Milions de gràcies a l’Alba, per haver estat durant tants anys al meu costat (física i moralment). Mai una alumna li portava ja d’entrada tant avantatge al mestre abans de començar. Merci per ser com ets, i per fer que els experiments i tot en general fos molt menys feixuc. També la Dra. Laia Vilà, pel seu jovial caràcter, tan alegre com la Heidi. A la Vicky, pel seu companyerisme, bon humor i amistat, fins i tot quan hem hagut de veure’ns dormint en aeroports irlandesos. Que no decaiga la fiesta en Sevilla, mi arma! Al Javier, per haver-se convertit en un gran amic i confessor, aquells temps que vàrem ser veïns i compartir pista de bàsquet. Espero veure’t aviat de tornada. A l’Anna, pel seu positivisme, energia i força interior que ens encomanava a tots. Espero, tot i que estic convençut que així és, que t’acompanyaran durant la teva aventura germana. Al Miguel, doncs encara que no hem coincidit pas gaire a la poiata, sempre transmetes el teu entusiasme, comparteixes un somriure, una paraula amable, una conversa agradable, i molt bon gust pel futbol. També les pobres incautes que van realitzar un treball dirigit sota la meva tutela, i que han contribuït a la meva formació. Merci a l’Olga, la Natàlia i la Lúdia, per la seva dedicació i les ganes que van demostrar.

Fent un canvi de color del blau cap al taronja, també haig de fer un forat als amics de Metabolisme. Així doncs, una menció especial pel Dr. Ricardo Rodríguez (Richy en la intimitat), que va ser qui més em va ajudar quan em sentia perdut en un món de neveres, Revcos, tubs, pipetes i expressions gèniques. T'has convertit en un gran amic, i en un mirall per a qualsevol científic. Espero que tinguis la sort que et mereixes, i que la teva carrera sigui una maratón sense fi. Gràcies al ProtoDr. David Álvarez, perquè tot i ser el Rei Mides del Caos, ha estat capaç d'harmonitzar la nostra estada al museu durant tants mesos, i s'ha convertit en un gran amic amb qui compartir qualsevol moment (bo i dolent) de la vida professional i personal, és a dir, la vida en general. Ets un *crack*, David, i molt aviat seràs un Dr. *crack*. Per associació d'idees, moltes gràcies a la Núria Leyes, perquè tot i la seva tímidesa, el temps m'ha permès conèixer millor una bellíssima persona. Moltes gràcies també a la Dra. Emma Barroso, a qui el doctorat m'ha ofert l'oportunitat de conèixer molt millor (una gran sort!). Qui ens ho hagués dit, quan compartíem el famós T2 de Biologia fa més de 10 anys, i eres la xunga de Sant Martí... Novament per extensió, merci a l'Albert Almagro, un altre membre il·lustre del T2, grans moments compartits en el passat, i espero que també en el futur. A la Lucía, la gemela angelical, quin mèrit té que encara continuïs aguantant-me, em facis els mimos de sempre, i siguis igual d'alegre, després de tant de temps. A la Dra. Teresa Coll (Trisa) i a l'Eva, les millors ambaixadores que Olot podria tenir. Sempre amb un somriure o un comentari perspicaç, i un "bon rollo" més que contagiós. Gràcies per la vostra amistat. A la Laia S., la noia que sempre riu, encara que sembli que alhora plora... moltes mercès per ser l'antídoto de la tristesa, amb només xerrar tres paraules. Al Gerard, per ser el tio més trempat de tot l'Organyà. A la Saray, pel seu sentit de l'humor, ándele!

Ara tocaria un altre salt, cap al groc, cap als amics de Neuro. A la Dra. Marta Tajés (Marty en l'espai-temps), perquè tot i que ja ens coneixíem abans d'arribar jo a aquest laboratori, només aquí he pogut valorar que ets la persona més bona que conec, i que el fet de ser amic teu ja em fa millor persona. No cabrien les gràcies que t'haig de donar ni en 5 memòries de tesi. Al Dr. Javier García, l'*alter ego* del Pizarro. I a la quasi Dra. Loli Molina, el seu complement perfecte. Qui m'ho diria, que aquell tio que jugava a futbol com un macarra

seria un tros de pa, un tros de científic, i una persona i un amic tan excel·lent. Estic convençut que tu i la Loli tindreu l'èxit que us mereixeu, allà a la France. Al Dr. Dani Alvira, el nen etern. Per molt que vulguis assemblar-te a un actor venedor de càpsules de cafè, no hi ha color. Ni en quatre reencarnacions arribaria ell a ser la meitat de gran que tu. Merci, simplement, per existir. Desitjo que tinguis la sort que et mereixes. A l'Aureli, un autèntic *gentleman* a qui encara estic intentant trobar-li un defecte... Potser ser massa bo? Moltes gràcies per la teva hospitalitat, generositat, i sobretot, amistat. Al Sergi, el *runner* de Calaceit. Un exemple de disciplina, sentit de l'humor, i companyerisme, sempre amb la maquinària *on fire*. No canviïs mai, nano. A la Luisa, el somriure de Portugal, sempre disposada a donar un cop de mà desinteressat. *Muito o'brigado*. Al David P.C., per tenir aquests cops amagats que tants farts de riure ens provoquen, en les sobretauls, i que contribueixen al bon ambient. Al Dr. Marc Yeste, per demostrar que la ciència, el hockey d'èlit, i el ser un bon col·lega, són perfectament compatibles. A la Bea Garcia i l'Eujin, que quan ens veiem és com una injecció de positivisme. A la Bea Trèmols, que quan ens veiem és un tornado de riure i una recàrrega d'energia. A la Dra. Marta Barenys, la "niña gigante", per ser capaç de travessar la distància entre finestres i arribar a ser una més del nostre grup. A la Katerina, el Paolo, l'Ilario i la Doris, per portar-nos i compartir amb nosaltres el millor de Grècia, Itàlia i Mèxic: la seva amistat. A la Laura, per ser una amiga amb la que no cal amagar-se res, per ser capaç de provocar-te un *reset* absolut dels teus maldecaps, simplement, per ser com ets. Moltes gràcies.

I ara arriba el moment de pensar en verd: els amics d'Amfetes. Agrair a la Dra. Sara Garcia la seva contagiosa innocència, el seu bon humor i el seu famós riure 3G (je-je-je). Molta sort i felicitats pel recent grau, doctora Sare. A la Sònia, la més esgarrapaespones d'Alcarràs. Qui la segueix l'aconsegueix, i per això tu també seràs doctora. Moltes gràcies per ser tan bona amiga i persona, i per fer que qualsevol que està al teu costat rigui encara que no vulgui. A l'Angela, perquè no sóc capaç de recordar un moment que no portis un somriure, per ser un sortidor de bondat, d'energia positiva i, sobretot, de pensament positiu. Al Dr. Carlos Chipana (Chipi), per sempre trobar un tema de conversa divertit, i pels partits del Barça compartits. A la Clara, perquè darrera

d'aquell aspecte de noia dura, sempre s'amagava algun comentari mordaç i una bona amiga. Al Lucas i l'Arís, per trencar estereotips alemanys i grecs, haver-se integrat com ho van fer en tan poc temps, i fer pinya amb tothom. A la Rut, per tenir sempre una estoneta per un piti, i la seva habilitat per animar quan les coses es veien magres.

Per suposat, vull fer extensius els meus agraïments al grup de Farmacognòsia. Espero que ben aviat tinguem dos nous doctors entre nosaltres. Gràcies Renato, per ser “nuestro Comandante”, un discurs incansable i un bon humor infranquejable. Gràcies Hadi, per rebre'ns en les nostres visites nocturnes a la farmàcia, i per demostrar què signifiquen realment la força de voluntat i la perseverància. I gràcies també Simona, Blanca, Carol i Enric, per les xerrades mentre dinem en taules enfrontades.

I és clar, de portes de la Facultat enfora hi ha una bona llista de gent a la que es deu, en bona part, que aquesta tesi hagi pogut finalitzar-se. Assumint el risc d'escriure els agraïments més llargs de la història moderna, trobo necessari el reconeixement per a tots ells.

No hi ha prou agraïment per a aquest grup de biòlegs que anomenem “Interjol”, i que vaig tenir la sort de compartir laboratori amb algun dels seus membres. Gràcies al Dr. Javi Gutiérrez (sempre seràs el Bufal), al Toño, a l'Abris, al Marín, al quasi Dr. Xurxo Fernández (quina setmana!), i a l'Àlex. Només vosaltres sou capaços de fer de les penes alegries d'aquesta manera, amb un humor absurd, però sobretot amb superàvit del primer: humor. Sou els més grans. Un record també per dos biòlegs molt singulars, el Dr. Pere Picart, i el Dr. Juan García. Us heu buscat les garrofes creuant les fronteres, però sempre que ens juntem és com si s'hagués aturat el temps. Gràcies.

També em quedaria curt a l'hora de tornar tot el que m'han aportat els meus amics de Sant Andreu. Bàsicament, sóc així gràcies (o per culpa) a vosaltres. Tants anys junts de convivència fan que no calgui parlar per saber com estem cadascun de nosaltres, tot i que sempre esteu quan es necessita fer-ho. Ara estem desperdigats i ens reunim menys del que voldríem, però no

té preu el veure'ns, des que tinc memòria. Moltíssimes gràcies al Diego i l'Irene, al Moski i l'Esther, al Manel i la Dalia, al Dani i la Cristina, al Raúl, al Mers, a l'Arti, al Javi, al David i l'Eva, i al Suter i la Carol, per tots aquests anys.

Un altre grup de gent que es mereixen unes línies són els meus amics del Prat. Sé lo complicat que és ser reconegut com a pratenc honorífic, i per això és un orgull poder-vos agrair tots els bons moments que he compartit amb vosaltres. Bé sigui una ruta de quintos, bé sigui veient per desena vegada "El Sargento de Hierro", bé sigui en un taulell de BB, sempre em feu riure i passar una estona inoblidable. Sou uns *cracks*.

I també voldria reservar un forat per als meus amics de la UPC, els que podria ajuntar en el que antigament anomenàvem "El Concilio". Cada cop quedem menys, i us veig amb menys freqüència del que m'agradaria, però vosaltres també heu posat una pedra en el camí, i per això us ho agraeixo sincerament.

Per últim, com no, vull donar les gràcies a la meva família. Per tot. Perquè simplement és mèrit seu el que avui sigui aquí. Gràcies als meus pares, per la seva col·laboració, per respectar les meves decisions, per motivar-me a continuar endavant quan m'atacaven els dubtes, per la confiança que sempre han dipositat en mi, i, bàsicament, per estimar-me i cuidar-me de forma incondicional. Gràcies al meu oncle, pel seu ajut, els seus consells, per ser un mirall. A la meva àvia, a la meva tieta, i a ma cosina, per ser com són, i per com m'estimen. Al meu avi. Perquè sé que t'hauria agradat saber que al final he aconseguit acabar el doctorat . Tant de bo ho haguessis pogut veure.

En conseqüència, com a conclusió de tota aquesta parrafada, i com a concepte o *leitmotiv* del que m'agradaria expressar, crec que una paraula ho pot resumir... en llenguatge científic, una *keyword*: **GRÀCIES.**

Si la fortuna d'una persona es mesurés per la qualitat dels seus amics, seria l'home més ric de l'univers.

INDEX

| | |
|---|----|
| INDEX..... | 1 |
| ABREVIACIONS..... | 5 |
| INTRODUCCIÓ..... | 9 |
| 1. ATEROSCLEROSI..... | 11 |
| 2. INFLAMACIÓ I ATEROSCLEROSI..... | 14 |
| 3. FACTORS DE RISC CARDIOVASCULAR..... | 15 |
| 3.1. Hiperlipèmies..... | 16 |
| 3.2. VIH, tractament antiretroviral i aterosclerosi..... | 22 |
| 4. MONÒCITS I MACRÒFAGS: PAPER EN EL DESENVOLUPAMENT D'ATEROSCLEROSI..... | 27 |
| 4.1. Reclutament de monòcits..... | 27 |
| 4.2. Macròfag: Inflamació i immunitat..... | 30 |
| 4.3. Receptors <i>scavenger</i> . Càrrega-eflux de colesterol..... | 34 |
| 4.4. Evolució de la lesió. Estabilitat de la placa..... | 38 |
| 5. FÀRMACS UTILITZATS EN EL TRACTAMENT DE LES HIPERLIPÈMIES. ESTATINES..... | 40 |
| 6. INTERLEUCINA-1. RECEPTORS I SENYALITZACIÓ..... | 44 |
| 6.1. IL1-R1..... | 46 |
| 6.2. IL-1R2..... | 49 |
| 7. DEGRADACIÓ DE LA MÀTRIU EXTRACEL·LULAR I PAPER DE TFPI-2..... | 51 |
| OBJECTIUS..... | 61 |
| RESULTATS..... | 63 |
| I. Ritonavir Increases CD36, ABCA1 and CYP27 Expression in THP-1 macrophages..... | 65 |
| II. Monocyte gene-expression profile in men with familial combined hyperlipidemia and its modification by atorvastatin treatment..... | 81 |

| | |
|--|-----|
| III. Tissue factor pathway inhibitor 2 is induced by thrombin in human macrophages..... | 105 |
| IV. Type II Interleukin-1 receptor expression is reduced in monocytes/macrophages and atherosclerotic lesions..... | 117 |
| DISCUSSIÓ..... | 149 |
| CONCLUSIONS..... | 167 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 171 |

ABREVIACIONES

| | |
|--------------------------------|---|
| ABCA1 | <i>ATP binding cassette transporter A1</i> |
| ABCG1 | <i>ATP binding cassette transporter G1</i> |
| acLDL | LDL acetilada |
| AGL | Àcids grassos lliures |
| AMPc | AMP cíclic |
| AP-1 | <i>Activator protein 1</i> |
| ApoA | Apolipoproteïna A |
| ApoB | Apolipoproteïna B |
| ApoE | Apolipoproteïna E |
| ATV | Atorvastatina |
| CAM | Molècules d'adhessió cel·lular |
| CCL2 | <i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i> |
| CD36 | <i>Cluster of Differentiation 36</i> |
| CE | Cèl·lula endotelial |
| cHDL | Colesterol associat a HDL |
| cLDL | Colesterol associat a LDL |
| CML | Cèl·lula muscular llisa |
| COX-2 | Ciclooxigenasa 2 |
| CYP27 | Esterol 27-hidroxilasa |
| ERK | <i>Extracellular signal-regulated kinases</i> |
| EGFR | Receptor del factor de creixement epidèrmic |
| G-CSF | <i>Granulocyte colony-stimulating factor</i> |
| GM-CSF | <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> |
| GLUT4 | Transportador de glucosa de tipus 4 |
| HDL | Lipoproteïna d'alta densitat |
| HFC | Hiperlipèmia familiar combinada |
| HMGCoA | <i>3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA</i> |
| HNF4α | <i>Hepatocyte nuclear factor 4 alpha</i> |
| ICAM-1 | <i>Inter-Cellular Adhesion Molecule 1</i> |
| IFNγ | Interferó gamma |
| Ig | Immunoglobulina |
| IκB | Proteïna inhibidora de kappa B |
| IKK | Cinasa d'I κ B |
| IL | Interleucina |
| IL-1 | Interleucina-1 |
| IL-1R/TLR | Família de receptors d'Interleucina-1/ <i>toll-like</i> |

| | |
|-----------------|--|
| IL-1R1 | Receptor de tipus 1 d'interleucina 1 |
| IL-1R2 | Receptor de tipus 2 d'interleucina 1 |
| IL-1Ra | Antagonista del receptor d'interleucina 1 |
| IL-1RAcP | Proteïna accessòria del receptor d'interleucina 1 |
| IL-6 | Interleucina-6 |
| IP | Inhibidors de proteases |
| IRAK | <i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i> |
| JNK | Jun N-terminal cinasa |
| KDa | Kilodalton |
| LDL | Lipoproteïna de baixa densitat |
| LDLR | Receptor de lipoproteïnes de baixa densitat |
| LOX-1 | <i>Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1</i> |
| Lp a | Lipoproteïna A |
| LPL | Lipoproteïna lipasa |
| LPS | Lipopolisacàrid |
| LXR | <i>Liver X receptor</i> |
| MAPK | <i>Mitogen-activated protein kinase</i> |
| MCP-1 | <i>Monocyte chemotactic protein-1</i> |
| M-CSF | <i>Macrophage colony-stimulating factor</i> |
| MCV | Malaltia cardiovascular |
| MEC | Matriu extracel·lular |
| MEK1/2 | <i>MAPK/ERK kinases 1 and 2</i> |
| mg | Mil·ligram |
| µg | Microgram |
| MKK | <i>MAP kinase kinase</i> |
| ml | Mil·lilitre |
| mmLDL | LDL mínimament modificada |
| MMP | Metal·loproteases de matriu |
| mRNA | RNA missatger |
| MyD88 | <i>Myeloid differentiation primary response gene (88)</i> |
| NF-κB | Factor nuclear kappa B |
| oxLDL | LDL oxidada |
| p38 | <i>p38 MAP Kinase</i> |
| PCR | Proteïna C Reactiva |
| PKC | Proteïna cinasa C |
| PP5 | <i>Placental protein 5</i> |

| | |
|--------------------------------|---|
| PPAR | Receptor activat per proliferadors peroxisòmics |
| proMMP | Prometal·loproteases de matriu |
| QM | Quilomicró |
| RNA | Àcid ribonucleic |
| sdLDL | LDL petites i denses |
| SIDA | Síndrome d'immunodeficiència adquirida |
| SR | Receptor scavenger |
| SR-A | Receptor scavenger A |
| SR-BI | Receptor scavenger B 1 |
| SREBP | <i>Sterol regulatory element-binding protein</i> |
| TAK1 | <i>Transforming growth factor-beta activated kinase-1</i> |
| TARGA | Teràpia antiretroviral de gran activitat |
| TCF7L2 | <i>Transcription factor 7-like 2</i> |
| TFPI-2 | <i>Tissue factor pathway inhibitor 2</i> |
| TG | Triglicèrid |
| TGF-β | <i>Transforming growth factor-beta</i> |
| THP-1 | <i>Human acute monocytic leukemia cell line</i> |
| TIMP | <i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i> |
| TIR | <i>Toll/Interleukin-1 receptor</i> |
| TLR | <i>Toll-like receptor</i> |
| TNF-α | <i>Tumor necrosis factor-alpha</i> |
| TRAF6 | <i>TNF receptor associated factor 6</i> |
| USF1 | <i>Upstream stimulatory factor 1</i> |
| VIH | Virus de la immunodeficiència humana |
| VLDL | Lipoproteïna de molt baixa densitat |

I. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

1. Aterosclerosi.

L'aterosclerosi pot ésser considerada una malaltia inflamatòria crònica, i també un trastorn patològic del metabolisme lipídic. Afecta les grans artèries (coronàries, aorta, caròtides, cerebrals), artèries de mida mitjana, fins i tot perifèriques. Es caracteritza per l'eixamplament i pèrdua d'elasticitat de la paret d'aquests vasos, degut a la formació de les anomenades plaques d'ateroma (Figura 1). Aquestes plaques es desenvolupen en l'espai subendotelial, i consisteixen en una estructura ben definida de lípids, teixit fibrós calcificat i un nucli necròtic en el qual es troben cèl·lules musculars llises (CML), cèl·lules endotelials (CE), cèl·lules del sistema immune, i cèl·lules escumoses (macròfags i CML carregats de lípids) [Lusis, 2000; Badimon, 2003].

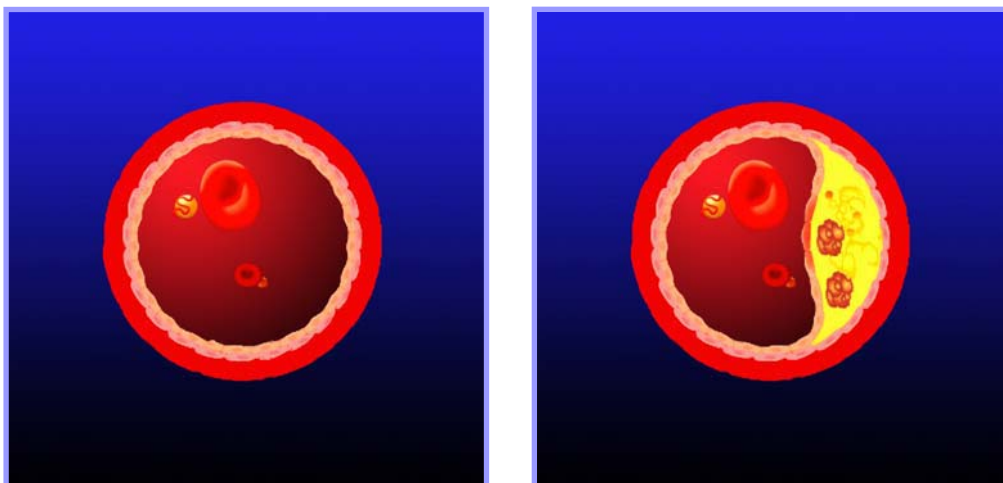


Figura 1. L'aterosclerosi es caracteritza pel progressiu desenvolupament d'una lesió als grans vasos, fet que donarà lloc a la formació de la placa d'ateroma (figura extreta del *Handbook of dyslipidemia and atherosclerosis*, de Jean-Charles Fruchart. Institut Pasteur de Lille, Universitat de Lille II).

La formació de la lesió ateroscleròtica és un procés molt complex, en el qual intervenen l'endoteli vascular, lipoproteïnes modificades, cèl·lules d'origen sanguini com els monòcits/macròfags i limfòcits T, CML, i una extensa xarxa de factors de creixement i citocines que interactuen en aquests tipus cel·lulars [Ross, 1999; Hansson i col., 2005]. La inflamació té un paper clau en l'inici, progressió i complicacions clíniques associades amb aquesta patologia.

L'evolució de les lesions pot arribar a provocar l'oclusió de la llum del vas. Aquesta oclusió pot produir-se pel propi creixement de la lesió, o per complicacions de tipus trombòtic (Figura 2).

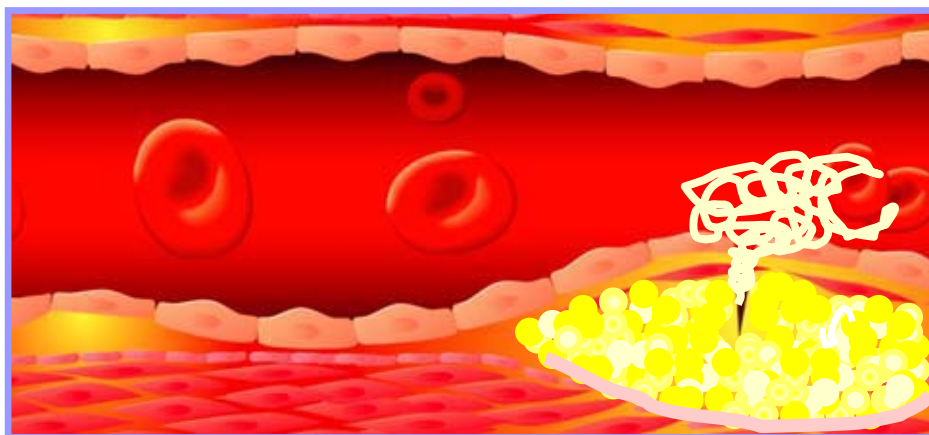


Figura 2. La paret arterial pateix una lesió, que és el primer pas en el desenvolupament de l'aterosclerosi. A mida que la patologia avança, un dipòsit de material lipídic i diferents tipus cel·lulars necròtics s'acumulen en l'espai subendotelial, formant la lesió. En fases tardanes, aquesta lesió pot arribar a obturar el vas, o bé originar complicacions cardiovasculars per ruptura o desprendiment de la placa, i pot provocar trombes (figura extreta del *Handbook of dyslipidemia and atherosclerosis*, de Jean-Charles Fruchart. Institut Pasteur de Lille, Universitat de Lille II).

L'estabilitat de la placa depèn de la seva coberta fibrosa, que està formada fonamentalment per proteïnes de la matriu extracel·lular (MEC), com ara fibres de col·lagen i proteoglicans sintetitzats per les CML. Les plaques que són més inestables presenten un gran nucli lipídic envoltat per una coberta fibrosa prima [Badimon i col., 2003]. El nucli lipídic es compon de macròfags i de CML carregats de lípids (anomenats cèl·lules escumoses) així com també de material lipídic extracel·lular que prové de la retenció de les lipoproteïnes circulants i dels lípids alliberats per les cèl·lules necròtiques [Nakashima i col., 2007]. Les plaques més complexes poden arribar a presentar calcificació, ulceració en la superfície luminal, i hemorràgia dels petits vasos que creixen en la lesió procedents de la capa mitja del vas sanguini. Finalment, la ruptura o ulceració de les plaques inestables genera l'exposició de superfícies

procoagulants i protrombòtiques, que acaben provocant l'activació de les plaquetes, i en última instància, poden portar a complicacions de tipus trombòtic després de la ruptura de la placa. D'aquesta manera, pot donar lloc a l'aparició de manifestacions clíniques com són la malaltia isquèmica cardíaca, o els accidents vasculars cerebrals [Martínez-González i col., 2001].

Aquestes manifestacions derivades de l'aterosclerosi representen la principal causa de mort en els països industrialitzats [Murray i col., 1997; Marrugat i col., 2001; Lopez i col., 2006; Mangas i col., 2007]. S'ha calculat que l'any 2020 l'aterosclerosi serà la primera causa de mortalitat a tot el món. A això contribuiran de manera determinant dos factors que faciliten el seu desenvolupament: d'una banda, el progressiu envelliment de la població mundial i, d'altra banda, la incorporació dels hàbits de vida occidentals (principalment, l'alimentació excessivament rica en greixos i calories, el sedentarisme i l'estrès) al tercer món.

La malaltia ateroscleròtica es considera un procés multifactorial del qual es coneixen un elevat nombre de factors que predisposen, d'una o altra manera, al seu desenvolupament. Entre ells, destaquen les hipercolesterolèmies i altres dislipèmies. Concretament, s'ha establert una relació causal entre nivells elevats de colesterol plasmàtic i la cardiopatia isquèmica, i diversos estudis clínics han confirmat que la reducció dels nivells plasmàtics de colesterol disminueix de manera significativa la morbiditat i mortalitat associada a la malaltia cardíaca coronària en pacients hipercolesterolèmics [Scandinavian simvastatin Survival Study, 1994; Shepherd i col., 1995; Gould i col., 1998; Aronow i col., 2001; Matsuzaki i col., 2002; Yonemura i col., 2005].

Altres factors associats amb la gènesi de l'aterosclerosi i la disfunció de l'endoteli són l'augment de la homocisteïna plasmàtica, la diabetis mellitus, l'obesitat, el sedentarisme i infeccions per microorganismes com *Chlamydia pneumoniae* o *Helicobacter pylori* [Ross R., 1999]. En qualsevol cas, tots aquests factors promouen el desenvolupament d'aterosclerosi quan es donen en una persona amb predisposició genètica per a la malaltia. Avui en dia es coneixen diverses alteracions genètiques que propicien l'aterosclerosi,

principalment les que afecten el metabolisme lipídic. La identificació d'aquests factors genètics pot ajudar a aprofundir en el coneixement dels mecanismes de formació de la lesió, i en conseqüència proporcionar noves estratègies de prevenció, tractament i diagnosi de la patologia [Allayee i col., 2003].

2. Inflamació i aterosclerosi.

Com ja s'ha comentat, la inflamació és un dels factors clau en el desenvolupament de l'aterosclerosi. En l'actualitat, s'ha demostrat l'existència d'una correlació entre complicacions cardiovasculars amb pronòstic desfavorable i evidències clíniques d'inflamació [Berg i col., 2009; Elkind, 2009].

Als darrers anys, s'ha postulat el que es coneix com a "*hipòtesi inflamatòria*", que contribuiria conjuntament amb la "*hipòtesi lipídica*" (predisposició genètica i dieta rica en lípids) i la que es coneix com a "*resposta a la lesió*", a modificar el microambient de la paret arterial [Yeh, 2004]. D'aquesta manera, estímuls inflamatoris locals, com ara lipoproteïnes oxidades, o també un procés infecciós, podrien modificar l'entorn del vas sanguini i provocar la producció de quimiocines i molècules d'adhesió [Yeh i col., 2001]. En conseqüència, les cèl·lules mononuclears circulants podrien interaccionar amb molècules d'adhesió expressades per les CML i iniciar així el seu reclutament i migració a les capes inferiors on s'iniciaria la formació de la lesió ateroscleròtica.

Els processos inflamatoris que cursen amb l'aterosclerosi tenen certa similitud amb els que acompanyen l'artritis reumatoide, una malaltia de tipus autoimmune que provoca una inflamació crònica de les articulacions [Full i col., 2009]. En ambdós processos es produeix activació de monòcits, de limfòcits T i B, i de cèl·lules endotelials, així com increment en els nivells de la proteïna C reactiva (PCR), una proteïna plasmàtica de fase aguda els nivells de la qual augmenten en resposta a una reacció de tipus inflamatori [Pemberton i col., 2009]. Altres paràmetres comuns entre ambdues malalties són una expressió elevada de metal·loproteases de matriu (MMPs), una elevació dels nivells de

citocines com el factor de necrosi tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL)-1 i IL-6, de molècules d'adhesió i d'endotelina, així com la presència de marcadors d'activació de limfòcits T i mastòcits, i de neoangiogènesi [Pasceri i col., 1999; Wallberg-Jonsson i col., 2004].

Molts processos que participen en el progrés de la lesió ateroscleròtica, des de les primeres fases de la aterogènesi fins a les fases avançades de la patologia, com pot ser la ruptura de les lesions inestables, es troben regulats per components del sistema immune, tant innat com adaptatiu [Hansson i col., 2002]. Algunes d'aquestes molècules que participen en la resposta inflamatòria, i estan relacionades amb el desenvolupament de l'aterosclerosi en totes les seves etapes són els TLRs (*toll like receptors*), els leucotriens (LT), i diverses citocines com ara el TNF- α , les IL i els interferons (IFN). Aquests mediadors inflamatoris produïts per diversos tipus cel·lulars presents a la lesió, intervien d'una o altra manera en l'inici, progressió, i desenvolupament de l'aterosclerosi. En conseqüència, resulta de gran interès l'estudi de les possibles vies implicades en els processos inflamatoris que conflueixen amb la malaltia, ja que constitueixen un possible punt d'actuació per modular i/o prevenir el desenvolupament d'aterosclerosi.

3. Factors de risc cardiovascular.

Els factors de risc per a la malaltia cardiovascular han estat identificats mitjançant llargs estudis prospectius, en diferents països [Keys i col., 1984; Wilson i col., 1998; Jousilathi i col., 1999; Doria i col., 2003; Gray i col., 2010]. La majoria d'aquests factors poden ser modificats, tractats o controlats (dislipèmia, hipertensió arterial, tabaquisme, diabetis mellitus, obesitat o sedentarisme), tot i que hi ha alguns factors de risc que no són modificables (factores de risc hereditaris, sexe, edat ...) [O'Donnell i Elosua, 2008].

No obstant això, hi ha una gran proporció d'episodis cardiovasculars que cursen en individus que no presenten aquests factors de risc establerts. Per aquesta raó, en els darrers anys s'ha proposat un gran nombre de factors de risc com predicció de l'aterosclerosi i de les seves complicacions. Entre ells destaquen la PCR, la lipoproteïna A [Lp (a)], el fibrinogen o la homocisteïna [Mangoni i col., 2002; Fruchart i col., 2004; Fujii i col., 2006; Tascilar i col., 2009; Gómez i col., 2009], així com la infecció pel virus de la immunodeficiència humana (VIH), i l'ús de determinats fàrmacs per al tractament d'aquesta malaltia, entre els quals destaquen els inhibidors de proteases [Masiá-Canuto i col., 2006; Hernández i col., 2009]. Aquests, conjuntament amb els factors de risc convencionals comentats anteriorment, s'utilitzen en la pràctica clínica amb l'objectiu d'identificar pacients amb un elevat risc cardiovascular i que necessiten prevenció primària.

A continuació, ens centrarem en aquells factors de risc cardiovascular que presenten una major relació amb els estudis i el treball realitzats en la present tesi doctoral.

3.1. Hiperlipèmies.

Les hiperlipèmies són un grup d'alteracions del metabolisme dels lípids que es caracteritzen per donar lloc a l'augment d'una o diverses fraccions lipídiques a la sang. Els dos tipus més importants de lípids circulants són els triglicèrids (TG) i el colesterol. Ambdós circulen en sang units a unes partícules proteiques formant les lipoproteïnes, que es classifiquen segons la seva densitat en quilomicrons (QM), lipoproteïnes de molt baixa densitat (*very-low density lipoprotein*, VLDL), lipoproteïnes de baixa densitat (*low density lipoprotein*, LDL) i lipoproteïnes d'alta densitat (*high density lipoprotein*, HDL).

El seu origen prové de l'alimentació i de la síntesi per part del fetge. TG i colesterol compleixen diferents missions fisiològiques en l'organisme,

principalment de tipus estructural i energètic, però quan la seva producció és excessiva o el seu metabolisme és deficient, la conseqüent acumulació pot constituir un important factor de risc per al desenvolupament d'aterosclerosi [Chapman i col., 2001].

La concentració plasmàtica d'aquests lípids és el resultat de complexes interaccions entre gens, metabolisme i ambient. En el cas de les hiperlipèmies familiars, predomina l'efecte dels gens per sobre dels factors ambientals [Alonso i col., 2002]. Les hiperlipèmies familiars o de base genètica són un conjunt de trastorns que es caracteritzen per unes elevades concentracions de colesterol i/o TG, així com de les fraccions lipoproteiques que els transporten, la presència de dipòsits variables de colesterol en els teixits extravasculars, conjuntament amb una marcada agregació familiar i un elevat risc de desenvolupar una malaltia cardiovascular de forma prematura de causa ateroscleròtica [Alonso i col., 2002; Hopkins i col., 2003].

L'expressió fenotípica de les hiperlipèmies familiars és variable. Es distingeixen diferents formes, les quals es poden englobar en tres grups que inclouen els diversos fenotips definits fa dècades per Fredrickson, [Fredrickson, 1970]:

- a) les que cursen amb hipercolesterolèmia pura, sense alteració d'altres paràmetres lipídics (fenotip IIa): Apo-B defectuosa familiar, hipercolesterolèmia familiar i hipercolesterolèmia poligènica.
- b) les que es presenten com hiperlipèmies mixtes o combinades, amb elevació del colesterol total i de TG, donant lloc a fenotips IIb, III o V: hiperlipèmia familiar combinada, disbetalipoproteinèmia familiar o hiperlipèmia mixta primària.
- c) Hipertrigliceridèmia pura (fenotip I o IV, depenent de la presència de QM).

La hiperlipèmia familiar combinada (HFC) és la hiperlipèmia genètica més freqüent, ja que arriba a afectar un 1-3% de la població general, fins i tot

alguns estudis poblacionals han mostrat una prevalença més elevada, al voltant del 5,7% [Hopkins i col., 2003; Gaddi i col., 2007]. Aquesta malaltia acostuma a derivar en aterosclerosi i altres malalties cardiovasculars que apareixen de forma prematura: aproximadament un 20% dels pacients de mitjana edat que han sobreviscut a un infart de miocardi estan afectats per la HFC, i en pacients menors de 40 anys aquest percentatge arriba fins gairebé un 40% [Lusis i col., 2004; Wiesbauer i col., 2009]. La HFC s'associa amb un risc 5 vegades més gran de patir infart de miocardi en pacients menors de 60 anys, i és present en un 30-50% dels familiars dels pacients amb malaltia coronària prematura [Williams i col., 1988; Veerkamp i col., 2004].

El perfil lipídic de la HFC es caracteritza per hipercolesterolèmia i/o hipertrigliceridèmia, nivells elevats de apolipoproteïna B (ApoB) i de colesterol associat a LDL, així com la presència de LDL petites i denses (sdLDL) [Shoulders i col., 2004]. Bàsicament, l'anomalia metabòlica predominant en molts dels individus afectats és una sobreproducció de VLDL, possiblement conseqüència d'alteracions en el metabolisme d'àcids grassos lliures (AGL) [Meijssen i col., 2000]. A més, la HFC també s'associa amb la diabetis mellitus, la hipertensió arterial, l'obesitat abdominal i la resistència a la insulina, presentant així diverses característiques de la Síndrome Metabòlica, fet que podria indicar un possible solapament etiològic entre les dues malalties [Shoulders i col., 2004; Martínez-Hervás i col., 2006].

La HFC promou un fenotip proinflamatori en els grans vasos, particularment les artèries, que pot contribuir a la situació patològica. S'ha establert que els limfòcits T poden ser el primer tipus cel·lular activat per una situació d'hipercolesterolèmia, en un procés en el qual participaria el sistema immune [Stokes, 2006]. La hipercolesterolèmia potencia l'expressió de citocines per part de les cèl·lules properes a la paret arterial. Aquestes citocines actuen com a molècules atraients per als monòcits i limfòcits T, que a l'activar-se poden contribuir al desenvolupament de l'aterosclerosi [Murphy i col., 2002].

La HFC presenta una expressió lipídica molt variable i en ocasions depèn de la interacció amb factors ambientals (especialment dieta i sobrepès).

Degut al problema de no existir un marcador genètic per al seu diagnòstic, es requereix un criteri de diagnòstic homogeni i/o un criteri d'exclusió, com els descrits a continuació [Zambón y col., 1999]:

Diagnòstic de membre afectat

- ApoB > 130 mg/dl.
- Colesterol LDL > 150 mg/dl.
- Triglicèrids entre 200-500 mg/dl.
- Transmissió monogènica d'hiperlipèmia.
- Historial familiar de malaltia cardiovascular prematura.

Exclusió

- Hipotiroidisme no controlat.
- Presència de nens hipercolesterolèmics a la família.
- Presència del genotip apoE 2/2.
- Consum d'alcohol > 40 g/dia.

Des de fa temps s'intenta localitzar un gen responsable de la malaltia, ja que en els primers estudis i en la majoria de treballs posteriors, aproximadament el 50% dels familiars de primer grau d'aquests pacients tenia concentracions de colesterol o triglicèrids superiors al percentil 90, la qual cosa feia suposar una herència autosòmica dominant. No obstant, el reanàlisi de les primeres sèries de famílies estudiades i els estudis posteriors han exclòs que la malaltia sigui de naturalesa monogènica, i encara no s'ha pogut establir la seva base genètica, tot i haver estudiat múltiples gens.

Diversos grups han intentat trobar els gens causants de la malaltia. Inicialment el gen de l'apo B, en el cromosoma 2, semblava ser el principal candidat, donada la sobreproducció de VLDL, l'elevació de les concentracions d'apo B i les sdLDL característiques d'aquests pacients, però no es van assolir resultats concloents [Austin i col., 1991; LaBelle i col., 1991]. També es va

pensar en el gen de la lipoproteïna lipasa (LPL), localitzat en el cromosoma 8, després que es descrivís un defecte funcional de la LPL en un grup de subjectes amb HFC. S'han descrit més de 50 mutacions associades a aquest gen i cap d'aquestes és present en la majoria dels subjectes afectats [de Bruin i col., 1996; Hölzl i col., 2000; Suviolahti i col., 2006; López-Ruiz i col., 2009].

Alguns estudis han suggerit la participació d'un gen en el cromosoma 1, ja que s'ha descrit en una població fina una alteració en aquest cromosoma que s'associa amb sobreproducció de VLDL, i també dels nivells d'apoB [Pajukanta i col., 2001; Allayee i col., 2002]. A més, dos escanejos complets amb múltiples marcadors van identificar un lligament positiu entre la HFC i la regió 1q21-23 del cromosoma 1. Aquesta observació ha estat confirmada en famílies nord-americanes, xineses, alemanyes, fineses i mexicanes [Pei i col., 2000; Huertas-Vázquez i col., 2004; Aguilar-Salinas i col., 2010]. En conseqüència, diversos gens continguts en aquesta regió han estat estudiats com a candidats per a intentar explicar les associacions anteriorment descrites. Un gen anomenat *Hylip1*, contingut a una regió de ratolí ortòloga al *locus* 1q21-23 de l'humà és causa d'hiperlipèmia mixta. Però el corresponent gen humà (TXNIP) ha estat seqüenciat en casos d'HFC sense que s'hagin observat defectes en ell [Coon i col., 2004]. Les evidències són més sòlides per al gen USF1 (*upstream transcription factor 1*), situat a 1.5 Mb de distància. El producte del gen USF1 és un factor de transcripció, modulador de la resposta immune, del metabolisme dels lípids i dels carbohidrats, i en l'actualitat es considera aquest gen com el que més susceptibilitat presenta per a la HFC [Pajukanta i col., 2004; Lee i col., 2006; Wierbizcki i col., 2008; Plaisier i col., 2009]. També va ser descrita en famílies canadenques afectades d'HFC i diabetis tipus 2 una alteració en aquest cromosoma que sembla ser juga un paper en la insulinoresistència associada a la HFC [Schäffler i col., 1999].

Una altra possible causa s'ha associat amb una alteració en el cromosoma 11 (11q23-24), l'anomenat *cluster* d'Apo AI-CIII-AIV-AV, que s'ha relacionat amb dislipèmia en diverses famílies amb HFC [Allayee i col., 2003; Mar i col., 2004; Suviolahti i col., 2006; Liu i col., 2010]. Altres estudis de lligament han identificat un *locus* important a 20q12-q13.1, segurament degut a

la presència del gen de HNF4 α (*hepatocyte nuclear factor 4 alpha*) [Weissglas i col., 2006], o també a 10q25.3, on es localitza el factor de transcripció TCF7L2 (*transcription factor 7-like 2*) [Huertas-Vázquez i col., 2008].

Altres *loci* han estat associats amb la malaltia, com per exemple 1p31, 2q31, 6q16.1–16.3, 8p23.3–22, 10p, 10q i 21q21 [Shoulders i col., 2004; Aguilar-Salinas i col., 2010], però les dades de l'associació d'aquests amb la patogènesi de la HFC no són del tot concloents.

No obstant això, cap d'aquestes troballes és un marcador genètic específic per a la HFC. Així, actualment es considera la HFC com una malaltia genèticament heterogènia, en la etiopatogènia de la qual intervenen un nombre desconegut de gens majors al costat d'altres gens modificadors de l'expressió d'aquests, a més de l'important paper que exerceixen els factors ambientals. Alguns autors consideren que la HFC es deuria al que denominen "*dèficit de gestió d'àcids grassos lliures*" [Ribalta i col., 2005]. Segons això, la sobreproducció hepàtica de VLDL, deguda a una captació deficient als teixits perifèrics i una excessiva canalització hepàtica cap a la síntesi de TG, seria el principal defecte en la HFC. El fenotip final seria el resultat d'un elevat nombre de factors, entre els que destacarien el defecte específic responsable dels elevats nivells d'AGL, l'existència d'una base genètica individual que faria que aquesta disfunció s'expressés com un defecte lipídic, amb tendència a l'obesitat i mal control de la glucosa, i un gran nombre de factors ambientals que modularien els dos factors anteriors, amb gran influència sobre el fenotip resultant.

En resum, s'accepta que hi ha un petit nombre de regions cromosòmiques associades amb la patogènesi de la HFC (1q21-23, 11p14-q12.1, 16q22-24.1 ò 20q12-q13.1), i alguns gens candidats, entre els que podem incloure factors de transcripció com USF1, TCF7L2 ò HNF4 α [Pajukanta i col., 1998; Coon i col., 2000; Aguilar-Salinas i col., 2010], tot i que el paper d'aquests en la fisiopatologia relacionada amb la HFC encara està pendent de ser descrit. Es podria proposar que aquests factors de transcripció regulen la

lipogènesi i la utilització dels àcids grassos circulants, però en l'actualitat no tenim informació concloent, i en conseqüència, encara es desconeix la causa genètica d'aquesta malaltia.

3.2. VIH, tractament antiretroviral i aterosclerosi.

L'aparició del virus de la immunodeficiència humana (VIH), del qual el primer cas d'infecció va ser reportat el 1981, va causar un gran nombre d'infeccions a causa de les quals els pacients afectats rarament vivien més d'alguns anys. La síndrome de la immunodeficiència adquirida (SIDA) es va convertir en la gran epidèmia del segle XX, i l'expansió d'aquesta malaltia es va transformar en una considerable càrrega per als sistemes assistencials de la majoria dels països afectats. En l'actualitat, però, l'existència de diversos fàrmacs efectius ha modificat de forma dràstica la història natural de la infecció per VIH, associant-se amb una reducció de la mortalitat i un increment notable en l'esperança i la qualitat de vida dels pacients afectats per aquesta malaltia, fins al punt que fins a un 85% dels pacients tenen una supervivència superior als 10 anys [UNAIDS-WHO, 2004; Sterne i col., 2005; Manuel i col., 2005]. Els fàrmacs que s'inclouen en aquest tipus de teràpia bàsicament es poden agrupar en tres categories ben diferenciades:

- a) Inhibidors de la retrotranscriptasa: interfereixen amb un pas important del cicle de vida del VIH i impedeixen que el virus es reproduïxi.
- b) Inhibidors de la proteasa (IP): interfereixen amb una proteïna que fa servir el VIH per produir partícules virals infeccioses.
- c) Inhibidors de la fusió: impedeixen l'entrada del virus a les cèl·lules del infectat.

La combinació de diversos d'aquests fàrmacs, normalment 3-4 d'ells, va donar lloc al que s'anomena Teràpia antiretroviral de gran activitat (TARGA), que va entrar en funcionament com a tractament per a la malaltia al 1996. La utilitat d'aquesta teràpia es troba limitada a causa de l'aparició d'efectes adversos, el més important dels quals és la lipodistròfia (alteracions en la distribució del greix corporal), associada a diverses alteracions metabòliques com dislipèmia, resistència a la insulina, aterosclerosi subclínica, hipertensió i alteracions del metabolisme ossi [Hadigan i col., 2001; Jericó i col., 2005; Grinspoon i col., 2008; Silva i col., 2009]. Aquestes alteracions metabòliques donen lloc a un perfil pro-aterogènic que fa que els pacients que reben aquest tractament presentin un notable increment del risc cardiovascular [Henry et al., 1998], fet confirmat en dos llargs estudis prospectius [Friis-Moller i col., 2003; Mary-Krause i col., 2003]. En els últims anys, nous estudis han suggerit una relació entre el TARGA i episodis cardiovasculars, especialment l'infart agut de miocardi [Pérez-Camacho i col., 2009].

Els efectes adversos descrits anteriorment es posen de manifest de manera especial en aquells tractaments que inclouen els IP [Carr i col., 1998, Jericó i col., 2006], entre els quals es troba el ritonavir (Figura 3). Aquest fàrmac es prescriu freqüentment com a part del TARGA, tant per la seva acció antiretroviral directa (unió al centre actiu de la proteasa, per la seva activitat inhibidora peptidomimètica de les aspartil proteases del VIH), com perquè inhibeix un enzim, el citocrom P450 3A4, (CYP3A4) que metabolitza altres inhibidors de proteasa [Zeldin i col., 2004]. Aquesta inhibició comporta concentracions més elevades d'aquests altres fàrmacs, permetent la reducció tant de la dosi com de la freqüència d'ús d'aquests, i millorant l'eficàcia clínica.

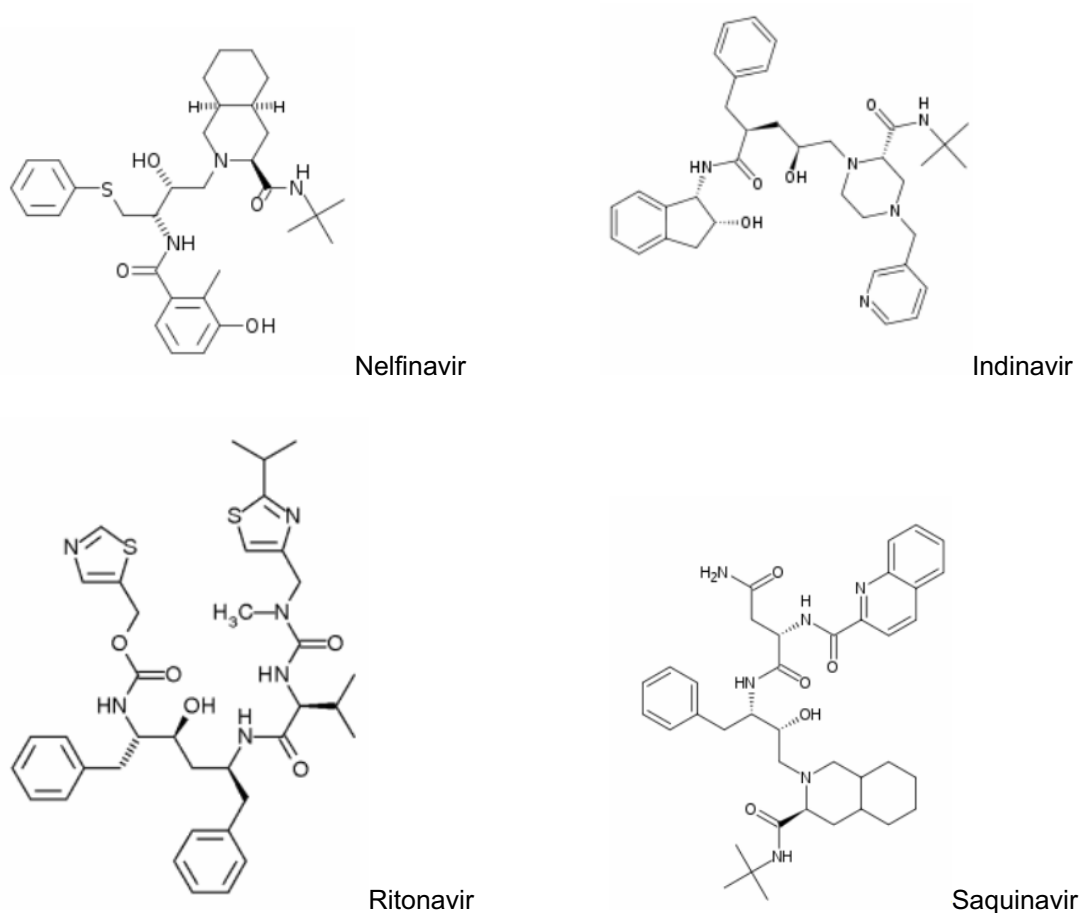


Figura 3. Estructura molecular dels inhibidors de proteases.

La utilització clínica d'IP es relaciona principalment amb l'aparició d'alteracions metabòliques com les dislipèmies i la resistència a la insulina. Així, el ritonavir pot augmentar la síntesi hepàtica de TG, i també la triglicèridèmia plasmàtica [Lenhard i col., 2000]. S'ha demostrat que el ritonavir per si sol pot inhibir la LPL i la lipasa hepàtica, la qual cosa també contribueix a l'augment de les concentracions de TG [Purnell i col., 2000]. Altres alteracions metabòliques que s'associen amb l'ús del ritonavir són hipercolesterolèmia, elevació de les transaminases, i fosfo-creatina cinasa elevada [Lee i col., 2005; Haubrich i col., 2009]. De fet, l'ús de ritonavir es relaciona amb un risc major d'hipercolesterolèmia que l'ús d'altres IP, com per exemple nelfinavir o indinavir [Periard i col., 1999].

Per altra banda, el ritonavir pot inhibir el transportador de glucosa regulat per insulina, GLUT4 [Noor i col., 2004; Hruz i col., 2008]. Això implicaria una barrera per a l'entrada de glucosa en el múscul i/o el teixit adipós, i podria comportar el desenvolupament de resistència a la insulina. A més, s'ha descrit que el ritonavir altera l'expressió de nombroses citocines inflamatòries, com ara TNF- α , IL-1 i IL-6 en adipòcits, de manera que es pot arribar a produir una desdiferenciació i apoptosi dels mateixos, o bé impedir la diferenciació dels precursors [Lagathu i col., 2005]. També s'ha vist que un tractament amb ritonavir és capaç d'induir gens de resposta a estrès oxidatiu i gens proapoptòtics en adipòcits, així com gens implicats en l'adhesió cel·lular i la remodelació de la MEC [Adler-Wailes, 2008]. Aquests efectes directes dels fàrmacs sobre els adipòcits provoquen lipoatròfia en el teixit adipós subcutani, de manera que s'incrementa l'alliberament d'àcids grassos; aquests s'acumulen en el teixit adipós visceral, el qual s'hipertrofia conduint a obesitat visceral i a les alteracions metabòliques associades [Villarroya i col., 2009].

A més dels adipòcits, els macròfags també poden tenir un paper important en l'aparició d'alteracions metabòliques degudes als IP. Per exemple, s'ha proposat que el ritonavir podria actuar regulant els processos que donen lloc a l'acumulació de lípids en el macròfag. En aquest sentit, alguns estudis s'han intentat centrar en els efectes del ritonavir en l'expressió de CD36, un receptor *scavenger* que intervé la càrrega de colesterol procedent de lipoproteïnes modificades en el macròfag. En el primer d'aquests estudis [Serghides i col., 2002], es va analitzar l'efecte d'un tractament de 7 dies amb l'antiretroviral sobre els nivells de CD36 en monòcits de voluntaris sans i pacients infectats amb el VIH. Els resultats d'aquest estudi van demostrar una reducció significativa en els nivells de CD36 en el 70% dels participants, reducció que va ser més acusada en els pacients infectats que en els voluntaris sans. En contraposició amb els resultats de Serghides i col·laboradors, els resultats d'un segon estudi indiquen que els IP indueixen l'expressió de CD36 i l'acumulació d'èsters de colesterol en macròfags humans *in vitro* i en macròfags peritoneals de ratolí *in vivo* [Dressman i col., 2003]. En aquest estudi es va observar una correlació entre l'increment relatiu de l'expressió de CD36 en macròfags i l'àrea de lesió ateroscleròtica a l'aorta.

Per tant, no resulta del tot clar si les alteracions en l'expressió de CD36 en pacients infectats pel VIH en tractament antiretroviral es correlacionen amb l'aparició d'aterosclerosi en aquests pacients. D'altra banda, els IP podrien actuar no només modificant l'expressió d'aquells receptors que intervenen en l'entrada de colesterol en el macròfags, sinó també la dels gens que actuen en el procés d'eflux (sortida) de colesterol d'aquestes cèl·lules, procés que es porta a terme principalment mitjançant el transportador ABCA1, i el receptor *scavenger* SR-BI.

Malgrat tot el que s'ha exposat anteriorment, sembla ser que les alteracions metabòliques i els corresponents efectes cardiovasculars en pacients sota tractament antiretroviral no són degudes únicament als fàrmacs, sinó que la pròpia infecció pel virus hi té un paper determinant. Cal tenir en compte que estudis realitzats abans de la instauració del TARGA, en pacients que no havien rebut tractament antiretroviral (*naïve*), ja demostren alteracions lipídiques. La infecció asimptomàtica per l'VIH s'associa amb una disminució en la concentració de colesterol unit a HDL de manera primerenca, que s'accentua amb la progressió de la malaltia. En absència de tractament, s'han observat elevacions dels valors plasmàtics de TG i una disminució del colesterol associat a HDL [Grunfeld i col., 1992]. Estudis en models experimentals suggereixen que el virus indueix la síntesi de TNF- α , que s'associa amb un increment dels TG, colesterol i apoB4 en plasma [Ledru i col., 2000]. L'activitat inflamatòria induïda pel virus implica, a més, que la infecció per VIH pugui provocar un augment dels marcadors de l'activació endotelial, modificant diferents paràmetres que determinen el risc cardiovascular [Ross i col., 2008; Kristoffersen i col., 2009]. Dades recents assenyalen una taxa incrementada d'infart de miocardi en pacients amb infecció per VIH en relació a la població seronegativa [Triant i col., 2008].

4. Monòcits i macròfags: paper en el desenvolupament d'aterosclerosi.

Els monòcits i macròfags són components essencials del sistema immune del cos humà, i són cèl·lules clau en totes les etapes de la aterogènesi, des de l'inici de la formació del que s'anomena estria grassa, que és la primera lesió detectable, fins als processos que en fases tardanes de la lesió contribueixen a la ruptura de la placa d'ateroma. Aquest tipus cel·lular participa activament en el desenvolupament de les lesions ateroscleròtiques, en l'acumulació de colesterol, com a mediador de la resposta immunitària, així com a font de nombrosos factors de creixement i enzims secretats [Jessup i col., 2002]. De fet, ha estat descrit que ratolins hipercolesterolèmics deficientes en factor estimulant de colònies de macròfags (M-CSF) són extremadament resistents al desenvolupament d'aterosclerosi [Smith i col., 1995; Quiao i col., 1997].

A continuació es revisarà el paper de monòcits i macròfags en les diferents fases del desenvolupament de la lesió ateroscleròtica.

4.1. Reclutament de monòcits.

Per a què s'iniciï la formació de la placa d'ateroma cal que els monòcits i lipoproteïnes circulants com les LDL travessin la paret arterial. En condicions normals això no succeeix, per la qual cosa la hipòtesi més acceptada sobre l'origen de l'aterosclerosi és el que es coneix com a "*resposta a la lesió*" [Ross R., 1986, 1993]. Segons aquesta teoria, l'aterosclerosi es contempla com una resposta de tipus inflamatori a una lesió o disfunció de l'endoteli vascular. De forma progressiva, l'endoteli pateix un dany crònic que modifica la seva correcta funcionalitat, fet que es coneix com disfunció endotelial. La disfunció endotelial implica diverses alteracions funcionals de l'endoteli, com per exemple

un augment de la permeabilitat a les lipoproteïnes plasmàtiques, una major adherència dels leucòcits, o un desequilibri local entre factors pro- i antitrombòtics i entre factors vasodilatadors i vasoconstrictors [Maclouf i col., 1998, Jennings, 2009].

Una de les conseqüències de la disfunció endotelial és l'increment de l'adhesió dels monòcits a la paret vascular, que condueix al reclutament d'aquestes cèl·lules per a la posterior migració cap a l'espai subendotelial. Entre els agents que intervenen en aquests efectes trobem molècules d'adhesió cel·lular (CAMs, selectines i integrines) que s'expressen en la superfície de les CE [Stokes i col., 2006].

Després de l'adhesió ferma dels monòcits a la paret arterial, es produeix la migració cap a la íntima, un procés mediat per les mateixes CAMs que participen en el procés d'adhesió, i facilitat per quimiocines sintetitzades per les CE, CML i els mateixos macròfags. En el procés de transmigració de monòcits, es produeix l'expressió de substàncies quimioattractants entre les quals destaquen la proteïna quimiotàctica de monòcits (MCP-1 o CCL2), i el seu propi receptor CCR2. Aquest receptor té un paper crític en el reclutament de monòcits a través de l'endoteli [Hansson i col., 2005; Stokes i col., 2006], i en diferents models de ratolins apoE^{-/-} que no expressen MCP-1 o CCR2, s'ha observat un menor desenvolupament de lesions ateroscleròtiques [Boring i col., 1998; Gosling i col., 1999; Inoue i col., 2002]. D'altra banda, la presència de MCP-1 en lesions ateroscleròtiques humanes està ben documentada [Nelken i col., 1991; Yilmaz i col., 2007].

L'augment en la permeabilitat de l'endoteli, unit als elevats nivells de lipoproteïnes plasmàtiques, facilita que les LDLs travessin la paret arterial i siguin retingudes a l'íntima. Aquestes lipoproteïnes acumulades a l'íntima arterial pateixen modificacions, principalment de tipus oxidatiu, que les converteixen en altament aterogèniques [Heinecke, 2006]. També les pròpies LDL modificades o les citocines proinflamàtòries poden tenir activitat atractant de monòcits, així com estimular l'expressió de MCP-1 per part de les CE [Cushing i col., 1990; Barter i col., 2005] (Figura 4).

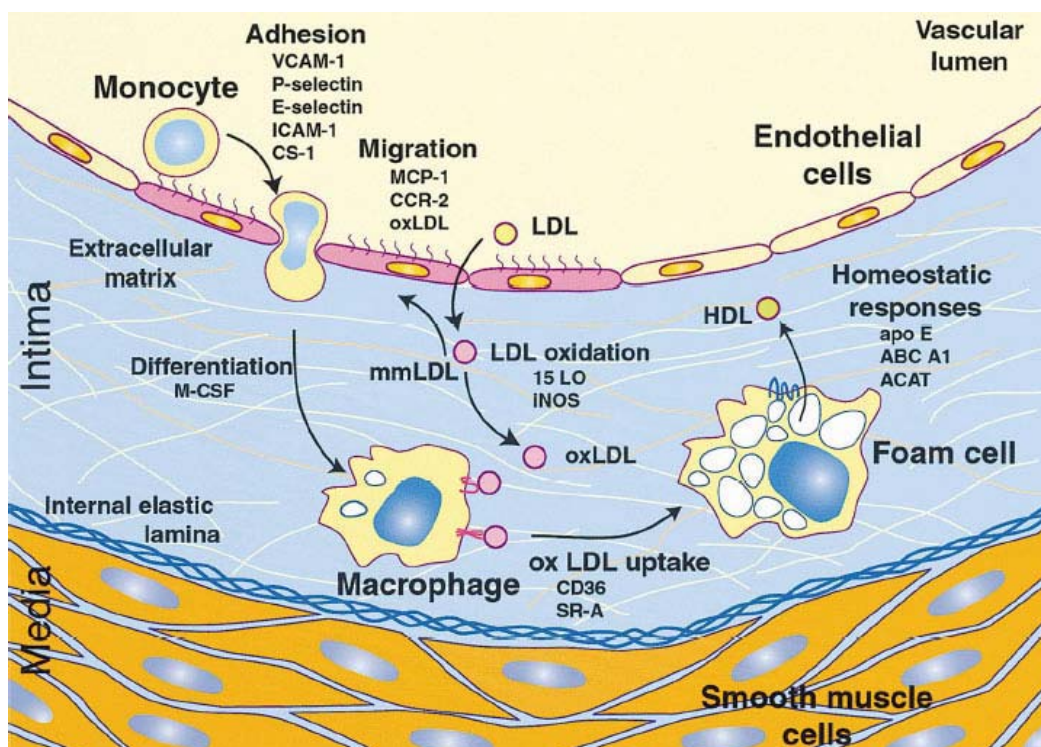


Figura 4. Inici de la lesió: reclutament de monòcits. Les cèl·lules endotelials activades expressen molècules d'adhesió (selectines) que provoquen que els monòcits llisquin rodant lentament per la superfície de l'endoteli. La interacció entre les integrines del monòcit i les proteïnes de la família de les immunoglobulines de les CE (VCAM-1 i ICAM-1) provoquen l'adhesió ferma. Posteriorment els monòcits migren a l'íntima en un procés estimulat per quimiocines (MCP-1, CXCL8 i CX3CL1), on es diferencien a macròfags sota la influència del M-CSF (figura de Glass i Witztum, 2001).

Un cop a l'íntima arterial, les LDL modificades i altres substàncies com el factor estimulant de colònies de macròfags (M-CSF) estimulen la proliferació dels monòcits i la seva diferenciació a macròfags. Aquesta diferenciació comporta una sèrie de canvis fenotípics entre els quals hi ha un augment de l'expressió dels anomenats receptors *scavenger*, que internalitzen LDL modificades donant lloc a la formació de cèl·lules escumoses. També l'adquisició del fenotip de macròfag s'associa amb un increment en l'expressió de receptors d'estructures microbianes, incloent els TLR. Existeixen estudis realitzats en ratolins *op/op*, un model de deficiència de M-CSF caracteritzat per una manca de macròfags diferenciat en diferents òrgans i teixits. Quan aquests ratolins es creuen amb ratolins *apoE^{-/-}*, la descendència presenta escasses lesions ateroscleròtiques, fet que confirma que la diferenciació de

monòcit a macròfag és un pas necessari en el desenvolupament d'aterosclerosi [Hansson, 2001].

4.2. Macròfag: Inflamació i immunitat.

El macròfag és una cèl·lula importantíssima en la resposta immune i inflamatòria. La immunitat innata constitueix la primera línia de defensa davant els patògens, i està programada per a reconèixer i detectar uns motius ben conservats, anomenats PAMPs (patrons associats a patògens microbians), mitjançant receptors altament especialitzats. Com ja s'ha comentat, un d'aquests tipus de receptors són els TLRs. Fins a 13 tipus de receptors diferents pertanyents a aquesta família han estat identificats en mamífers, cadascun dels quals presenta una diferent especificitat per a un ampli rang de lligands. Els membres de la família dels TLR comparteixen un mateix domini citoplasmàtic amb els receptors de IL-1, denominat *Toll/IL-1 domain* (TIR). D'aquesta manera, hi ha vies de senyalització activades pels TLRs que es troben compartides amb la via de IL-1, que acaben activant la resposta inflamatòria mitjançant el sistema NF- κ B (factor nuclear kappa B) [O'Neill i Bowie, 2007] (Figures 5 i 6).

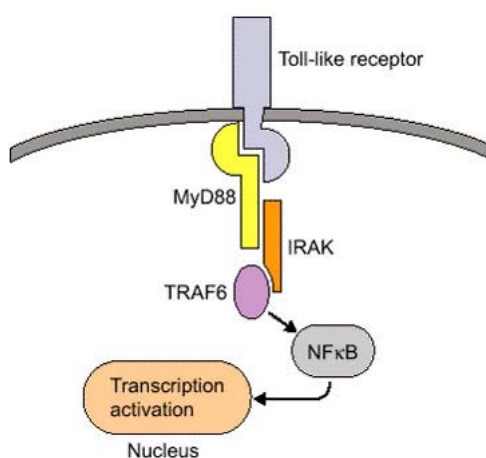


Figura 5. Esquema de l'estructura i la via de senyalització dels *Toll-like receptors*.
(figura extreta de <http://genomebiology.com>)

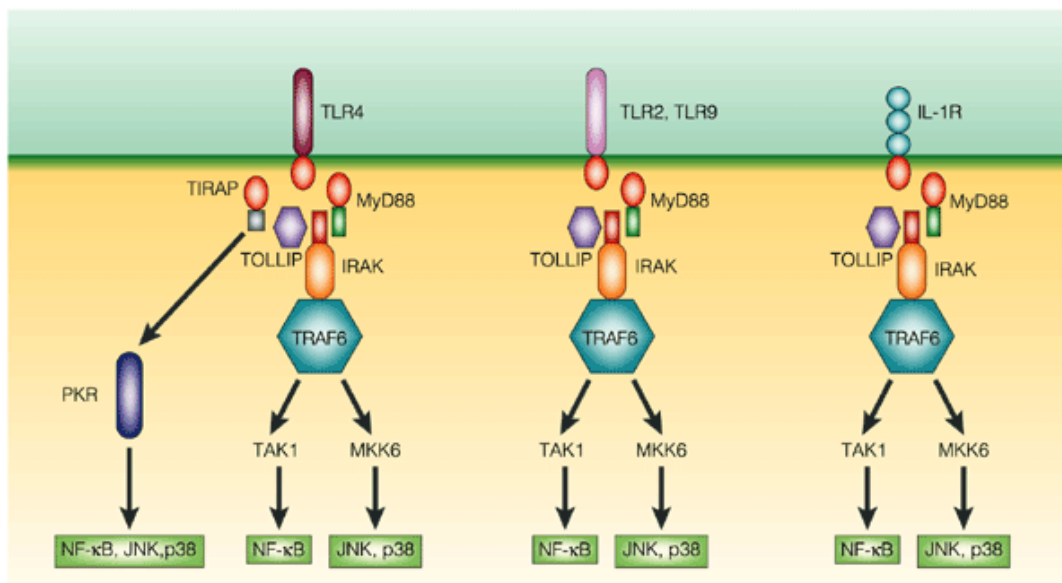


Figura 6. Esquema estructural de TLR-2, TLR-4 i IL-1R. Aquests receptors comparteixen un domini TIR a la part citoplasmàtica, així com diferents components de la cascada de senyalització, el pas final de la qual activa el factor nuclear κ B (figura de Medzhitov, 2001).

Les citocines són molècules bàsiques en la resposta inflamatòria, tant aguda com crònica. La producció de citocines depèn de molts factors, i aquesta està finament regulada durant la inflamació. Diverses citocines, com per exemple el TNF- α , moltes interleucines, interferó γ (IFN- γ), CXCL8, M-CSF y TGF- β , han estat identificades en vasos que van presentar lesions ateroscleròtiques primerenques [Tedgui i Mallat, 2006]. Els macròfags són un dels tipus cel·lulars presents a la lesió que produeixen citocines proinflamatòries, com ara IL-1 (el paper de la qual es comentarà amb més detall a la secció 6), IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 i TNF- α , tot i que també secreten algunes citocines antiinflamatòries com són la IL-10 o el TGF- β . Cal destacar que la IL-1, la IL-6 i el TNF- α no participen únicament en respostes inflamatòries locals, sinó que també donen lloc a efectes distants, com ara l'activació de gens hepàtics que codifiquen per proteïnes de fase aguda com són el fibrinogen i la PCR [Koh i col., 2005].

Les citocines secretades pels macròfags regulen la producció de citocines i molècules d'adhesió per part d'altres cèl·lules presents a l'entorn de la lesió, com ara CML, CE i limfòcits. L'augment de l'expressió de molècules d'adhesió en CE promou el reclutament de més monòcits, creant així un *feed-back* que amplifica i perpetua la reacció inflamatòria (Figura 7).

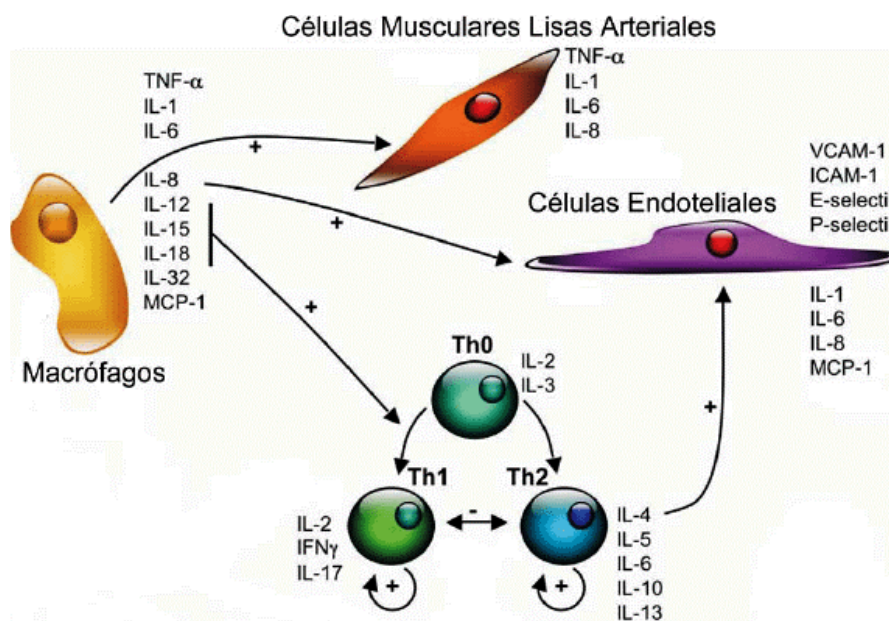


Figura 7. Principals citocines implicades en l'establiment de l'aterosclerosi.

La totalitat de les cèl·lules vasculars són capaces de produir citocines, però són els macròfags les principals cèl·lules secretores i amplificadores de la resposta inflamatòria. La IL-12 i la IL-18 són inductores de forma sinèrgica de l'IFN- γ , el principal promotor de limfòcits T, i de la seva transformació a limfòcits T cooperadors (Th). Les citocines secretades per macròfags també activen les CML, a més de promoure l'augment de molècules d'adhesió, com ICAM-1 i VCAM-1 i de selectines a les CE, incrementant el reclutament de leucòcits i l'amplificació de la resposta inflamatòria, així com l'establiment de la lesió ateroscleròtica (figura de Tedgui i Mallat, 2006)

Les citocines, a més, poden afectar la permeabilitat endotelial, així com la composició de la MEC a causa de l'alteració de l'expressió de diverses MMPs, i dels seus inhibidors (TIMPs) [Newby, 2005].

A part del seu paper en la resposta inflamatòria, les citocines poden afectar l'expressió dels receptors *scavenger*, regulant la captació de

lipoproteïnes modificades i la sortida o exportació de colesterol des dels macròfags (Figura 8). Així doncs, la reducció de l'expressió de citocines en el macròfag pot ser una bona estratègia terapèutica per reduir o alentir la progressió d'aterosclerosi. No obstant això, l'ús d'antagonistes de $\text{TNF-}\alpha$ o d'IL-1 en clínica és molt limitat, i a més s'associa amb aparició d'efectes adversos [Furst i col., 2005]. Una aproximació alternativa es basa en el fet que els PPARs (receptors activats per proliferadors peroxisòmics) i els receptors hepàtics X (LXR) actuen com a reguladors negatius de la resposta inflamatòria en el macròfag, per tant, PPAR i LXR constitueixen dianes terapèutiques més adequades per modular la producció de citocines en el macròfag.

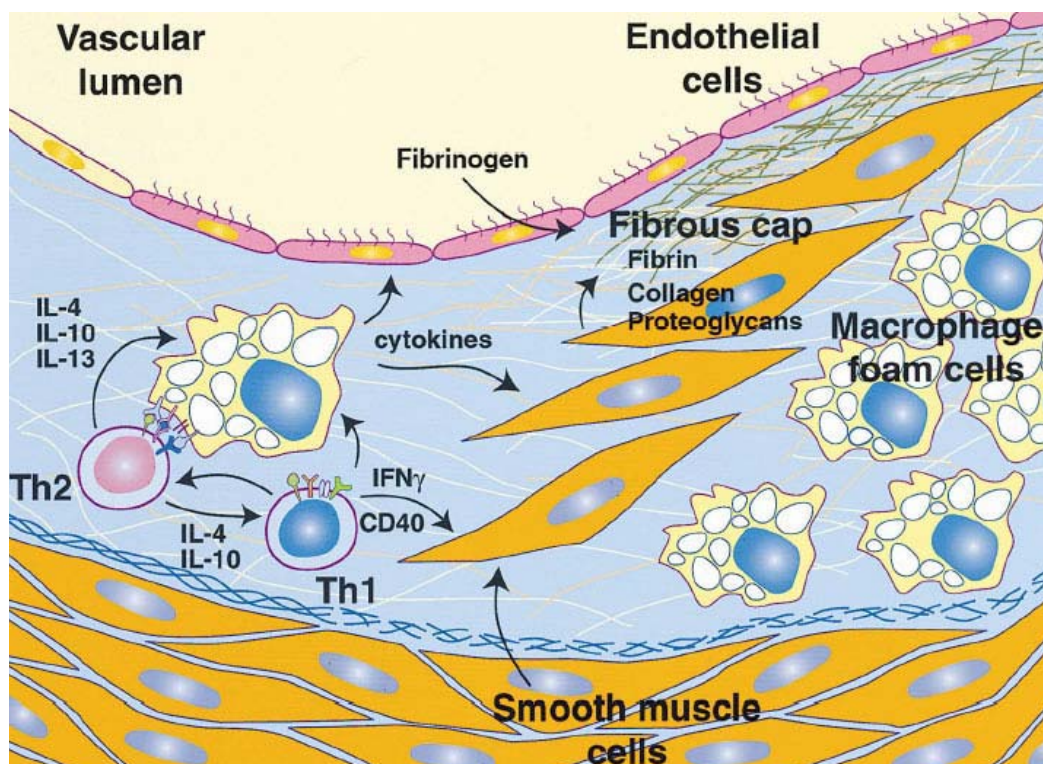


Figura 8. Formació de la estria grassa. La diferenciació dels monòcits a macròfags comporta un increment en l'expressió de TLRs i SRs. L'activació dels TLRs inicia una cascada de senyalització mediada per $\text{NF-}\kappa\text{B}$ que condueix a l'alliberament de citocines proinflamatòries (IL-1, IL-6 i $\text{TNF-}\alpha$) i de quimiocines com la MCP-1, de manera que s'estableix una inflamació local, en la qual també participaran les CE i les CMLs. D'altra banda, les citocines també estimulen la captació de lipoproteïnes modificades mitjançant els SRs del macròfag. Aquestes cèl·lules carregades de colesterol es coneixen com cèl·lules escumoses, i la seva acumulació juntament amb la síntesi de proteïnes de matriu per part de les CMLs, donaran lloc a la gènesi de la estria grassa (figura de Glass i Witztum, 2001).

4.3. Receptors *scavenger*. Càrrega-eflux de colesterol.

Com ja s'ha comentat, la diferenciació de monòcit a macròfag es caracteritza per l'increment en l'expressió de receptors *scavenger* (SR). El terme *scavenger* va ser encunyat per Goldstein i Brown per distingir aquests receptors dels receptors de LDL natives, l'expressió dels quals està regulada pels valors intracel·lulars d'esterols [Brown i Goldstein, 1983]. Els SR, en canvi, no estan sotmesos a aquesta regulació, i a causa de la seva capacitat per unir i internalitzar lipoproteïnes modificades, contribueixen de manera important a l'acumulació de colesterol en els macròfags.

Els macròfags expressen diverses classes de SR [Murphy i col., 2005; Moore i col., 2006]. Aquests receptors són capaços de reconèixer, amb diferent afinitat, LDL modificades així com també, en alguns casos, HDL. De fet, s'ha descrit que a més del seu paper en la formació de la cèl·lula escumosa per reconeixement de lipoproteïnes modificades, aquests receptors tenen una destacada funció en la immunitat natural, ja que reconeixen altres agents com microorganismes patògens i cèl·lules apoptòtiques [Hartvigsen i col., 2009; Chen i col., 2010].

Entre els receptors *scavenger*, trobem SR-A, CD36, CD68, *lectin-like oxidized receptor-1* (LOX-1), receptor *scavenger* que s'uneix a fosfatidilserina i lipoproteïnes oxidades (SR-PSOX), i SR-BI. Pel que fa a l'entrada i acumulació de colesterol en el macròfag, els SR més importants són SR-A i CD36, ja que són responsables de fins a un 90% de la captació de les LDL acetilades i oxidades [Kunjathoor i col., 2002].

CD36 és un receptor *scavenger* de classe B implicat en múltiples processos biològics, incloent el metabolisme lipídic, la inflamació i la angiogènesi [Febbraio i col., 2001]. La seva capacitat per reconèixer i internalitzar LDL, fins i tot les mínimament modificades (mmLDL), sembla implicar-lo clarament en la formació de cèl·lules escumoses. En aquest sentit, s'ha observat que els macròfags de pacients que presenten un polimorfisme en

el gen de CD36, així com els macròfags procedents de ratolins deficients en CD36, mostren una menor capacitat d'unir i captar LDL oxidades [Nozaki i col., 1995; Febbraio i col., 1999; Yamashita i col., 2007]. A més, ratolins doblement deficients en CD36 i apoE desenvolupen menys lesions ateroscleròtiques que aquells que únicament són deficients en apoE.

Resulta interessant el fet que l'exposició de macròfags a LDL oxidades dóna lloc a una marcada inducció de CD36 [Han i col., 1997], mitjançant l'activació de PPAR γ per part dels derivats oxidats dels àcids grassos de les lipoproteïnes [Tontonoz i col., 1998, Nagy i col., 1998]. Això implica que les LDL oxidades indueixen la seva pròpia captació mitjançant el receptor CD36, fet que facilita el procés de formació de la cèl·lula escumosa [Ríos i col., 2008].

El receptor SR-BI presenta una elevada homologia amb CD36 i forma part dels receptors scavenger de classe B. SR-BI és un receptor multiligand, capaç d'unir lipoproteïnes modificades (acetilades i oxidades), lipoproteïnes natives (LDL i VLDL), i fosfolípids aniònics i cèl·lules apoptòtiques. Sens dubte, el fet més rellevant és que SR-BI s'uneix amb elevada afinitat a les HDL, regulant el flux bidireccional de colesterol entre les HDL i les cèl·lules. El colesterol que surt del macròfag a través d'SR-BI és convertit en èsters de colesterol per l'enzim lecitina: colesterol aciltransferasa (LCAT), i posteriorment aquests èsters que transporten les HDL poden ser captats de manera selectiva pels hepatòcits a través del mateix receptor SR-BI (Figura 9). La participació d'aquest receptor tant en les fases inicials com en les fases finals del procés de transport revers de colesterol suggereix un rol protector contra el desenvolupament d'aterosclerosi, paper que s'ha confirmat en estudis realitzats en animals transgènics. Així, la sobreexpressió hepàtica de SR-BI resulta en una reducció de l'aterosclerosi [Arai i col., 1999; Ueda i col., 2000; Kozarsky i col., 2000], mentre que la seva eliminació en ratolins apoE^{-/-} o LDLR^{-/-} indueix el desenvolupament de lesions [Trigatti i col., 1999; Covey i col., 2003].

Altres molècules que participen en l'eliminació de colesterol del macròfag són els transportadors ABCA1 i ABCG1 (*ATP-binding cassette transporter A1-G1*) (Figura 9). Pertanyen a una família de transportadors que usen ATP per transportar lípids i altres molècules a través de les membranes [Dean i col., 2001]. Aquests transportadors participen d'una de les rutes més importants d'exportació de colesterol del macròfag. ABCA1 és capaç d'interactuar amb diferents apolipoproteïnes pobres en colesterol, com ApoA-I, ApoA-II i apoE, que funcionen com a acceptors de fosfolípids i colesterol [Yancey i col., 2003]. Tot i que no es qüestiona el paper fonamental d'ABCA1 en l'eflux de colesterol, els experiments realitzats en ratolins que sobreexpressen o que no tenen aquest transportador han donat lloc a resultats contradictoris en relació amb el desenvolupament d'aterosclerosi [McNeish i col., 2000; Singaraja i col., 2002 ; Joyce i col., 2002]. No obstant això, en estudis de trasplantament de moll d'os en els quals el gen ABCA1 ha estat eliminat de forma selectiva dels macròfags, s'ha observat un increment en les lesions ateroscleròtiques [Van Eck i col., 2002; Aiello i col., 2002], i al contrari, el trasplantament de macròfags que sobreexpressen ABCA1 en ratolins LDLR^{-/-} protegeix enfront del desenvolupament d'aterosclerosi [Van Eck i col., 2006].

Pel que fa a ABCG1, aquest receptor vehiculitza el colesterol i fosfolípids cap a les HDL, un acceptor que es troba en major proporció que la ApoA-I en plasma, de manera que el seu paper en l'eflux de colesterol podria ser fins i tot més rellevant que el d'ABCA1. Resulta interessant el fet que la lipidació de la ApoA-I mediada per ABCA1 dóna lloc a un acceptor eficient del colesterol que és eliminat via ABCG1, el que suggereix que tots dos transportadors actuen de forma sinèrgica per facilitar l'eflux de colesterol des del macròfag [Baldan i col., 2006].

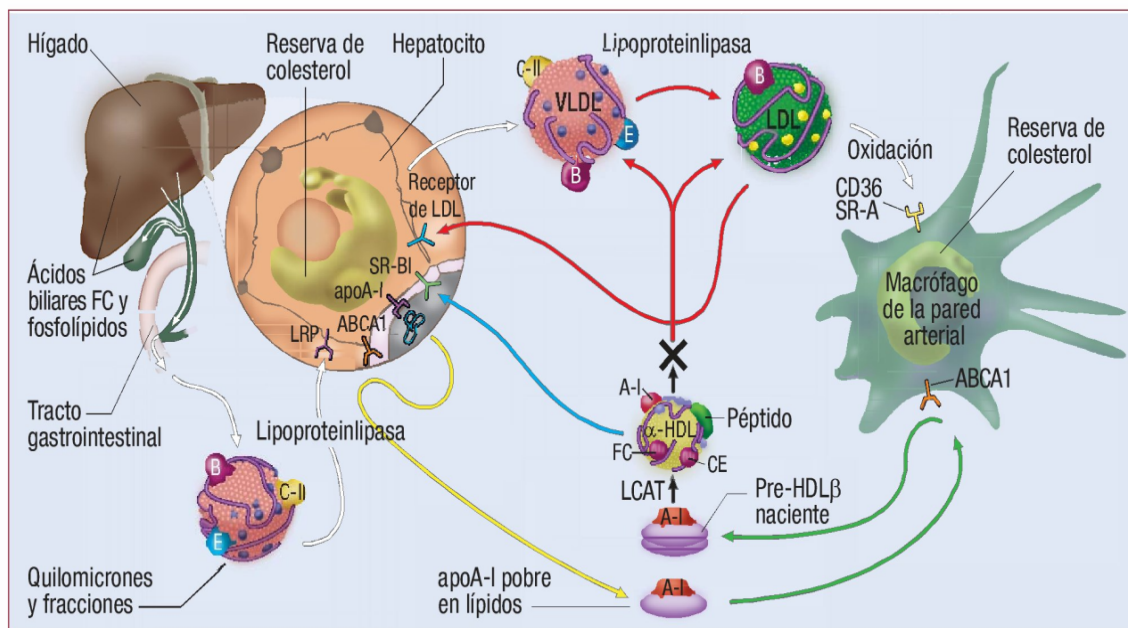


Figura 9. Flux del colesterol mitjançant lipoproteïnes en l'organisme. Els receptors *scavenger* i els transportadors ABC s'encarreguen de la càrrega-eflux de colesterol en el macròfag. Les lipoproteïnes modificades (acLDL i oxLDL) són reconegudes per SR-A i CD36, que transporten el colesterol a l'interior de la cèl·lula. El colesterol intracel·lular serà exportat als acceptors pels transportadors ABCA1 (ApoA-I, pre- β -HDL) i ABCG1 (HDL), o pel receptor SR-BI, que al seu torn és capaç de captar els èsters de colesterol de les HDL al fetge (figura de Badimon i Ibáñez, 2010).

L'expressió d'ABCA1 i ABCG1 en macròfags és controlada pels receptors nuclears LXR α i β [Costet i col., 2000; Sabol i col., 2005]. Es tracta d'un mecanisme homeostàtic dissenyat per reduir la càrrega de colesterol lliure intracel·lular, ja que s'activa pels propis oxisterols aportats per les lipoproteïnes modificades que el macròfag capta. A més, s'ha descrit que els agonistes PPAR α i PPAR γ són capaços d'induir ABCA1 en macròfags humans, promovent així l'eflux de colesterol [Chinetti i col., 2001].

En resum, els SRs juguen un paper importantíssim en l'inici del desenvolupament d'aterosclerosi. Mitjançant aquests receptors, majoritàriament SR-A i CD36, el macròfag capta colesterol de manera no regulada, i la seva acumulació comporta la formació de la cèl·lula escumosa. Per aquesta raó, un increment en l'expressió dels receptors que intervien la càrrega lipídica, o una reducció en els mecanismes d'eflux del colesterol com són els transportadors

ABC o el receptor SR-BI, comportarien un desajust en el balanç de transport lipídic que, en condicions aterogèniques, facilitaria l'inici de la lesió. En conseqüència, resulta de gran interès la possible modulació farmacològica de l'expressió d'aquests receptors.

4.4. Evolució de la lesió. Estabilitat de la placa.

Les cèl·lules escumoses s'acumulen en forma de capes estratificades en l'íntima arterial, originant per aquest procés el que es denomina estria grassa. Aquestes estries grasses ressalten sobre la superfície endotelial de l'artèria, i representen la primera lesió detectable en el procés ateroscleròtic. No obstant, la presència d'estries grasses no és sinònim de desenvolupament de placa d'ateroma, ja que poden romandre en aquesta forma asimptomàtica durant dècades, o fins i tot regressionar [Tsukamoto i col., 1999; Choudhury i col., 2005; Ibáñez i col., 2008].

Si el procés de proliferació i infiltració cel·lular continua, la estria grassa evoluciona cap a una lesió de tipus intermedi, o placa d'ateroma en estat madur, que presenta un major contingut lipídic i cel·lular. En aquesta fase, tant els macròfags com les CML, que adquireixen capacitat de migració i prolifereixen activament, acumulen lípids al seu interior i si superen la seva capacitat d'acumulació, moren (mitjançant necrosi o apoptosi) i alliberen el seu contingut lipídic (Figura 10). A més, les CML sintetitzen proteïnes de la MEC, com ara col·lagen, elastina i proteoglicans, que donaran lloc al desenvolupament de la capa fibrosa [Ross i col., 1993].

A mesura que la lesió progressa, es produeix una desorganització de l'estructura normal de l'íntima que dóna lloc a l'aparició d'una lesió de tipus avançat anomenada placa fibrosa o fibroateroma. Aquest tipus de lesió consta d'un nucli format per grans quantitats de lípid extracel·lular i teixit necròtic, que conté cèl·lules escumoses procedents de macròfags i limfòcits T en la seva

perifèria. Aquest nucli es troba recobert per una capa formada per CML embolicades per teixit connectiu fibrós, bàsicament ric en fibres de col·lagen [Stary i col., 1995; Wagenknecht i col., 2009].

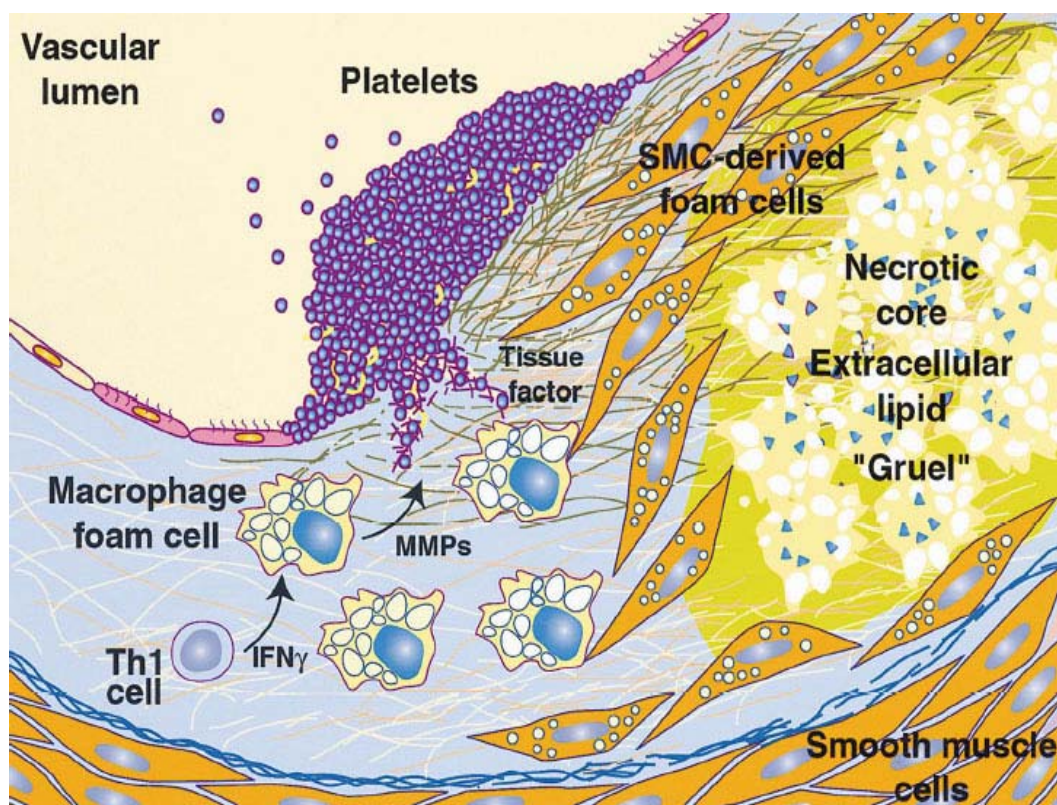


Figura 10. Formació de la placa fibrosa i la ruptura de la mateixa. Les cèl·lules escumoses derivades dels macròfags i les CML carregades de lípids moren i alliberen el seu contingut. Aquest fet promou l'acumulació d'un core necròtic, format principalment de lípids i cèl·lules necròtiques, que amb la progressió de la malaltia serà recobert per una capa fibrosa. Els macròfags secreten MMPs, que juntament amb la neovascularització provocaran la ruptura de la placa. La interacció de productes sanguinis amb el factor tissular secretat pels macròfags acabarà provocant la formació d'un trombe, degut a un procés de coagulació i al reclutament de les plaquetes (figura de Glass i Witztum, 2001).

Com s'ha comentat anteriorment, la progressió de les lesions ateroscleròtiques poden provocar símptomes d'isquèmia com a resultat de l'oclusió de la llum del vas, tot i que els accidents cardiovasculars són generalment provocats per la ruptura de la placa d'ateroma i la gènesi d'un trombe, per contacte entre la sang i el contingut altament trombogènic del nucli

lipídic, com per exemple el factor tissular [Davies i col., 1993; Lee i col., 1997; Toschi i col., 1997]. Per aquest motiu, l'estudi dels factors involucrats en la vulnerabilitat o estabilització de les plaques ateroscleròtiques resulta de gran importància.

5. Fàrmacs utilitzats en el tractament de les hiperlipèmies. Estatines.

El tractament i prevenció de la malaltia ateroscleròtica es basa en l'ús de fàrmacs que corregeixen les dislipèmies, principalment mitjançant la reducció dels nivells de colesterol plasmàtic, i també els nivells de triglicèrids en aquelles hiperlipèmies de tipus mixt. Entre els més utilitzats trobem els inhibidors de la hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa, també anomenats estatines.

Les estatines presenten una gran eficiència en la reducció dels nivells de colesterol LDL, fet que s'associa amb una reducció del risc cardiovascular. També es relaciona el tractament amb estatines amb una elevació dels nivells de colesterol HDL, efecte beneficiós també en la prevenció d'aterosclerosi i del risc cardiovascular que van lligats al desenvolupament de la malaltia.

Actualment hi ha al mercat sis estatines: lovastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina, atorvastatina i rosuvastatina (Figura 11). Els tres primers són d'origen natural, obtinguts a partir de productes d'origen fúngic l'estructura dels quals ha estat modificada, i els restants són compostos totalment sintètics [Williams i col., 2002]. Com a grup, són els més efectius per al tractament de pacients amb hiperlipidèmia primària associada a elevació dels nivells de LDL. Encara que comparteixen un mateix mecanisme d'acció, el grau de lipofília, la selectivitat hepàtica i la magnitud de l'efecte inhibidor de l'HMG-CoA reductasa podrien explicar efectes particulars de certes estatines, que no presenten altres components del grup [Chong i col., 2001]. Depenent de la dosi i del tipus d'estatina utilitzades, la reducció dels nivells de colesterol LDL plasmàtic pot ser d'un 19-60%, i acostuma a anar associada amb un descens

del valor de TG i d'un increment variable dels nivells de colesterol associat a HDL [Igel i col., 2002; Gupta i col., 2010].

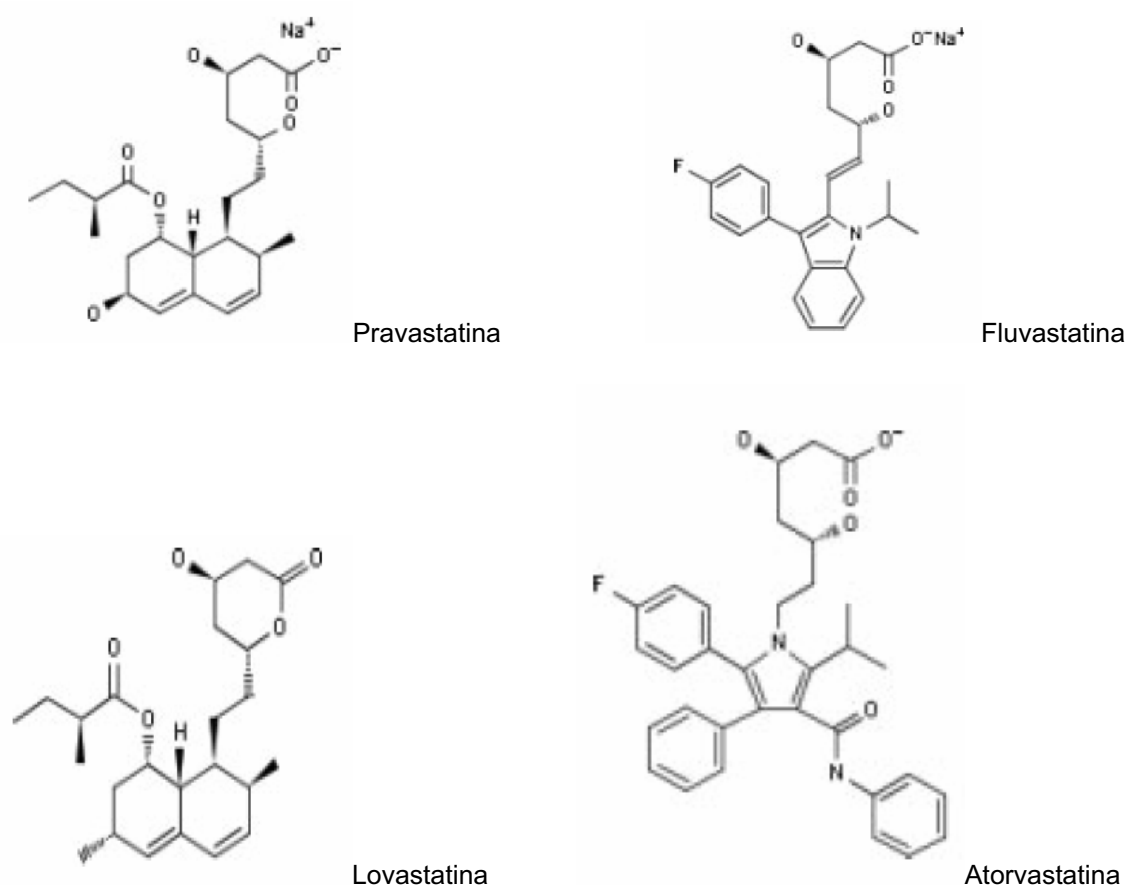


Figura 11. Estructura molecular de les estatines.

El seu mecanisme d'acció consisteix en la inhibició selectiva i competitiva de la HMG-CoA reductasa, l'enzim limitant de la síntesi de colesterol. La HMG-CoA reductasa és l'enzim responsable de la conversió del HMG-CoA en mevalonat, que és el precursor dels esterols. La inhibició de l'HMG-CoA reductasa redueix la quantitat de mevalonat, que després de successives transformacions enzimàtiques dóna lloc al colesterol (Figura 12) [Edwards i col., 1999]. Les estatines presenten una gran similitud estructural amb l'HMG-CoA, de manera que s'uneixen amb gran afinitat al centre actiu, desplaçant així el seu substrat natural, i bloquejant finalment la seva activitat.

La reducció intracel·lular del colesterol, produïda per la inhibició de la seva síntesi, activa la proteïna SREBP-2 (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*) [Goldstein i col., 2002], que s'uneix a un element de resposta a esterols (SRE) situat a la regió promotora del gen del receptor de les LDL. Com a conseqüència, es produeix un increment en l'expressió del receptor de les LDL, i en la captació de les mateixes de la circulació, de manera que es dona una reducció del colesterol associat a les LDLs [Brown i Goldstein, 1986]. D'altra banda, la inhibició de la HMG-CoA reductasa pot comportar una disminució de la disponibilitat de colesterol i/o èsters de colesterol per a la síntesi de VLDL, fet que alhora provoca una inhibició de la secreció d'aquesta lipoproteïna i contribueix a la reducció de la producció de LDL. Aquesta inhibició en la secreció de VLDL es considera el principal mecanisme pel qual es produeix la reducció dels nivells plasmàtics de TG associats al tractament amb estatines [Huff i col., 1997].

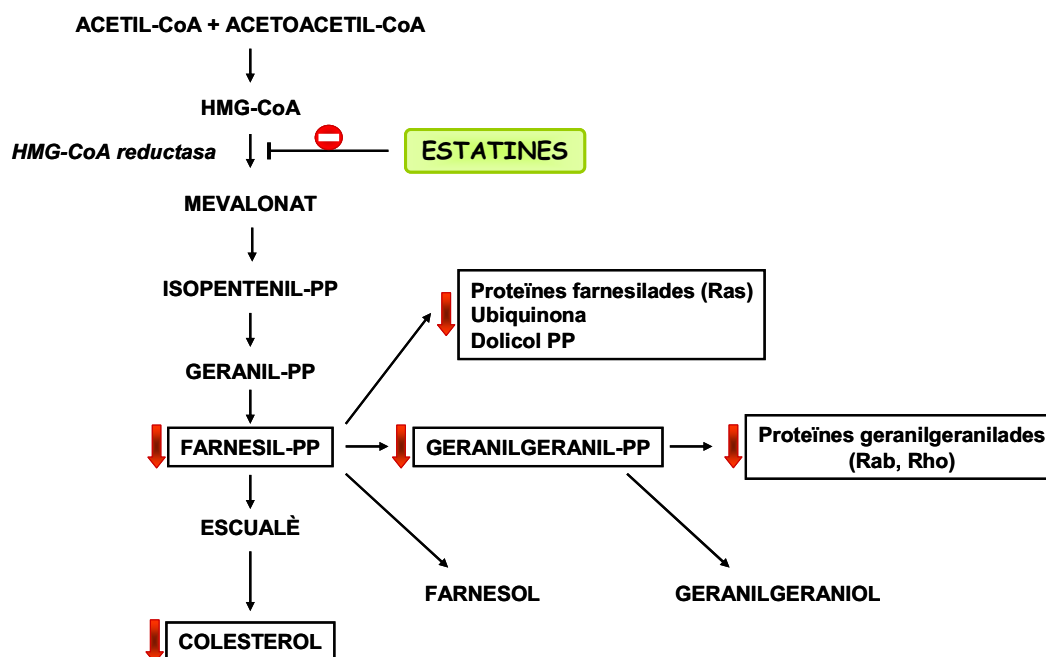


Figura 12. Esquema de la ruta biosintètica del colesterol, i punt d'actuació de les estatines. A l'inhibir la HMG-CoA reductasa, a més de bloquejar la síntesi de colesterol, es bloqueja la síntesi d'intermediaris isoprenilats.

Diversos estudis clínics han demostrat els efectes beneficiosos del tractament amb estatines tant pel que fa a la prevenció primària (prevenció dels factors de risc) com secundària (després d'haver patit un accident vascular) [Scandinavian simvastatin survival study, 1994; Shepherd i col., 1995; Sacks i col., 1996; Downs i col., 1998; Lipid study group, 1998; Baigent i col., 2005]. Tenint en compte la forta associació entre els valors de colesterol LDL i l'aparició de malaltia cardiovascular [Klag i col., 1993] s'assumeix, de forma general, que aquests efectes beneficiosos deriven principalment de la reducció del colesterol produïda degut a l'ús d'aquests fàrmacs.

No obstant això, independentment de la disminució dels nivells de lípids plasmàtics les estatines exerceixen altres efectes, anomenats pleiotròpics, la majoria dels quals estan mediat per la inhibició de la síntesi d'intermediaris isoprenilats que deriven de la via de síntesi del colesterol [Cernuda-Morollón i Ridley, 2006]. Concretament, els intermediaris de tipus isoprenoide farnesil-pirofosfat i geranilgeranil-pirofosfat intervien en la modificació post-traducciona d'una gran varietat de proteïnes de senyalització cel·lular [Edwards i col., 1999]. Per exemple, els membres de la família de GTPases *Ras* i *Rho* necessiten patir un procés d'isoprenilació, mediada per farnesil-pirofosfat en el cas de *Ras*, i per geranilgeranil-pirofosfat en el cas de *Rho*, per ser definitivament funcionals [Takemoto i col., 2001; Weitz-Schmidt, 2002].

Per aquest mecanisme, les estatines redueixen l'expressió d'integrines, així com l'expressió de ICAM-1 i P-selectina en CE [Pruefer i col., 1999; Takeuchi i col., 2000; Yoshida i col., 2001; Dimitrova i col., 2003; Stulc i col., 2008]. També s'ha descrit que poden reduir l'adhesió de limfòcits a l'endoteli a través de la seva unió a zones reguladores de l'antigen LFA-1, de manera que estableixen aquest receptor en la seva forma inactiva [Weitz-Schmidt i col., 2001; Weitz-Schmidt i col., 2003]. Aquest efecte no només és independent de la reducció dels nivells lipídics, sinó que tampoc es relaciona amb la inhibició de la HMG-CoA reductasa ni la isoprenilació de proteïnes [Bonetti i col., 2003]. Les estatines també redueixen l'expressió de CCR2 en els monòcits, inhibint així la migració d'aquestes cèl·lules [Han i col., 2005].

També s'ha descrit que les estatines redueixen l'expressió de TLR-4 en la superfície de monòcits *in vitro* i *in vivo*, inhibint d'aquesta manera la secreció de citocines proinflamatòries. Així, el pretractament amb simvastatina en un model humà d'endotoxèmia redueix l'expressió tant de TLR-4 com de TLR-2, en monòcits [Methe i col., 2005; Niessner i col., 2006]. Altres estudis clínics han demostrat que aquests fàrmacs provoquen una reducció en l'expressió de citocines proinflamatòries, no només en macròfags, sinó també en altres cèl·lules de la paret vascular (CML, CE), el que condueix a una menor concentració plasmàtica d'aquestes citocines i de PCR [Ridker i col., 1999; Albert i col., 2001; Jialal i col., 2001].

6. Interleucina-1. Receptors i senyalització.

Com s'ha explicat anteriorment, la inflamació juga un paper molt important en el desenvolupament de l'aterosclerosi. Un dels components bàsics en la resposta inflamatòria és la IL-1, una citocina multifuncional secretada per monòcits/macròfags, neutròfils, CE i CML. Diversos estudis han suggerit un paper crucial de la IL-1 en el procés ateroscleròtic [Von der Thusen i col., 2003; Kusunuma i col., 2006; Chamberlain i col., 2009]. IL-1 α i IL-1 β faciliten la formació de la lesió fins i tot des de les etapes més primerenques, ja que incrementen l'adhesió i transmigració dels leucòcits. També s'ha suggerit que la IL-1 participa en la formació de la cèl·lula escumosa, i posteriorment de la estria grassa [Elhage i col., 1998].

La IL-1 presenta efectes pleiotròpics mitjançant l'activació, en última instància, dels factors de transcripció NF- κ B i AP-1. Entre els efectes induïts per la IL-1, trobem la proliferació de timòcits, el creixement i diferenciació de les cèl·lules B, i la producció d'IL-2 i IL-6 [Dinarello, 1998]. També s'ha relacionat aquesta citocina amb respostes d'estrès, regulació de la son i la ingesta, i malalties neurodegeneratives com ara l'Alzheimer. Altres patologies en què

s'ha demostrat un paper important de la IL-1 són malalties autoimmunes, com ara l'artritis reumatoide.

La IL-1 exerceix els seus efectes mitjançant la unió al seu receptor, que pertany a la superfamília de receptors d'interleucina-1/*toll-like* (IL-1R/TLR). Aquesta família comprèn un grup de proteïnes estructuralment homòlogues vitals per a la immunitat innata davant infeccions, inflamacions i estrès de tipus al·lèrgic o no al·lèrgic [Bowie i O'Neill, 2000]. Aquest tipus de receptors també són importants perquè serveixen d'enllaç entre les respostes immunes de tipus innat i les de tipus adaptatiu, mitjançant la inducció de citocines com el TNF- α , IL-6, IL-12 i IL-18. Els membres d'aquesta família es caracteritzen per un domini intracel·lular molt conservat (TIR), que transdueix el senyal mitjançant vies molt similars tant en vertebrats com en invertebrats [Fallon i col., 2004]. La majoria de proteïnes que contenen aquest domini TIR són receptors, amb l'excepció del factor de diferenciació mieloide 88 (MyD88) i la *MyD88-adaptor-like protein*, que funciona en associació amb receptors per dur a terme la transducció de senyals.

D'aquesta manera, els dominis TIR posseeixen la capacitat de reclutar altres proteïnes que contenen aquest mateix tipus de domini, mitjançant interacció homotípica proteïna-proteïna, durant la cascada de transducció de la senyalització [Burns i col., 1998, Xu i col., 2000].

La família de receptors IL-1R/TLR es divideix en dos grups:

- La família IL1-R, que comprèn proteïnes transmembrana i proteïnes solubles, que posseeixen dominis *immunoglobulin (Ig)-like*.
- La família TLR, formada per proteïnes transmembrana de tipus I i proteïnes citoplasmàtiques, que posseeixen un domini extracel·lular ric en repeticions de leucina.

Els membres de la família IL-1R han estat clonats en mamífers, aus i peixos. Aquest subgrup es defineix pels dominis *Ig-like* en els segments extracel·lulars del receptor. Aquests dominis presenten poca homologia quant a la composició d'aminoàcids, però tots ells presenten una estructura similar, i posseeixen residus de cisteïna bastant conservats, en posicions similars, que mitjançant els ponts disulfur mantenen l'estructura del domini. Els dominis *Ig-like* intervenen en les interaccions proteïna-ligand i proteïna-proteïna.

Existeixen nombrosos membres en la família IL-1R, entre els quals trobem IL-1R1, IL-1R2, IL-1RAcP, ST2, IL-18R α , IL-18R β , o IL-1Rrp2 [Vélez-Castrillón i col., 2004]. En humans, IL-1R1, IL-1R2, IL-18R i IL-1RAcP s'han localitzat en un *cluster* de 530 Kb, en el cromosoma 2q12 [Dale i col., 1999; Kim i col. 2001]. La majoria de receptors d'IL-1 han estat localitzats en el cromosoma 2 [Barton i col., 2000; Smith i col., 2000]. IL-1RAcP es troba codificada en el cromosoma 3q28 [Dale i col., 1998]. Sembla que no hi ha una significació funcional rellevant en el *clustering* d'aquests receptors, ja que en el genoma de ratolí no es produeix aquesta agrupació.

En el nostre cas, ens centrarem en la família de receptors d'IL-1, i en conseqüència, en el receptor funcional IL-1R1, el receptor *decoy* IL-1R2, i la proteïna accessòria per a la senyalització IL-1RAcP.

6.1. IL1-R1.

El receptor IL-1R1 va ser descrit per primera vegada en cèl·lules T, fibroblasts i CE, com una proteïna de 80 KDa [Bomstzyk i col., 1989]. Aquest receptor no és molt abundant en la superfície cel·lular. No obstant això, menys d'una desena de receptors units al lligand per cèl·lula són suficients per a induir una intensa resposta [Auron, 1998], ja que el receptor activa múltiples vies que s'indueixen de forma paral·lela.

IL-1R1 en mamífers s'uneix als seus agonistes, IL-1 α i IL-1 β , i a l'antagonista IL-1Ra. El receptor, en humans, conté 7 residus d'aspartat que són llocs de glicosilació, i aquesta glicosilació és un requisit per a la posterior unió de la IL-1 [Einstein i col., 1996]. Un cop el receptor s'ha unit la IL-1, el complex és internalitzat cap al nucli, probablement mitjançant un procés d'endocitosis mediada per receptor [Oakley i col., 2009].

El receptor IL-1R1 és incapaç d'iniciar la senyalització per si mateix. Es necessita la prèvia formació d'un complex entre lligand, receptor i la proteïna IL-1RAcP, per a què es produeixi la correcta transducció del senyal. En la formació d'aquests complexos, la interacció dels dominis TIR, que comportarà una estreta associació espacial, implica canvis en la conformació dels dominis citoplasmàtics. Aquest succés permet el reclutament de la molècula adaptadora, MyD88 [Burns i col., 2000; Oakley i col., 2009], que llavors reclutarà unes serina/treonina cinases, denominades *IL-1R-associated kinase* (IRAK) -1, IRAK-2, IRAK-M i IRAK-4 cap al complex. En aquest procés interaccionen els dominis de mort de la proteïna adaptadora MyD88 i de les cinases [Wesche i col., 1999; Miller i col., 2007].

Estudis d'immunoprecipitació han suggerit que el complex *Toll-interaction protein* (*Tollip*)-IRAK-1 és reclutat cap a IL-1RAcP, mentre que IRAK-2 és reclutada cap a IL-1R1 [Bulut i col., 2001]. IRAK-4 fosforila a IRAK-1, de manera que IRAK-1 es dissocia de *Tollip* i els receptors d'IL-1. Llavors, IRAK-1 i IRAK-2 interactuen amb el factor-6 associat al receptor del factor de necrosi tumoral (TRAF6). A partir d'aquest punt, TRAF6 activa la *transforming growth factor-activated kinase-1* (TAK-1), que de forma subseqüent, activarà els complexos de senyalització mitjançant fosforilació com, per exemple, en el cas de la I κ B cinasa (IKK). [Ninomiya-Tsuji i col., 1999].

Aquesta via de senyalització comportarà l'activació de NF- κ B, un factor de transcripció regulador clau de l'expressió gènica de les vies immunes i d'inflamació, i també a l'activació de les *mitogen activated protein* (MAP)

cinases, p38 i JNK , que també són dianes de fosforilació per a TAK-1 [O'Neill i col., 2000] (Figura 13).

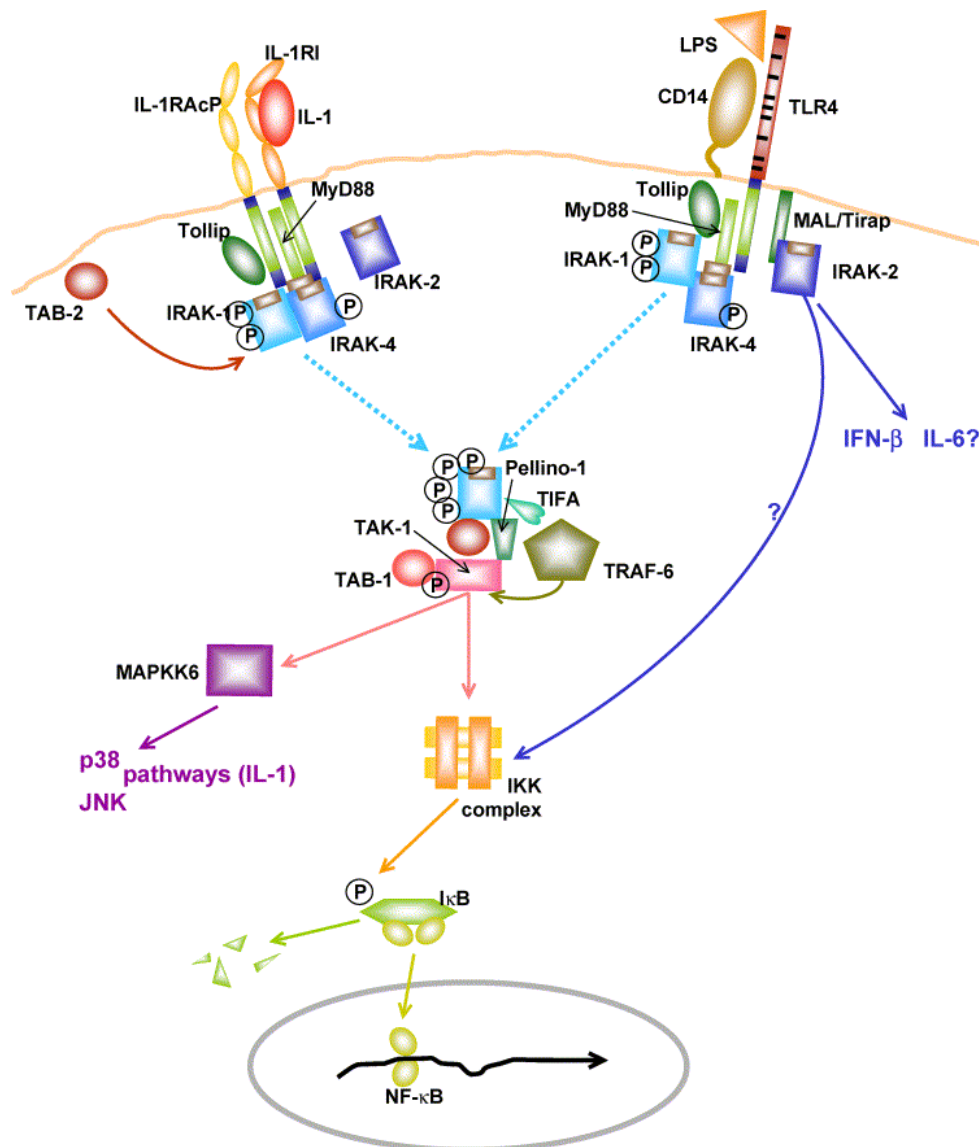


Figura 13. Resum de les vies de transducció del senyal utilitzades pels membres de la superfamília de receptors IL-1R/TLR. La via s'inicia mitjançant l'oligomerització de proteïnes adaptadores i receptors, per interacció mitjançant els dominis TIR. Com a pas final, la fosforilació d'IκB pel complex IKK allibera el factor NF-κB, que és translocat al nucli, donant lloc a la transcripció dels seus gens diana. També s'inicia la senyalització per mitjà de les MAP cinases, que acabarà conduint a la fosforilació de les cinases p38 i JNK, activant el factor de transcripció AP-1 (figura de Subramaniam i col., 2004)

El receptor IL-1R1 pot patir un procés catalític enzimàtic, de manera que s'alliberaria de la superfície de la membrana donant lloc a una forma soluble que manté la capacitat d'unió a IL-1. Aquesta forma soluble s'ha trobat en sèrum, plasma, fluids sinovials i orina en pacients humans sans [Arend i col., 1994]. Alguns estudis han atorgat tant un paper antiinflamatori i immunosupressor per a aquesta forma soluble del receptor [Arend i col., 1994; Fernández-Botran, 1996; Ghivizzani i col., 1998], com un rol agonista per a la mateixa [Preas i col., 1996; Sporri i col., 1998]. Segons això, s'ha postulat que la IL-1 s'uniria a la forma alliberada del receptor, i aquest complex seria capaç d'interactuar amb IL-1RAcP, donant lloc a l'inici de la via de senyalització.

6.2. IL-1R2.

El receptor de 68 KDa IL1-R2 va ser clonat per primera vegada en cèl·lules B humanes i de ratolí. Es troba predominantment en cèl·lules limfoides i mieloides incloent monòcits, neutròfils, macròfags i cèl·lules B [McMahan i col., 1991]. Els limfòcits T i les cèl·lules epitelials també expressen aquest receptor. Posseeix una regió extracel·lular amb 3 dominis *Ig-like* que mostren una relativa homologia en la seva seqüència amb IL-1R1, i un domini intracel·lular extremadament curt, que no té el domini TIR i, en conseqüència, és incapaç de transduir el senyal [Colotta i col., 1993].

IL1-R2 existeix com a receptor transmembrana, encara que també es presenta en forma de receptor soluble. Aquest receptor és capaç de segrestar la IL-1, actuant d'aquesta manera com un regulador negatiu de la via de senyalització d'aquesta citocina per diversos mecanismes:

- El receptor de membrana IL-1R2, en no tenir domini TIR, funciona com un receptor no senyalitzador, ja que és incapaç d'interactuar amb MyD88 i iniciar d'aquesta manera la senyalització.

- Un cop unit a la IL-1, IL-1R2 pot funcionar com un receptor *decoy*, ja que té capacitat per reclutar IL-1RAcP, disminuint així la possibilitat de formar el complex actiu amb el receptor funcional IL-1R1.
- IL-1R2 presenta una afinitat molt baixa per unir-se a l'antagonista endogen IL-1Ra, de manera que les dues molècules funcionen de forma sinèrgica inhibint l'activitat d'IL-1.
- La forma soluble d'IL-1R2 (sIL-1R2), que no posseeix ni domini transmembrana ni tampoc part citoplasmàtica, és capaç d'unir-se a la pro-IL-1 β , bloquejant d'aquesta manera el seu processament enzimàtic cap a IL-1 β . A més, el receptor de tipus 2 disminueix la disponibilitat d'IL-1 unint-se a ella, reduint per aquest mecanisme la unió del receptor funcional de tipus 1 a la citocina.

Diversos estudis han coincidit en atorgar a IL-1R2 un paper com a receptor *decoy* per la IL-1 (Figura 14). Això es veu confirmat pel fet que l'ús d'anticossos que bloquegen IL-1R2 amplifica la resposta de cèl·lules mielomonocítiques a la IL-1, així com també que l'expressió d'aquest receptor és induïda per agents antiinflamatoris [Colotta i col., 1994; Re i col., 1994]. Aquests resultats han estat confirmats i estesos en models *in vitro* i *in vivo*. Experiments de transferència gènica han demostrat que la transferència del gen d'IL-1R2 bloqueja la resposta a IL-1 en diversos models cel·lulars. També s'ha observat que el tractament amb cèl·lules que han rebut la transferència d'IL-1R2 en models de ratolins artrítics, millora notablement aquesta artritis induïda per col·lagen [Re i col., 1996; Penton i col., 1997 ; Bessis i col., 2000].

Segons tot l'exposat, el receptor IL-1R2, el primer receptor *decoy* pur identificat, constitueix una estratègia cel·lular per a evitar una excessiva senyalització induïda per la citocina proinflamatòria IL-1, regulant així la seva acció.

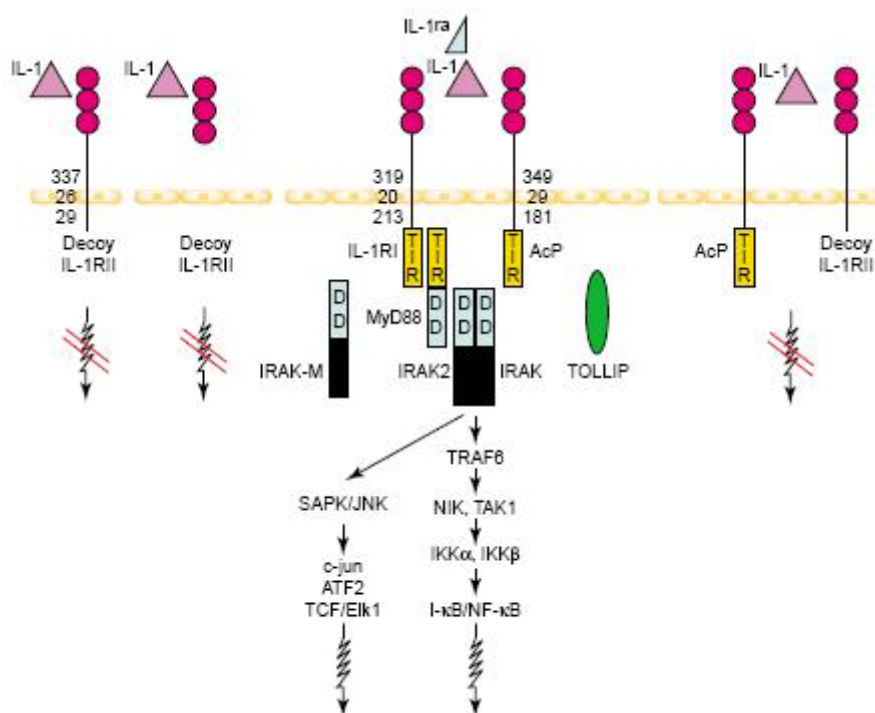


Figura 14. Esquema del sistema de senyalització d'IL-1. El complex de senyalització (IL-1R1 i la proteïna accessòria AcP) activa la cascada per MyD88, que donarà lloc a l'activació de NF- κ B i AP-1. D'altra banda, el receptor IL-1R2, tant en forma de membrana com en forma soluble, captura la IL-1 i evita la formació del complex de senyalització. A més, el receptor de tipus 2 és capaç d'unir-se a IL-1RAcP, evitant que aquesta pugui unir-se al receptor de tipus 1 (figura de Mantovani i col., 2001).

7. Degradació de la matriu extracel·lular i paper de TFPI-2.

Com s'ha explicat anteriorment, la ruptura de la placa d'ateroma i la trombosi posterior provocada per aquesta és la principal causa de síndromes coronàries agudes entre les quals s'inclouen angina inestable, infart de miocardi i mort sobtada [Fuster i col., 1992; 1992]. La composició i la vulnerabilitat de les plaques d'ateroma semblen ser un determinant clau d'aquesta ruptura, més que, per exemple, el seu volum i grau d'estenosi [Falk i col., 1995]. Les plaques "febles", amb un elevat contingut extracel·lular de lípids i èsters de colesterol i una coberta fibrosa fina, són les més vulnerables a la

ruptura [Gutstein i col., 1999]. La inflamació que cursa amb l'aterosclerosi podria ser la causa del trencament de la lesió, amb la subseqüent trombosi [Van der Wal i col., 1994; Shah i col., 1995].

La degradació de la MEC arterial contribueix de manera important a la ruptura de la placa ateroscleròtica. De fet, la pèrdua de col·lagen, que proporciona en condicions normals la principal força tensora a la paret arterial, colocalitza amb aquelles àrees en què es presenten cèl·lules escumoses derivades de macròfags [Newby, 2008]. En lesions en fases més avançades hi ha un gran nucli lipídic en què abunda la presència de macròfags, els quals secreten nombroses proteases extracel·lulars que participen en la degradació de la MEC. Entre elles, trobem serín-proteases, catepsines i MMPs, com les gelatinases MMP-2 i MMP-9 (Figura 15) [Zhou i col., 2003; Dollery i col., 2006]. Aquestes proteases, i en particular les MMPs, han estat associades amb nombrosos processos patològics, entre els quals podem destacar la invasió tumoral i metàstasi, artritis reumatoide, cirrosi hepàtica o aterosclerosi [Amalinei i col., 2010]. L'activitat d'aquestes MMPs es veu incrementada per l'activació de la forma de proenzim mitjançant cascades proteolítiques, normalment degut a altres MMPs [Nagase i col., 2006], entre les quals destaquen les gelatinases MMP-2 i MMP-9. Per regular l'activitat de les MMPs, i evitar una excessiva degradació principalment del col·lagen i altres components de la MEC, que pot portar a una situació patològica, les cèl·lules locals expressen inhibidors endògens, que són anomenats inhibidors tissulars de metal·loproteases (TIMPs) [González i col., 2007].

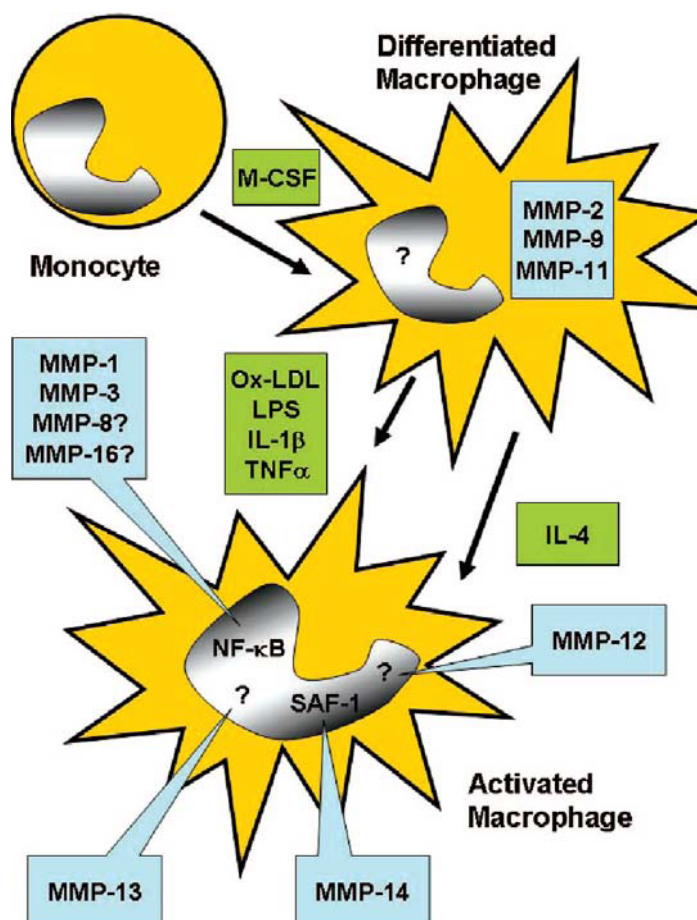


Figura 15. Els macròfags expressen una major quantitat de MMPs degut a la diferenciació. Nombrosos mediadors inflamatoris i ò aterogènics (LPS, oxLDL, IL-1β, TNF-α) presenten efectes agonistes en l'expressió de les MMPs, fet que suggereix que els macròfags reclutats en l'íntima arterial resulten més invasius i destructius per a la MEC que els monòcits no diferenciats. Els factors de transcripció NF-κB i SAF-1 estan implicats en aquest augment de MMPs a causa de l'activació dels macròfags, però els mecanismes encara no es coneixen en profunditat (figura de Newby, 2008).

Entre les molècules que modulen la degradació de la MEC trobem també l'inhibidor de tipus 2 del factor tissular (*tissue factor pathway inhibitor 2* o TFPI-2). El TFPI-2 humà va ser purificat originalment de teixit placentari com una glicoproteïna de 27-33 KDa, que va ser anomenada proteïna placentària 5 (PP5) [Bohn i Sedlacek, 1975; Bohn i Winckler, 1977]. Hi ha 3 isoformes producte del mateix gen, que difereixen en el grau de glicosilació. PP5 va ser descrita com un inhibidor de l'activitat aminolítica de plasmina, tripsina, cal·licreïna

plasmàtica i també de l'efecte proteolític de la trombina sobre el fibrinogen [Butzow i col., 1988]. Pertany a una família de proteïnes anomenada “tipus Kunitz”, que inclou entre altres l'aprotinina i l'inhibidor de tipus 1 del factor tissular (TFPI). Totes elles presenten els anomenats “dominis Kunitz”, dominis actius que inhibeixen la funció d'enzims de degradació de proteïnes (Figura 16).

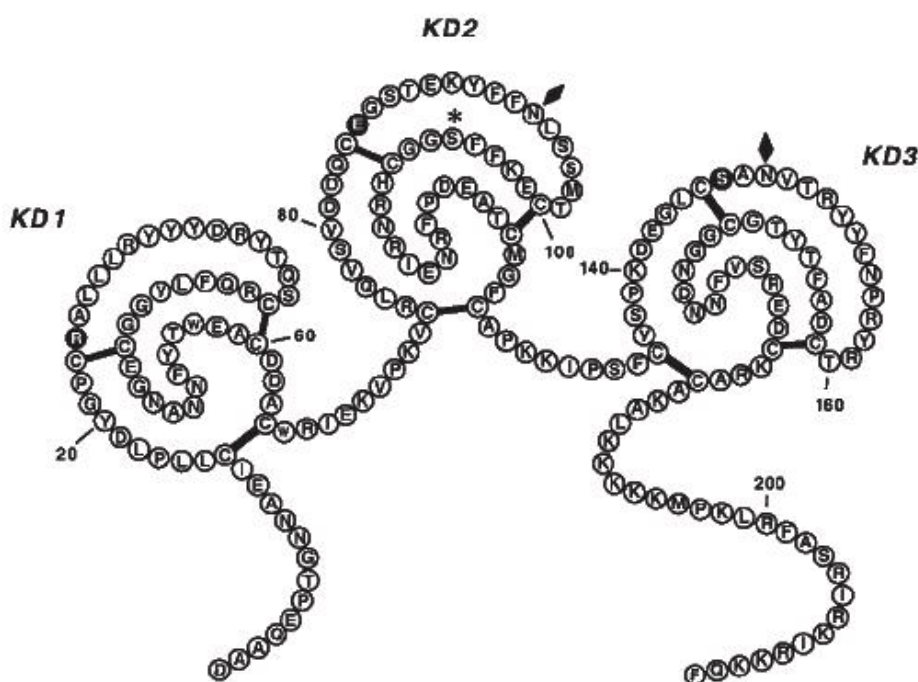


Figura 16. Estructura secundària del TFPI-2 humà. Els dominis Kunitz (KD) es mantenen per ponts disulfur, que han estat representats com a línies sòlides. Els llocs de glicosilació putatius estan assenyalats per ▲, i hi ha un possible lloc de fosforilació per a la PKC assenyalat per un *, a la volta interna del domini KD2 (figura de Chand i col., 2005).

Hi ha una gran varietat de teixits humans que expressen TFPI-2 a més de la placenta: el fetge, el múscul esquelètic, el cor, els ronyons i el pàncrees [Miyagi i col., 1994]. En els vasos sanguinis sans, únicament s'ha detectat TFPI-2 en l'endoteli vascular. No obstant això, en teixit de pacients afectats per aterosclerosi, s'ha vist que TFPI-2 s'expressa en macròfags, cèl·lules T, CE i CML [Herman i col., 2001].

Nombrosos mediadors inflamatoris, com èsters de forbol, citocines i lipopolisacàrid (LPS), regulen l'expressió de TFPI-2 [Iino i col., 1998], encara que les senyalitzacions intracel·lulars que provoquen un augment o disminució de l'expressió de TFPI-2 no s'han definit de forma clara. Diferents estudis han relacionat un augment paral·lel de l'AMP cíclic i de la via dependent de la proteïna cinasa C (PKC) amb l'expressió de TFPI-2 [Butzow i col., 1988], així com elements de la cascada de senyalització del sistema MAPK/ERK [Shinoda i col., 1999]. Més concretament, la MKK7 s'ha relacionat amb l'expressió de TFPI-2, de manera que aquesta cinasa podria ser l'efector que controlaria la resposta cel·lular a diferents estímuls extracel·lulars com IL-1 o TNF- α en l'expressió de TFPI-2, mitjançant l'activació de JNK [Wolter i col., 2002; Chand i col., 2005]. En aquest sentit, s'ha demostrat que CE estimulades amb IL-1 augmenten l'expressió de TFPI-2 de manera temps i dosi dependent, mitjançant la via de les MAPK [Xu i col., 2006].

En cèl·lules renals l'expressió de TFPI-2 es veu augmentada per trombina, a través dels receptors PAR (*protease-activated receptor*) [Neaud i col., 2004]. Aquesta inducció es pot bloquejar amb l'ús d'inhibidors específics de la ciclooxygenasa-2 (NS-398), o de la via de les MAPK (PD98059). Aquest fet podria representar un sistema de regulació de l'activitat trombogènica de la trombina, ja que el TFPI-2 és un inhibidor en la gènesi d'aquesta.

La funció fisiològica de TFPI-2 encara no s'ha descrit amb exactitud. No obstant això, cada vegada hi ha més evidències que es diposita majoritàriament en la MEC, on se suposa que actua regulant la seva remodelació (Figura 17). Així, un dels papers més importants de TFPI-2 in vivo està relacionat amb la inhibició de la plasmina [Rao i col., 1998, 1999], la qual pot degradar alguns components de la MEC, a més de potenciar l'activació de MMPs. Alguns estudis han suggerit que TFPI-2 té capacitat d'inhibició directa de les MMPs [Herman i col., 2001; Kong i col., 2004], mitjançant interacció d'aquestes amb el domini Kunitz KD1, de forma similar amb el que succeeix en el cas de la plasmina o la tripsina. Però els estudis d'unió entre TFPI-2 silvestre i MMP-2, MMP-9 o MMP-1 van donar resultats negatius [Du i col., 2003]. En conseqüència, és probable que TFPI-2 no sigui un inhibidor directe de la MMP-

1 ni formi estructures estables amb MMP-2 o MMP-9, sinó que inhibeixi de manera indirecta l'activació de certes proMMPs gràcies a la inhibició de serín proteases com la tripsina o la plasmina [Rao i col., 1999].

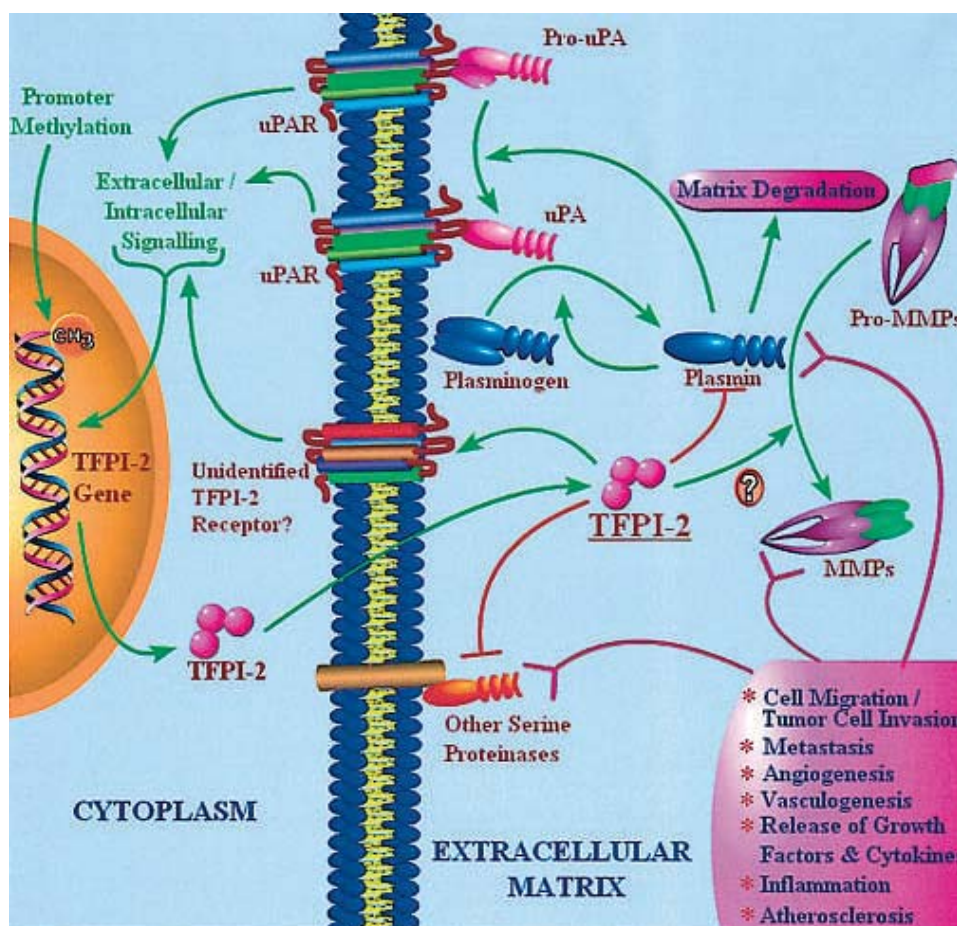


Figura 17. Diversos rols de TFPI-2 en la remodelació tissular. La seva funció més estudiada és la d'inhibidor de diverses serín-proteases com la plasmina, implicada directament en la degradació de la MEC i en l'activació de MMPs. El gen de TFPI-2 és regulat per metil·lació del promotor, així com per diferents senyals extra- i intracel·lulars (figura de Chand i col., 2005).

Degut a la seva capacitat d'inhibir proteases relacionades amb la degradació de la MEC, TFPI-2 pot tenir importants implicacions en el desenvolupament i estabilitat de les plaques ateroscleròtiques. Anàlisis immunohistoquímiques han indicat que zones susceptibles de patir una ruptura

de la placa ateroscleròtica presentaven menys senyal de TFPI-2, el que suggereix que una disminució de TFPI-2 provoca una desregulació de les MMPs que condueix a la ruptura de la placa. Per altra banda, s'ha detectat la presència de TFPI-2 en àrees de l'ateroma on colocalitza amb el factor tissular i el factor VII de la coagulació. La detecció de TFPI-2 a la proximitat de plasmina/plasminogen en macròfags i CE fa pensar que aquest està relacionat amb la regulació de l'activitat de la plasmina i altres mecanismes proteolítics que es desenvolupen durant la progressió de la lesió ateroscleròtica [Crawley i col., 2002].

A més de la regulació del recanvi de la MEC, TFPI-2 s'ha relacionat amb altres processos com ara la migració i proliferació cel·lular, i la generació de trombina a la paret del vas [Neaud i col., 2000]. Atès que l'aterosclerosi es considera una inflamació crònica íntimament lligada a tots aquests processos [Ross, 1999], canvis en l'expressió de TFPI-2 poden tenir una significació rellevant en el desenvolupament d'aquesta malaltia en les seves diverses fases.

OBJECTIUS

Com s'ha comentat anteriorment, l'aterosclerosi és una malaltia multifactorial dependent en gran part de factors ambientals, però amb una forta base genètica que pot predisposar a patir-la. Però a més de la susceptibilitat individual, en el desenvolupament d'aquesta patologia tenen una gran importància les modificacions en l'expressió gènica que es produeixen en les cèl·lules com una resposta homeostàtica davant d'estímuls de tipus pro-aterogènic. Aquesta resposta és un intent de corregir o adaptar la funció cel·lular davant l'estímul, però pot acabar contribuint al desenvolupament de la malaltia. Per altra banda, molts dels fàrmacs emprats en el tractament i prevenció de l'aterosclerosi i les seves complicacions actuen en gran part modificant l'expressió o activitat d'alguns dels gens relacionats amb aquesta patologia.

La complexitat d'aquests processos, i l'elevat nombre de gens que poden estar-hi implicats, en gran mesura desconeguts, constitueixen un repte per a la comunitat científica. El seu coneixement permetrà una millor comprensió dels mecanismes moleculars que condueixen al desenvolupament de l'aterosclerosi, i per tant, permetrà dissenyar estratègies terapèutiques per tal de prevenir-la o frenar-la.

En aquest context, l'objectiu general de la present tesi doctoral ha estat contribuir a un millor coneixement de la regulació de l'expressió gènica en monòcits i macròfags, cèl·lules clau en totes les etapes de l'aterogènesi, com a resposta davant diferents condicions pro-aterogèniques i/o fàrmacs. La consecució d'aquest objectiu ha portat a la realització dels quatre treballs que es presenten, els objectius específics dels quals han estat:

- I. Estudiar l'efecte del ritonavir sobre l'expressió de gens que controlen l'acumulació de colesterol en macròfags d'origen humà THP-1.
- II. Determinar el perfil d'expressió gènica en monòcits de pacients amb hiperlipèmia familiar combinada, abans i després d'un tractament amb atorvastatina, mitjançant la utilització de *microarrays* de cDNA.

III. En models *in vitro* (macròfags THP-1 i/o cultiu primari de macròfags derivats de monòcits humans), determinar l'efecte d'estímuls pro-aterogènics sobre l'expressió dels gens més rellevants identificats en l'anterior objectiu, explorant les vies de senyalització intracel·lulars que resulten afectades.

II. RESULTATS

I

Ritonavir Increases CD36, ABCA1 and CYP27 Expression in THP-1 Macrophages

Jordi Pou, Alba Rebollo, Núria Roglans, Rosa M. Sánchez, Manuel Vázquez-Carrera, Juan C. Laguna, Juan Pedro-Botet, Marta Alegret

Experimental Biology and Medicine (2008); 233 (12):1572-1582

L'objectiu d'aquest treball va ser determinar si el ritonavir, un inhibidor de proteases utilitzat freqüentment com a part del tractament antiretroviral en malalts infectats pel VIH, induïa canvis en l'expressió d'alguns dels gens involucrats en el transport de colesterol en monòcits/macròfags.

Per realitzar els experiments presentats en aquest article, es van utilitzar monòcits humans de la línia THP-1, com a tals o bé diferenciats a macròfags per exposició a un èster de forbol, que es van tractar amb concentracions creixents de ritonavir (0.05-2.5 µg/ml) durant 24 h, en absència de lipoproteïnes.

Els nostres resultats van mostrar que el ritonavir, a una concentració de 2.5 µg/ml, incrementava l'expressió proteica i d'RNAm de CD36, un receptor implicat en la captació i acumulació de lípids. La inducció es va observar en macròfags diferenciats, però no en monòcits. El ritonavir també va produir un increment en l'expressió de PPAR_γ en macròfags, possiblement mediat per un increment en la forma madura de SREBP-1, però aquest efecte no semblava estar relacionat amb la inducció de l'expressió de CD36, que no revertia per co-incubació amb l'antagonista de PPAR_γ GW9662.

El ritonavir també va alterar l'expressió de gens implicats en la sortida de colesterol del macròfag: l'expressió proteica de SR-BI va resultar reduïda, mentre que l'expressió gènica d'ABCA1 i de l'esterol 27-hidroxilasa (CYP27) va augmentar. L'increment en l'expressió de CYP27 es relaciona amb l'efecte del ritonavir sobre PPAR_γ, ja que va ser revertit per l'antagonista GW9662. En canvi, la inducció d'ABCA1 no dependria de PPAR_γ sinó que podria estar relacionada amb l'activació de LXR_α. D'acord amb aquesta hipòtesi, el ritonavir va incrementar l'expressió de LXR_α a nivell gènic i proteic, així com també la seva activitat d'unió a l'element de resposta a LXR situat al promotor d'ABCA1.

En resum, l'increment en l'expressió d'ABCA1 i d'altres mediadors de l'eflux de colesterol del macròfag, com CYP27, podria compensar la inducció de CD36 produïda pel ritonavir, de manera que el seu efecte, almenys en absència de lipoproteïnes, no és clarament pro-aterogènic.

Ritonavir Increases CD36, ABCA1 and CYP27 Expression in THP-1 Macrophages

JORDI POU,* ALBA REBOLLO,* NÚRIA ROGLANS,* ROSA M. SÁNCHEZ,*
 MANUEL VÁZQUEZ-CARRERA,* JUAN C. LAGUNA,* JUAN PEDRO-BOTET,†
 AND MARTA ALEGRET*,¹

*Pharmacology Department, Faculty of Pharmacy and Biomedicine Institute (IBUB), University of Barcelona, and Ciber Diabetes y Enfermedades Metabólicas asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III, Spain and †Department of Medicine, Hospital del Mar, Universidad Autónoma de Barcelona, Spain

Ritonavir, a protease inhibitor used in combination antiretroviral therapy for HIV-1 infection, is associated with an increased risk of premature atherosclerosis. The aim of the present study was to assess the effects of ritonavir, in the absence of added lipoproteins, on the expression of genes that control cholesterol trafficking in human monocytes/macrophages. **Design:** THP-1 cells were used to study the effects of ritonavir on the expression of CD36, ATP binding cassette transporters A1 (ABCA1) and G1 (ABCG1), scavenger receptor B class I (SR-BI), caveolin-1 and sterol 27-hydroxylase (CYP27). Exposure to ritonavir (2.5 µg/ml) increased CD36 protein (28%, $P < 0.05$) and mRNA (38%, $P < 0.05$) in differentiated THP-1 macrophages, but not in undifferentiated monocytes. This effect was not related to the increase in PPAR γ expression (51%, $P < 0.05$) caused by ritonavir. Ritonavir also reduced SR-BI protein levels (46%, $P < 0.05$) and increased CYP27 (43%, $P < 0.05$) and ABCA1 (49%, $P < 0.05$) mRNA expression. Liver X receptor α (LXR α) mRNA, protein and binding activity were also increased by ritonavir treatment. **Conclusions:** We propose that ritonavir induces ABCA1 expression in THP-1 macrophages through LXR α . The increase in ABCA1 and other cholesterol efflux mediators, such as CYP27, may compensate CD36 induction. Therefore, we suggest that the net effect of ritonavir on macrophages in the absence of lipoproteins is not clearly pro-atherogenic. *Exp Biol Med* 233:1572–1582, 2008

Key words: ritonavir; macrophage; CD36; ABCA1; sterol 27-hydroxylase

Combination antiretroviral therapy (CART) has dramatically changed the natural history of human immunodeficiency virus (HIV) infection, leading to a significant decrease in morbidity and mortality and a notable prolongation of life expectancy (1, 2). However, the potential for maintaining HIV-infected patients on treatment for decades may be limited by the various adverse effects observed in patients on CART such as dyslipidemia, fat redistribution, insulin resistance and premature atherosclerosis (3–6), particularly when therapy contains protease inhibitors (PIs) (7–11). This fact has raised the concern that the HIV-infected population may be at increased risk for cardiovascular disease in the long term, as described in two large prospective studies (12, 13). At present, the relationship between PIs and atherosclerosis in HIV-infected patients remains unclear, and the mechanisms underlying this association remain unknown. In addition to their proatherogenic metabolic abnormalities, direct effects of PIs on different cell types involved in atherogenesis have been reported (14–19).

One of the earliest events in atherosclerosis development is macrophage lipid loading, which leads to foam cell and fatty streak formation. This process is mediated by a group of scavenger receptors expressed on these cells, particularly SR-A and CD36 (20). An early and marked down-regulation of CD36 on monocytes induced by PIs has been proposed as a possible cause of insulin resistance and dyslipidemia in HIV-infected patients (21). In contrast, other authors described a PI-driven up-regulation of CD36 leading to accumulation of sterols in macrophages, thereby implying a proatherogenic effect of PIs (19, 22, 23). In addition to the opposing findings of these studies, which could be explained at least in part by differences in experimental design, data on other molecules involved in macrophage cholesterol efflux, such as ATP-binding cassette transporters ABCA1 (24) and ABCG1 (25), scavenger receptor class B type I (SR-BI) (26), sterol 27-

¹ To whom correspondence should be addressed at Diagonal 643, Barcelona 08028, Spain. E-mail: alegret@ub.edu

Received May 5, 2008.
 Accepted July 31, 2008.

DOI: 10.3181/0805-RM-144
 1535-3702/08/23312-1572\$15.00
 Copyright © 2008 by the Society for Experimental Biology and Medicine

Table 1. Primers Used for the Polymerase Chain Reaction (PCR)^a

| Gene | Gene sequence of primers (5'-3') | Product length (bp) | Number of cycles | Linear range |
|---------------|--|---------------------|------------------|--------------|
| ABCA1 | forward: GGAGGCAATGGCACTGAGGAA reverse: CCTGCCTTGTGGCTGGAGTGT | 181 | 18 | 18–23 |
| ABCG1 | forward: CCATGATGGTGTGCGCACATC reverse: GCTGGTGGGCTCATCGAAGAA | 206 | 22 | 20–25 |
| Caveolin-1 | forward: ACAAGCCCAACAACAAGGCCA reverse: GAGGGCAGACAGCAAGCGGTA | 245 | 25 | 20–25 |
| CD36 | forward: CTGTGACCGGAAGTGTGGGCT reverse: GAAGATGGCACCATTGGGCTG | 361 | 18 | 18–23 |
| CYP27 | forward: GCCATGGGCAGCCTGCCTGA reverse: CTTGCGAGGAGTAGCTGCATC | 502 | 23 | 20–25 |
| SR-BI | forward: ACGACACCGTGTCTTCTCG reverse: CGGGCTGTAGAACTCCAGCGA | 509 | 19 | 18–23 |
| PPAR γ | forward: CATTCTGGCCCACCAACTTTGG reverse: TGGAGATGCAGGCTCCACTTTG | 229 | 20 | 19–23 |
| LXR α | forward: AGCCCCCTTCAGAACCACAG reverse: AGGACACACTCCTCCCGCATG | 295 | 23 | 20–25 |
| GAPDH | forward: CAGTCCATGCCATCACTGCCA reverse: AGGTGGAGGAGTGGGTGTCCG | 302 | 18 | 18–23 |

^a Primers' sequences, length, number of cycles and linear range for each of the studied genes.

hydroxylase (CYP27) (27) and caveolin-1 (28) are lacking. Thus, the aim of the present study was to assess the effects of ritonavir, in the absence of added lipoproteins, on the expression of genes that control cholesterol trafficking in THP-1 monocytes/macrophages.

Materials and Methods

Cell culture reagents were from Gibco, Invitrogen Corporation, with the exception of fetal bovine serum, purchased from Sigma-Aldrich. Trizol and RT-PCR reagents were from Invitrogen Corporation, except for the random hexamers and specific primers obtained from Roche Diagnostics, and α -[³²P]dATP from Amersham Biosciences. Antibodies against SR-BI and ABCA1 were from Novus Biologicals, against SREBP-1 from Santa Cruz, and anti- β -actin antibody was from Sigma-Aldrich. Other general chemicals were obtained from commercial sources and were of analytical grade.

Cell Culture. THP-1 monocytoid cells were obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECACC) and kept in RPMI 1640 medium with 25 mM Hepes Buffer supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine 200 mM, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin at 37°C in 5% CO₂. Monocytes were exposed to complete medium supplemented with 50 ng/ml PMA for 24 h and then incubated with different ritonavir concentrations (0.05–2.5 μ g/ml) for 24 h. In some cases, non-differentiated THP-1 monocytes were also used. Drug solutions were prepared in ethanol, with the final ethanol concentration being 0.1%.

Cytotoxicity Assays. Release of lactate dehydrogenase (LDH) into the culture medium was evaluated after 24 h of incubation with various concentrations of ritonavir (0.05–10 μ g/ml) by using the LDH assay kit (Roche

Molecular Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's protocol. The spectrophotometric absorbance of the colored formazan was determined at 490 nm wavelength and 690 nm reference wavelength. LDH release was measured as percentage of LDH leakage:

$$\%LDH \text{ release} = [(A_S - A_L)/(A_H - A_L)] \times 100,$$

where, A_S = absorbance of the treated sample, A_L = absorbance of control sample (low control), and A_H = absorbance of samples treated with 0.3% triton-X100 (a control for maximum LDH release (high control)). Results of three independent experiments (by duplicate) are expressed as average percentages \pm standard deviation.

Cell viability was also determined by measuring the ability of THP-1 cells to reduce MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] and form a formazan product, which can be quantified spectrophotometrically at 570 nm (29). Results are expressed as % versus the absorbance of control samples, and are the mean \pm standard deviation of three independent experiments performed in duplicate.

RNA Preparation and Analysis. Specific mRNA levels were assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), as previously described (30). The sequences of the forward and reverse primers used for PCR amplification, length of the PCR product, number of cycles used in the PCR and linear range for the amplification are given in Table 1. PCR was performed in an MJ Research Thermocycler equipped with a peltier system and temperature probe. Results for specific mRNA expression were normalized to the expression of the control gene (*gadh*), and expressed as expressed as the change in gene expression in percentage compared with the control situation (100%).

Western Blot Analysis. Protein extracts from con-

Table 2. Effects of Ritonavir on Cell Viability in THP-1 Macrophages^a

| Control | 0.05 µg/ml | 0.1 µg/ml | 0.25 µg/ml | 0.5 µg/ml | 1 µg/ml | 2.5 µg/ml | 5 µg/ml | 10 µg/ml |
|------------------------------------|------------|-----------|------------|-----------|------------|------------|--------------|---------------|
| LDH leakage assay (% cytotoxicity) | | | | | | | | |
| 8.6 ± 3.1 | 8.9 ± 3.7 | 7.4 ± 3.0 | 8.5 ± 4.5 | 7.6 ± 6.0 | 11.2 ± 5.1 | 15.8 ± 6.0 | 27.1 ± 8.8** | 45.4 ± 4.1*** |
| MTT assay (% cell viability) | | | | | | | | |
| 100 | 101 ± 7 | 95 ± 13 | 90 ± 13 | 95 ± 15 | 82 ± 22 | 84 ± 24 | nd | nd |

^a LDH release to the medium was determined on THP-1 macrophages treated with vehicle alone (control) or with 0.05–10 µg/ml ritonavir for 24 h, and results are expressed as percentage of cytotoxicity as described in the Methods section. The MTT assay was also performed on THP-1 macrophages treated with vehicle alone (control) or with 0.05–2.5 µg/ml ritonavir for 24 h, and results are expressed as percentage of viability compared to vehicle-treated cells (control group), which was set at 100%.

** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (ANOVA test).

control and treated cells were obtained as previously described (31), and membrane and crude nuclear fraction were prepared from THP-1 macrophages according to Matsuoka et al. (32) with several modifications. Briefly, cells were homogenized in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 10 µM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin and 1 mM sodium orthovanadate, and centrifuged at 21,000 g at 4°C for 20 min. The supernatant was used as the membrane fraction and the pellets were resuspended in RIPA buffer (Sigma), kept on ice for 30 min and centrifuged at 12,000 g at 4°C for 15 min. The supernatant was then used as the nuclear fraction. Forty µg of protein were subjected to 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred to Immobilon polyvinylidene difluoride transfer membranes (Millipore). The membranes were blocked for 1 h at room temperature in phosphate saline buffer containing 5% non-fat dry milk, and proteins were immunologically detected using rabbit polyclonal antibodies against SR-BI (dilution 1:500, 1.5 h at room temperature), ABCA1 (dilution 1:500, overnight at 4°C) and SREBP-1 (1:200 dilution, overnight at 4°C) or a goat polyclonal antibody against LXR α (1:100 dilution, overnight at 4°C).

After several washes, blots were incubated with an appropriate secondary antibody, and detection was achieved using the enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (Amersham Bioscience). Blots were also incubated with a monoclonal antibody raised against β -actin used as a control of equal loading of protein. Size of detected proteins was estimated using protein molecular-mass standards (BioRad). Chemiluminescence was detected using a Chemidoc XRS (BioRad), and densitometric analysis was performed by Quantity One[®] software. Each band was quantified and normalized to β -actin signal. Protein levels are expressed as percentage of controls (100%).

Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA). The DNA sequence of the double-stranded oligonucleotide used (LXR response element from ABCA1 promoter) was 5'-TGGGCTTTGACCGATAGTAACCTCTGCGC-3' (33). Oligonucleotides were labeled in the following reaction: 2 µl of oligonucleotide (100 ng/µl), 2 µl of 5 × kinase buffer, 5 U of T4 polynucleotide

kinase (Invitrogen Life Technologies), and 3 µl of [γ -³²P] ATP (3000 Ci/mmol at 10 mCi/ml, Amersham Biosciences) incubated at 37 °C for 2 h. The reaction was stopped by adding 90 µl of TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4) and 1 mM EDTA). To separate the labeled probe from the unbound ATP, the reaction mixture was eluted in a Nick column (Pharmacia) according to the manufacturer's instructions. Three micrograms of crude nuclear proteins was incubated for 10 min on ice in binding buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.1 mM EDTA (pH 8.0), 5% glycerol, 5 mg/ml BSA and 50 µg/ml poly(dI-dC)), in a final volume of 10 µl. Labeled probe (approximately 70,000 cpm) was added and the reaction was incubated for 20 min at room temperature. Where indicated, non-radioactive specific competitor oligonucleotide was added before the addition of labeled probe and incubated for 15 min on ice. Radioactive bands were quantified by video-densitometric scanning.

Flow Cytometry for Surface Expression of CD36. Immunofluorescent flow cytometry was carried out using a FITC-conjugated mouse monoclonal antibody against CD36 (Serotec), as previously described (34), and analyzed with a flow cytometer (Epics XL).

Statistical Analysis. Data are presented as mean \pm standard deviation. An analysis of variance (ANOVA), combined with the Student-Newman-Keuls test, was used to evaluate the statistical significance of the differences. The GraphPad InStat computer program was used for the calculations.

Results

Ritonavir Increased CD36 and ABCA1 and Reduced SR-BI Protein Levels. Since ritonavir concentrations reported for in vitro studies with macrophages vary widely, we first treated THP-1 cells with increasing concentrations (from 0.05 to 10 µg/ml) and evaluated cytotoxicity by two methods: LDH leakage and MTT. Both assays showed that cytotoxicity was marked at concentrations higher than 2.5 µg/ml (Table 2). THP-1 monocytes and macrophages were then treated with ritonavir (0.05–2.5 µg/ml) and protein levels of CD36, ABCA1 and SR-BI were determined. At the highest concentration tested,

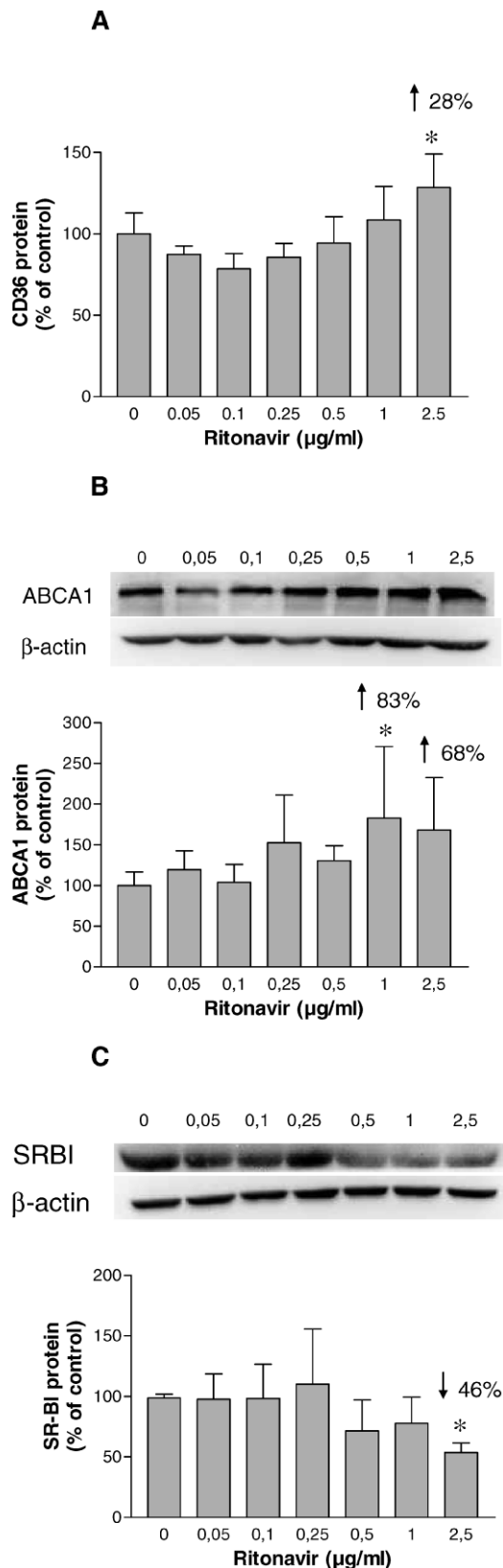


Figure 1. Ritonavir increases CD36 and ABCA1 protein levels. THP-1 macrophages were incubated with various concentrations (0.05–2.5 µg/ml) of ritonavir during 24 h. **A:** Analysis of CD36 surface protein expression by flow cytometry, using a FITC-conjugated antibody against CD36. Data are expressed as the percentage of

ritonavir increased CD36 cell surface expression by 28% (Fig. 1A, $P < 0.05$), while it was ineffective on non-differentiated THP-1 monocytes (data not shown). Ritonavir treatment also increased macrophage ABCA-1 protein levels (Fig. 1B, 83% increase at 1 µg/ml, $P < 0.05$), while SR-BI protein expression was significantly reduced (Fig. 1C, 46% decrease at 2.5 µg/ml, $P < 0.05$).

Ritonavir Increased CD36 and ABCA1 mRNA Expression. THP-1 macrophages were treated with ritonavir (1 and 2.5 µg/ml) and RT-PCR analysis was performed to ascertain whether changes in protein levels were associated with modifications in the corresponding mRNA. Results showed that ritonavir treatment increased CD36 mRNA by 38% (Fig. 2A, $P < 0.05$) and ABCA1 mRNA (32% and 49% increase at 1 and 2.5 µg/ml, respectively, $P < 0.05$, Fig. 2B), while SR-BI mRNA levels were not significantly altered (Fig. 2C). In addition, the mRNA expression of two other molecules involved in cholesterol efflux, ABCG1 and caveolin-1 (cav-1) was analyzed. As shown in Figure 2D–E, the expression of both genes was unaffected by exposure to ritonavir.

PPAR γ Expression Was Increased in Ritonavir-Treated Macrophages. Treatment with 2.5 µg/ml ritonavir raised PPAR γ mRNA levels by 51% ($P < 0.05$) (Fig. 3A). It has been suggested that the effects of PIs on PPAR γ could be mediated by activated SREBP accumulation in the macrophage nucleus. Immunoblot analysis of the membrane fraction of cell homogenates revealed a band at ~125 kDa corresponding to the precursor form (pSREBP-1), and a ~67-kDa protein in the nuclear fraction corresponding to active nuclear form (nSREBP-1). Ritonavir treatment (2.5 µg/ml, 24 h) did not change pSREBP-1 levels compared with control, whereas nSREBP-1 abundance was significantly increased (Fig. 3B).

To further explore the involvement of PPAR γ in the observed ritonavir effects, we treated the cells with ritonavir alone or combined with a PPAR γ antagonist (GW9662, 20 µM) or a PPAR γ agonist (rosiglitazone, 2 µM) and determined the expression levels of CD36, ABCA1 and sterol 27-hydroxylase (CYP27), another protein related to cholesterol efflux known to be induced by PPAR γ agonists. Our results showed that pre-treatment with GW9662 did not block the increase in CD36 or ABCA1 mRNA levels (Fig. 4A–B). In fact, ABCA1 induction was significantly greater when GW9662 was present (116% vs 47% increase in the absence of GW9662, $P < 0.001$). Interestingly, 2.5 µg/ml ritonavir increased the mRNA levels of CYP27 by 43% (P

←
mean fluorescence intensity \pm SD of 3 independent experiments run in duplicate. **B, C:** Whole protein extracts (40 µg) were resolved in 12% SDS-polyacrylamide gel. The blots were analysed with anti-ABCA1 (**B**) and anti-SR-BI (**C**) antibodies. Representative autoradiograms are shown. Bands were quantified, normalized to β -actin signal and the change in protein expression was calculated in comparison with the control situation (100%). Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD) of 3–4 independent experiments run in duplicate. * $P < 0.05$ versus control cells (ANOVA test).

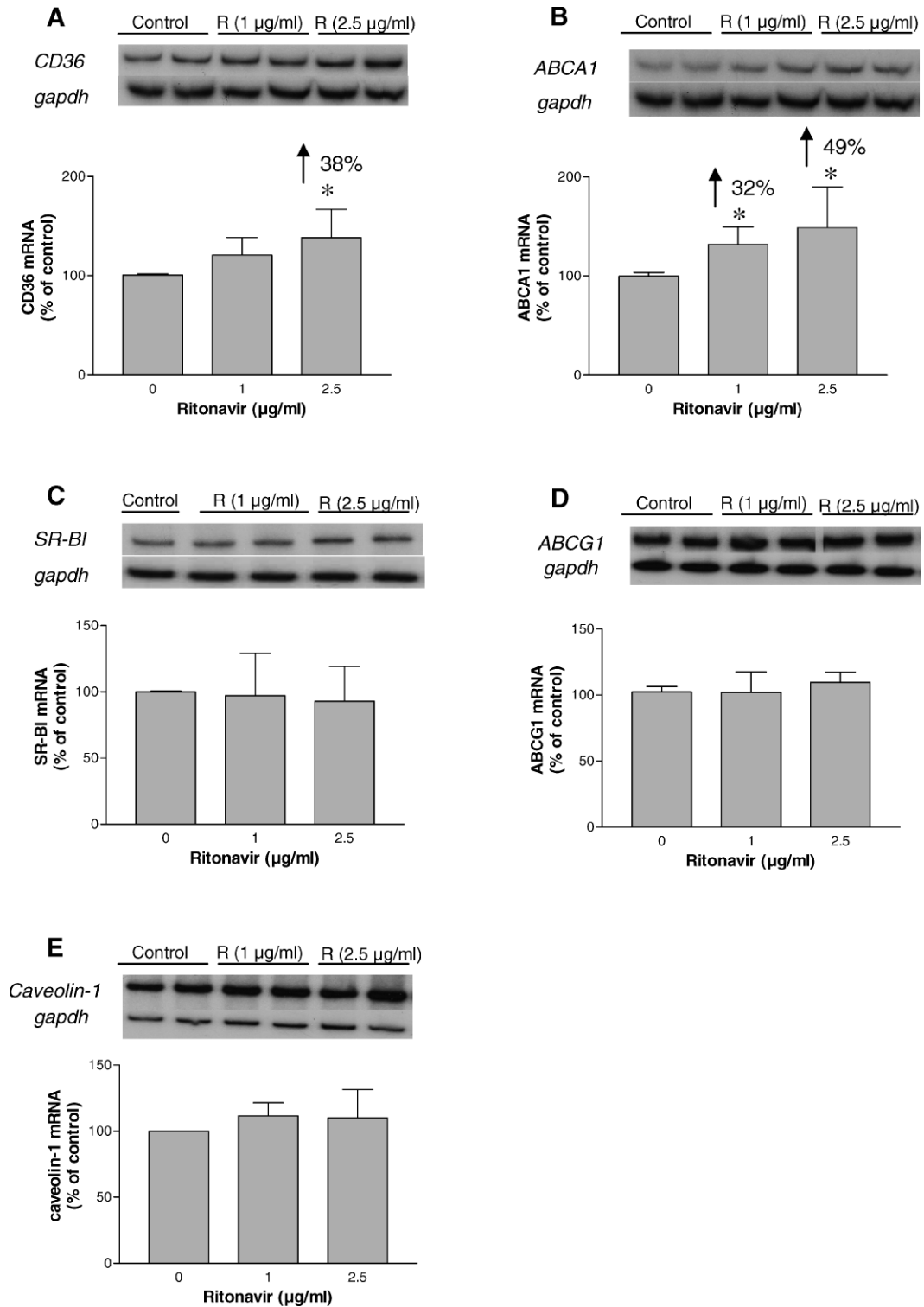


Figure 2. Ritonavir increases CD36 and ABCA1 mRNA expression. THP-1 macrophages were incubated in the absence (CT) or in the presence of ritonavir (1 and 2.5 µg/ml) during 24 h. Analysis of CD36 (A), ABCA1 (B), SR-BI (C), ABCG1 (D) and caveolin-1 (E) mRNA levels. 0.5 µg of total RNA was analyzed by RT-PCR. Representative autoradiograms are shown. Bands were quantified, normalized to the gapdh signal and the change in mRNA levels was calculated in comparison with the control situation (100%). Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD) of 3 independent experiments run in duplicate. * $P < 0.05$ versus corresponding control cells (ANOVA test).

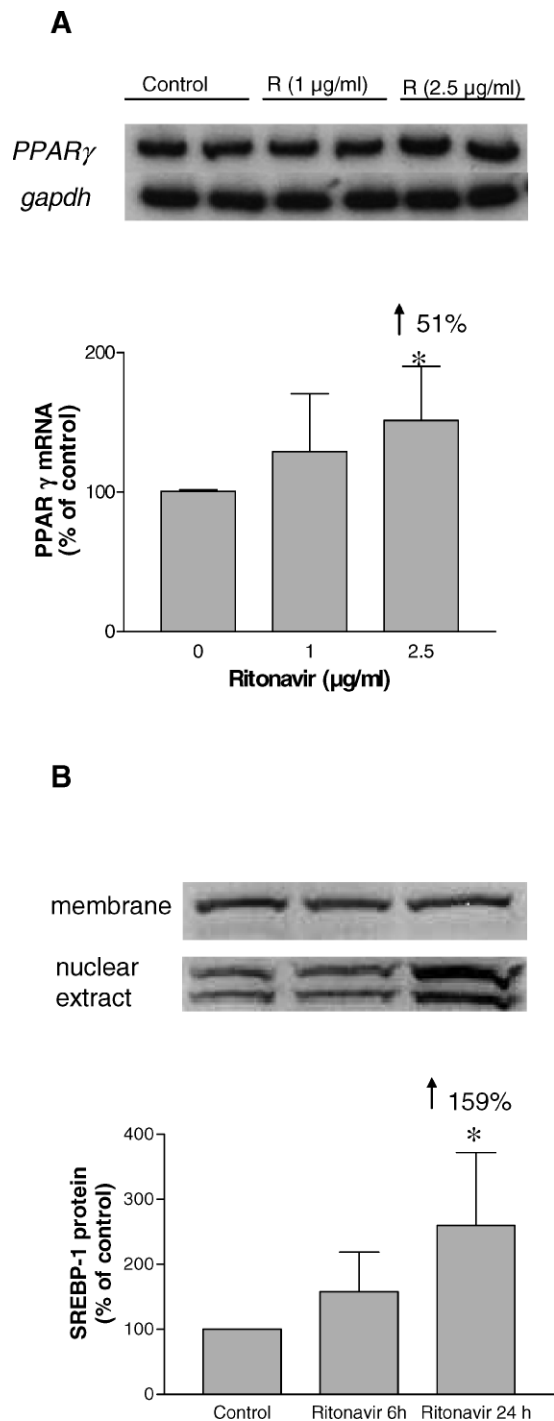


Figure 3. PPAR γ expression and mature SREBP-1 are increased in ritonavir-treated macrophages. **A:** Analysis of PPAR γ mRNA levels in THP-1 macrophages exposed to ritonavir (1 and 2.5 μ g/ml) during 24 h. 0.5 μ g of total RNA were analyzed by RT-PCR. A representative autoradiogram is shown. Bands were quantified, normalized to the gapdh signal and the change in mRNA levels was calculated in comparison with the control situation (100%). Data are expressed as mean \pm SD of 3 independent experiments. * $P < 0.05$ compared with control cells (ANOVA test). **B:** Immunoblot analysis of the SREBP-1 precursor form was performed in the membrane fraction, whereas analysis of the active, nuclear form of SREBP-1 was performed in the nuclear fraction. A representative autoradiogram and quantifications are shown. Data are expressed as the band intensity ratio of mature versus precursor form relative to control, and correspond to the mean values \pm SD of 5 independent experiments. * $P < 0.05$ compared with control cells (ANOVA test).

< 0.05) and, in this case pre-treatment with GW9662 abolished the stimulatory effect, thereby lowering mRNA levels by nearly 40% ($P < 0.001$) (Fig. 4C). On the other hand, the effect of ritonavir on CD36, ABCA1 or CYP27 was not modified by the addition of rosiglitazone.

ABCA1 Increase Was Related to LXR but Not to the cAMP-PKA Pathway. We were interested in studying the mechanisms by which ritonavir induces ABCA1 expression in macrophages. It has been described that liver X receptor (LXR) mRNA is transcriptionally controlled by PPAR γ agonists, leading to ABCA1 induction (35). Therefore, we analysed the LXR mRNA levels in macrophages treated with ritonavir, and found that ritonavir (2.5 μ g/ml) significantly increased the mRNA expression of LXR α by 36% ($P < 0.01$) (Fig. 5A). Moreover, protein levels of LXR α were also increased in the nuclear fraction of ritonavir-treated THP-1 cells (Fig. 5B). Further, we examined whether ritonavir could increase the binding of LXR to a LXR response element (LXRE) in the ABCA1 promoter. The incubation of macrophage nuclear extracts with a LXRE oligonucleotide probe yielded a single, specific band that disappeared in the presence of increasing amounts of unlabeled probe (Fig. 5C). Nuclear extracts from macrophages treated with ritonavir (2.5 μ g/ml, 24 h) showed a 61% increase ($P < 0.05$) in the intensity of the specific band corresponding to the binding of LXR to an ABCA1 specific LXRE (Fig. 5D).

ABCA1 expression is also regulated independently of the LXR system by cyclic AMP via a protein kinase A (PKA)-mediated process. However, the pharmacological blockade of the PKA pathway using H89, a specific PKA inhibitor, did not reverse ABCA1 induction driven by ritonavir (Fig. 5E). Taken together, these results suggest that ritonavir stimulates ABCA1 expression through LXR α in a cAMP-PKA-independent manner.

Discussion

The present study demonstrates that ritonavir has a significant impact on the expression of master regulators of cholesterol trafficking in human macrophages by lowering SR-BI and increasing CD36, ABCA1 and CYP27 expression. These findings may be clinically significant, since the effective ritonavir concentrations used in the present study were within the range of pharmacological steady-state plasma concentrations observed after a 600 mg/12 h dose in human subjects (23). In contrast to other studies, the experiments were performed in the absence of any added lipoprotein to better ascertain the ritonavir-specific effects. In this respect, it is well known that some components of modified lipoproteins and cholesterol loading in themselves induce changes in the expression of these cholesterol-related genes (31); thus, the observed ritonavir effects may have been influenced by co-incubation with these lipoproteins.

Several studies demonstrated that ritonavir and other PIs alter the expression of CD36, but discrepancies existed

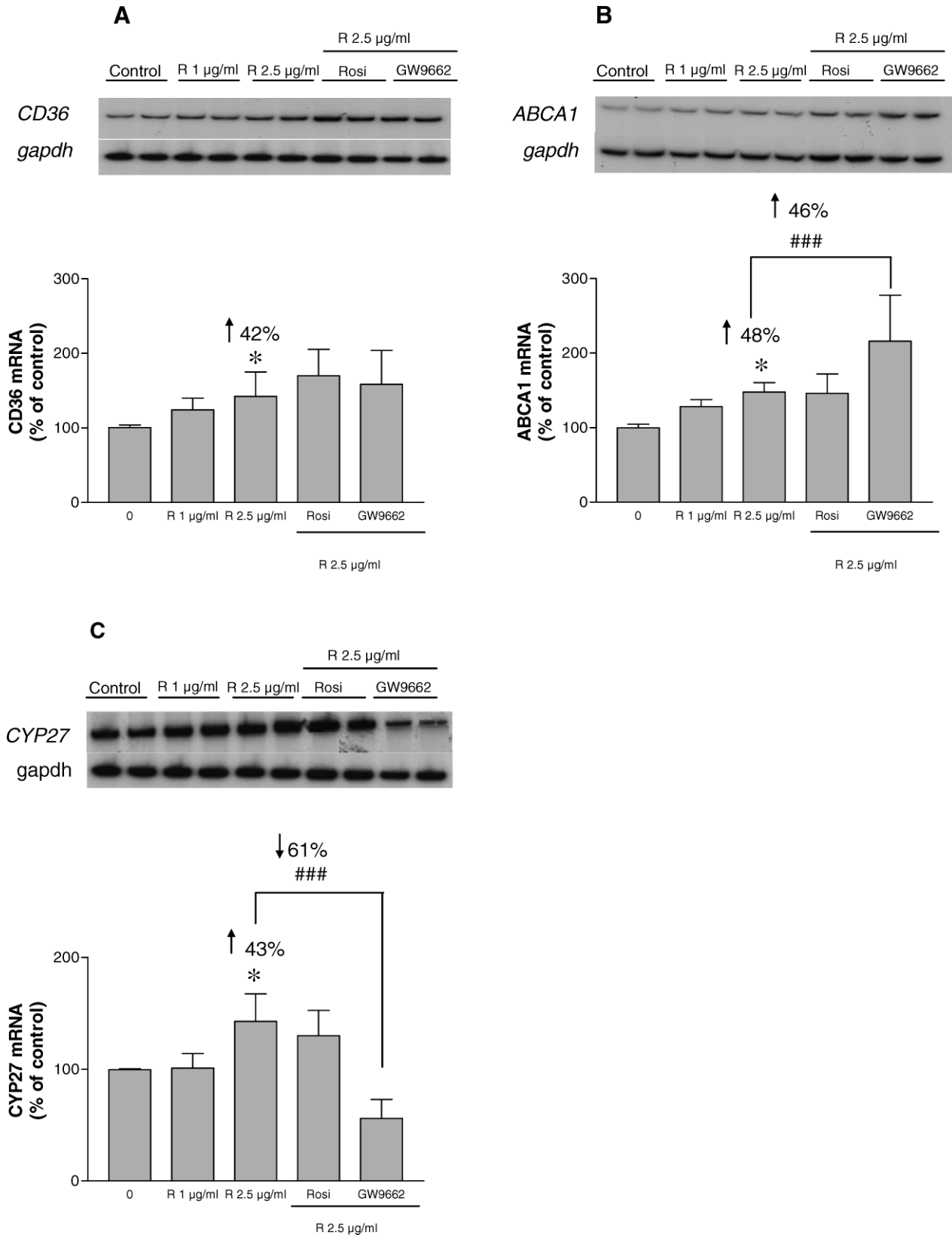


Figure 4. A PPAR γ antagonist (GW9662) does not affect CD36 or ABCA1 induction, but reverses the increase in CYP27 expression caused by ritonavir. Analysis of CD36 (**A**) ABCA1 (**B**) and CYP27 (**C**) mRNA levels in THP-1 macrophages incubated with ritonavir 1 µg/ml and ritonavir 2.5 µg/ml (alone or combined with rosiglitazone (2 µM) or GW 9662 (20 µM)) during 24 h. 0.5 µg of total RNA was analyzed by RT-PCR. Representative autoradiograms are shown. Bands were quantified, normalized to the gapdh signal and the change in mRNA levels was calculated in comparison with the control situation (100%). Data are expressed as mean \pm SD of 3 independent experiments run in duplicate. * $P < 0.05$ versus corresponding control cells. $### P < 0.001$ vs cells treated with 2.5 µg/ml ritonavir (ANOVA test).

among these studies; some showed a decrease (21) and others an increase in CD36 (22, 23). It was speculated that PIs caused differential effects depending on the differentiation status of the monocyte-macrophage (36). Our results also point to a different effect of ritonavir on THP-1 monocytes where CD36 surface levels were unaffected by the drug treatment, and THP-1 differentiated macrophages where an increase was observed in both CD36 surface expression and mRNA levels (Figs. 1A and 2A). One of the mechanisms proposed for CD36 induction by PIs involves changes in the expression or activity of PPAR γ (21, 22). However, co-incubation with a PPAR γ antagonist (GW9662) did not inhibit ritonavir-mediated induction of CD36, indicating that this effect was independent of PPAR γ signaling.

Regarding the mechanism underlying the increase in PPAR γ mRNA by ritonavir, it has been reported that PPAR γ expression can be controlled by the SREBP family of transcription factors (37). It has been proposed that PI may cause the accumulation of activated SREBPs in the macrophage nucleus (19). In agreement with this hypothesis, we observed an increase in mature SREBP-1 levels in nuclear extracts of THP-1 macrophages treated with ritonavir 2.5 μ g/ml for 24 h (Fig. 3B). These results suggest that the increase in mature SREBP-1 caused by ritonavir may mediate the observed PPAR γ induction. It is noteworthy that, in contrast to Zhou *et al.* (19), we did not observe an increase in SREBP-1 precursor form, which points to an effect of ritonavir on SREBP-1 processing rather than on SREBP-1 transcription.

Our results also show that ABCA1 is induced by exposure to ritonavir. Zhou *et al.* (19) observed a similar trend in murine macrophages treated with ritonavir 15 μ M, but the increase did not reach statistical significance. In contrast, ABCA1 expression was not modified in ritonavir-treated THP-1-derived foam cells (38). In foam cells, the intracellular accumulation of sterols and oxysterols could activate LXR and result in higher basal ABCA1 levels, which ritonavir would not increase further. The absence of cholesterol loading in our cell model may have facilitated ABCA1 induction by ritonavir. It has been shown that macrophage ABCA1 expression is controlled by a PPAR γ -LXR pathway (35). However, pre-treatment with the PPAR γ antagonist GW9662 did not reverse the inductive effect of ritonavir on ABCA1, which was even greater than that observed with ritonavir alone (Fig. 4A). This effect could have been mediated by GW9662 working as a partial PPAR α agonist, as other authors suggested previously (39, 40). Chawla *et al.* (2001) described that PPAR γ agonists induce LXR α mRNA expression, leading to ABCA1 upregulation. Although PPAR γ does not seem to play a major role in ABCA1 induction by ritonavir, this compound could act directly by increasing LXR expression. Accordingly, we observed a significant increase in LXR α mRNA after ritonavir exposure (Fig. 5A), which suggests that the upregulation of ABCA1 by ritonavir is independent of

PPAR γ and could be directly mediated through LXR. To gain further insight into the mechanism regulating ABCA1 expression by LXR, we performed EMSA experiments using as the probe a double stranded oligonucleotide that contained the LXRE identified in the ABCA1 promoter. This probe originated single band upon incubation with THP-1 nuclear extracts, and the observed binding was increased when THP-1 macrophages were treated with ritonavir. This suggests that the effect of ritonavir on ABCA1 expression may be mediated by transcription activation upon binding of LXR-RXR heterodimers to the LXRE in the promoter of the ABCA1 gene. However, the effect of ritonavir on LXR α expression may not be strong enough to induce ABCG1, another LXR target gene (41).

Interestingly, ritonavir treatment significantly increased mRNA levels of CYP27 (Fig. 4B), another protein involved in cholesterol efflux from macrophages (27, 42). Our results show that co-incubation with a PPAR γ antagonist abolishes the induction caused by ritonavir, which indicates that in this case the effect is PPAR γ -dependent. The CYP27 product 27-hydroxycholesterol is the most likely endogenous ligand for LXR α in macrophages, and overexpression of CYP27 has been shown to activate the LXR/RXR system (43). Moreover, treatment of cells with 27-hydroxycholesterol increases ABCA1 gene expression to a greater extent than ABCG1 (43). Therefore, it is tempting to speculate that the increase in 27-hydroxycholesterol due to CYP27 stimulation activates LXR enough to induce ABCA1, but not ABCG1, expression in THP-1 macrophages.

Taken together, our results suggest that the increase in CD36 expression, which is regarded as pro-atherogenic, may be compensated by an increase in the expression of genes involved in cholesterol efflux, ABCA1 and CYP27. The decrease in SR-BI protein levels caused by ritonavir would not impair this process, as it has recently been reported that SR-BI does not promote reverse cholesterol transport *in vivo* (44). Earlier reports in human macrophages exposed to atherogenic lipoproteins (22, 38) showed that ritonavir effects were clearly pro-atherogenic. Thus, CD36 overexpression was observed in THP-1 macrophages and peripheral blood mononuclear cells after treatment with ritonavir in combination with aggregated LDL (22, 45); on the other hand, ritonavir reduced SR-BI and caveolin-1 expression in THP-1 monocytes and peripheral blood mononuclear cells preincubated with acetylated-LDL to form foam cells; this led to a reduction in cholesterol efflux, despite ABCA1, ABCG1 and CYP27 expression was not modified (38). The accumulation of cholesterol due to increased influx and decreased efflux was suggested to be at the basis of the higher atherosclerotic risk in patients treated with PI. In contrast, our findings suggest that ritonavir in the absence of hyperlipidemia would not exert pro-atherogenic effects on vascular cells such as macrophages. However, we did not measure cholesterol influx or efflux in our non-lipid loaded cell model system. Clearly, these results were obtained *in vitro*, and it is difficult to extrapolate them to

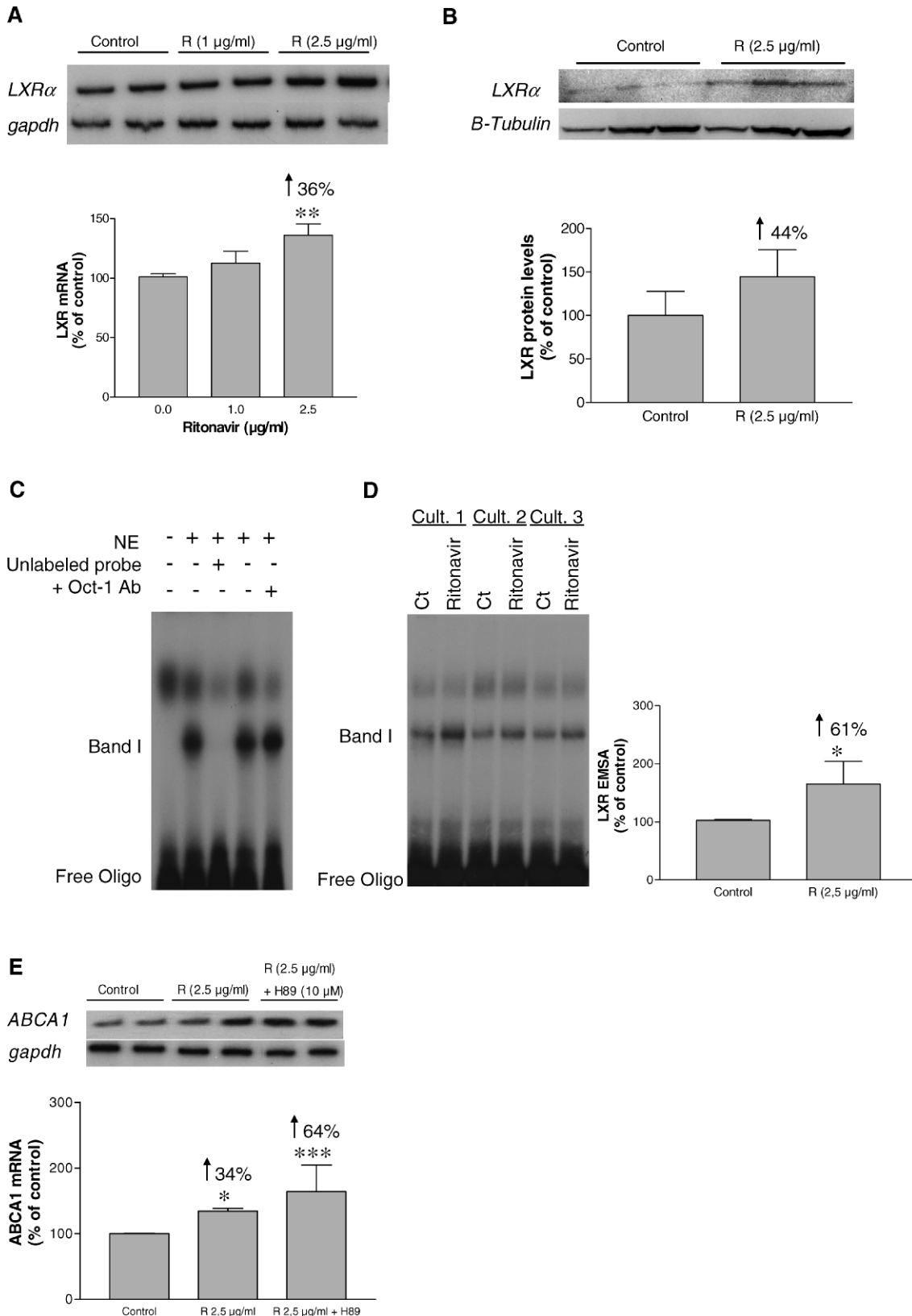


Figure 5. Ritonavir increases LXR mRNA, protein and binding activity, but not the cAMP-PKA pathway. **A:** Analysis of LXR α mRNA levels in THP-1 cells exposed to ritonavir 1 and 2.5 μ g/ml during 24 h. **B:** Immunoblot analysis of LXR α in the nuclear fraction of THP-1 cells exposed or not to ritonavir 2.5 μ g/ml during 24 h. Bands were quantified, normalized to the β -tubulin signal and the change in protein levels was calculated in comparison with the control situation (100%). **C:** EMSA assay showing the binding of THP-1 nuclear extracts (NE) to a LXRE oligonucleotide, forming a single specific band. **D:** Representative EMSA autoradiography showing the specific band formed with nuclear extracts from control

the *in vivo* situation in humans. Moreover, other PI-induced metabolic abnormalities (dyslipidemia, lipodystrophy and insulin resistance) may be considered as pro-atherogenic, but their contribution could be relatively minor compared to the effects of HIV infection itself (46).

We thank Miss Christine O'Hara for review of the English version of the manuscript. M.V.-C., R.M.S., J.C.L. and M.A. are members of a Consolidated Research Group (Generalitat de Catalunya, SGR05-00833) with no financial aid. Ritonavir was provided by Abbot Laboratories. Alba Rebollo holds a pre-doctoral position endowed by FIS. CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas is an ISCIII project.

1. Sterne JA, Hernan MA, Ledergerber B, Tilling K, Weber R, Sendi P, Rickenbach M, Robins JM, Egger M. Long-term effectiveness of potent antiretroviral therapy in preventing AIDS and death: a prospective cohort study. *Lancet* 366:378–384, 2005.
2. Manuel O, Thiebaut R, Darioli R, Tarr PE. Treatment of dyslipidaemia in HIV-infected persons. *Expert Opin Pharmacother* 6:1619–1645, 2005.
3. Hadigan C, Meigs JB, Corcoran C, Rietschel P, Piecuch S, Basgoz N, Davis B, Sax P, Stanley T, Wilson PW, D'Agostino RB, Grinspoon S. Metabolic abnormalities and cardiovascular disease risk factors in adults with human immunodeficiency virus infection and lipodystrophy. *Clin Infect Dis* 32:130–139, 2001.
4. Carr A. HIV lipodystrophy: risk factors, pathogenesis, diagnosis and management. *AIDS* 17 Suppl 1:S141–S148, 2003.
5. Friis-Moller N, Weber R, Reiss P, Thiebaut R, Kirk O, d'Arminio MA, Pradier C, Morfeldt L, Mateu S, Law M, El-Sadr W, de WS, Sabin CA, Phillips AN, Lundgren JD. Cardiovascular disease risk factors in HIV patients—association with antiretroviral therapy. Results from the DAD study. *AIDS* 17:1179–1193, 2003.
6. Jerico C, Knobel H, Montero M, Ordonez-Llanos J, Guelar A, Gimeno JL, Saballs P, Lopez-Colomes JL, Pedro-Botet J. Metabolic syndrome among HIV-infected patients: prevalence, characteristics, and related factors. *Diabetes Care* 28:132–137, 2005.
7. Carr A, Samaras K, Burton S, Law M, Freund J, Chisholm DJ, Cooper DA. A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. *AIDS* 12:F51–F58, 1998.
8. Periard D, Telenti A, Sudre P, Cheseaux JJ, Halfon P, Reymond MJ, Marcovina SM, Glauser MP, Nicod P, Darioli R, Mooser V. Atherogenic dyslipidemia in HIV-infected individuals treated with protease inhibitors. The Swiss HIV Cohort Study. *Circulation* 100:700–705, 1999.
9. Depairon M, Chessex S, Sudre P, Rodondi N, Doser N, Chave JP, Riesen W, Nicod P, Darioli R, Telenti A, Mooser V. Premature atherosclerosis in HIV-infected individuals—focus on protease inhibitor therapy. *AIDS* 15:329–334, 2001.
10. Stein JH, Klein MA, Bellehumeur JL, McBride PE, Wiebe DA, Otvos JD, Sosman JM. Use of human immunodeficiency virus-1 protease inhibitors is associated with atherogenic lipoprotein changes and endothelial dysfunction. *Circulation* 104:257–262, 2001.
11. Jerico C, Knobel H, Calvo N, Sorli ML, Guelar A, Gimeno-Bayon JL, Saballs P, Lopez-Colomes JL, Pedro-Botet J. Subclinical carotid atherosclerosis in HIV-infected patients: role of combination antiretroviral therapy. *Stroke* 37:812–817, 2006.
12. Mary-Krause M, Cotte L, Simon A, Partisani M, Costagliola D. Increased risk of myocardial infarction with duration of protease inhibitor therapy in HIV-infected men. *AIDS* 17:2479–2486, 2003.
13. Friis-Moller N, Sabin CA, Weber R, d'Arminio MA, El-Sadr WM, Reiss P, Thiebaut R, Morfeldt L, de WS, Pradier C, Calvo G, Law MG, Kirk O, Phillips AN, Lundgren JD. Combination antiretroviral therapy and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 349:1993–2003, 2003.
14. Lenhard JM, Furfine ES, Jain RG, Ittoop O, Orband-Miller LA, Blanchard SG, Paulik MA, Weiel JE. HIV protease inhibitors block adipogenesis and increase lipolysis *in vitro*. *Antiviral Res* 47:121–129, 2000.
15. Zhong DS, Lu XH, Conklin BS, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen C. HIV protease inhibitor ritonavir induces cytotoxicity of human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1560–1566, 2002.
16. Kappert K, Caglayan E, Baumer AT, Sudkamp M, Fatkenheuer G, Rosenkranz S. Ritonavir exhibits anti-atherogenic properties on vascular smooth muscle cells. *AIDS* 18:403–411, 2004.
17. Chen C, Lu XH, Yan S, Chai H, Yao Q. HIV protease inhibitor ritonavir increases endothelial monolayer permeability. *Biochem Biophys Res Commun* 335:874–882, 2005.
18. Grigem S, Fischer-Posovszky P, Debatin KM, Loizon E, Vidal H, Wabitsch M. The effect of the HIV protease inhibitor ritonavir on proliferation, differentiation, lipogenesis, gene expression and apoptosis of human preadipocytes and adipocytes. *Horm Metab Res* 37:602–609, 2005.
19. Zhou H, Pandak WM Jr, Lyall V, Natarajan R, Hylemon PB. HIV protease inhibitors activate the unfolded protein response in macrophages: implication for atherosclerosis and cardiovascular disease. *Mol Pharmacol* 68:690–700, 2005.
20. Kunjathoor VV, Febbraio M, Podrez EA, Moore KJ, Andersson L, Koehn S, Rhee JS, Silverstein R, Hoff HF, Freeman MW. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem* 277:49982–49988, 2002.
21. Serghides L, Nathoo S, Walmsley S, Kain KC. CD36 deficiency induced by antiretroviral therapy. *AIDS* 16:353–358, 2002.
22. Dressman J, Kincer J, Matveev SV, Guo L, Greenberg RN, Guerin T, Meade D, Li XA, Zhu W, Uittenbogaard A, Wilson ME, Smart EJ. HIV protease inhibitors promote atherosclerotic lesion formation independent of dyslipidemia by increasing CD36-dependent cholesterol ester accumulation in macrophages. *J Clin Invest* 111:389–397, 2003.
23. Munteanu A, Zingg JM, Ricciarelli R, Azzi A. CD36 overexpression in ritonavir-treated THP-1 cells is reversed by alpha-tocopherol. *Free Radic Biol Med* 38:1047–1056, 2005.
24. Knight BL. ATP-binding cassette transporter A1: regulation of cholesterol efflux. *Biochem Soc Trans* 32:124–127, 2004.
25. Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldan A, Tarr P, Fishbein MC, Frank J, Francone OL, Edwards PA. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab* 1:121–131, 2005.
26. de LL-M, Connelly MA, Drazul D, Klein SM, Favari E, Yancey PG,

← and ritonavir-treated THP-1 cells. On the right side of the figure, a bar plot shows the band intensity (in % of control) for control and ritonavir-treated cells. Each bar represents the mean \pm SD of values from 3 independent cultures. **E:** Analysis of ABCA1 mRNA levels in THP-1 cells incubated with ritonavir 2.5 μ g/ml alone or combined with the PKA inhibitor H89 (10 μ M). RNA were analyzed by RT-PCR. Representative autoradiograms are shown. Bands were quantified, normalized to the gapdh signal and the change in mRNA levels was calculated in comparison with the control situation (100%). Data are expressed as mean \pm SD of 3 independent experiments. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ versus corresponding control cells (ANOVA test).

- Williams DL, Rothblat GH. Scavenger receptor class B type I affects cholesterol homeostasis by magnifying cholesterol flux between cells and HDL. *J Lipid Res* 42:1969–1978, 2001.
27. Bjorkhem I, Andersson O, Diczfalusy U, Sevastik B, Xiu RJ, Duan C, Lund E. Atherosclerosis and sterol 27-hydroxylase: evidence for a role of this enzyme in elimination of cholesterol from human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8592–8596, 1994.
 28. Fielding CJ, Fielding PE. Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol. *Adv Drug Deliv Rev* 49:251–264, 2001.
 29. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63, 1983.
 30. Llaverias G, Rebollo A, Pou J, Vazquez-Carrera M, Sanchez RM, Laguna JC, Alegret M. Effects of rosiglitazone and atorvastatin on the expression of genes that control cholesterol homeostasis in differentiating monocytes. *Biochem Pharmacol* 71:605–614, 2006.
 31. Llaverias G, Lacasa D, Vazquez-Carrera M, Sanchez RM, Laguna JC, Alegret M. Cholesterol regulation of genes involved in sterol trafficking in human THP-1 macrophages. *Mol Cell Biochem* 273:185–191, 2005.
 32. Matsuoka Y, Kitamura Y, Okazaki M, Terai K, Taniguchi T. Kainic acid-induced activation of nuclear factor-kappaB in rat hippocampus. *Exp Brain Res* 124:215–222, 1999.
 33. Costet P, Lalanne F, Gerbod-Giannone MC, Molina JR, Fu X, Lund EG, Gudas LJ, Tall AR. Retinoic acid receptor-mediated induction of ABCA1 in macrophages. *Mol Cell Biol* 23:7756–7766, 2003.
 34. Llaverias G, Lacasa D, Vinals M, Vazquez-Carrera M, Sanchez RM, Laguna JC, Alegret M. Reduction of intracellular cholesterol accumulation in THP-1 macrophages by a combination of rosiglitazone and atorvastatin. *Biochem Pharmacol* 68:155–163, 2004.
 35. Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, Evans RM, Tontonoz P. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* 7:161171, 2001.
 36. Hui DY. HIV protease inhibitors and atherosclerosis. *J Clin Invest* 111:317–318, 2003.
 37. Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, Martin G, Fruchart JC, Briggs M, Spiegelman BM, Auwerx J. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol* 19:5495–5503, 1999.
 38. Wang X, Mu H, Chai H, Liao D, Yao Q, Chen C. Human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir inhibits cholesterol efflux from human macrophage-derived foam cells. *Am J Pathol* 171:304–314, 2007.
 39. Leesnitzer LM, Parks DJ, Bledsoe RK, Cobb JE, Collins JL, Consler TG, Davis RG, Hull-Ryde EA, Lenhard JM, Patel L, Plunket KD, Shenk JL, Stimmel JB, Therapontos C, Willson TM, Blanchard SG. Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry* 41:6640–6650, 2002.
 40. Emery MN, Leontiou C, Bonner SE, Merulli C, Nanzer AM, Musat M, Galloway M, Powell M, Nikookam K, Korbonits M, Grossman AB. PPAR-gamma expression in pituitary tumours and the functional activity of the glitazones: evidence that any anti-proliferative effect of the glitazones is independent of the PPAR-gamma receptor. *Clin Endocrinol (Oxf)* 65:389395, 2006.
 41. Kennedy MA, Venkateswaran A, Tarr PT, Xenarios I, Kudoh J, Shimizu N, Edwards PA. Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein. *J Biol Chem* 276:39438–39447, 2001.
 42. Lund E, Andersson O, Zhang J, Babiker A, Ahlborg G, Diczfalusy U, Einarsson K, Sjoval J, Bjorkhem I. Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of intracellular cholesterol in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:208–212, 1996.
 43. Fu X, Menke JG, Chen Y, Zhou G, MacNaul KL, Wright SD, Sparrow CP, Lund EG. 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J Biol Chem* 276:38378–38387, 2001.
 44. Wang X, Collins HL, Ranalletta M, Fuki IV, Billheimer JT, Rothblat GH, Tall AR, Rader DJ. Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest* 117:2216–2224, 2007.
 45. Wilson ME, Sengoku T, Allred KF. Estrogen prevents cholesteryl ester accumulation in macrophages induced by the HIV protease inhibitor ritonavir. *J Cell Biochem* 103:1598–1606, 2008.
 46. Mujawar Z, Rose H, Morrow MP, Pushkarsky T, Dubrovsky L, Mukhamedova N, Fu Y, Dart A, Orenstein JM, Bobryshev YV, Bukrinsky M, Sviridov D. Human immunodeficiency virus impairs reverse cholesterol transport from macrophages. *PLoS Biol* 4:e365, 2006.

II

Monocyte gene-expression profile in men with familial combined hyperlipidemia and its modification by atorvastatin treatment

Gemma Llaverias, Jordi Pou, Emilio Ros, Daniel Zambón, Montserrat Cofán, Álex Sánchez, Manuel Vázquez-Carrera, Rosa M. Sánchez, Juan C. Laguna, Marta Alegret

Pharmacogenomics (2008); 9 (8): 1035-1054

L'objectiu d'aquest estudi va ser analitzar, utilitzant *arrays* de cDNA, els perfils d'expressió gènica en monòcits de sang perifèrica procedents d'homes sans i pacients amb HFC abans i després del tractament amb atorvastatina, per identificar gens que podrien estar relacionats amb el desenvolupament d'aquesta patologia.

Per dur a terme aquest treball, 12 pacients amb HFC de sexe masculí i un grup control (CT) equiparable en sexe i edat van ser reclutats a la Unitat de Lípids de l'Hospital Clínic de Barcelona. Es van obtenir mostres de sang per a la determinació dels lípids plasmàtics i diverses molècules senyalitzadores. Les mostres de sang també es van utilitzar per aïllar-ne els monòcits, i obtenir l'RNA total. Els pacients del grup HFC van ser tractats amb atorvastatina (40 mg/dia) durant un mes, i al final d'aquest període es van extreure mostres de sang amb idèntica finalitat (Grup HFC + ATV). Els RNA individuals dels pacients de cada grup es van unir per formar 3 *pools* d'RNA per a cada condició destinats a la hibridació amb *arrays* d'expressió gènica Human Genome U133A 2.0, d'Affymetrix.

Com era esperable, els pacients amb HFC presentaven nivells elevats de colesterol total, colesterol-LDL i TG, i el tractament amb ATV va reduir significativament tots tres paràmetres. En canvi, malgrat l'adipositat era similar en els dos grups, la concentració plasmàtica d'àcids grassos lliures (AGL) era significativament superior i la d'adiponectina inferior en malalts amb HFC, i el tractament amb ATV no va modificar aquests paràmetres.

Pel que fa al perfil de expressió gènica, l'anàlisi estadística de les dades generades a partir dels *arrays* va mostrar l'expressió diferencial de 82 gens en el grup HFC en comparació amb el grup control, i de 86 gens en el grup HFC després del tractament amb ATV en comparació amb la situació basal. Molts dels gens diferencialment expressats es relacionen amb funcions clau en el macròfag, com ara la resposta inflamatòria i immune, el control de la composició de la MEC i el metabolisme lipídic. Tenint en compte la importància d'aquests processos en l'aterosclerosi, l'expressió diferencial d'aquests gens en

una situació d'hiperlipèmia podria tenir connexió directa o indirecta amb l'aparició i desenvolupament de lesions ateroscleròtiques.

Per tal d'aprofundir en aquest estudi, en primer lloc es van seleccionar una sèrie de gens (segons el seu nivell d'expressió diferencial i la seva funció), per validar els resultats mitjançant la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa a temps real. A continuació, es van intentar correlacionar els canvis en l'expressió gènica induïts per la patologia i/o el tractament amb ATV amb alguns dels paràmetres plasmàtics analitzats. En aquest aspecte, resulten particularment interessants aquells gens l'expressió dels quals va ser modificada amb el tractament en sentit contrari al canvi d'expressió observat en la comparació de HFC amb els individus control.

No obstant això, no tots els canvis en l'expressió gènica van ser revertits pel tractament, que tal i com hem comentat tampoc normalitza els baixos nivells d'adiponectina ni els elevats nivells d'AGL detectats en els pacients amb HFC. Aquests resultats suggereixen que el tractament amb ATV no és capaç de corregir certes alteracions de la HFC, especialment les associades a anomalies metabòliques del teixit adipós.



Monocyte gene-expression profile in men with familial combined hyperlipidemia and its modification by atorvastatin treatment

Gemma Llaverias¹,
Jordi Pou¹, Emilio Ros²,
Daniel Zambón²,
Montserrat Cofán²,
Alex Sánchez³, Manuel
Vázquez-Carrera¹,
Rosa M Sánchez¹,
Juan C Laguna¹ &
Marta Alegret^{1†}

[†]Author for correspondence
¹Pharmacology Department,
Faculty of Pharmacy and
Biomedicine Institute
(IBUB), University of
Barcelona and Ciber Diabetes
y Enfermedades Metabólicas
asociadas (CIBERDEM),
Instituto de Salud Carlos III,
Diagonal 643. E-08028,
Spain

Tel.: +34 934 024 531;
Fax: +34 934 035 982;
E-mail: alegret@ub.edu
²Lipid Clinic, Endocrinology
and Nutrition Service,
Institut d'Investigacions

Biomèdiques August Pi
Sunyer, Hospital Clínic,
Barcelona, and CIBER
Fisiopatología de la Obesidad
y Nutrición (CIBEROBN),
Instituto de Salud Carlos III
(ISCIII), Spain

³Statistics Department,
Faculty of Biology, University
of Barcelona, Barcelona,
Spain

Keywords: atorvastatin,
familial combined
hyperlipidemia, gene
expression, monocytes

future medicine part of fsg

Aim: The genetic origin of familial combined hyperlipidemia (FCH) is not well understood. We used microarray profiling of peripheral blood monocytes to search novel genes and pathways involved in FCH. **Methods:** Fasting plasma for determination of lipid profiles, inflammatory molecules and adipokines was obtained and peripheral blood monocytes were isolated from male FCH patients basally and after 4 weeks of atorvastatin treatment. Sex-, age- and adiposity-matched controls were also studied. Gene-expression profiles were analyzed using Affymetrix[®] Human Genome U133A 2.0 GeneChip arrays. **Results:** Analysis of gene expression by cDNA microarrays showed that 82 genes were differentially expressed in FCH monocytes compared with controls. Atorvastatin treatment modified the expression of 86 genes. Pathway analysis revealed the over-representation of the complement and coagulation cascades, the hematopoietic cell lineage and the arachidonic acid metabolism pathways. Changes in the expression of some genes, confirmed by real-time RT-PCR, (CD36, leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains-1, tissue factor pathway inhibitor 2, myeloid cell nuclear differentiation antigen, tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25, CD96 and lipoprotein lipase), may be related to a proinflammatory environment in FCH monocytes, which is partially reversed by atorvastatin. Higher plasma levels of triglycerides and free fatty acids and lower levels of adiponectin in FCH patients could also trigger changes in gene expression that atorvastatin cannot modify. **Conclusion:** Our results show clear differences in gene expression in FCH monocytes compared with those of matched healthy controls, some of which are influenced by atorvastatin treatment.

Familial combined hyperlipidemia (FCH) is the most common genetic lipid disorder in humans, affecting 1–3% of the general population. It is associated with a substantially enhanced risk of premature coronary heart disease (CHD) [1]. The lipid profile in FCH is characterized by a variable lipid phenotype with predominance of mixed hyperlipidemia, elevated levels of low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol and apolipoprotein B (apoB), decreased levels of high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, and the presence of small dense LDL [2]. Most affected individuals show overproduction of very-low-density lipoprotein (VLDL), which may arise from impaired free fatty acid (FFA) metabolism [3]. The frequent association with insulin resistance, increased oxidative stress and low-grade inflammation are additional features of FCH that may accelerate atherosclerosis development [4].

A number of chromosomal regions (1q21–23, 11p14.1–q12.1 and 16q22–24.1) have been related to the pathogenesis of FCH [5]. Recently, the upstream stimulatory factor 1 (*USF1*) gene has been suggested as a candidate gene for FCH in the region 1q21–23 [6]. However, the complex

genetics of FCH still remain evasive. Gene-expression arrays can be used to identify novel genes involved in FCH and to increase our knowledge of the action of drugs used to treat this disorder, such as the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors (statins). Peripheral blood cells are easily accessible, and they have been widely used to obtain gene-expression profiles in patients with different conditions, including hyperlipidemia [7–9]. In the case of atherogenic disorders, such as FCH, monocytes are particularly suitable owing to their key role in atherosclerosis [10].

We hypothesized that chronic exposure of blood monocytes to a proatherogenic and proinflammatory environment would lead to changes in gene expression that might be related to the development of FCH and atherosclerosis, and that treatment with atorvastatin would reverse at least some of these changes. To test this hypothesis, cDNA microarray analysis was performed to investigate the differences in gene-expression profile in monocytes isolated from peripheral blood of 12 male patients with FCH and 12 healthy controls. In addition, the gene-expression

profile was reassessed in FCH patients after treatment with atorvastatin. We are aware that the data thus obtained cannot distinguish between genes differentially expressed as an adaptive response to changes in plasma lipid levels or as a result of primary genetic defects and that, given small numbers, our findings should be regarded as preliminary. Despite these limitations, the results show that the gene-expression pattern in monocytes from FCH patients differs from that of control subjects, and atorvastatin treatment is able to reverse, in part, some of these changes.

Methods

Patients

A total of 12 asymptomatic male patients with FCH were recruited from the Lipid Clinic of Hospital Clínic, Barcelona, Spain. FCH was diagnosed as described [11] in subjects with mixed dyslipidemia (phenotype IIb) associated with serum apoB above 1.2 g/l; monogenic transmission of hyperlipidemia with variable lipoprotein phenotypes (IIa, IIb or IV) present in at least two family members; absence of hypercholesterolemic children in the family; family history of premature CHD; and absence of an *apoE* 2/2 genotype. All patients fulfilled the standard criteria of untreated serum cholesterol and/or triglyceride levels above the sex- and age-adjusted 90th percentile for the reference population [12]. Furthermore, all patients had a serum apoB level above 1.2 g/l, an accepted cut-off value for diagnosis of FCH [13]. Finally, patients with secondary causes of hyperlipidemia, tendon xanthomas or a diagnosis matching familial hypercholesterolemia were excluded. A total of four patients who disclosed a lipid phenotype overlapping that of familial hypercholesterolemia (LDL cholesterol ≥ 250 mg/dl with triglycerides < 300 mg/dl) underwent further diagnostic procedures to exclude misdiagnosis. First, Achilles tendon sonograms were obtained following a standard protocol [14] and assessed for both thickness and abnormal echostructure diagnostic of xanthoma undetected by physical examination. Second, we performed DNA testing for identification of mutations in the LDL receptor or *APOB* genes according to Spanish Lipid Clinics procedures [15]. No patient had sonographically enlarged tendons or mutations in the genes investigated.

A control group of 12 healthy men, matched to FCH patients for age and adiposity, was recruited from hospital personnel and lists of primary-health physicians. None of the study subjects used aspirin or nonsteroidal anti-inflammatory agents on a regular basis. Written

informed consent was obtained for all participants in this study. The study was approved by the Clinical Investigation Ethics Committee of Hospital Clínic, University of Barcelona, Spain.

Study design

Familial combined hyperlipidemia patients underwent washout of any hypolipidemic drugs for at least 4 weeks before the study. This washout period is considered adequate for any residual effect of statin drugs to have worn off [16]. They were then treated with atorvastatin (40 mg/day) for 4 weeks. All blood samples were collected after a 12-h fast, once in controls and twice in FCH patients (samples taken at baseline and after 4 weeks of treatment with atorvastatin).

Laboratory measurements

Except for immediate blood glucose and lipid measurements, serum and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-plasma samples were stored at -80°C and analyzed at the end of the study. Serum glucose was determined by the glucose oxidase method. Cholesterol and triglycerides were measured using enzymatic procedures. HDL cholesterol was quantified after precipitation with phosphotungstic acid and magnesium chloride. LDL cholesterol was estimated with the Friedewald equation [17] except in subjects with triglycerides over 300 mg/dl, when it was measured by ultracentrifugation techniques, as described [18]. Apolipoproteins A1 and B and lipoprotein(a) were determined by turbidimetry. In subjects with a clinical diagnosis of FCH, *APOE* genotyping was performed using the method of Wenham *et al.* [19]. Analytes determined in frozen samples of whole serum or plasma were: FFA by an enzymatic colorimetric method (Wako, Neuss, Germany); insulin by an immunoradiometric technique (BioSource, Nivelles, Belgium); leptin and adiponectin by radioimmunoassay (Linco Research, MO, USA); high-sensitivity C-reactive protein (CRP) by particle-enhanced immunonephelometry; fibronectin and serum soluble tumor necrosis factor (sTNF) receptors by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria). All analyses were done in duplicate.

Statistical comparisons of differences between the control and FCH groups were performed by unpaired t-tests or the Mann-Whitney test. In FCH patients, differences between baseline values and those obtained after treatment with atorvastatin 40 mg/day were assessed by paired t-tests or the Wilcoxon test.

Isolation of monocytes from peripheral blood

Human mononuclear cells were isolated from 50 ml of peripheral blood by density-gradient centrifugation on Ficoll–Paque™ (Amersham Biosciences Corp., NJ, USA). Mononuclear cells were washed and resuspended in RPMI-1640 medium (containing 25 mM HEPES buffer, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 1% glutamine, 1% nonessential amino acids and 2% sodium pyruvate). To purify monocytes by adhesion to tissue culture plates, mononuclear cells were plated and after 2 h at 37°C in 5% CO₂ they were washed with phosphate buffered saline (PBS) to eliminate non-adherent cells. This isolation procedure yielded monocyte preparations of over 92% purity, as assessed by flow cytometry using a two-color system (CD14-FITC/CD64-PE) from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA).

RNA isolation & array hybridization

Total RNA was isolated from monocytes using Trizol® (Invitrogen Corp., CA, USA), was further purified by using RNeasy kit (Qiagen Inc., CA, USA), and was quantified by spectrometry at 260 nm; purity was assessed by the ratio of absorbances at 260–280 nm. RNA integrity was assessed after agarose gel electrophoresis.

Nine total RNA pools were prepared, three each from control samples, FCH before treatment and FCH after treatment with atorvastatin. Pooling is considered as an appropriate tool to reduce subject-to-subject biological variability when the interest is focused on characterizing a population from which certain individuals are obtained, as in the present study [20], and provides reliable results that reflect gene expression in individual donors [21]. Each pool was prepared with the same amount of RNA from individual monocyte cultures. We used the RNA pools to analyze gene-expression profiles through microarray technology (Progenika Biopharma SA, Zamudio, Spain). Briefly, cDNA was prepared by reverse transcription, and biotinylated RNA preparation was performed according to the Affymetrix® protocol (Affymetrix Inc., CA, USA). Labeled cRNA was purified using the GeneChip® Sample Cleanup Module from Affymetrix, fragmented and hybridized to Affymetrix Human Genome U133A 2.0 GeneChip array. All nine hybridized arrays were considered of enough quality to be further analyzed, according to the

presence of spike controls and the 3':5' sequence ratio of the housekeeping gene glyceraldehyde phosphate dehydrogenase.

GeneChip arrays were washed and scanned using a GeneArray Scanner, and scanned images were quantified according to Affymetrix standard procedures to obtain a signal intensity for each gene in each array. Raw expression values were preprocessed using the robust multiarray averaging RMA method [22], a three-step process that integrates background correction, normalization and summarization of probe values. These normalized values were the basis for all the analysis.

Prior to any analysis, data were submitted to nonspecific filtering to remove low-signal genes and low-variability genes (those genes whose standard deviation between all samples did not exceed a minimum threshold).

Data analysis

The selection of differentially expressed genes between conditions was based on a linear model analysis with empirical Bayes moderation of the variance estimates following the methodology developed by Smyth [23]. In order to deal with the multiple testing issues derived from the fact that many tests (one per gene) are performed simultaneously, p-values were adjusted to obtain strong control over the false-discovery rate using the Benjamini and Hochberg method [24]. We called 'differentially expressed' those genes whose change showed a p-value 0.01 or less.

Pathway analysis was performed by an over-representation analysis, as originally described by Draghici *et al.*, which allows to use either Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) or gene ontology (GO) information in a unified manner [25]. This type of analysis performs statistical tests to determine whether a given set, either a particular GO category or pathway, is over- or under-represented in the list of selected genes with respect to a reference set from where it has been selected. The reference set is usually taken to be all the genes included in the analysis.

Quantitative real-time RT-PCR

To confirm the expression patterns of upregulated or downregulated genes, we chose several genes for further analysis using quantitative real-time RT-PCR. Complementary DNA was synthesized from the same RNA samples used in microarray experiments by mixing 0.5 µg of

total RNA, 125 ng of random hexamers in the presence of 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol, 200 U Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, 20 U RNasin, 0.5 mM of each dNTP (Sigma, MO, USA) and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.3). Samples were incubated at 37°C for 60 min. Real-time PCR was performed in the Perkin-Elmer ABI Prism 7700 sequence-detection system. TaqMan® Universal PCR Master Mix and PCR primers and TaqMan probes (listed in Table 1) were obtained from TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, CA, USA). As an internal control, primers for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) were amplified in parallel with the genes of interest. All samples were run in triplicate. Sequence Detector Software (SDS 1.9.1; Applied Biosystems) was used for data analysis. A threshold cycle value (C_T) was obtained for each amplification plot, and, after normalization by the reference gene *GAPDH*, the relative expression ratio for each gene was calculated, based on the difference between the mean C_T of the sample and the corresponding control. Data are presented as mean \pm SD, and

statistical analyses were performed by t-tests with the computer program GraphPad Instat® (CA, USA).

Results

Clinical characteristics

The clinical characteristics of the two study groups are summarized in Table 2. FCH patients and controls were matched for age and adiposity measures. They had comparable blood pressure and similarly elevated insulin levels, but a widely different lipid profile by study design. FFA levels were higher and adiponectin levels were lower in the FCH group than in controls.

Treatment with atorvastatin

Table 2 also shows the serum lipid and lipoprotein changes of FCH patients after 4 weeks of treatment with atorvastatin 40 mg/day. The changes in total cholesterol (-39%), LDL cholesterol (-47%), HDL cholesterol (4%), triglycerides (-36%), apoB (-34%) and CRP (-36%) were all significant. No changes in adiposity, blood pressure, glycemic control or circulating levels of leptin and adiponectin were observed.

Table 1. TaqMan® gene expression assays probes.

| Gene name | Symbol | Assay ID |
|---|----------------|---------------|
| Activated leukocyte cell adhesion molecule | <i>ALCAM</i> | Hs00233455_m1 |
| CD163 | <i>CD163</i> | Hs00174705_m1 |
| CD36 | <i>CD36</i> | Hs00169627_m1 |
| CD96 | <i>CD96</i> | Hs00175524_m1 |
| Fibronectin 1 | <i>FN1</i> | Hs00415006_m1 |
| Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | <i>GAPDH</i> | Hs99999905_m1 |
| Grancalcin | <i>GCA</i> | Hs00201854_m1 |
| Guanine nucleotide-binding protein (G protein), α 13 | <i>GNA13</i> | Hs00183573_m1 |
| IL-1 receptor, type II | <i>IL1R2</i> | Hs00174759_m1 |
| Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1 | <i>LFI1</i> | Hs00394267_m1 |
| Lipoprotein lipase | <i>LPL</i> | Hs00173425_m1 |
| Microphthalmia-associated transcription factor | <i>MITF</i> | Hs00165156_m1 |
| Myeloid cell nuclear differentiation antigen | <i>MNDA</i> | Hs00159210_m1 |
| Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3 | <i>NOR1</i> | Hs00545007_m1 |
| Syndecan 2 | <i>SDC2</i> | Hs00299807_m1 |
| Tissue factor pathway inhibitor 2 | <i>TFPI2</i> | Hs00197918_m1 |
| Translocase of outer mitochondrial membrane 70 homolog A | <i>TOMM70A</i> | Hs00207896_m1 |
| Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25 | <i>DR3</i> | Hs00237054_m1 |

Table 2. Characteristics of study groups and effects of a 4-week course of atorvastatin treatment in familial combined hyperlipidemia subjects.

| Variables | Control (n = 12) | FCH (n = 12) | | p-value* | p-value [‡] |
|--|-------------------|------------------|------------------|----------|----------------------|
| | | Baseline | Treatment | | |
| Age (years) | 55 ± 12 | 54 ± 10 | – | 0.881 | – |
| BMI (kg/m ²) | 27.1 ± 2.6 | 26.9 ± 2.6 | 26.9 ± 2.5 | 0.850 | 0.523 |
| Weight (kg) | 76.7 ± 6.2 | 78.8 ± 9.2 | 78.9 ± 9 | 0.519 | 0.536 |
| Waist circumference (cm) | 98 ± 8 | 97 ± 8 | 97 ± 8 | 0.762 | 0.339 |
| Current smoking, n (%) | 2 (17) | 2 (17) | – | – | – |
| Systolic BP (mmHg) | 128 ± 12 | 132 ± 11 | 132 ± 11 | 0.404 | 0.449 |
| Diastolic BP (mmHg) | 82 ± 7 | 84 ± 10 | 83 ± 9 | 0.576 | 0.413 |
| Glycemic control | | | | | |
| Fasting glucose (mg/dl) | 88 ± 6 | 90 ± 8 | 88 ± 4 | 0.592 | 0.385 |
| Fasting insulin (mU/l) | 18.0 ± 13.1 | 16.9 ± 5.5 | 16.2 ± 5.2 | 0.791 | 0.665 |
| Free fatty acids (μmol/l) | 213 (111–289) | 371 (228–642) | 388 (248–532) | 0.013 | 0.386 |
| Lipids (mg/dl) | | | | | |
| Total cholesterol | 210 ± 29 | 338 ± 50 | 206 ± 34 | <0.001 | <0.001 |
| LDL cholesterol | 137 ± 20 | 234 ± 47 | 123 ± 31 | <0.001 | <0.001 |
| HDL cholesterol | 53 ± 9 | 47 ± 7 | 49 ± 7 | 0.054 | <0.001 |
| Triglycerides | 91 (69–107) | 250 (206–292) | 159 (135–195) | <0.001 | 0.002 |
| Apolipoprotein B (g/l) | 1.06 ± 0.13 | 1.58 ± 0.24 | 1.04 ± 0.16 | <0.001 | <0.001 |
| Apolipoprotein AI (g/l) | 1.36 ± 0.17 | 1.30 ± 0.12 | 1.34 ± 0.09 | 0.390 | 0.084 |
| Adipocytokines & inflammation-related molecules | | | | | |
| Leptin (ng/ml) | 9.4 ± 4.7 | 11.6 ± 4.9 | 11.7 ± 4.7 | 0.274 | 0.939 |
| Adiponectin (μg/ml) | 6.7 ± 2.1 | 4.8 ± 1.7 | 5.0 ± 2.2 | 0.023 | 0.597 |
| hsCRP (mg/l) | 2.25 (1.57–3.70) | 2.20 (1.07–3.07) | 1.40 (0.90–2.70) | 0.887 | 0.037 |
| sTNF-R 60 kDa (ng/ml) | 2.42 (1.78–3.11) | 2.27 (1.98–2.60) | 2.15 (1.71–2.35) | 0.551 | 0.041 |
| sTNF-R 80 kDa (ng/ml) | 6.05 (4.85–11.56) | 5.08 (4.08–6.72) | 6.18 (4.35–7.26) | 0.211 | 0.407 |
| Fibronectin (μg/ml) | 45.3 ± 15.7 | 45.7 ± 18.8 | 29.3 ± 14.2 | 0.902 | 0.045 |

Data as mean ± SD or medians (interquartile ranges). Differences between control and baseline FCH group

*Differences between control and baseline FCH group by unpaired t-test or the Mann–Whitney test and between baseline and on-treatment with atorvastatin 40 mg/day in the FCH group

[‡]Differences between control and baseline FCH group by paired t-test or the Wilcoxon test.

BP: Blood pressure; FCH: Familial combined hyperlipidemia; HDL: High-density lipoprotein; hsCRP: High-sensitivity C-reactive protein; LDL: Low-density lipoprotein; SD: Standard deviation; sTNF-R: Soluble tumor necrosis factor receptor.

Differentially expressed genes

We identified 82 probe sets of differentially expressed genes in monocytes from FCH and controls, 46 downregulated and 36 upregulated (Table 3 & Table S1 in the supplementary material). When we compared the gene-expression profile in monocytes from FCH patients at baseline and after atorvastatin treatment, 86 probe sets were differentially expressed, 36 downregulated and 50 upregulated (Table 4 & Table S2 in the supplementary material).

According to GO data mining for molecular function, the transcriptional profile induced by FCH in monocytes was mainly related to receptor activity, Glycosylphosphatidylinositol

(GPI)-anchor binding, interferon-class cytokine receptor activity, interleukin binding, iron–iron binding, and hydrolase and methyltransferase activity, these functional categories being the most enriched in up- and down-regulated genes. A significant number of FCH-modulated genes coded for proteins implicated in immune response, neutrophil chemotaxis and activation, response to wounding, cell-fate determination, coagulation, multicellular organismal processes and bacterium response. Monocytes from atorvastatin-treated FCH patients also showed a prominent expression of genes involved in multicellular organismal processes, cellular lipid metabolism, response to external stimuli and

Table 3. Top 20 most differentially expressed genes in monocytes from familial combined hyperlipidemia subjects compared with controls.

| Gene name | Symbol | FCH vs CT (fold change) | p-value | Adjusted p-value | GenBank accession number | Function |
|--|------------------|-------------------------------|---------|---------------------|--------------------------------|--|
| Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c | <i>TNFRSF10C</i> | 0.30 | 0.0063 | 0.290 | AF012536 | Inflammation |
| Interleukin 8 receptor, β | <i>IL8FB</i> | 0.30 | 0.0006 | 0.138 | NM_001557 | Inflammation |
| Myeloid cell nuclear differentiation antigen | <i>MNDA</i> | 0.33 | 0.0001 | 0.100 | NM_002432 | Cell death/cell growth and differentiation |
| Vanin 2 | <i>VNN2</i> | 0.34 | 0.0001 | 0.100 | NM_004665 | Cell migration |
| Thrombomodulin | <i>THBD</i> | 0.35 | 0.0011 | 0.138 | NM_000361 | Coagulation |
| Matrix metalloproteinase 12 | <i>MME</i> | 0.37 | 0.0003 | 0.100 | NM_007287 | Extracellular matrix |
| LCCL domain containing cysteine-rich secretory protein 2 | <i>CRISPLD2</i> | 0.38 | 0.0004 | 0.122 | AL136861 | Unknown |
| CYP 4F3 | <i>CYP4F3</i> | 0.39 | 0.0042 | 0.263 | NM_000896 | Metabolism |
| Hypothetical protein MGC31957 | <i>MGC31957</i> | 0.41 | 0.0089 | 0.290 | BC005043 | Unknown |
| CD36 antigen | <i>CD36</i> | 0.42 | 0.0058 | 0.290 | NM_000072 | Lipid transport |
| Tensin 3 | <i>TNS3</i> | 2.42 | 0.0065 | 0.289 | NM_022748 | Inflammation |
| Syndecan 2 | <i>SDC2</i> | 2.50 | 0.0002 | 0.100 | AL577322 | Cell-cell/cell-matrix adhesion |
| Autocrine motility factor receptor | <i>AMFR</i> | 2.57 | 0.0001 | 0.100 | NM_001144 | Cell motility |
| Platelet-derived growth factor D | <i>PDGFC</i> | 2.58 | 0.0006 | 0.138 | NM_016205 | Cell proliferation |
| HtrA serine peptidase 1 | <i>HTRA1</i> | 2.58 | 0.0031 | 0.220 | NM_002775 | Cell growth |
| Activated leukocyte cell-adhesion molecule | <i>ALCAM</i> | 2.60 | 0.0003 | 0.100 | AA156721 | Response to pathogens/inflammation |
| Fibronectin 1 | <i>FN1</i> | 2.60 | 0.0002 | 0.100 | BC005858 | Extracellular matrix |
| Lipoprotein lipase | <i>LPL</i> | 2.90 | 0.0081 | 0.290 | BF672975 | Fatty acid metabolism |
| Lysosomal-associated membrane protein 3 | <i>LAMP3</i> | 3.00 | 0.0063 | 0.289 | NM_014398 | Immune response |
| Tissue factor pathway inhibitor 2 | <i>TFPI2</i> | 3.97 | 0.0009 | 0.138 | L27624 | Extracellular matrix turnover |

The table shows the name, relative expression, p-value (calculated by ANOVA test), adjusted P value (calculated by the Sng, the Benjamini and the Hochberg methods, which controls the false discovery rate) and GenBank accession number of the genes that were differentially expressed in monocytes of FCH and controls. The last column indicates the functional categories to which the genes belong. Results are the mean of three independent experiments performed per each condition.

ANOVA: Analysis of variance; CT: Control; FCH: Familial combined hyperlipidemia.

immune response. Over-representation analysis was also performed using the pathway resource KEGG. As shown in Table 5, KEGG analysis revealed over-representation of seven categories and under-representation of one category in the two comparisons established. Interestingly, two immune-related categories were over-represented: the complement and coagulation cascades and the hematopoietic cell lineage pathway. Another enriched category was the

arachidonic acid metabolism pathway, which, in addition to being related to lipid metabolism, is a network leading to production of proinflammatory mediators.

To validate the array results, several genes were selected for analysis by real-time PCR on the basis of their fold regulation and biological relevance (Figures 1 & 2). The experiments were performed using the same total RNA pools used in the arrays.

Table 4. Top 20 most differentially expressed genes in monocytes from familial combined hyperlipidemia subjects after treatment with atorvastatin compared with baseline.

| Gene name | Symbol | Treated vs FCH (fold change) | p-value | Adjusted p-value | GenBank accession number | Function |
|---|-----------------|------------------------------|---------|------------------|--------------------------|--|
| Matrix metalloproteinase 10 | <i>MMP10</i> | 0.51 | 0.0018 | 0.312 | NM_002425 | Extracellular matrix |
| CD96 | <i>CD96</i> | 0.52 | 0.0007 | 0.312 | NM_005816 | Immune response |
| KIAA0256 | <i>KIAA0256</i> | 0.52 | 0.0010 | 0.312 | N52532 | Unknown |
| NMDA receptor regulated 1 | <i>NARG1</i> | 0.56 | 0.0014 | 0.312 | AF327722 | Unknown |
| α -thalassemia/mental retardation syndrome X-linked | <i>ATRX</i> | 0.58 | 0.0039 | 0.312 | A1650257 | Transcription regulation |
| Tissue factor pathway inhibitor 2 | <i>TFPI2</i> | 0.58 | 0.0025 | 0.312 | L27624 | Extracellular matrix turnover |
| Dedicator of cytokinesis 9 | <i>DOCK9</i> | 0.58 | 0.0031 | 0.312 | AL576253 | GTP binding |
| Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1 | <i>LRIG1</i> | 0.59 | 0.0032 | 0.312 | AB050468 | EGFR signaling/cell growth |
| Protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor α | <i>PKIA</i> | 0.59 | 0.0024 | 0.312 | NM_006823 | Protein kinase regulation |
| Structural maintenance of chromosomes 3 | <i>SMC3</i> | 0.59 | 0.0031 | 0.312 | A1373676 | Mitosis |
| Interferon-induced protein 44 | <i>IF44</i> | 1.95 | 0.0015 | 0.312 | NM_006417 | Response to virus |
| Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase) | <i>MMP8</i> | 1.96 | 0.0006 | 0.312 | NM_002424 | Extracellular matrix remodeling |
| Peptidase inhibitor 3, skin-derived (SKALP) | <i>PI3</i> | 2.08 | 0.0002 | 0.312 | L10343 | Elastase inhibition |
| Myeloid cell nuclear differentiation antigen | <i>MNDA</i> | 2.12 | 0.0016 | 0.312 | NM_002432 | Cell death/cell growth and differentiation |
| LCCL domain containing cysteine-rich secretory protein 2 | <i>CRISPLD2</i> | 2.13 | 0.0008 | 0.312 | AL136861 | Unknown |
| Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2) | <i>CDKN1C</i> | 2.16 | 0.0038 | 0.312 | N33167 | Cell cycle |
| Hairy and enhancer of split 1, (<i>Drosophila</i>) | <i>HES1</i> | 2.23 | 0.0084 | 0.312 | NM_005524 | Transcription regulation |
| CD36 antigen | <i>CD36</i> | 2.30 | 0.0019 | 0.312 | NM_00072 | Lipid transport |
| Guanine nucleotide binding protein (G protein), α 13 | <i>GNA13</i> | 2.43 | 0.0028 | 0.319 | NM_006572 | G-protein signaling |
| Radical Sadenosyl methionine domain containing 2 | <i>RSAD2</i> | 2.60 | 0.0063 | 0.319 | A1337069 | Response to virus |

The table shows the name, relative expression, p value (calculated by ANOVA test), adjusted p-value (calculated by the Sng, the Benjamini and the Hochberg methods, which controls the false discovery rate) and GenBank accession number of the genes that were differentially expressed in monocytes of FCH subjects after treatment with atorvastatin compared with baseline. The last column indicates the functional categories to which the genes belong. Results are the mean of 3 independent experiments performed per each condition.

ANOVA: Analysis of variance; FCH: Familial combined hyperlipidemia.

Genes differentially expressed in monocytes of FCH patients & control subjects

According to the array results, one of the more strongly downregulated genes in FCH is myeloid

cell nuclear differentiation antigen (*MNDA*) (array ratio: 0.33). PCR results confirmed the decreased expression of *MNDA* (ratio: 0.42). We also used this method to confirm the underexpression of

IL-1 receptor type 2 (*IL1R2*; array ratio: 0.43; PCR ratio: 0.37). Other downregulated genes were grancalcin (array ratio: 0.43; PCR ratio: 0.46), *CD36* (array ratio: 0.42; PCR ratio: 0.52), and *CD163* (array and PCR ratio: 0.47).

Lipoprotein lipase (*LPL*), a gene that encodes a key enzyme in lipid metabolism that has previously been linked to FCH susceptibility, was found to be upregulated 2.9-fold (both assays) in monocytes from diseased individuals. Tissue factor pathway inhibitor 2 (*TFPI2*), a serine protease inhibitor relevant to plaque development and stability via the control of extracellular matrix (ECM) turnover, was upregulated 3.8-fold according to the array results and 6.5-fold by PCR. Two ECM genes potentially involved in atherosclerosis development were also upregulated, fibronectin 1 (*FN1*; array ratio: 2.6; PCR ratio: 2.45) and syndecan 2 (*SDC2*; array ratio: 2.5; PCR ratio: 2.49). Other upregulated genes activated were leukocyte cell-adhesion molecule, a protein of the immunoglobulin superfamily of cell adhesion molecules involved in inflammatory and immune responses (*ALCAM*; array ratio: 2.6; PCR ratio: 2.76), leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains-1 (*LRIG1*; array ratio: 1.80; PCR ratio: 2.52), and microphthalmia-associated transcription factor (*MITF*; array ratio: 1.95; PCR ratio: 2.55). Additionally, we analyzed the expression of tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25, also termed death receptor 3 (*DR3*), and *CD96*, which were increased by both methods (*DR3*: array ratio: 1.48, PCR ratio: 1.84; *CD96*: array ratio: 1.79, PCR ratio: 1.72).

Genes differentially expressed in FCH monocytes after atorvastatin treatment

Several genes that were overexpressed at baseline in FCH patients (*TFPI2*, *LRIG1* and *DR3*) were downregulated in response to atorvastatin (array ratios: 0.58, 0.59 and 0.72, respectively; PCR ratios: 0.29 for *TFPI2* and 0.51 for *LRIG1* and *DR3*). In addition, *LPL* showed increased expression in monocytes from FCH patients, and the expression was reduced after atorvastatin treatment (array ratio: 0.61; PCR ratio: 0.55). Other genes downregulated by treatment and selected for validation were *CD96* and translocase of the outer mitochondrial membrane 70 homolog A (*TOMM70A*; array ratios: 0.52 and 0.71, respectively). Both genes were also under-expressed by PCR, although to a lesser extent (0.73 and 0.81, respectively).

On the other hand, *CD36* and *MNDA*, which showed lower expression in FCH samples compared with controls, were upregulated after atorvastatin treatment. This was also confirmed by real-time PCR: *CD36* (array ratio: 2.30; PCR ratio: 1.67); *MNDA* (array ratio: 2.12; PCR ratio: 1.79). However, the expression of guanine nucleotide binding protein α 13 (*GNAI3*), nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3 (*NOR1*) and *IL1R2*, which were upregulated according to the array results, was not significantly changed by PCR.

Discussion

The pathogenesis and genetic abnormalities underlying FCH are not fully understood. Microarray technology has provided a tool to analyze the expression pattern of thousands of genes simultaneously, allowing the identification of novel genes and pathways involved in complex diseases such as FCH. In this study, we examined the gene-expression profile in monocytes from normolipidemic controls and FCH patients before and after treatment with atorvastatin. Using Affymetrix oligonucleotide arrays, we observed the differential expression of 82 and 86 genes between FCH and controls and before and after treatment, respectively. A limitation of our study is that owing to the small number of samples the statistical power may be low, and there is a probably certain number of false negatives. However, even though we cannot rule out that some changes in gene expression have been missed, our data show that there is a different gene-expression pattern in monocytes from controls and FCH patients, and that atorvastatin treatment is able to reverse, at least partially, some of these changes.

Several of the differentially expressed genes are involved in key macrophage functions, especially regarding the inflammatory and immune responses. Accordingly, pathway analysis revealed the over-representation of immune-related categories, such as complement and coagulation cascades and hematopoietic cell lineage pathways, as well as the proinflammatory arachidonic acid metabolism pathway. This pattern suggests the differential expression of inflammation and immune response pathways. Low-grade arterial wall inflammation is characteristic of FCH [4], and exposure to this proinflammatory environment may affect the expression of genes that respond to these stimuli or are involved in inflammation cascades.

Table 5. Representative pathways identified by KEGG analysis.

| Pathway | p-value | IDs in selected genes | IDs in analyzed genes | Over/under | Comparison |
|---|---------|-----------------------|-----------------------|------------|------------------|
| Nucleotide sugars metabolism | 0.0184 | 2 | 3 | Over | FCH vs CT |
| Aminoacyl-tRNA biosynthesis | 0.0348 | 2 | 4 | Over | FCH vs CT |
| Complement and coagulation cascades | 0.0012 | 7 | 18 | Over | FCH vs CT |
| Nicotinate and nicotinamide metabolism | 0.0017 | 5 | 10 | Over | FCH vs CT |
| Arachidonic acid metabolism | 0.0137 | 4 | 10 | Over | FCH vs CT |
| Caprolactam degradation | 0.0295 | 2 | 3 | Over | FCH vs CT |
| Hematopoietic cell lineage | 0.0335 | 9 | 45 | Over | FCH vs CT |
| Natural killer cell-mediated cytotoxicity | 0.0066 | 0 | 57 | Under | FCH vs CT |
| Complement and coagulation cascades | 0.0012 | 7 | 18 | Over | FCH + ATV vs FCH |
| Hematopoietic cell lineage | 0.0038 | 11 | 45 | Over | FCH + ATV vs FCH |
| Nitrogen metabolism | 0.0169 | 3 | 6 | Over | FCH + ATV vs FCH |
| Calcium signaling pathway | 0.024 | 6 | 23 | Over | FCH + ATV vs FCH |
| One-carbon pool by folate | 0.0171 | 2 | 3 | Over | FCH + ATV vs FCH |
| T-cell-receptor signaling pathway | 0.0209 | 8 | 46 | Over | FCH + ATV vs FCH |
| Aminoacyl-tRNA biosynthesis | 0.0326 | 2 | 4 | Over | FCH + ATV vs FCH |
| Antigen processing and presentation | 0.0353 | 0 | 30 | Under | FCH + ATV vs FCH |

The table shows the over- and under-represented pathways in each comparison, along with the p-values and the number of genes ('IDs') belonging to each pathway found in the list of selected genes or in all the genes analyzed, respectively.

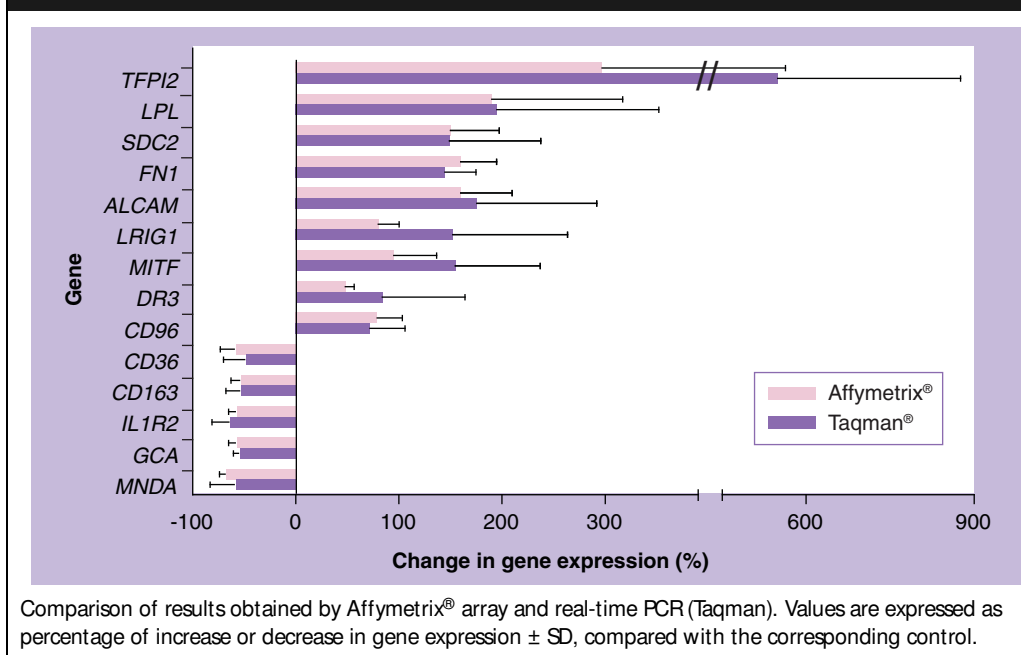
ATV: Atorvastatin; CT: Control; FCH: Familial combined hyperlipidemia; IDs: Identities; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

A major finding in this study was the reversal of some of the changes in gene expression in FCH monocytes after atorvastatin treatment. Thus, the baseline underexpression of *CD36* and *MNDA* in FCH patients was increased after treatment, while the expression of *LPL*, *LRIG1*, *DR3*, *TFPI2* and *CD96*, which was upregulated at baseline, was reduced in samples from atorvastatin-treated patients. Considering that altered gene expression is related to the inflammatory phenotype of untreated FCH, reversion towards control expression might be owing to the anti-inflammatory effects of atorvastatin [26], as evidenced by decreased CRP concentration and levels of other inflammatory molecules after treatment (Table 2).

Changes in the expression of these genes may be relevant to FCH and atherosclerosis development. Thus, the observed decrease in *CD36* expression could reflect the proinflammatory milieu surrounding circulating monocytes in FCH. It has been shown that *CD36* expression in monocytes/macrophages is downregulated by several inflammatory mediators, such as lipopolysaccharide, suggesting that *CD36* expression is lower during inflammation [27]. The increase in *CD36* expression by atorvastatin treatment, an effect previously reported in human monocytes [28], may be related to the anti-inflammatory properties of the statins.

In contrast to the downregulation of the abovementioned genes, FCH monocytes showed increased expression of *LPL*, *LRIG1*, *DR3* and *TFPI2*, while atorvastatin treatment reversed these effects. Plasma LPL plays a key role in the clearance of triglyceride-rich lipoproteins, and it has been shown that approximately a third of FCH patients have low post-heparin LPL activity compared with the general population [4]. However, in addition to its enzymatic function, LPL possesses a bridging function that contributes to lipoprotein uptake and lipid accumulation in vascular cells such as macrophages [29]. In addition, LPL induces TNF- α secretion from macrophages, thus playing a role in the inflammatory response [30]. Therefore, the increase in *LPL* expression in monocytes from FCH patients may be related to their increased susceptibility to atherosclerosis, similar to what Beauchamp *et al.* reported in patients with familial hypercholesterolemia [31]. Accordingly, the lower expression of *LPL* after atorvastatin treatment may be regarded as an antiatherogenic effect.

LRIG1 transcriptional induction leads to the ubiquitylation and degradation of the EGF receptor [32]. Considering the role of this receptor in atherogenesis as a mediator of monocyte and macrophage chemotaxis [33], the increase in

Figure 1. Validation of differentially expressed genes in familial combined hyperlipidemia samples compared with controls.

LRIG1 expression in FCH monocytes may be regarded as an adaptive mechanism to prevent excessive EGF signaling.

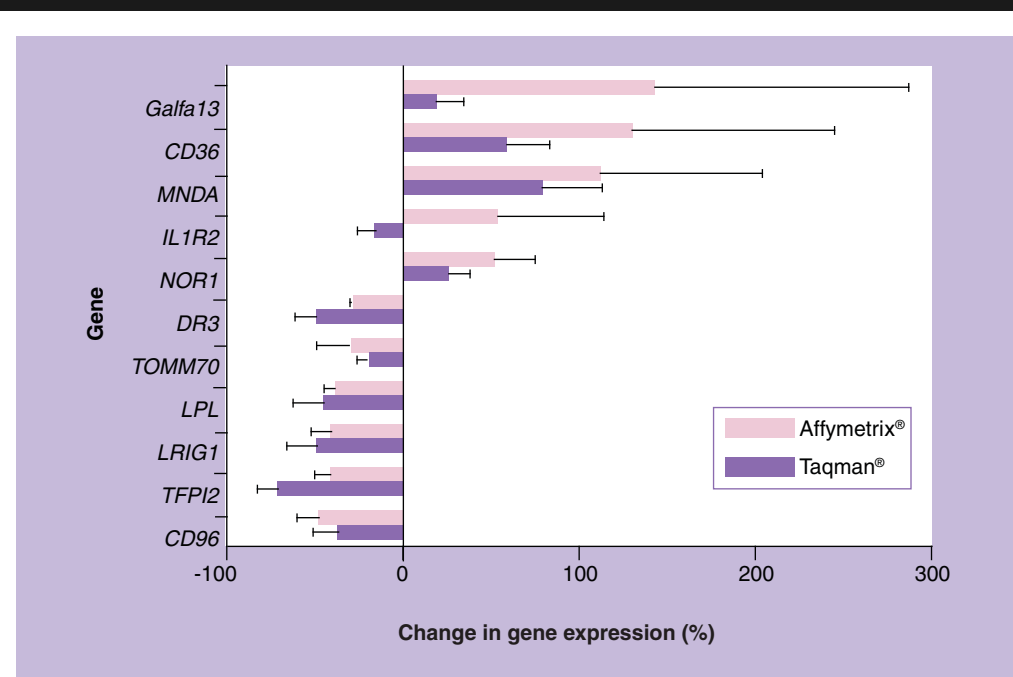
Death receptor 3, a member of the TNF receptor superfamily involved in the induction of apoptosis [34], was also overexpressed in FCH monocytes. DR3 activation stimulates NF- κ B [35], proinflammatory cytokines/chemokines, and matrix metalloproteinases (MMP) [36], which suggests a role in atherogenesis. This is further supported by data from Kang *et al.* showing that human atherosclerotic plaques express DR3 colocalized with macrophages and foam cells, and increased DR3 expression in peripheral blood monocytes after proinflammatory stimuli [37]. The inflammatory surroundings of FCH monocytes may also increase DR3 expression, while the anti-inflammatory effects of atorvastatin would reverse this effect.

Tissue factor pathway inhibitor 2 is a serine protease inhibitor associated with the ECM. Reports on TFPI2 expression in atherosclerotic lesions are conflicting, as both upregulation [38] and downregulation [39] have been described. In the monocytes of our FCH patients, *TFPI2* was one of the most overexpressed genes. Increased TFPI2 expression leads to inhibition of plasmin and of MMP activation, relevant to plaque development and instability [38]. The downregulation of *TFPI2* expression by atorvastatin could alter the maintenance and regulation of ECM remodeling.

In contrast to the above-commented results, some of the changes in gene expression observed in FCH monocytes (decreases in *GCA* and *CD163*, and increases in *MITF*, *ALCAM*, *FN1* and *SDC2* expression) were not reversed by atorvastatin treatment. The metabolic response of FCH patients to atorvastatin may shed some light on the different effects of the drug on gene-expression. The low levels of adiponectin, which is an anti-inflammatory adipokine [40], were similar in FCH patients before and after atorvastatin treatment. Similarly, increased FFA levels at baseline were not modified, and plasma triglyceride levels were reduced, but not normalized, by treatment (Table 2). This suggests that statin treatment does not correct the metabolic abnormalities associated with adipose tissue dysregulation in FCH [4]. It is possible that some of the changes in gene expression observed in monocytes from FCH patients are directly or indirectly related to those metabolic effects. This would explain why atorvastatin, through its anti-inflammatory effects, is able to reverse or correct some of the changes in gene expression induced by FCH, while modifications in gene expression that are linked to metabolic disturbances could not be corrected by the treatment.

In conclusion, our results show a different transcription profile in FCH monocytes compared with those of matched healthy controls.

Figure 2. Validation of differentially expressed genes in FCH after atorvastatin treatment compared with baseline.



Comparison of results obtained by Affymetrix® array and real-time PCR (Taqman®). Values are expressed as percentage of increase or decrease in gene expression ± SD, compared with the corresponding control.

We propose that a local inflammatory environment and metabolic abnormalities in adipose tissue may account for some of the observed changes in gene expression in FCH, and several of them are influenced by atorvastatin treatment. Such differentially expressed genes may be candidates for further studies, as for most of them there was no prior evidence of an association with atherosclerosis, or there existed only scant information on their role in this process. However, from these preliminary results, based on a relatively small sample of patients and controls, we cannot know whether the observed changes arise from primary genetic defects, adaptive responses, or both. Differential expression studies should be combined with the results of other techniques, such as genome-wide screens or candidate-gene studies, to be able to decipher the complex genetics of a disease such as FCH.

Acknowledgement

We thank the patients and controls for their participation in the study and Mr R Rycroft (Language Advice Service of the University of Barcelona) for helpful assistance.

Financial & competing interests disclosure

CIBERs *Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN)* and *Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM)* are initiatives of ISCIII. GL, JP, MV-C, RMS, JCL and MA are part of a Consolidated Research Group (Generalitat de Catalunya, SGR05-00833) with no financial aid. This study was partly supported by grants from *Fundació Privada Catalana de Nutrició i Lípids*, *Fundación Ramón Areces*, *Spanish Pharmacology Society* and ISCIII (G03/181). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

Executive summary**Introduction**

- Using the Affymetrix® Human Genome U133A 2.0 GeneChip array, we performed a global analysis of gene expression induced by familial combined hyperlipidemia (FCH) and atorvastatin in blood peripheral monocytes.

Results

- We observed the differential expression of 82 and 86 genes between FCH and controls and before and after treatment, respectively.
- Pathway analysis revealed a trend towards the differential expression of inflammatory and immune response pathways, probably as a consequence of the low-grade inflammation that is characteristic of FCH.
- Changes in the expression of *CD36*, *MNDA*, *LPL*, *TFPI2*, *LRIG1*, *DR3* and *CD96* in monocytes from FCH patients were reverted, at least in part, by atorvastatin treatment.

Discussion

- We hypothesize that these changes may be related to the inflammatory phenotype of untreated FCH, and reversion towards control expression might be owing to the anti-inflammatory effects of atorvastatin.
- Other differences in gene expression might be directly or indirectly related to metabolic abnormalities in adipose tissue, which are not corrected by atorvastatin treatment.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as either of interest (•) or of considerable interest (••) to readers.

- Hopkins PN, Heiss G, Ellison RC *et al.*: Coronary artery disease risk in familial combined hyperlipidemia and familial hypertriglyceridemia: a case-control comparison from the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Circulation* 108, 519–523 (2003).
- Ayyobi AF, McGladdery SH, McNeely MJ, Austin MA, Motulsky AG, Brunzell JD: Small, dense LDL and elevated apolipoprotein B are the common characteristics for the three major lipid phenotypes of familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 1289–1294 (2003).
- Meijssen S, Castro-Cabezas M, Twickler TB, Jansen H, Erkelens DW: *In vivo* evidence of defective postprandial and postabsorptive free fatty acid metabolism in familial combined hyperlipidemia. *J. Lipid Res.* 41, 1096–1102 (2000).
- de Graaf J, Veerkamp MJ, Stalenhoef AF: Metabolic pathogenesis of familial combined hyperlipidaemia with emphasis on insulin resistance, adipose tissue metabolism and free fatty acids. *J. R. Soc. Med.* 95(Suppl. 42), 46–53 (2002).
- Lee JC, Lusic AJ, Pajukanta P: Familial combined hyperlipidemia: upstream transcription factor 1 and beyond. *Curr. Opin. Lipidol.* 17, 101–109 (2006).
- van der Vleuten GM, Isaacs A, Hijmans A, van Duijn CM, Stalenhoef AF, de Graaf J: The involvement of upstream stimulatory factor 1 (USF1) in Dutch patients with familial combined hyperlipidemia. *J. Lipid Res.* 48(1), 193–200 (2006).
- Wibaut-Berlaimont V, Randi AM, Mandryko V, Lunnon MW, Haskard DO, Naoumova RP: Atorvastatin affects leukocyte gene expression in dyslipidemia patients: *in vivo* regulation of hemostasis, inflammation and apoptosis. *J. Thromb. Haemost.* 3, 677–685 (2005).
- **Interesting research paper describe the results of an array-based experiment performed using leukocytes from hypercholesterolemic individuals treated with atorvastatin.**
- Batliwalla FM, Li W, Ritchlin CT *et al.*: Microarray analyses of peripheral blood cells identifies unique gene expression signature in psoriatic arthritis. *Mol. Med.* 11(1–12), 21–29 (2006).
- Morello F, de Bruin TW, Rotter JI *et al.*: Differential gene expression of blood-derived cell lines in familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 2149–2154 (2004).
- **Differential gene-expression study using immortalized blood-derived cell lines obtained from individuals with FCH. The use of immortalization procedures precludes direct comparison with the results described in the present article.**
- Osterud B, Bjorklid E: Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol. Rev.* 83, 1069–1112 (2003).
- Zambon D, Ros E, Rodriguez-Villar C *et al.*: Randomized crossover study of gemfibrozil versus lovastatin in familial combined hyperlipidemia: additive effects of combination treatment on lipid regulation. *Metabolism* 48, 47–54 (1999).
- Gomez-Gerique JA, Gutierrez-Fuentes JA, Montoya MT *et al.*: [Lipid profile of the Spanish population: the DRECE (diet and risk of cardiovascular disease in Spain) study. DRECE study group]. *Med. Clin. (Barc.)* 113, 730–735 (1999).
- Veerkamp MJ, de Graaf J, Hendriks JC, Demacker PN, Stalenhoef AF: Nomogram to diagnose familial combined hyperlipidemia on the basis of results of a 5-year follow-up study. *Circulation* 109, 2980–2985 (2004).
- Junyent M, Gilabert R, Zambon D *et al.*: The use of Achilles tendon sonography to distinguish familial hypercholesterolemia from other genetic dyslipidemias. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2203–2208 (2005).
- Pocovi M, Civeira F, Alonso R, Mata P: Familial hypercholesterolemia in Spain: case-finding program, clinical and genetic aspects. *Semin. Vasc. Med.* 4, 67–74 (2004).
- Stein EA, Black DM: Lipoprotein changes with statins. *Curr. Atheroscler. Rep.* 4, 14–18 (2002).
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS: Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18, 499–502 (1972).
- Junyent M, Zambon D, Gilabert R, Cofan M, Nunez I, Ros E: Carotid atherosclerosis in familial combined hyperlipidemia associated with the APOB/APOA-I ratio. *Atherosclerosis* 197, 740–746 (2008).

19. Wenham PR, Price WH, Blandell G: Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR. *Lancet* 337, 1158–1159 (1991).
20. Kerr MK: Design considerations for efficient and effective microarray studies. *Biometrics* 59, 822–828 (2003).
21. Peng X, Wood CL, Blalock EM, Chen KC, Landfield PW, Stromberg AJ: Statistical implications of pooling RNA samples for microarray experiments. *BMC Bioinformatics* 4, 26 (2003).
22. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F *et al.*: Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4, 249–264 (2003).
23. Smyth GK: Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* 3, Article 3 (2004).
24. Benjamini Y, Hochberg Y: Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. B.* 57, 289–300 (1995).
25. Draghici S, Khatri P, Martins RP, Ostermeier GC, Krawetz SA: Global functional profiling of gene expression. *Genomics* 81, 98–104 (2003).
26. Davignon J: Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation* 109, III39–III43 (2004).
27. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL: CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J. Clin. Invest* 108, 785–791 (2001).
- **Focuses on the different biological roles of CD36, not only in cellular lipid accumulation, but also in inflammation and related conditions.**
28. Ruiz-Velasco N, Dominguez A, Vega MA: Statins upregulate CD36 expression in human monocytes, an effect strengthened when combined with PPAR- γ ligands putative contribution of Rho GTPases in statin-induced CD36 expression. *Biochem. Pharmacol.* 67, 303–313 (2004).
29. Clee SM, Bissada N, Miao F *et al.*: Plasma and vessel wall lipoprotein lipase have different roles in atherosclerosis. *J. Lipid Res.* 41, 521–531 (2000).
30. Reiner G, Oliver M, Skamene E, Radzioch D: Induction of tumor necrosis factor α gene expression by lipoprotein lipase requires protein kinase C activation. *J. Lipid Res.* 35, 1413–1421 (1994).
31. Beauchamp MC, Letendre E, Renier G: Macrophage lipoprotein lipase expression is increased in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *J. Lipid Res.* 43, 215–222 (2002).
- **First article describing an increase in low-density lipase expression in patients with hyperlipemia, in this case familial hypercholesterolemia, consistent with what we have observed in patients with FCH.**
32. Rubin C, Gur G, Yarden Y: Negative regulation of receptor tyrosine kinases: unexpected links to c-Cbl and receptor ubiquitylation. *Cell Res* 15, 66–71 (2005).
33. Lamb DJ, Modjtahedi H, Plant NJ, Ferns GA: EGF mediates monocyte chemotaxis and macrophage proliferation and EGF receptor is expressed in atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 176, 21–26 (2004).
34. Borysenko CW, Furey WF, Blair HC: Comparative modeling of TNFRSF25 (DR3) predicts receptor destabilization by a mutation linked to rheumatoid arthritis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 794–799 (2005).
35. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu GL *et al.*: Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274, 990–992 (1996).
36. Bobik A, Kalinina N: Tumor necrosis factor receptor and ligand superfamily family members TNFRSF14 and LIGHT: new players in human atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 1873–1875 (2001).
37. Kang YJ, Kim WJ, Bae HU *et al.*: Involvement of TL1A and DR3 in induction of pro-inflammatory cytokines and matrix metalloproteinase-9 in atherogenesis. *Cytokine* 29, 229–235 (2005).
- **DR3 is one of the genes that has been upregulated in FCH patients and downregulated by atorvastatin in the present study. This paper reveals the potential connections between DR3 and atherosclerosis.**
38. Crawley JT, Goulding DA, Ferreira V, Severs NJ, Lupu F: Expression and localization of tissue factor pathway inhibitor-2 in normal and atherosclerotic human vessels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 218–224 (2002).
- **Article showing that TFPI-2, one of the genes whose expression is altered in FCH patients and reverted by atorvastatin treatment, is expressed in human atherosclerotic lesions.**
39. Tuomisto TT, Korkeela A, Rutanen J *et al.*: Gene expression in macrophage-rich inflammatory cell infiltrates in human atherosclerotic lesions as studied by laser microdissection and DNA array: overexpression of HMG-CoA reductase, colony stimulating factor receptors, CD11A/CD18 integrins, and interleukin receptors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 2235–2240 (2003).
40. Tilg H, Moschen AR: Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 772–783 (2006).

Supplementary Material

Table S1. Genes differentially expressed in monocytes from familial combined hyperlipidemia subjects compared with controls .

| Gene name | Symbol | FCH vs CT (fold change) | p-value | Adjusted p-value | GenBank accession number | Function |
|--|------------------|-------------------------|---------|------------------|--------------------------|--|
| Vanin 2 | <i>VNN2</i> | 0.34 | 0.0001 | 0.100 | NM_004665 | Cell migration |
| Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c | <i>TNFRSF10C</i> | 0.30 | 0.0063 | 0.290 | AF012536 | Inflammation |
| Interleukin 8 receptor, β | <i>IL8RB</i> | 0.30 | 0.0006 | 0.138 | NM_001557 | Inflammation |
| Myeloid cell nuclear differentiation antigen | <i>MNDA</i> | 0.33 | 0.0001 | 0.100 | NM_002432 | Cell death/cell growth and differentiation |
| Thrombomodulin | <i>THBD</i> | 0.35 | 0.0011 | 0.138 | NM_000361 | Coagulation |
| Matrix metalloproteinase 12 | <i>MME</i> | 0.37 | 0.0003 | 0.100 | NM_007287 | Extracellular matrix |
| LCCL domain containing cysteine-rich secretory protein 2 | <i>CRISPLD2</i> | 0.38 | 0.0004 | 0.122 | AL136861 | Unknown |
| CYP 4F3 | <i>CYP4F3</i> | 0.39 | 0.0042 | 0.263 | NM_000896 | Metabolism |
| Hypothetical protein MGC31957 | <i>MGC31957</i> | 0.41 | 0.0089 | 0.290 | BC005043 | Unknown |
| CD36 antigen | <i>CD36</i> | 0.42 | 0.0058 | 0.290 | NM_000072 | Lipid transport |
| Fc fragment of CD16B | <i>FCGR3B</i> | 0.42 | 0.0008 | 0.137 | J04162 | Immune response |
| Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C | <i>CDKN1C</i> | 0.42 | 0.0032 | 0.222 | N33167 | Regulator of cell proliferation |
| Fibrinogen-like 2 | <i>FGL2</i> | 0.43 | 0.0087 | 0.290 | NM_006682 | Coagulation |
| Grancalcin | <i>GCA</i> | 0.43 | 0.0013 | 0.148 | NM_012198 | Cell adhesion/inflammation |
| Interleukin 1 receptor, type II | <i>IL1R2</i> | 0.43 | 0.0004 | 0.122 | NM_004633 | Immune response/inflammation |
| Interferon-induced transmembrane protein 2 | <i>IFITM2</i> | 0.47 | 0.0010 | 0.138 | NM_006435 | Immune response |
| FERM domain containing 4B | <i>FFMD4B</i> | 0.47 | 0.0003 | 0.100 | AU145019 | Cytoskeletal protein binding |
| CD163 | <i>CD163</i> | 0.47 | 0.0011 | 0.138 | NM_004244 | Inflammation |
| Flexin C1 | <i>FLXNC1</i> | 0.49 | 0.0068 | 0.290 | NM_005761 | Cell adhesion |
| Potassium channel tetramerization domain containing 20 | <i>KCTD20</i> | 0.49 | 0.0056 | 0.287 | AW500220 | Ion channel activity |
| Bone marrow stromal cell antigen 1 | <i>BST1</i> | 0.50 | 0.0020 | 0.178 | NM_004334 | Immune response |
| GTPase activating Rap/RanGAP domain-like 4 | <i>GARNL4</i> | 0.50 | 0.0043 | 0.266 | AK000478 | Unknown |
| Ribonuclease, RNase A family, 2 | <i>RNASE2</i> | 0.50 | 0.0016 | 0.165 | NM_002934 | RNA catabolism |
| Complement component 3b/4b receptor 1 | <i>CR1</i> | 0.50 | 0.0017 | 0.165 | NM-000651 | Immune response |

The table shows the name, relative expression, p-value (calculated by ANOVA test), adjusted p-value (calculated by the Sng, the Benjamini and the Hochberg methods, which controls the false discovery rate) and GenBank accession number of the genes that were differentially expressed in monocytes of FCH and controls. The last column indicates the functional categories to which the genes belong. Results are the mean of three independent experiments performed per each condition.

ANOVA: Analysis of variance; CT: Control; FCH: Familial combined hyperlipidemia.

Table S1. Genes differentially expressed in monocytes from familial combined hyperlipidemia subjects compared with controls (cont.).

| Gene name | Symbol | FCH vs CT (fold change) | p-value | Adjusted p-value | GenBank accession number | Function |
|---|-----------------|-------------------------|---------|------------------|--------------------------|---------------------------------|
| Guanine nucleotide binding protein α 13 | <i>GNA13</i> | 0.50 | 0.0080 | 0.290 | NM_006572 | Signal transduction |
| Glutamate-ammonia ligase | <i>GLUL</i> | 0.51 | 0.0025 | 0.199 | NM_002065 | Glutamine synthesis |
| Interferon-induced transmembrane protein 3 | <i>IFTM3</i> | 0.51 | 0.0018 | 0.165 | BF338947 | Immune response |
| Lipopolysaccharide-induced TNF factor | <i>LITAF</i> | 0.51 | 0.0017 | 0.165 | NM_004862 | Inflammation |
| Colony stimulating factor 3 receptor | <i>CSF3R</i> | 0.51 | 0.0027 | 0.208 | NM_000760 | Cell adhesion |
| Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13 | <i>TNFSF13</i> | 0.51 | 0.0048 | 0.280 | BF448647 | Immune response |
| Dysferlin | <i>DYSF</i> | 0.53 | 0.0018 | 0.165 | NM_003494 | Membrane fusion/repair |
| Solute carrier family 11 | <i>SLC11A1</i> | 0.53 | 0.0100 | 0.290 | A1346187 | Ion transport |
| Hypothetical protein FLJ22662 | <i>FLJ22662</i> | 0.53 | 0.0055 | 0.287 | NM_024829 | Unknown |
| Interleukin 6 receptor | <i>IL6R</i> | 0.53 | 0.0077 | 0.290 | NM_000565 | Inflammation |
| Syntaxin 3 | <i>STX3</i> | 0.54 | 0.0064 | 0.289 | BE966922 | Intracellular protein transport |
| Apolipoprotein B mRNA editing enzyme | <i>APOBEC3A</i> | 0.54 | 0.0082 | 0.290 | U03891 | Cell-cycle control |
| Interleukin 8 receptor, α | <i>IL8RA</i> | 0.54 | 0.0084 | 0.290 | NM_000634 | Inflammation |
| Complement component 5a receptor 1 | <i>C5AR1</i> | 0.56 | 0.0085 | 0.290 | NM_001736 | Cellular defense response |
| CD302 molecule | <i>CD302</i> | 0.56 | 0.0077 | 0.290 | NM_014880 | Sugar binding |
| Interferon-induced transmembrane protein pseudogene | NA | 0.57 | 0.0053 | 0.287 | AL121994 | Unknown |
| Myxovirus resistance 2 | <i>MX2</i> | 0.57 | 0.0080 | 0.290 | NM_002463 | Immune response |
| Leukocyte receptor cluster member 4 | <i>LENG4</i> | 0.58 | 0.0063 | 0.289 | BC003164 | Receptor activity |
| Lymphocyte cytosolic protein 2 | <i>LCP2</i> | 0.60 | 0.0091 | 0.291 | NM_005565 | Immune response |
| Interferon-related developmental regulator 1 | <i>IFRD1</i> | 0.60 | 0.0076 | 0.290 | NM_001550 | Cell differentiation |
| TBC1 domain family, member 5 | <i>TBC1D5</i> | 0.61 | 0.0097 | 0.290 | NM_014744 | Protein binding |
| Salic acid binding Ig-like lectin 7 | <i>SIGLEC7</i> | 0.61 | 0.0072 | 0.289 | NM_016543 | Cell adhesion |
| Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25 | <i>DR3</i> | 1.48 | 0.0099 | 0.289 | U94510 | Apoptosis/inflammation |
| SWAP-70 protein | <i>SWAP70</i> | 1.61 | 0.0093 | 0.291 | AB014540 | Calcium ion binding/DNA binding |
| 5'-nucleotidase, ecto (CD73) | <i>NT5E</i> | 1.62 | 0.0097 | 0.291 | NM_002526 | DNA metabolism |
| WD repeat domain 3 | <i>WDR3</i> | 1.64 | 0.0070 | 0.289 | NM_006784 | Unknown |

The table shows the name, relative expression, p-value (calculated by ANOVA test), adjusted p-value (calculated by the Sng, the Benjamini and the Hochberg methods, which controls the false discovery rate) and GenBank accession number of the genes that were differentially expressed in monocytes of FCH and controls. The last column indicates the functional categories to which the genes belong. Results are the mean of three independent experiments performed per each condition.

ANOVA: Analysis of variance; CT: Control; FCH: Familial combined hyperlipidemia.

Table S1. Genes differentially expressed in monocytes from familial combined hyperlipidemia subjects compared with controls (cont.).

| Gene name | Symbol | FCH vs CT (fold change) | p-value | Adjusted p-value | GenBank accession number | Function |
|---|-----------------|-------------------------|---------|------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| Flexin A1 | <i>FLXNA1</i> | 1.64 | 0.0098 | 0.290 | AL136663 | Development |
| Mixed-lineage leukemia translocated to 3 | <i>MLLT3</i> | 1.68 | 0.0091 | 0.290 | NM_004529 | Transcription regulation |
| Protein kinase B, γ | <i>AKT3</i> | 1.71 | 0.0075 | 0.290 | U79271 | Signal transduction |
| Transcription factor EC | <i>TTEC</i> | 1.74 | 0.0086 | 0.290 | NM_012252 | Transcription regulation |
| Origin recognition complex, subunit 5-like | <i>ORC5L</i> | 1.75 | 0.0024 | 0.200 | NM_002553 | DNA replication |
| Sterol-C4-methyl oxidase-like | <i>SC4MOL</i> | 1.75 | 0.0087 | 0.290 | U93162 | Fatty acid metabolism |
| CD96 molecule | <i>CD96</i> | 1.79 | 0.0052 | 0.287 | NM_005816 | Cell adhesion |
| Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1 | <i>LRIG1</i> | 1.80 | 0.0040 | 0.256 | AB050468 | EGFR signaling/cell growth |
| Exportin 1 | <i>XPO1</i> | 1.81 | 0.0070 | 0.289 | D89729 | Protein transport |
| Activin A receptor, type II | <i>ACVR2A</i> | 1.84 | 0.0072 | 0.289 | NM_001616 | Protein phosphorylation |
| Ataxin 1 | <i>ATXN1</i> | 1.89 | 0.0033 | 0.244 | AW235612 | Regulation of transcription |
| Protein C receptor | <i>PROCR</i> | 1.89 | 0.0070 | 0.289 | NM_006404 | Coagulation |
| Palladin | <i>PALLD</i> | 1.91 | 0.0025 | 0.199 | AU157932 | Cytoskeleton organization |
| Major histocompatibility complex, class II, DQ α 1 | <i>HLA-DQA1</i> | 1.92 | 0.0044 | 0.266 | X00452 | Immune response |
| Protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor α | <i>PKIA</i> | 1.94 | 0.0064 | 0.289 | NM_006823 | Protein kinase regulation |
| Microphthalmia-associated transcription factor | <i>MITF</i> | 1.95 | 0.0070 | 0.289 | NM_000248 | Inflammation |
| CD226 molecule | <i>CD226</i> | 1.96 | 0.0084 | 0.290 | NM_006566 | Cell adhesion |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 | <i>HNRPH1</i> | 1.99 | 0.0098 | 0.290 | BF983406 | RNA processing |
| Protein tyrosine kinase 2 | <i>PTK2</i> | 2.06 | 0.0016 | 0.165 | AL037339 | Integrin-mediated signaling pathway |
| Myosin X | <i>MYO10</i> | 2.09 | 0.0047 | 0.274 | NM_012334 | Signal transduction |
| Chemokine (C-C motif) ligand 22 | <i>CCL22</i> | 2.12 | 0.0007 | 0.138 | NM_002990 | Inflammation |
| Phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin) | <i>PDE4DIP</i> | 2.31 | 0.0011 | 0.138 | AI821791 | Cytoskeleton organization |
| Tensin 3 | <i>TNS3</i> | 2.42 | 0.0065 | 0.289 | NM_022748 | Inflammation |
| Syndecan 2 | <i>SDC2</i> | 2.50 | 0.0002 | 0.100 | AL577322 | Cell-cell/cell-matrix adhesion |
| Autocrine motility factor receptor | <i>AMFR</i> | 2.57 | 0.0001 | 0.100 | NM_001144 | Cell motility |
| Platelet-derived growth factor D | <i>PDGFC</i> | 2.58 | 0.0006 | 0.138 | NM_016205 | Cell proliferation |

The table shows the name, relative expression, p-value (calculated by ANOVA test), adjusted p-value (calculated by the Sng, the Benjamini and the Hochberg methods, which controls the false discovery rate) and GenBank accession number of the genes that were differentially expressed in monocytes of FCH and controls. The last column indicates the functional categories to which the genes belong. Results are the mean of three independent experiments performed per each condition.

ANOVA: Analysis of variance; CT: Control; FCH: Familial combined hyperlipidemia.

Table S1. Genes differentially expressed in monocytes from familial combined hyperlipidemia subjects compared with controls (cont.).

| Gene name | Symbol | FCH vs CT (fold change) | p-value | Adjusted p-value | GenBank accession number | Function |
|--|--------------|-------------------------|---------|------------------|--------------------------|------------------------------------|
| HtrA serine peptidase 1 | <i>HTRA1</i> | 2.58 | 0.0031 | 0.220 | NM_002775 | Cell growth |
| Activated leukocyte cell-adhesion molecule | <i>ALCAM</i> | 2.60 | 0.0003 | 0.100 | AA156721 | Response to pathogens/inflammation |
| Fibronectin 1 | <i>FN1</i> | 2.60 | 0.0002 | 0.100 | BC005858 | Extracellular matrix |
| Lipoprotein lipase | <i>LPL</i> | 2.90 | 0.0081 | 0.290 | BF672975 | Fatty acid metabolism |
| Lysosomal-associated membrane protein 3 | <i>LAMP3</i> | 3.00 | 0.0063 | 0.289 | NM_014398 | Immune response |
| Tissue factor pathway inhibitor 2 | <i>TFPI2</i> | 3.97 | 0.0009 | 0.138 | L27624 | Extracellular matrix turnover |

The table shows the name, relative expression, p-value (calculated by ANOVA test), adjusted p-value (calculated by the Sng, the Benjamini and the Hochberg methods, which controls the false discovery rate) and GenBank accession number of the genes that were differentially expressed in monocytes of FCH and controls. The last column indicates the functional categories to which the genes belong. Results are the mean of three independent experiments performed per each condition.

ANOVA: Analysis of variance; CT: Control; FCH: Familial combined hyperlipidemia.

Table S2. Genes differentially expressed in monocytes from familial combined hyperlipidemia subjects after treatment with atorvastatin compared with baseline .

| Gene name | Symbol | Treated vs FCH (fold change) | p-value | Adjusted p-value | GenBank accession number | Function |
|---|-----------------|------------------------------|---------|------------------|--------------------------|-------------------------------|
| Matrix metalloproteinase 10 | <i>MMP10</i> | 0.51 | 0.0018 | 0.312 | NM_002425 | Extracellular matrix |
| CD96 | <i>CD96</i> | 0.52 | 0.0007 | 0.312 | NM_005816 | Immune response |
| KIAA0256 | <i>KIAA0256</i> | 0.52 | 0.0010 | 0.312 | N52532 | Unknown |
| NMDA receptor regulated 1 | <i>NARG1</i> | 0.56 | 0.0014 | 0.312 | AF327722 | Unknown |
| α thalassemia/mental retardation syndrome X-linked | <i>ATRX</i> | 0.58 | 0.0039 | 0.312 | A1650257 | Transcription regulation |
| Tissue factor pathway inhibitor 2 | <i>TFPI2</i> | 0.58 | 0.0025 | 0.312 | L27624 | Extracellular matrix turnover |
| Dedicator of cytokinesis 9 | <i>DOCK9</i> | 0.58 | 0.0031 | 0.312 | AL576253 | GTP binding |
| Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1 | <i>LRIG1</i> | 0.59 | 0.0032 | 0.312 | AB050468 | EGFR signaling/cell growth |
| Protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor α | <i>PKIA</i> | 0.59 | 0.0024 | 0.312 | NM_006823 | Protein kinase regulation |
| Structural maintenance of chromosomes 3 | <i>SMC3</i> | 0.59 | 0.0031 | 0.312 | A1373676 | Mitosis |
| Lymphoid enhancer-binding factor 1 | <i>LEF1</i> | 0.59 | 0.0045 | 0.312 | AF294627 | Regulation of transcription |
| Hypothetical protein HSPC111 | <i>HSPC111</i> | 0.60 | 0.0045 | 0.312 | NM_016391 | Unknown |
| Cas-Br-M ecotropic retroviral transforming sequence b | <i>CBLB</i> | 0.60 | 0.0028 | 0.312 | U26710 | Immune response |
| Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1 | <i>SLC30A1</i> | 0.60 | 0.0098 | 0.319 | A1972416 | Cation transport |

The table shows the name, relative expression, p-value (calculated by ANOVA test), adjusted p-value (calculated by the Sng, the Benjamini and the Hochberg methods, which controls the false discovery rate) and GenBank accession number of the genes that were differentially expressed in monocytes of FCH subjects after treatment with atorvastatin compared with baseline. The last column indicates the functional categories to which the genes belong. Results are the mean of three independent experiments performed per each condition.

ANOVA: Analysis of variance; FCH: Familial combined hyperlipidemia.

Table S2. Genes differentially expressed in monocytes from familial combined hyperlipidemia subjects after treatment with atorvastatin compared with baseline (cont.).

| Gene name | Symbol | Treated vs FCH (fold change) | p-value | Adjusted p-value | GenBank accession number | Function |
|--|----------------|------------------------------|---------|------------------|--------------------------|--|
| HIR histone cell-cycle regulation defective homolog A | <i>HIRA</i> | 0.60 | 0.0085 | 0.319 | X75296 | Protein binding |
| Ataxin 1 | <i>ATXN1</i> | 0.61 | 0.0050 | 0.312 | AW235612 | Regulation of transcription |
| Leucine-rich repeat neuronal 3 | <i>LRRN3</i> | 0.61 | 0.0069 | 0.319 | AI221950 | Protein binding |
| Transportin 1 | <i>TNPO1</i> | 0.61 | 0.0082 | 0.319 | U72069 | Protein transport |
| Lipoprotein lipase | <i>LPL</i> | 0.61 | 0.0071 | 0.319 | BF672975 | Fatty acid metabolism |
| TRAF2 and NCK interacting kinase | <i>TNIK</i> | 0.62 | 0.0048 | 0.312 | AF172268 | Protein serine/threonine kinase activity |
| Stromal cell-derived factor 2-like 1 | <i>SDF2L1</i> | 0.62 | 0.0047 | 0.312 | NM_022044 | Hydrolase activity |
| Transmembrane protein 158 | <i>TMEM158</i> | 0.63 | 0.0064 | 0.319 | BF062629 | Unknown |
| G-protein-coupled receptor 171 | <i>GPR171</i> | 0.63 | 0.0077 | 0.319 | NM_013308 | Signal transduction |
| WD repeat domain 68 | <i>WDR68</i> | 0.63 | 0.0072 | 0.319 | AW575465 | Protein binding |
| Upstream binding transcription factor, RNA polymerase I | <i>UBTF</i> | 0.63 | 0.0061 | 0.319 | X56687 | Regulation of transcription |
| Phosphoribosylglycinamide formyltransferase | <i>GART</i> | 0.63 | 0.0087 | 0.319 | NM_000819 | <i>De novo</i> purine biosynthesis |
| Sacsin | <i>SACS</i> | 0.63 | 0.0091 | 0.319 | A1932370 | Protein folding |
| MORC family CW-type zinc finger 2 | <i>MORC2</i> | 0.64 | 0.0073 | 0.319 | AC004542 | ATP binding |
| ESF1, nucleolar pre-rRNA processing protein | <i>ESF1</i> | 0.64 | 0.0072 | 0.319 | NM_016649 | Regulation of transcription |
| Transcription factor A, mitochondrial | <i>TFAM</i> | 0.64 | 0.0083 | 0.319 | NM_003201 | Regulation of transcription |
| CD7 molecule | <i>CD7</i> | 0.65 | 0.0084 | 0.319 | NM_006137 | Immune response |
| KRIT1, ankyrin repeat containing | <i>KRIT1</i> | 0.65 | 0.0094 | 0.319 | U90269 | Signal transduction |
| GTPase, IMAP family member 6 | <i>GIMAP6</i> | 0.65 | 0.0093 | 0.319 | NM_024711 | GTP binding |
| Structure-specific recognition protein 1 | <i>SSRP1</i> | 0.66 | 0.0095 | 0.319 | BE795648 | Regulation of transcription |
| Translocase of outer mitochondrial membrane 70 A | <i>TOMM70A</i> | 0.71 | 0.0090 | 0.319 | NM_014820 | Protein binding |
| Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25 | <i>DR3</i> | 0.72 | 0.0097 | 0.312 | U94510 | Apoptosis/inflammation |
| Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3 | <i>NOR1</i> | 1.52 | 0.01 | 0.319 | NM_006981 | Regulation of transcription |
| Interleukin 1 receptor, type II | <i>IL1R2</i> | 1.54 | 0.0094 | 0.328 | NM_004633 | Immune response/inflammation |
| Annexin A4 | <i>ANXA4</i> | 1.56 | 0.0087 | 0.319 | NM_001153 | Signal transduction |
| Cell division cycle 2, G ₁ to S and G ₂ to M | <i>CDC2</i> | 1.56 | 0.0085 | 0.319 | D88357 | Cell division |

The table shows the name, relative expression, p-value (calculated by ANOVA test), adjusted p-value (calculated by the Sng, the Benjamini and the Hochberg methods, which controls the false discovery rate) and GenBank accession number of the genes that were differentially expressed in monocytes of FCH subjects after treatment with atorvastatin compared with baseline. The last column indicates the functional categories to which the genes belong. Results are the mean of three independent experiments performed per each condition.

ANOVA: Analysis of variance; FCH: Familial combined hyperlipidemia.

Table S2. Genes differentially expressed in monocytes from familial combined hyperlipidemia subjects after treatment with atorvastatin compared with baseline (cont.).

| Gene name | Symbol | Treated vs FCH (fold change) | p-value | Adjusted p-value | GenBank accession number | Function |
|--|-----------------|------------------------------|---------|------------------|--------------------------|-----------------------------|
| ATP-binding cassette, subfamily A, member 1 | <i>ABCA1</i> | 1.57 | 0.0083 | 0.319 | AF285167 | Cholesterol efflux |
| AHNAK nucleoprotein | <i>AHNAK</i> | 1.59 | 0.0055 | 0.319 | NM_024060 | Protein binding |
| Zinc-finger protein 467 | <i>ZNF467</i> | 1.61 | 0.0067 | 0.319 | BE549732 | Regulation of transcription |
| Transglutaminase 2 | <i>TGM2</i> | 1.61 | 0.0045 | 0.312 | AL031651 | Inflammation/apoptosis |
| Chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39) | <i>CHI3L1</i> | 1.63 | 0.0040 | 0.312 | M80927 | Carbohydrate metabolism |
| Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13 | <i>TNFSF13</i> | 1.63 | 0.0092 | 0.319 | BF448647 | Immune response |
| Myotubularin-related protein 11 | <i>MTMR11</i> | 1.63 | 0.0050 | 0.312 | NM_006697 | Phospholipid metabolism |
| Defensin, α 4, corticostatin | <i>DEFA4</i> | 1.63 | 0.0080 | 0.319 | NM_001925 | Host defense |
| Salic acid binding Ig-like lectin 5 | <i>SGLEC5</i> | 1.64 | 0.0059 | 0.319 | NM_003830 | Cell adhesion |
| Protein phosphatase 3 regulatory subunit B, α isoform | <i>PPP3R1</i> | 1.65 | 0.0076 | 0.319 | AL544951 | Calcium binding |
| Interferon, α -inducible protein 6 | <i>IFI6</i> | 1.66 | 0.0084 | 0.319 | NM_022873 | Immune response |
| Adenosine A2 β receptor | <i>ADORA2B</i> | 1.67 | 0.0066 | 0.319 | NM_000676 | Signal transduction |
| Oncostatin M | <i>OSM</i> | 1.68 | 0.0062 | 0.319 | BG437034 | Apoptosis/immune response |
| Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A | <i>MS4A6A</i> | 1.68 | 0.0064 | 0.319 | NM_022349 | Signal transduction |
| Peptidoglycan recognition protein 1 | <i>PGLYRP1</i> | 1.68 | 0.0041 | 0.312 | NM_005091 | Immune response |
| Charcot-Leyden crystal protein | <i>CLC</i> | 1.68 | 0.0085 | 0.319 | NM_001828 | Phospholipid metabolism |
| Vanin 2 | <i>VNN2</i> | 1.69 | 0.0082 | 0.319 | NM_004665 | Cell migration |
| Fc fragment of IgG, low-affinity IIIb, receptor (CD16b) | <i>FCGR3B</i> | 1.69 | 0.0091 | 0.319 | J04162 | Immune response |
| CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3 | <i>CDC42EP3</i> | 1.69 | 0.0046 | 0.312 | AF104857 | Signal transduction |
| Bone marrow stromal cell antigen 1 | <i>BST1</i> | 1.72 | 0.0034 | 0.312 | NM_004334 | Immune response |
| Hypothetical protein FL22662 | <i>FL22662</i> | 1.72 | 0.0048 | 0.312 | NM_024829 | Unknown |
| Dysferlin | <i>DYSF</i> | 1.73 | 0.0044 | 0.312 | NM_003494 | Membrane fusion/repair |
| Interferon-induced transmembrane protein 3 (1–8U) | <i>IFITM3</i> | 1.73 | 0.0051 | 0.312 | BF338947 | Immune response |
| v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog | <i>FOS</i> | 1.73 | 0.0027 | 0.312 | BC004490 | Inflammation |

The table shows the name, relative expression, p-value (calculated by ANOVA test), adjusted p-value (calculated by the Sng, the Benjamini and the Hochberg methods, which controls the false discovery rate) and GenBank accession number of the genes that were differentially expressed in monocytes of FCH subjects after treatment with atorvastatin compared with baseline. The last column indicates the functional categories to which the genes belong. Results are the mean of three independent experiments performed per each condition.
ANOVA: Analysis of variance; FCH: Familial combined hyperlipidemia.

Table S2. Genes differentially expressed in monocytes from familial combined hyperlipidemia subjects after treatment with atorvastatin compared with baseline (cont.).

| Gene name | Symbol | Treated vs FCH (fold change) | p-value | Adjusted p-value | GenBank accession number | Function |
|---|-----------------|------------------------------|---------|------------------|--------------------------|--|
| Pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 β | <i>PTX3</i> | 1.77 | 0.0022 | 0.312 | NM_002852 | Inflammation |
| Ribonuclease, RNase A family, 2 | <i>RNASE2</i> | 1.81 | 0.0013 | 0.312 | NM_002934 | RNA catabolism |
| Transcobalamin I | <i>TCN1</i> | 1.82 | 0.0030 | 0.312 | NM_001062 | Cobalamin transport |
| Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1 | <i>ALDH1A1</i> | 1.82 | 0.0023 | 0.312 | NM_000689 | Aldehyde metabolism |
| Glutathione peroxidase 3 (plasma) | <i>GPX3</i> | 1.83 | 0.0015 | 0.312 | NM_002084 | Glutathione metabolism |
| Annexin A3 | <i>ANXA3</i> | 1.84 | 0.0022 | 0.312 | M63310 | Signal transduction |
| Snail homolog 1 (<i>Drosophila</i>) | <i>SNAI1</i> | 1.87 | 0.0038 | 0.312 | NM_005985 | Organismal development |
| CYP, family 4, subfamily F, polypeptide 3 | <i>CYP4F3</i> | 1.87 | 0.0010 | 0.312 | D12620 | Leukotriene metabolism |
| G-protein-coupled receptor 109B | <i>GPR109B</i> | 1.88 | 0.0027 | 0.312 | NM_006018 | Signal transduction |
| G ₀ /G ₁ switch 2 | <i>G0S2</i> | 1.89 | 0.0094 | 0.319 | NM_015714 | Cell cycle |
| MAX dimerization protein 1 | <i>MXD1</i> | 1.92 | 0.0019 | 0.312 | NM_002357 | Transcription regulation |
| Apolipoprotein B mRNA editing enzyme 3A | <i>APOBEC3A</i> | 1.93 | 0.0052 | 0.312 | U03891 | Cell growth/cell cycle |
| Interferon-induced protein 44 | <i>IFI44</i> | 1.95 | 0.0015 | 0.312 | NM_006417 | Response to virus |
| Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase) | <i>MMP8</i> | 1.96 | 0.0006 | 0.312 | NM_002424 | Extracellular matrix remodeling |
| Peptidase inhibitor 3, skin-derived (SKALP) | <i>PI3</i> | 2.08 | 0.0002 | 0.312 | L10343 | Elastase inhibition |
| Myeloid cell nuclear differentiation antigen | <i>MNDA</i> | 2.12 | 0.0016 | 0.312 | NM_002432 | Cell death/cell growth and differentiation |
| LCCL domain containing cysteine-rich secretory protein 2 | <i>CRISPLD2</i> | 2.13 | 0.0008 | 0.312 | AL136861 | Unknown |
| Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2) | <i>CDKN1C</i> | 2.16 | 0.0038 | 0.312 | N33167 | Cell cycle |
| Hairy and enhancer of split 1, (<i>Drosophila</i>) | <i>HES1</i> | 2.23 | 0.0084 | 0.312 | NM_005524 | Transcription regulation |
| CD36 molecule (thrombospondin receptor) | <i>CD36</i> | 2.30 | 0.0019 | 0.312 | NM_000072 | Lipid transport |
| Guanine nucleotide binding protein (G protein), α 13 | <i>GNA13</i> | 2.43 | 0.0028 | 0.319 | NM_006572 | G-protein signaling |
| Radical Sadenosyl methionine domain containing 2 | <i>RSAD2</i> | 2.60 | 0.0063 | 0.319 | A1337069 | Response to virus |

The table shows the name, relative expression, p-value (calculated by ANOVA test), adjusted p-value (calculated by the Sng, the Benjamini and the Hochberg methods, which controls the false discovery rate) and GenBank accession number of the genes that were differentially expressed in monocytes of FCH subjects after treatment with atorvastatin compared with baseline. The last column indicates the functional categories to which the genes belong. Results are the mean of three independent experiments performed per each condition.

ANOVA: Analysis of variance; FCH: Familial combined hyperlipidemia.

III

Tissue factor pathway inhibitor-2 is induced by thrombin in human macrophages

Jordi Pou, Alba Rebollo, Lúdia Piera, Manuel Merlos, Núria Roglans,
Juan C. Laguna, Marta Alegret

BBA – Molecular Cell Research (2011); 1813 (6): 1254-1260.

En aquest treball vam voler examinar la regulació de l'expressió de TFPI-2, un dels gens que havia resultat expressat diferencialment en monòcits de pacients amb HFC respecte els controls sans en l'estudi anterior. Per fer-ho es van utilitzar macròfags diferenciats THP-1 i macròfags humans derivats de monòcits de sang perifèrica, els quals van ser tractats inicialment amb diferents concentracions de VLDL.

Els resultats obtinguts van indicar que l'expressió de TFPI-2 no va resultar modificada en macròfags THP-1 després de l'exposició a VLDL durant 24 h a cap de les concentracions estudiades (0-150 µg/ml). En canvi, el tractament de macròfags THP-1 i macròfags humans derivats de monòcits amb trombina (10 U/ml durant 24 h) va incrementar aproximadament al doble l'expressió de mRNA de TFPI-2. L'especificitat de l'efecte inductor es va demostrar amb la preincubació amb inhibidors de trombina com la hirudina i PPACK, que van bloquejar els efectes de la trombina en l'expressió de TFPI-2.

Per analitzar les vies implicades en la inducció de TFPI-2, es van emprar diversos inhibidors farmacològics: els inhibidors de MEK1/2 U0126 i PD98059; SP600125, un inhibidor de la JNK; un antagonista del receptor del factor de creixement epidèrmic (EGF), AG1478; i inhibidors dels factors de transcripció NF- κ B (parthenolide) i AP-1 (SR-11302). Els resultats van demostrar que la trombina activava tant la via ERK1/2 com JNK (ja que incrementava la fosforilació d'aquestes) i que aquests efectes mediaven la inducció de TFPI-2, ja que aquesta es prevenia al pre-incubar els macròfags amb els corresponents inhibidors. D'altra banda, la trombina va incrementar la fosforilació d'I κ B α en macròfags THP-1, i el parthenolide va bloquejar completament la inducció de TFPI-2 per trombina, el que indica que l'efecte està mediat per l'activació del factor NF- κ B.

També es va analitzar la implicació de la cicloxigenasa 2 (COX-2) en la inducció de TFPI-2 per trombina en macròfags. Els resultats obtinguts amb un inhibidor de COX-2 (NS-398) van demostrar que l'increment en l'expressió de

TFPI-2 causat per la trombina era independent de COX-2, ja que aquest agent no va prevenir, sinó que per si mateix va induir, l'expressió d'aquest gen.

Per últim, vam voler estudiar si l'increment en l'expressió de TFPI-2 en macròfags podia estar relacionat amb l'augment dels nivells d'AMPc, com succeeix en altres cèl·lules vasculares. Els nostres resultats així ho indiquen, ja que un tractament curt amb IBMX (un inhibidor de les fosfodiesterases que incrementa els nivells intracel·lular d'AMPc) era capaç de provocar una inducció de TFPI-2 de magnitud similar a la de la trombina.

En resum, el nostre treball va evidenciar que la trombina indueix l'expressió de TFPI-2 en macròfags mitjançant un mecanisme mediat per AMPc i que comporta l'activació de les vies ERK1/2 i JNK, que comportaria al final l'activació de NF- κ B. Fisiològicament, tenint en compte el paper de TFPI-2 com a inhibidor de MMPs, la inducció d'aquest gen en macròfags podria representar un mecanisme de prevenció per evitar una excessiva activació d'aquests enzims relacionada amb el procés inflamatori de l'aterosclerosi.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamcr

Tissue factor pathway inhibitor 2 is induced by thrombin in human macrophages

Jordi Pou^a, Alba Rebollo^a, Lúdia Piera^a, Manuel Merlos^a, Núria Roglans^{a,b},
Juan C. Laguna^{a,b}, Marta Alegret^{a,b,*}^a Unidad de Farmacología, Facultad de Farmacia, Instituto de Biomedicina (IBUB), Universidad de Barcelona, Spain^b CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 December 2010

Received in revised form 25 March 2011

Accepted 28 March 2011

Available online 15 April 2011

Keywords:

Human macrophage

Lipoprotein

Thrombin

Tissue factor pathway inhibitor 2

ABSTRACT

Tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI2) is a serine protease inhibitor critical for the regulation of extracellular matrix remodeling and atherosclerotic plaque stability. Previously, we demonstrated that TFPI2 expression is increased in monocytes from patients with familial combined hyperlipidemia (FCH). To gain insight into the molecular mechanisms responsible for this upregulation, we examined TFPI2 expression in THP-1 macrophages exposed to lipoproteins and thrombin. Our results showed that TFPI2 expression was not affected by treatment with very low density lipoproteins (VLDL), but was induced by thrombin (10 U/ml) in THP-1 (1.9-fold increase, $p < 0.001$) and human monocyte-derived macrophages (2.3-fold increase, $p < 0.005$). The specificity of the inductive effect was demonstrated by preincubation with the thrombin inhibitors hirudin and PPACK, which ablated thrombin effects. TFPI2 induction was prevented by pre-incubation with MEK1/2 and JNK inhibitors, but not by the EGF receptor antagonist AG1478. In the presence of parthenolide, an inhibitor of NF κ B, but not of SR-11302, a selective AP-1 inhibitor, thrombin-mediated TFPI2 induction was blunted. Our results also show that thrombin treatment increased ERK1/2, JNK and I κ B α phosphorylation. Finally, we ruled out the possibility that TFPI2 induction by thrombin was mediated by COX-2, as preincubation with a selective COX-2 inhibitor did not prevent the inductive effect. In conclusion, thrombin induces TFPI2 expression by a mechanism involving ERK1/2 and JNK phosphorylation, leading finally to NF κ B activation. In the context of atherosclerosis, thrombin-induced macrophage TFPI2 expression could represent a means of avoiding excessive activation of matrix metalloproteinases at sites of inflammation.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

TFPI2 is a Kunitz-type serine protease inhibitor expressed in smooth muscle cells, macrophages, T cells and endothelial cells [1]. It presents a high degree of homology to TFPI1, an important regulator of the extrinsic pathway of blood coagulation [2]. The physiological role of TFPI2 has yet to be established, but it has been suggested that it is critical for the regulation of extracellular matrix (ECM) remodeling, due to its ability to inhibit plasmin and matrix metalloproteinases (MMP) [3]. As a consequence, TFPI2 is involved in pathological processes such as tumor invasion and metastasis dissemination [4], as well as in the regulation of atherosclerotic plaque stability [1]. Moreover, although TFPI2 does not directly inhibit thrombin, it reduces the conversion of prothrombin to thrombin through inhibiting the formation of factor Xa by the tissue factor-activated factor VII complex [5]. Therefore, TFPI2 is also involved in the regulation of coagulation and fibrinolysis. Taken together, these findings suggest that TFPI2 could play a role in the development and

progression of atherosclerotic lesions. In this respect, Crawley et al. demonstrated increased TFPI2 expression in human atherosclerotic coronary arteries compared with healthy vessels [6], while in advanced atherosclerotic plaques TFPI2 expression was reduced [7]. In addition, TFPI2 upregulation has been reported in vascular cells (endothelial cells, smooth muscle cells) in response to several atherosclerosis-related stimuli, such as inflammatory mediators [8], vascular endothelial growth factor [9] or shear stress [10]. In these studies, the increase in TFPI2 expression has been related to the inhibition of EC and SMC proliferation, indicating that TFPI2 plays a beneficial antiangiogenic and antiatherogenic role, and contributes to the control of cellular turnover after vascular injury. However, the regulation of TFPI2 expression in macrophages, key cells in atherosclerosis development, has not been studied.

In a previous study using cDNA microarrays, we identified TFPI2 as the most differentially expressed gene in monocytes from patients with familial combined hyperlipidemia (FCH) compared to healthy controls [11]. The expression of other related genes (TFPI1 or tissue factor) was not altered in these samples. The objective of the present study was to determine the expression of TFPI2 in human THP-1 macrophages after stimulation with proatherogenic and proinflammatory stimuli, focusing on the mechanisms involved in the upregulation of this gene caused by thrombin exposure.

* Corresponding author at: Unidad de Farmacología, Facultad de Farmacia e Instituto de Biomedicina (IBUB), Universidad de Barcelona, Diagonal 643, Barcelona E-08028, Spain. Tel.: +34 93 4024531; fax: +34 93 4035982.

E-mail address: alegret@ub.edu (M. Alegret).

2. Materials and methods

Cell culture reagents were obtained from Gibco, Invitrogen Corporation (Paisley, UK), with the exception of fetal bovine serum (PAA Laboratories, Pasching, Austria), 4- β -phorbol 12- β -myristate 13- α -acetate (PMA) and human AB serum, which were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Thrombin, lipopolysaccharide (*Escherichia coli* 0127:B8), U0126, PD98059, SP600125, parthenolide and 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) were also from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Hirudin was purchased from BioPur AG (Bubendorf, Switzerland), and PPACK and AG1478 were from Calbiochem (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Trizol reagent was from Invitrogen Corporation (Paisley, UK). Antibodies were obtained from Cell Signaling (Danvers, MA), except antibody against total I κ B α , which was from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA) and against TFPI2 (from Abcam, Cambridge, MA). Other general chemicals were obtained from commercial sources and were of analytical grade.

2.1. Lipoproteins

Very low density lipoproteins (VLDL) were prepared from pooled plasma samples obtained from anonymous healthy donors (Hospital Clínic, Barcelona) by sequential ultracentrifugation as previously described [12]. Lipoproteins were dialyzed against phosphate saline buffer at 4 °C in the darkness, and their protein concentration was assessed by the method of Bradford [13], using bovine serum albumin as a standard. Lipoproteins were tested for possible endotoxin contamination using a LAL kit (GenScript), stored at 4 °C and used within 15 days after preparation.

2.2. THP-1 macrophages

THP-1 cells were obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECACC), and maintained in RPMI 1640 medium (with 25 mM Hepes Buffer, supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine 200 mM, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin) at 37 °C in 5% CO₂. Differentiation of monocytes to macrophages was achieved by exposing the cells to 50 ng/ml PMA for 24 h.

2.3. Isolation and culture of peripheral blood mononuclear cells derived macrophages

Buffy coat preparations were obtained from the Banc de Sang i Teixits after approval by the Ethical Committee of Clinical Investigation (CEIC) of Vall d'Hebron University Hospital (Barcelona). 4 ml of buffy coat was diluted with 5 ml of PBS, layered onto 6 ml of Ficoll and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation. Mononuclear cells were resuspended in RPMI medium (supplemented with 1% heat inactivated human AB serum, 1% L-glutamine 200 mM, 2% sodium pyruvate, 1% non essential fatty acids, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin), plated in tissue culture dishes and placed in a 37 °C incubator for 2 h to allow adherence to take place [11]. Nonadherent cells were removed by washing with PBS, and adherent monocytes were incubated for 24 h in complete RPMI medium with 10% heat inactivated human serum. After 24 h, monocytes were washed with PBS and medium was replaced by macrophage-serum free medium (Invitrogen Corp, CA) with 100 U/ml penicillin 100 μ g/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine. Cells were cultured for 8 days with fresh addition of media every 3 days until complete differentiation to macrophages was achieved.

2.4. Cell treatments

Macrophages were then washed three times with PBS and incubated for 24 h with VLDL (0–150 μ g/ml), or with thrombin at the usual concentration range used in macrophages (0–10 U/ml) [14,15]. For the

experiments involving chemical inhibitors, they were dissolved in DMSO and used to pretreat the cells for 30 min followed by thrombin stimulation. Controls were pretreated with DMSO for 30 min. The concentrations of inhibitors used in the present study did not affect cell viability as evaluated by MTT assay.

2.5. RNA extraction, cDNA synthesis and TaqMan real-time PCR

Total RNA was extracted using the Trizol reagent. RNA quantity was assessed by Nanodrop, and cDNA was synthesized by mixing 0.5 μ g of total RNA, 125 ng of random hexamers in the presence of 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol, 200 U Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, 20 U RNasin, 0.5 mM of each dNTP (Sigma), and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.3). Samples were incubated at 37 °C for 60 min. Quantitative Taqman PCR was performed with ABI Prism 7700 sequence detector, according to the manufacturer's instructions. Reactions (20 μ l) containing 9 μ l of cDNA, primer/probe pairs for TFPI2 (Hs00197918_m1), obtained from Assay-on-demand™ (Applied Biosystems, Foster City, USA) and TaqMan Universal PCR Master Mix solution (Applied Biosystems, Foster City, USA), were run in duplicate. A threshold cycle value (Ct) was obtained for each amplification plot. As an internal control, primers for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH (Hs99999905_m1) were amplified in parallel with the genes of interest. Sequence detector software (S.D.S. 1.9.1) was used for data analysis. After normalization of Ct values to the reference gene GAPDH, the relative expression ratio for each gene was calculated from Δ Ct values (based on the difference between the mean Ct of the sample and the corresponding control) and converted to linear expression values by the formula $2^{-\Delta\text{Ct}}$.

2.6. Western blot analysis

Protein extracts (40 μ g) from control and treated cells were subjected to 10 % SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were then transferred to Immobilon polyvinylidene difluoride transfer membranes (Millipore, Bedford, MA). In some experiments, supernatants from THP-1 macrophages cultured with or without thrombin and concentrated using Amicon Ultra 10K filter units (Millipore) were used. The membranes were blocked for 1 h at room temperature in phosphate saline buffer containing 0.1% Tween 20 (PBST) in the presence of 5% bovine serum albumin (BSA) and immunological detection was performed using a primary rabbit polyclonal antibody raised against P-ERK (dilution 1:1,000), total ERK (dilution 1:1,000), P-JNK (dilution 1:500), total JNK (dilution 1:1,000), P-I κ B α (dilution 1:1,000), total I κ B α (dilution 1:200) or TFPI2 (dilution 1:350). After several washes, blots were incubated with an appropriate secondary antibody, and detection was achieved using the enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (Amersham Bioscience). Blots were also incubated with a monoclonal antibody raised against β -actin used as a control of equal protein loading. Size of detected proteins was estimated using protein molecular-mass standards (Invitrogen). Chemoluminescence was detected using a Chemidoc XRS (BioRad), and densitometric analysis was performed by Quantity One® software. Each band was quantified and normalized to β -actin signal. Protein levels are expressed as percentage of controls (100%).

2.7. Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard deviation. An analysis of variance (ANOVA), combined with a posteriori test, was used to evaluate the statistical significance of the differences. The computer program GraphPad Instat was used for the calculations, and values of $p < 0.05$ were considered to be significant.

3. Results

3.1. Divergent effects of lipoproteins and thrombin on TFPI2 expression

The change in TFPI2 expression observed in monocytes from subjects suffering FCH could be a cellular response to the chronic exposure of the cells to a proatherogenic, proinflammatory or prothrombotic environment [11]. As FCH is thought to be caused primarily by VLDL overproduction [16], we first determined TFPI2 expression in human THP-1 macrophages treated with these lipoproteins. As shown in Fig. 1A, the expression of TFPI2 was not altered after treatment of macrophages with VLDL (0–150 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Next, we determined the effect of thrombin, as it has been reported that thrombin induces the expression of this gene in hepatic cells [17]. Our results show that thrombin induced TFPI2 mRNA levels in THP-1 macrophages in a dose dependent manner, reaching statistical significance at 5 U/ml and maximal effect (1.9-fold increase, $p < 0.001$) at a dose of 10 U/ml (Fig. 1B). The increase could be observed after 24 h but not after short periods (4 h) of incubation with this concentration of thrombin

(Fig. 1C). Consistent with the increase in mRNA levels, western blot analysis showed increased TFPI2 protein expression in THP-1 macrophages treated with 10 U/ml thrombin for 24 h (Fig. 1D).

To confirm that TFPI2 induction was thrombin-specific, we incubated the cells with the thrombin inhibitors hirudin (10 U/ml) and PPACK (1 μM) before adding thrombin. Our results show that both agents prevented the inductive effect of thrombin on TFPI2 while by themselves they did not exert any effect on TFPI2 expression (Fig. 1E).

To further evaluate physiological relevance, results were confirmed in human monocyte-derived macrophages. Consistent with the findings in THP-1 macrophages, treatment of human monocyte-derived macrophages with thrombin (10 U/ml) for 24 h increased TFPI2 mRNA levels 2.3-fold ($p < 0.05$) (Fig. 1F).

3.2. MAPK inhibitors, but not an EGF receptor antagonist, prevent thrombin-related TFPI2 mRNA increase

In order to determine the signaling pathways involved in TFPI2 upregulation by thrombin, we pretreated THP-1 macrophages with

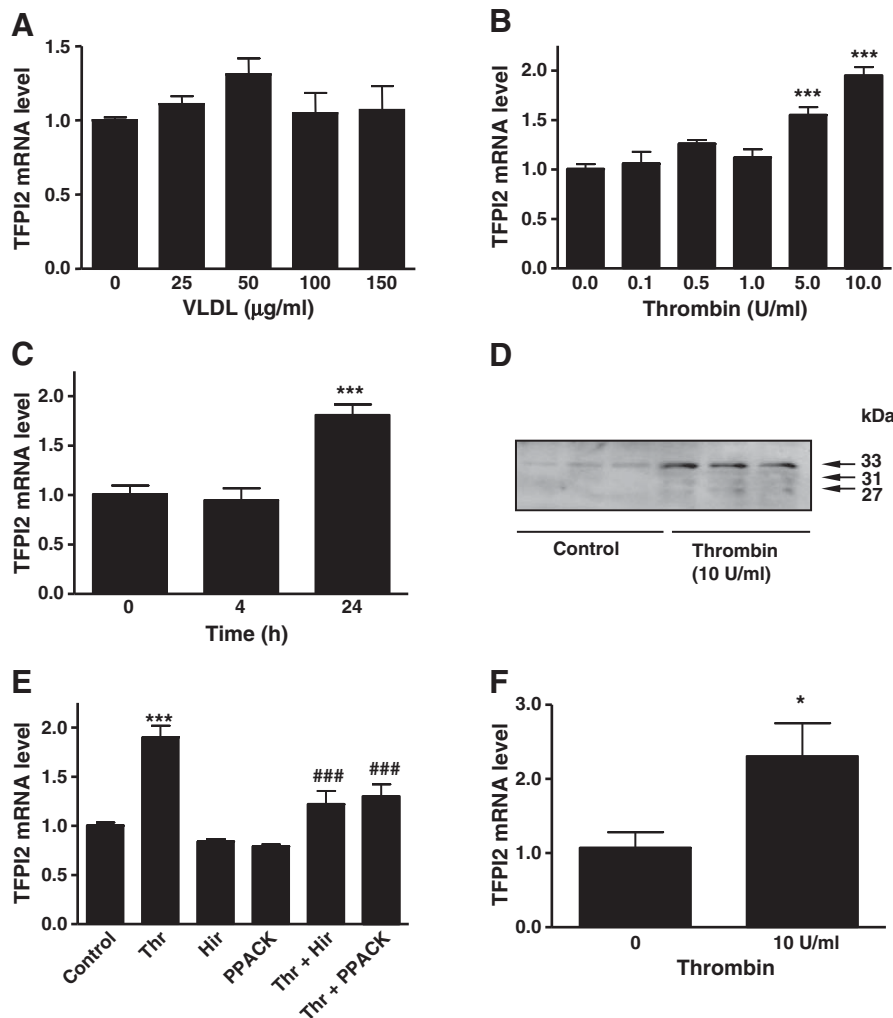


Fig. 1. Effects of VLDL and thrombin on TFPI2 mRNA. THP-1 macrophages were incubated with VLDL (A) or thrombin (B) for 24 h at different concentrations as indicated, or with 10 U/ml of thrombin for 4 and 24 h (C), and the mRNA levels of TFPI2 were evaluated by real-time PCR. (D) TFPI2 protein levels in the supernatant of THP-1 macrophages exposed or not to thrombin (10 U/ml, 24 h). Arrows indicate three different glycosylated forms of TFPI2. Equal protein loading was confirmed by red ponceau staining. (E) Effects of preincubation with the thrombin inhibitors hirudin (10 U/ml) and PPACK (1 μM) on thrombin-induced TFPI-2 expression. (F) Effect of treatment with thrombin (10 U/ml, 24 h) on TFPI2 expression in human monocyte-derived macrophages. Data were normalized by GAPDH mRNA levels. Results are the mean \pm S.E.M of four independent experiments performed in duplicate. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control; ### $p < 0.001$ vs thrombin).

several inhibitors of key signaling MAP kinases: U0126, a MEK1/2 inhibitor, PD98059, which preferentially inhibits MEK1, and SP600125, an inhibitor of JNK. As shown in Fig. 2A, all these agents prevented the thrombin-induced rise in TFPI2 mRNA expression, while preincubation with the EGF receptor antagonist AG1478 did not affect thrombin-induced TFPI2 expression.

To confirm that the effect of thrombin on TFPI2 expression is mediated by the MAPK pathways, we examined the phosphorylation of ERK and JNK after treatment of macrophages with thrombin, using western blot analysis. Our results show that both kinases are activated by thrombin in a time-dependent manner, with maximal effects observed at 15–30 min (Fig. 2B and C).

3.3. NF-κB but not AP-1 pathway is involved in thrombin induced TFPI2 expression

It has been reported that thrombin activates NFκB and AP-1 in THP-1 macrophages [15]. Therefore, we tested whether the induction of TFPI2 by thrombin in these cells was mediated through the activation of any of these transcription factors by using parthenolide, an inhibitor of NFκB [18] or SR-11302, a selective AP-1 inhibitor [19]. In the presence of parthenolide, but not of SR-11302, the thrombin-mediated induction of TFPI2 was blunted (Fig. 3A). This demonstrates that thrombin increases

TFPI2 mRNA levels through a mechanism involving NF-κB activation. Using immunoblot analysis we also show here that thrombin increases IκBα phosphorylation at 15 min, and phosphorylated IκBα levels remain high up to 60 min after treatment (Fig. 3B).

3.4. Treatment with a COX-2 inhibitor enhances the effect of thrombin on TFPI2 mRNA levels

In hepatic cells, TFPI2 induction by thrombin was COX-2-dependent [17]. Therefore, we first determined whether thrombin could stimulate COX-2 expression in THP-1 macrophages. Our results (Fig. 4A) indicate that thrombin upregulated COX-2 mRNA, an inductive effect that was prevented by ERK1/2 and JNK inhibitors, similar to TFPI2 induction. In addition, COX-2 mRNA increase was also prevented by preincubation with the EGF receptor antagonist AG1478. Moreover, COX-2 expression was also induced by thrombin in human monocyte-derived macrophages (Fig. 4B). In order to determine whether TFPI2 induction by thrombin was mediated by COX-2, we treated the cells with a COX-2 inhibitor (NS-398). Our results showed that this compound increased TFPI2 expression by 2-fold ($p < 0.001$), an effect that was cumulative to that of thrombin, resulting in a 3-fold induction when both agents were present ($p < 0.001$ vs thrombin or NS-398 alone, Fig. 4C). Adding prostaglandin

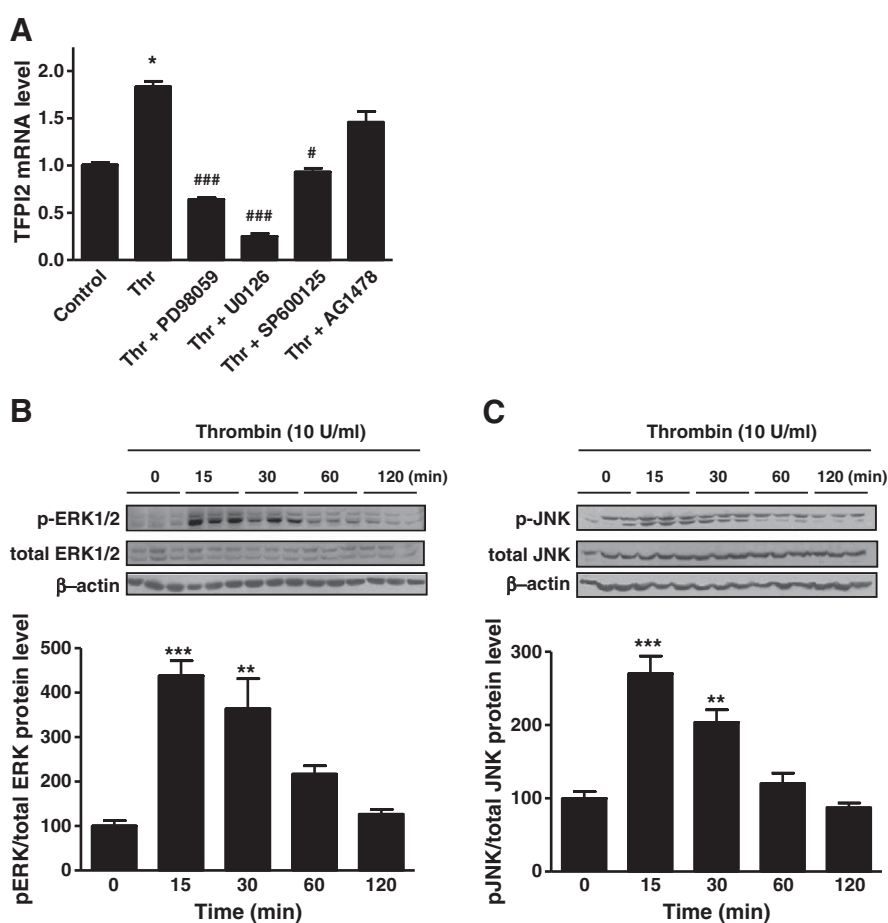


Fig. 2. ERK1/2 and JNK inhibitors, but not an EGFR antagonist, prevent TFPI2 induction by thrombin. (A) Analysis of TFPI2 mRNA levels in THP-1 macrophages incubated with thrombin alone or combined with U0126 (10 μM), PD98059 (50 μM), SP600125 (10 μM), or AG1478 (0.5 μM) for 24 h. The inhibitors were added 30 min before thrombin. TFPI2 mRNA levels were evaluated by real-time PCR, and data were normalized by GAPDH mRNA levels. Graphs represent the mean ± S.E.M. of six independent experiments performed in duplicate (* $p < 0.05$ vs control; # $p < 0.05$ and ### $p < 0.001$ vs thrombin). (B and C) Phosphorylation of ERK1/2 and JNK in THP-1 macrophages after incubation with thrombin for different times as indicated. Equal amounts of total protein (40 μg) were resolved, electrotransferred, and probed for phosphorylated and total ERK1/2, phosphorylated and total JNK, and β-actin. Graphs represent the mean ± S.E.M. of three independent experiments performed in triplicate (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control). A representative autoradiography is included.

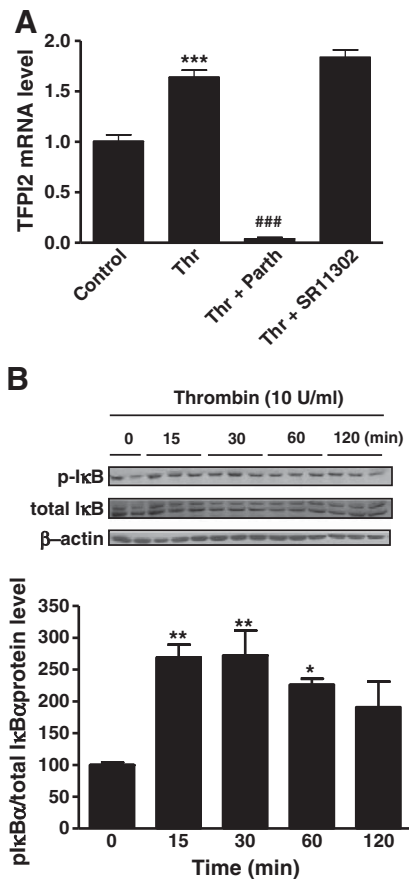


Fig. 3. NF- κ B is involved in TFPI2 induction by thrombin. (A) Analysis of TFPI2 mRNA levels in THP-1 macrophages incubated with thrombin alone or combined with parthenolide (10 μ M) or SR-11302 (1 μ M). The inhibitors were added 30 min before thrombin. TFPI2 mRNA levels were evaluated by real-time PCR, and data were normalized by GAPDH mRNA levels. The graph represents the mean \pm S.E.M of four independent experiments performed in duplicate (** p <0.001 vs control, ### p <0.001 vs thrombin). (B) Western blot of the total and phosphorylated forms of I κ B in THP-1 macrophages after incubation with thrombin for different times as indicated. Equal amounts of total protein (40 μ g) were resolved, electrotransferred, and probed for phosphorylated and total I κ B, and β -actin. Graph represents the mean \pm S.E.M of three independent experiments performed in triplicate (* p <0.05, ** p <0.01 vs control). A representative autoradiography is included.

E2 to the cells did not reverse, but rather potentiated, the inductive effect of NS-398 on TFPI2 expression (4.8-fold increase p <0.001 vs NS-398, Fig. 4C). Moreover, treatment with prostaglandin E2 or with the cAMP-raising agent IBMX also induced TFPI2 expression (4-fold and 2-fold, respectively, p <0.001, Fig. 4D–E).

4. Discussion

TFPI2 may play an important role in atherosclerosis development [6,7]. Here, we demonstrate that thrombin upregulates TFPI2 expression in macrophages by a mechanism involving the MAP kinases ERK and JNK, linked to NF- κ B activation.

Previous results obtained by our research group indicates that TFPI2 could be one of the genes regulated by high lipoprotein levels, as its mRNA expression was markedly increased in monocytes from patients with FCH [11]. Overproduction and increased plasma VLDL levels are one of the main characteristics of FCH, but our results showed that treatment of THP-1 macrophages with increasing concentrations of VLDL did not induce TFPI2 expression. It is widely recognized that FCH is characterized not only by an atherogenic lipoprotein profile, but also by

low-grade inflammation [20] and a prothrombotic phenotype [21]. Thrombin exerts powerful inflammatory effects on vascular cells, including monocytes and macrophages, and these effects are related to atherosclerosis development [22]. Moreover, it has been reported that thrombin induces TFPI2 expression in human liver myofibroblasts [17]. Therefore, we studied the effects of thrombin on TFPI2 expression in THP-1 and human monocyte-derived macrophages, showing an inductive effect. Preincubation with the thrombin inhibitors PPACK and hirudin prevented TFPI2 induction in THP-1 macrophages, demonstrating that the effect was thrombin-specific and not attributable to LPS impurities [23].

ERK1/2 activation is one of the most common events in thrombin signaling in vascular cells, and it is involved in thrombin-induced COX-2 expression in murine macrophages [24]. In human liver myofibroblasts, TFPI2 upregulation is also ERK1/2-dependent, but independent of EGF receptor [17]. Our results also show that thrombin-induced TFPI2 expression involves the ERK1/2 pathway, as the induction was prevented by both U0126 and PD98059, and phosphorylation of these kinases was increased by thrombin treatment. Although transactivation of EGFR has been reported as a common event in thrombin signaling, our results showed that blocking this receptor did not affect TFPI2 induction. In contrast, COX-2 expression was induced by thrombin in our model by a mechanism that is dependent on EGFR transactivation.

Thrombin-mediated induction of TFPI2 is not only dependent on ERK1/2, but also on JNK activity, as the effect is prevented by preincubation with SP600125. Moreover, we observed that thrombin induced JNK phosphorylation after 15–30 min. Although the ERK1/2 and JNK pathways are essential for the activation of the transcription factor AP-1 [25], the three AP-1 binding sites identified in the TFPI2 promoter are involved in the negative control, but not in the induction of TFPI2 gene expression [26]. In consequence, inhibition of AP-1 by SR-11302 did not affect TFPI2 induction by thrombin. In contrast, the binding sites for the transcription factor NF- κ B present in the TFPI2 gene promoter are crucial for its induction [26]. Accordingly, we observed that preincubation with the NF- κ B inhibitor parthenolide prevented the increase in TFPI2 expression. In support of NF- κ B involvement, we observed that thrombin induced I κ B phosphorylation in THP-1 macrophages, an effect that has already been reported in a murine macrophage cell line [14]. I κ B may be phosphorylated by I κ B kinase, which is activated in turn by a number of kinases, including ERK1 [27]. Taken together, our results suggest that thrombin induces TFPI2 expression through ERK1/2 and JNK phosphorylation linked to NF- κ B activation, independently of EGF receptor transactivation.

Since in hepatic myofibroblasts thrombin-induced TFPI2 expression is also mediated through COX-2 [17], we decided to explore the involvement of this pathway in our model. In our case, pre-incubation of macrophages with the selective COX-2 inhibitor NS-398 did not prevent the inductive effect of thrombin on TFPI2 expression, suggesting that it was COX-2 independent. In fact, NS-398 itself upregulated TFPI2 expression by a mechanism that was COX-2 independent, as the induction was not reverted, but rather potentiated, by adding PGE₂ to the cells. PGE₂ may modulate gene expression through Gs proteins and cAMP induction [28]. Interestingly, the increase in cAMP production caused by PGE₂ is potentiated by NS-398 in renal cells [29], and a parallel increase in cAMP and TFPI2 levels after PGE₂ treatment has been described in endometrial stromal cells [30]. cAMP has been shown to be involved in thrombin signaling in vascular cells [31], and our results indicate that treatment of THP-1 macrophages with IBMX, which raises intracellular cAMP by inhibiting phosphodiesterases, induces TFPI2 expression to a similar degree as thrombin. Therefore, we could speculate that thrombin may induce TFPI2 in macrophages by a cAMP-related mechanism, and NS-398 would potentiate this effect.

The consequences of TFPI2 induction in macrophages may affect the development of the lesion itself, either by effects on the extracellular matrix or on surrounding cells. As previously commented, most of these effects are considered as anti-atherogenic. For example, one of the major

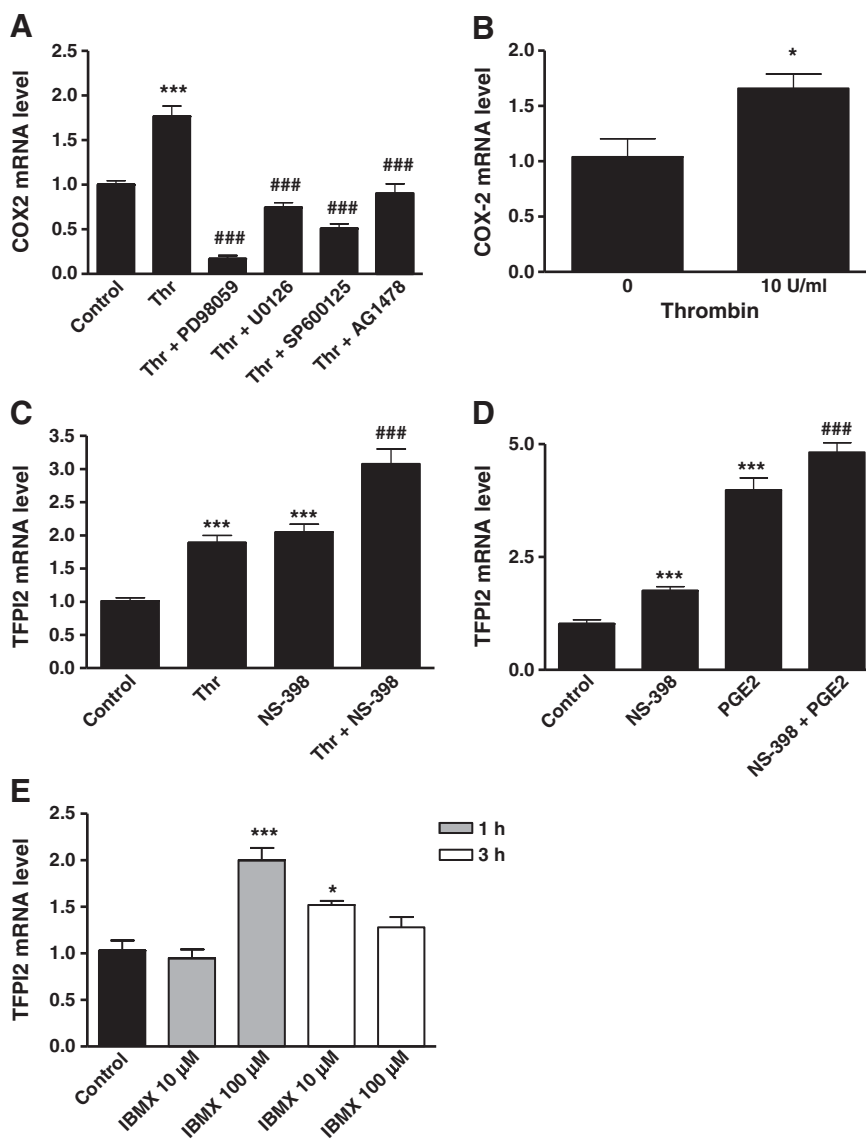


Fig. 4. (A) Thrombin induces COX-2 expression in THP1 macrophages. Analysis of COX-2 mRNA levels in THP-1 macrophages incubated with thrombin alone or combined with U0126 (10 μM) PD98059 (50 μM), SP600125 (10 μM), or AG1478 (0.5 μM) for 24 h. The inhibitors were added 30 min before thrombin. COX-2 mRNA levels were evaluated by real-time PCR, and data were normalized by GAPDH mRNA levels. The graph represents the mean ± S.E.M of six independent experiments performed in duplicate (****p*<0.001 vs control, ### *p*<0.001 vs thrombin). (B) Effect of treatment with thrombin (10 U/ml, 24 h) on COX-2 expression in human monocyte-derived macrophages. (C, D) Effects of a COX-2 inhibitor and PGE₂ on thrombin-induced TFPI2 expression. Analysis of TFPI2 mRNA levels in THP-1 macrophages incubated with thrombin, NS-398 (5 μM), PGE₂ (1 μM) or combinations. (E) Effects of IBMX treatment on TFPI2 expression. TFPI2 mRNA levels were evaluated by real-time PCR, and data were normalized by GAPDH mRNA levels. The graph represent the mean ± S.E.M of six independent experiments performed in duplicate (**p*<0.05 and ****p*<0.001 vs control, ### *p*<0.001 vs thrombin).

roles of TFPI-2 in vivo is plasmin and MMPs inhibition, which may inhibit ECM degradation and increase atherosclerotic plaque stability [6]. Very recently, it has been proposed that TFPI2 may also play an antiatherogenic role by promoting macrophage apoptosis [32]. Therefore, the induction of TFPI2 expression by thrombin could represent a physiological negative feedback regulatory mechanism triggered to avoid excessive MMP activity and limit lesion cellularity in atherosclerotic lesions. Further studies are required to unravel the relationship between TFPI2 and thrombin in the context of atherosclerosis progression.

Acknowledgements

We would like to thank the Language Advice Service of the University of Barcelona for helpful assistance.

Financial support: This study was partly supported by grants FIS 2007-0875, 2009SGR0413, 2010SAF-15664 Fundació Privada Catalana de Nutrició i Lípids, Spanish Pharmacology Society and European

Community FEDER funds. Alba Rebollo was supported by a grant from ISCIII.

References

- [1] C. Zawadzki, N. Chatelain, M. Delestre, S. Susen, B. Quesnel, F. Juthier, E. Jeanpierre, R. Azaoui, D. Corseaux, J. Breyne, G. Torpier, B. Staels, B.E. Van, B. Jude, Tissue factor pathway inhibitor-2 gene methylation is associated with low expression in carotid atherosclerotic plaques, *Atherosclerosis* 204 (2009) e4–e14.
- [2] S. Siegling, E. Thyzel, J. Glahn, K. Kleesiek, C. Gotting, Analysis of sequence variations in the promoter region of the human tissue factor pathway inhibitor 2 gene in apoplectic patients and blood donors, *Ann. Hematol.* 85 (2006) 32–37.
- [3] H.S. Chand, D.C. Foster, W. Kisiel, Structure, function and biology of tissue factor pathway inhibitor-2, *Thromb. Haemost.* 94 (2005) 1122–1130.
- [4] E. Sierko, M.Z. Wojtukiewicz, W. Kisiel, The role of tissue factor pathway inhibitor-2 in cancer biology, *Semin. Thromb. Hemost.* 33 (2007) 653–659.
- [5] L.C. Petersen, C.A. Sprecher, D.C. Foster, Inhibitory properties of a novel human Kunitz-type protease inhibitor homologous to tissue factor pathway inhibitor, *Biochemistry* 35 (1996) 266–272.

- [6] J.T. Crawley, D.A. Goulding, V. Ferreira, N.J. Severs, F. Lupu, Expression and localization of tissue factor pathway inhibitor-2 in normal and atherosclerotic human vessels, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22 (2002) 218–224.
- [7] T. Higashikata, M. Yamagishi, T. Higashi, I. Nagata, K. Iihara, S. Miyamoto, H. Ishibashi-Ueda, N. Nagaya, T. Iwase, H. Tomoike, A. Sakamoto, Altered expression balance of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human carotid plaque disruption: results of quantitative tissue analysis using real-time RT-PCR method, *Atherosclerosis* 185 (2006) 165–172.
- [8] M. Iino, D.C. Foster, W. Kisiel, Quantification and characterization of human endothelial cell-derived tissue factor pathway inhibitor-2, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18 (1998) 40–46.
- [9] Z. Xu, D. Maiti, W. Kisiel, E.J. Duh, Tissue factor pathway inhibitor-2 is upregulated by vascular endothelial growth factor and suppresses growth factor-induced proliferation of endothelial cells, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26 (2006) 2819–2825.
- [10] J. Ekstrand, A. Razuvaev, L. Folkersen, J. Roy, U. Hedin, Tissue factor pathway inhibitor-2 is induced by fluid shear stress in vascular smooth muscle cells and affects cell proliferation and survival, *J. Vasc. Surg.* 52 (2010) 167–175.
- [11] G. Llaverias, J. Pou, E. Ros, D. Zambon, M. Cofan, A. Sanchez, M. Vazquez-Carrera, R.M. Sanchez, J.C. Laguna, M. Alegret, Monocyte gene-expression profile in men with familial combined hyperlipidemia and its modification by atorvastatin treatment, *Pharmacogenomics* 9 (2008) 1035–1054.
- [12] G. Llaverias, M. Jove, M. Vazquez-Carrera, R.M. Sanchez, C. Diaz, G. Hernandez, J.C. Laguna, M. Alegret, Avasimibe and atorvastatin synergistically reduce cholesteryl ester content in THP-1 macrophages, *Eur. J. Pharmacol.* 451 (2002) 11–17.
- [13] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [14] K.W. Kang, S.Y. Choi, M.K. Cho, C.H. Lee, S.G. Kim, Thrombin induces nitric-oxide synthase via Galphai2/13-coupled protein kinase C-dependent I-kappaBalpha phosphorylation and JNK-mediated I-kappaBalpha degradation, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 17368–17378.
- [15] L. Zheng, M. Martins-Green, Molecular mechanisms of thrombin-induced interleukin-8 (IL-8/CXCL8) expression in THP-1-derived and primary human macrophages, *J. Leukoc. Biol.* 82 (2007) 619–629.
- [16] S. Venkatesan, P. Cullen, P. Pacy, D. Halliday, J. Scott, Stable isotopes show a direct relation between VLDL apoB overproduction and serum triglyceride levels and indicate a metabolically and biochemically coherent basis for familial combined hyperlipidemia, *Arterioscler. Thromb.* 13 (1993) 1110–1118.
- [17] V. Neaud, J.G. Duplantier, C. Mazzocco, W. Kisiel, J. Rosenbaum, Thrombin up-regulates tissue factor pathway inhibitor-2 synthesis through a cyclooxygenase-2-dependent, epidermal growth factor receptor-independent mechanism, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 5200–5206.
- [18] S.P. Hehner, M. Heinrich, P.M. Bork, M. Vogt, F. Ratter, V. Lehmann, K. Schulze-Osthoff, W. Droge, M.L. Schmitz, Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF-kappa B by preventing the degradation of I kappa B-alpha and I kappa B-beta, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 1288–1297.
- [19] A. Fanjul, M.I. Dawson, P.D. Hobbs, L. Jong, J.F. Cameron, E. Harlev, G. Graupner, X.P. Lu, M. Pfahl, A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation, *Nature* 372 (1994) 107–111.
- [20] A.E. Ter, S. Holewijn, S.J. Bredie, A.F. Stalenhoef, J. de Graaf, Remnant particles are the major determinant of an increased intima media thickness in patients with familial combined hyperlipidemia (FCH), *Atherosclerosis* 191 (2007) 220–226.
- [21] A.M. Georgieva, H.T. Cate, E.T. Keulen, O.R. Van, J.W. Govers-Riemslog, K. Hamulyak, C.J. van der Kallen, M.M. Van Greevenbroek, T.W. De Bruin, Prothrombotic markers in familial combined hyperlipidemia: evidence of endothelial cell activation and relation to metabolic syndrome, *Atherosclerosis* 175 (2004) 345–351.
- [22] K. Croce, P. Libby, Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis, *Curr. Opin. Hematol.* 14 (2007) 55–61.
- [23] M. Xue, M.D. Hollenberg, V.W. Yong, Combination of thrombin and matrix metalloproteinase-9 exacerbates neurotoxicity in cell culture and intracerebral hemorrhage in mice, *J. Neurosci.* 26 (2006) 10281–10291.
- [24] H.M. Lo, C.L. Chen, Y.J. Tsai, P.H. Wu, W.B. Wu, Thrombin induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 release via PAR1 activation and ERK1/2- and p38 MAPK-dependent pathway in murine macrophages, *J. Cell. Biochem.* 108 (2009) 1143–1152.
- [25] D.W. Hommes, M.P. Peppelenbosch, S.J. van Deventer, Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets, *Gut* 52 (2003) 144–151.
- [26] F. Hube, P. Reverdiu, S. Iochmann, C. Cherpi-Antar, Y. Gruel, Characterization and functional analysis of TFPI-2 gene promoter in a human choriocarcinoma cell line, *Thromb. Res.* 109 (2003) 207–215.
- [27] M. Karin, M. Delhase, JNK or IKK, AP-1 or NF-kappaB, which are the targets for MEK kinase 1 action? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 9067–9069.
- [28] S.G. Harris, J. Padilla, L. Koumas, D. Ray, R.P. Phipps, Prostaglandins as modulators of immunity, *Trends Immunol.* 23 (2002) 144–150.
- [29] R. Nasrallah, O. Laneuville, S. Ferguson, R.L. Hebert, Effect of COX-2 inhibitor NS-398 on expression of PGE2 receptor subtypes in M-1 mouse CCD cells, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 281 (2001) F123–F132.
- [30] R. Butzow, V.P. Lehto, O. Ritvos, T. Ranta, M. Seppala, Regulation of the production of placental protein 5 by human endometrial stromal cells; the role of prostaglandins E2 and F2 alpha, *Mol. Cell. Endocrinol.* 60 (1988) 137–143.
- [31] L. Martorell, J. Martinez-Gonzalez, J. Crespo, O. Calvayrac, L. Badimon, Neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) is induced by thrombin and mediates vascular endothelial cell growth, *J. Thromb. Haemost.* 5 (2007) 1766–1773.
- [32] J.J. Pan, H.M. Shi, X.P. Luo, D. Ma, Y. Li, J. Zhu, W. Liang, J.G. Mu, J. Li, Recombinant TFPI-2 enhances macrophage apoptosis through upregulation of Fas/FasL, *Eur. J. Pharmacol.* 654 (2011) 135–141.

IV

Type II Interleukin-1 receptor expression is reduced in monocytes/macrophages and atherosclerotic lesions

Jordi Pou, Alba Rebollo, José Martínez-González, Cristina Rodríguez, Ricardo Rodríguez-Calvo, Paula Martín-Fuentes, Ana Cenarro, Fernando Civera, Juan C. Laguna, Marta Alegret

BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids (acceptat, en premsa)

L'objectiu d'aquest treball va ser analitzar la regulació de l'expressió del receptor tipus II de la interleucina-1 (IL-1R2) en monòcits i macròfags sotmesos a condicions pro-aterogèniques, i en lesions ateroscleròtiques humanes.

En primer lloc, vàrem comprovar que la reducció dels nivells de mRNA d'IL-1R2 observada en monòcits de pacients amb HFC (Llaverias i col, *Pharmacogenomics*, 9 (8): 1035-1054, 2008) es produïa també a nivell de l'expressió proteica d'aquests receptors, mentre que l'expressió del receptor funcional IL-1R1 no va resultar modificada. A continuació, i emprant la línia de monòcits THP-1 diferenciats a macròfags, vam determinar l'efecte de l'exposició d'aquestes cèl·lules a concentracions creixents de lipoproteïnes pro-aterogèniques (LDL acetilades i VLDL) sobre l'expressió dels esmentats receptors. Els nostres resultats van indicar que tant els nivells de mRNA com de proteïna d'IL-1R2 resultaven reduïts en macròfags THP-1 després de la incubació amb aquestes lipoproteïnes.

Els efectes de les lipoproteïnes sobre l'expressió d'IL-1R2 semblen relacionar-se amb la seva capacitat d'induir l'acumulació de lípids en els macròfags, ja que van ser revertits per agents que interfereixen amb aquests processos. Així, la cloroquina (inhibidor del processament lisosomal de lipoproteïnes) i l'orlistat (inhibidor de l'activitat LPL i de l'acumulació de TG induïda per VLDL) van evitar la reducció de l'expressió d'IL-1R2 produïda per LDL acetilades o per VLDL, respectivament.

Atès que IL-1R2 actua com a regulador negatiu de l'activitat de la IL-1, vam voler determinar si la menor expressió d'aquest receptor podria facilitar l'establiment d'una resposta inflamatòria mitjançada per IL-1 en els macròfags. Quan s'activa aquesta via, la proteïna IRAK-1 és hiperfosforilada i vehiculitzada al proteasoma per la seva degradació. En el nostre estudi vàrem comprovar que el tractament amb lipoproteïnes revertia l'increment en l'expressió d'IL-1R2 observat després de l'estimulació amb LPS, un dels activadors de la via d'IL-1. D'altra banda, la pre-incubació amb LDL acetilada i amb VLDL revertia l'increment de la forma fosforilada d'IRAK-1 induït per LPS, però també en

reduïa l'expressió total, suggerint que les lipoproteïnes faciliten la degradació al proteasoma d'aquest component de la via de senyalització d'IL-1.

Per últim, la rellevància de la reducció d'IL-1R2 en el procés ateroscleròtic es va evidenciar per la marcada reducció dels nivells proteics d'IL-1R2 en artèries amb lesions ateroscleròtiques, al comparar-los amb artèries sanes.

En resum, els resultats obtinguts permeten pensar que la reducció de l'expressió d'IL-1R2 podria facilitar la senyalització per IL-1 i l'establiment d'una reacció inflamatòria que contribuiria al desenvolupament de l'aterosclerosi.

**Type II interleukin-1 receptor expression is reduced in monocytes/macrophages
and atherosclerotic lesions**

Jordi Pou^a, José Martínez-González^b, Alba Rebollo^a, Cristina Rodríguez^b, Ricardo Rodríguez-Calvo^b, Paula Martín-Fuentes^c, Ana Cenarro^c, Fernando Civeira^c, Juan C. Laguna^{a,d}, Marta Alegret^{a,d*}

^aUnidad de Farmacología, Facultad de Farmacia, Instituto de Biomedicina (IBUB), Universidad de Barcelona, Spain. ^bCentro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC), IBB Sant Pau, Barcelona, Spain. ^cUnidad de Lípidos y Laboratorio de Investigación Molecular, Hospital Universitario Miguel Servet, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (I+CS), Zaragoza, Spain. ^dCIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spain

*Corresponding author: Marta Alegret, Unidad de Farmacología, Facultad de Farmacia e Instituto de Biomedicina (IBUB), Universidad de Barcelona, Diagonal 643, Barcelona E-08028, Spain. Tel: +34 93 4024531; fax +34 93 4035982, E-mail address: alegret@ub.edu

Abbreviations: ERK, extracellular response kinase; FCH, familial combined hyperlipidemia; IL-1, interleukin-1; IL-1R1, type I interleukin-1 receptor; IL-1R2, type II interleukin-1 receptor; IRAK, interleukin-1 receptor associated kinase; LPS, lipopolysaccharide; MAPK, mitogen activated protein kinase; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate.

Abstract

Type II interleukin-1 receptor (IL-1R2) is a non-signalling decoy receptor that negatively regulates the activity of interleukin-1 (IL-1), a pro-inflammatory cytokine involved in atherogenesis. In this article we assessed the relevance of IL-1R2 in atherosclerosis by studying its expression in monocytes from hyperlipidemic patients, in THP-1 macrophages exposed to lipoproteins and in human atherosclerotic lesions. Our results showed that the mRNA and protein expression of IL-1R2 was reduced in monocytes from patients with familial combined hyperlipidemia (-30%, $p < 0.05$). THP-1 macrophages incubated with increasing concentrations of acetylated low density (ac-LDL) and very low density (VLDL) lipoproteins also exhibit a decrease in IL-1R2 mRNA and protein levels. Pre-incubation with agents that block intracellular accumulation of lipids prevent the decrease in IL-1R2 mRNA caused by lipoproteins. Lipoproteins also prevented the increase in IL-1R1 and IL-1R2 caused by a 4-h stimulation with LPS and reduced protein expression of total and phosphorylated IL-1 receptor-associated kinase-1. Finally, IL-1R2 expression in human atherosclerotic vessels was markedly lower than in non-atherosclerotic arteries (-80%, $p < 0.0005$). Overall, our results suggest that under atherogenic conditions, there is a decrease in IL-1R2 expression in monocytes/macrophages and in the vascular wall that may facilitate IL-1 signaling.

Keywords: monocytes; THP-1 macrophages; lipoproteins; interleukin-1 receptors; atherosclerosis.

1. Introduction

There is increasing evidence that inflammation plays an important role in the development and progression of atherosclerosis. One of the key components of the inflammatory response is interleukin-1 (IL-1), a multifunctional cytokine secreted by monocytes/macrophages, polymorphonuclear neutrophils, and vascular endothelial and smooth muscle cells (VSMC). Several studies have suggested a crucial role for IL-1 in the atherosclerotic process [1]. IL-1 α and β facilitate lesion formation even in its earliest stages, by increasing leukocyte adhesion and transmigration. It has also been suggested that IL-1 is involved in foam cell and fatty streak lesion formation [2].

IL-1 signaling is initiated by the binding of IL-1 α or IL-1 β to the type I IL-1 receptor (IL-1R1), a 80-kDa receptor that possesses a characteristic cytosolic Toll-IL-1R (TIR) domain. Following IL-1 binding, the IL-1 receptor accessory protein (IL-1RacP) is recruited to form a high affinity complex that mediates signaling via the adaptor protein MyD88. This triggers phosphorylation of the IL-1 receptor-associated kinase (IRAK) 4, which subsequently phosphorylates IRAK1 and IRAK2, allowing interaction with the downstream adaptor tumor necrosis factor receptor associated factor-6 (TRAF-6), finally leading to activation of the transcription factor NF- κ B [3]. IL-1 activity is tightly regulated at multiple levels to avoid the detrimental effects of prolonged activation. Type II IL-1 receptor (IL-1R2) inhibits IL-1 activity by a variety of mechanisms [4]. First, membrane IL-1R2 functions as a non-signaling receptor and reduces IL-1 activity by acting as a ligand sink that subtracts IL-1 from the signaling type I receptor. Second, once bound to IL-1, IL-1R2 can function as a decoy receptor as it recruits IL-1RacP, diminishing its ability to form a complex with IL-1R1. Third, the low binding affinity of IL-1R2 for the endogenous antagonist IL-1Ra allows these molecules to function in a synergistic fashion. Finally, soluble IL-1R2 (sIL-1R2) binds IL-1 in the microenvironment, diverting it from interaction with IL-1R1, and thus represents another mechanism by which excessive IL-1 bioactivity can be attenuated.

In a previous study performed using cDNA microarrays, we found that the mRNA levels of IL-1R2 were significantly reduced in monocytes from patients with familial combined hyperlipidemia (FCH) compared to matched healthy controls [5]. As far as we know, there is a lack of information about the regulation of this receptor in the context of hyperlipidemia and atherosclerosis. In the present paper we demonstrate that levels of IL-1R2 protein are also lower in monocytes from FCH subjects and in atherosclerotic lesions. As reduced IL-1R2 expression may be caused by exposure to proatherogenic factors, specifically high levels of lipoproteins, we also studied the effect of VLDL or acetylated LDL (ac-LDL) on human THP-1 macrophages, a well known model for studying the role of inflammatory cells and foam cell formation in atherosclerosis [6-9].

2. Material and Methods

Cell culture reagents were from Gibco, Invitrogen Corporation (Paisley, UK), with the exception of fetal bovine serum (PAA Laboratories, Pasching, Austria) and 4-beta phorbol 12 beta myristate 13 alpha acetate (PMA), which was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Lipopolysaccharide (*Escherichia coli* 0127:B8), U0126, LY294002, chloroquine and orlistat were also from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Trizol reagent was from Invitrogen Corporation (Paisley, UK). Antibody against IL-1R2 was from Abcam (Cambridge, MA), anti IRAK-1 from Cell Signaling Technology (Danvers, MA) and anti- β -actin from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Other general chemicals were obtained from commercial sources and were of analytical grade.

2.1. Cell culture

Human mononuclear cells were isolated from peripheral blood from five asymptomatic male patients with FCH recruited from the Lipid Unit of the Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza (Spain). The subjects presented mixed dyslipidemia (phenotype IIb) and fulfilled the standard criteria of untreated serum cholesterol and/or triglyceride levels above the sex- and age-adjusted 90th percentile for the reference population [10]. All subjects had at least one first-

degree relative with mixed hyperlipidemia. A control group of five unrelated men, healthy normolipidemic volunteers, matched to FCH patients for age and adiposity, was recruited from Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza (Spain). They were selected during their annual medical examination because of normal lipid values and absence of drugs affecting lipid metabolism.

Isolation of mononuclear cells was performed by density gradient centrifugation on Ficoll-Paque (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA), as described previously [5].

Written informed consent was obtained for all participants in this study, which was approved by the Clinical Investigation and Ethical Committee of Aragón.

THP-1 cells were obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECACC), and differentiated to macrophages by exposing the cells to 50 ng/ml PMA for different time periods. Macrophages obtained by treatment with PMA for 24 h were washed three times in PBS and incubated in medium devoid of serum with very low density lipoproteins (VLDL, 0-150 µg/ml) or acetylated low density lipoproteins (ac-LDL, 0-150 µg/ml) for 24 h, as previously described by our group [7,11,12]. In experiments using LPS, cells were first incubated for 24 h with or without addition of ac-LDL or VLDL, both at 150 µg protein/ml, washed with a heparin solution (20 U/ml in PBS) in order to remove lipoproteins attached to cell surfaces [13] and then incubated for an additional 4 h with LPS (1 µg/ml). Cell viability was not affected by any of the treatments, as determined by the MTT method.

2.2. Lipoproteins

VLDL and LDL were prepared from the plasma of healthy donors by sequential ultracentrifugation, and LDL were acetylated as previously described [11]. Lipoproteins were stored at 4°C and used within 15 days of preparation. Native and modified lipoprotein preparations were tested for possible endotoxin contamination using a LAL kit (GenScript).

2.3. Human artery sampling and preservation

Human coronary artery samples were collected from patients undergoing heart transplant operations at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain). Immediately after surgical excision, arteries were dissected, immersed in cell maintenance media, and cleaned of connective tissue and fat under low magnification with a stereomicroscope (SZH10; Olympus, Tokyo, Japan). This examination allowed us to classify coronary arteries as atherosclerotic, assessed by the presence of evident atherosclerotic lesions, and non-atherosclerotic arteries as deduced from absence of fibro-fatty tissue or visible plaques. Vessel samples were split and processed for either conventional staining or frozen in liquid nitrogen and stored at -80° C until protein extraction. The absence/presence of atherosclerotic lesions was confirmed by conventional Masson's trichrome or hematoxylin and eosin staining [14]. The study was approved by the ethics committee of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and was conducted according to the Declaration of Helsinki (revised in 2000).

2.4. Immunohistochemistry

The specimens for immunohistochemistry were immersed in fixative solution (4% paraformaldehyde/0.1 mol/L PBS, pH 7.4). After overnight treatment, vessels were sectioned into blocks and embedded in paraffin. The presence of IL-1 Receptor II in human coronary arteries was assessed by immunohistochemistry analysis following the avidin-biotin-peroxidase complex method. Briefly, sections of 5 µm were deparaffined, treated for unspecific binding and incubated with a rabbit polyclonal anti-IL-1R2 antibody (1:50 dilution, Abcam) overnight at 4°C. As secondary antibody, a goat polyclonal anti-rabbit IgG coupled to avidin-biotin was used (1:100 dilution, Vector). The peroxidase reaction was visualized with 0.05% diaminobenzidine and 0.01% hydrogen peroxide. Negative controls were performed by omitting the primary antibody. Images were captured and digitised using a Nikon microscope equipped with a Canon digital camera.

2.5. RNA preparation and analysis

Total RNA was isolated using the Trizol reagent, and levels of specific mRNAs were assessed by quantitative real-time RT-PCR, using a Perkin-Elmer ABI Prism 7700 sequence detection system as described [5,15]. TaqMan Universal PCR Master Mix, and TaqMan probes were obtained from TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, USA). The primer/probe pairs for human IL-1R2 (Hs00174759_m1), IL-1R1 (Hs00183573_m1), IL-1RacP (Hs00158057_m1), IL-1 β (Hs99999029_m1), IL-1Ra (Hs00893626_m1) and the internal control glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, Hs99999905_m1) were used. Sequence detector software (S.D.S. 1.9.1) was used for data analysis. A threshold cycle value (C_T) was obtained for each amplification plot, and after normalization by the reference gene GAPDH the relative expression ratio for each gene was calculated, based on the difference between the mean C_T of the sample and the corresponding control.

2.6. Western blot analysis

Total protein extracts were obtained from cells and human aortic samples using an ice-cold lysis buffer supplemented with phosphatase and protease inhibitors. Proteins (40 μ g) were resolved by SDS-PAGE and then transferred to immobilon polyvinylidene difluoride or nitrocellulose membranes. The membranes were blocked for 1 h at room temperature in phosphate saline buffer containing 0.1% Tween 20 (PBST) in the presence of 5% nonfat dry milk, and immunological detection was performed using a rabbit polyclonal antibody raised against IL-1R2 (dilution 1:500), IL-1R1 (dilution 1:1000) or IRAK-1 (dilution 1:1000), overnight at 4°C. After several washes, blots were incubated with an appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, and detection was achieved using the enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (Amersham Bioscience). Blots were also incubated with a monoclonal antibody against β -actin, used as an equal protein loading control. Chemiluminescence was detected using a Chemidoc XRS (BioRad), and densitometric analysis

was performed by Quantity One® software. Each band was quantified and normalised to β -actin signal. Protein levels are expressed in arbitrary units relative to the corresponding control.

2.7. Statistical analysis

Data are presented as mean \pm S.E.M. An analysis of variance (ANOVA), combined with an *a posteriori* test, was used to evaluate the statistical significance of the differences. When only two groups were compared, either the Student's t test or the corresponding non-parametric Mann-Whitney test was selected. The computer program GraphPad InStat was used for the calculations.

3. Results

3.1. IL-1R2 expression is reduced in monocytes from hypercholesterolemic patients

We previously demonstrated that IL-1R2 mRNA levels were reduced in monocytes from patients with FCH [5]. In the present study we corroborated this finding in another group of FCH patients and matched control individuals. As shown in Fig. 1A, IL-1R2 mRNA expression was 30% lower in monocytes from patients compared to controls ($p < 0.05$), while IL-1R1 mRNA levels were not significantly altered in these samples. To investigate whether protein expression was also changed, we performed Western blot analysis using an antibody directed against the extracellular domain of human IL-1R2. We observed an immunoreactive band of approximately 69 kDa, which corresponds to the membrane form of IL-1R2 as described by other authors [16,17]. Our results (Fig. 1B) show that in accordance with the decrease in mRNA expression, IL-1R2 protein was also significantly lower in monocytes from FCH patients, compared with healthy controls (-36%, $p < 0.01$). Western blot analysis using an antibody against the type I receptor did not reveal any differences between control and patient monocytes.

3.2. Expression of IL-1R2 in undifferentiated and PMA-differentiated THP-1 cells

To gain insight into the mechanisms involved in the decrease of IL-1R2 expression in hyperlipidemic patients, we were interested in studying the expression of this receptor in the human monocytic cell line THP-1. PMA-differentiated THP-1 macrophages are metabolically and morphologically very similar to mature human primary macrophages [18], so they have been widely used as an *in vitro* model of these cells [6,9]. First, we examined the expression of IL-1R2 in THP-1 cells exposed to PMA for different time periods (Supplemental Fig. 1). We found that undifferentiated THP-1 monocytes expressed appreciable levels of IL-1R2 mRNA, but at 48 and 72 h after PMA treatment, IL-1R2 expression was strongly increased (approximately 150- and 190-fold respectively, $p < 0.001$). Thus, to obtain differentiated macrophages and to avoid the marked effects of PMA on IL-1R2 expression, we chose to treat monocytes with PMA for 24 h prior to lipoprotein exposure.

3.3. Effect of ac-LDL or VLDL on the expression of IL-1 receptor family members

Next, we studied the mRNA and protein levels of IL-1R2 in THP-1 macrophages treated with increasing concentrations of ac-LDL or VLDL for 24 h. Both lipoproteins reduced IL-1R2 mRNA levels in a concentration-dependent manner (Fig 2A and B). Maximal effect (-48%, $p < 0.001$ and -45%, $p < 0.05$) was attained at a dose of 150 $\mu\text{g/ml}$ of ac-LDL and VLDL, respectively. In accordance with these data, IL-1R2 protein expression was also significantly reduced by both ac-LDL and VLDL (Fig 2C and D). We also studied the effect of lipoproteins on the mRNA expression of other IL-1-related genes in THP-1 macrophages. The expression of IL-1RacP, IL-1 β or IL-1Ra was not affected (data not shown), while the mRNA levels of the functional receptor IL-1R1 were reduced after treatment with ac-LDL (-42%, $p < 0.01$, at 150 $\mu\text{g/ml}$), but not with VLDL (Fig 2E and F).

3.4. Mechanisms involved in lipoprotein-related IL-1R2 mRNA decrease

To investigate whether the effects of lipoproteins are secondary to lipid accumulation, we used compounds that alter intracellular processing and accumulation of cholesteryl esters or triglycerides. As it is shown in Fig 3A, pretreatment with chloroquine (inhibitor of lysosomal

processing) or orlistat (inhibitor of LPL activity) effectively prevented the down regulation of IL-1R2 expression caused by ac-LDL or VLDL, respectively. It has been reported that VLDL from hyperlipidemic subjects induce macrophage-derived LPL enzyme activity without modulating LPL mRNA and protein expression [19]. However, in our case exposure to VLDL caused a significant increase in macrophage LPL mRNA levels at all the concentrations tested, with maximal effect (30% increase, $p < 0.01$) at 150 $\mu\text{g/ml}$ (Fig 3B).

Intracellular lipid accumulation plays an important role in mediating the pro-inflammatory effects of lipoproteins. For example, it has been proposed that the pro-inflammatory effects of VLDL on macrophages are mediated by the activation of mitogen activated protein kinase (MAPK) family members, specifically extracellular response kinase (ERK) 1/2 [20]. In order to determine whether the changes induced in IL-1R2 expression by lipoproteins could also involve the ERK pathway, we pretreated macrophages with U0126, a selective MEK1/2 inhibitor, before exposing the cells to either ac-LDL or VLDL. As shown in Fig 4A and B, U0126 inhibited the reduction in IL-1R2 mRNA expression caused by ac-LDL treatment, while it was ineffective in cells exposed to VLDL. It has also been suggested that VLDL could activate the PI3 kinase pathway through the VLDL receptor, which is expressed in THP-1 macrophages [21,22]. However, the PI3 kinase inhibitor LY294002 did not prevent IL-1R2 down-regulation.

3.5. Response to inflammatory stimulus

We were also interested in studying whether pre-treatment with lipoproteins alters the changes in IL-1R1 and IL-1R2 expression induced by lipopolysaccharide (LPS), a prototypic inflammatory stimulus, in THP-1 macrophages. Our results showed that LPS increased the mRNA expression of both IL-1 receptors. However, the effects of pre-incubation with lipoproteins were different: neither VLDL nor ac-LDL altered the LPS-induced expression of IL-1R1, while both lipoproteins partially blocked the induction of IL-1R2 expression caused by LPS exposure (Fig 5A and B). Since activation of IRAK-1 is one of the initial steps in IL-1 signaling, we assessed the regulation of IRAK-1 in LPS-stimulated cells in the presence or absence of lipoproteins. As shown in Fig 5C, LPS challenge caused an increase in modified

IRAK-1 bands (~100 kDa), corresponding to the covalent IRAK1 modification probably due to activation and phosphorylation at multiple sites. In the presence of VLDL or ac-LDL, both unmodified (~80 kDa) and modified IRAK-1 bands were reduced.

3.6. Expression of IL-1R2 is lower in human atherosclerotic arteries

To assess whether IL-1R2 is also down-regulated during atherogenesis, the protein expression of IL-1 receptors in human atherosclerotic lesions was investigated. Our results (Fig. 6) show that IL-1R2 expression was strikingly reduced in atherosclerotic versus non-atherosclerotic human coronary artery samples (-80%, $p=0.0005$), while IL-1R1 protein levels were not significantly different. Accordingly, IL-1R2 was located in human coronary arteries without atheroma (immunostaining was prominent in medial VSMC and low in the thickened intima). By contrast, IL-1R2 was extensively down-regulated in advanced atherosclerotic lesions (in both media and intima) (Fig 6B).

4. Discussion

IL-1 is a pro-inflammatory cytokine that plays a decisive role in atherosclerosis development. Elevated IL-1 levels are associated with traditional cardiovascular risk factors, and induce chemokine and cytokine secretion, increased expression of adhesion molecules, activation of endothelial cells and macrophages, smooth muscle cell proliferation and increased vascular permeability [23]. The importance of IL-1 in atherosclerosis progression has been demonstrated by studies showing less atherosclerosis in mice deficient in IL-1 or in IL-1R1, the functional IL-1 receptor. Similarly, mice deficient in IL-1Ra, the natural antagonist of IL-1R1, are more liable to develop atherosclerosis. However, less attention has been paid to IL-1R2, a non-signaling decoy receptor that negatively regulates IL-1 activity. To our knowledge, there have been no reports on the regulation of IL-1R2 in macrophages, and there is no prior evidence of an association of this receptor with atherosclerosis. The present study demonstrates that the expression of IL-1R2 is reduced in monocytes from FCH patients, in lipoprotein-treated macrophages and in human atherosclerotic lesions.

It is well known that high plasma lipid levels may affect monocyte gene expression in a pro-atherogenic manner [24]. However, from our previous studies it was not clear whether the differential expression of IL-1R2 in circulating monocytes was the result of a primary genetic defect in these patients or a cellular response to exposure to proatherogenic factors, specifically high levels of VLDL and/or modified LDL. To shed some light on this aspect, we studied the effect of these lipoproteins on human THP-1 macrophages. The unregulated uptake of VLDL [8, 19,25] or acetylated LDL [9,11,12] by these macrophages not only contributes to foam cell formation, but also alters macrophage biology by modulating the expression of several genes [25]. Indeed, our results show that treatment with both classes of lipoproteins caused a dose-dependent down-regulation of IL-1R2 mRNA, suggesting that the observed effect may be the consequence of progressive lipid accumulation induced by these lipoproteins in macrophages. To explore this hypothesis, we studied the effect of several compounds that may affect either triglyceride or cholesteryl ester intracellular build up. It has been reported that only a small percentage of VLDL is taken up as whole particles through receptor-mediated processes, while more than 80% of intracellular triglyceride accumulation is due to the uptake of remnants or free fatty acids resulting from LPL-induced VLDL catabolism [20,26]. Our results indicate that the inhibition of LPL activity by orlistat prevents VLDL downregulation of IL-1R2, suggesting that this effect is secondary to VLDL-induced triglyceride accumulation in macrophages. On the other hand, macrophage lipid loading by ac-LDL involves the hydrolysis of ac-LDL delivered cholesteryl esters by lysosomal acid lipase, re-esterification of free cholesterol by acyl-CoA:cholesterol acyltransferase and accumulation of newly synthesized cholesteryl esters in cytosolic lipid droplets [27]. The inhibition of lysosomal lipase by chloroquine, which therefore blocks ac-LDL-induced lipid accumulation [28], also prevented the downregulation of IL-1R2 caused by these lipoproteins. Therefore, the inhibitory effect of lipoproteins on IL-1R2 expression may be attributed to intracellular lipid accumulation.

Taking into account the inhibitory effect of IL-1R2 on IL-1 signaling, one may speculate that reduced IL-1R2 expression in lipoprotein-treated macrophages could facilitate the inflammatory response. It has been reported that the pro-inflammatory effects of VLDL in murine

macrophages depend on LPL-mediated hydrolysis and the subsequent accumulation of intracellular free fatty acids and triglycerides [20,19]. In our study, we confirmed that VLDL exposure significantly increased macrophage LPL expression. It could be speculated that the increase in VLDL lipolysis and the subsequent intracellular lipid accumulation in macrophages promote inflammatory effects in part through the reduction of IL-1R2 expression, as this would facilitate IL-1 signaling. Contrary to what has been described in murine macrophages, in our case the ERK1/2 pathway was not involved in the production of VLDL-driven inflammation effects, as pre-incubation with the ERK1/2 inhibitor U0126 did not reverse the inhibitory effect of these lipoproteins on IL-1R2 expression.

Exposure of THP-1 macrophages to ac-LDL triggers oxidative stress and inflammatory responses [29]; moreover, it has been reported that foam cell formation by ac-LDL in human macrophages involves ERK activation [30]. According to our results, the inhibitory effect of ac-LDL on IL-1R2 expression was reduced by pre-incubation with U0126, suggesting that the decrease in IL-1R2 expression caused by ac-LDL is due to cholesterol loading and ERK activation in THP-1 macrophages.

We also wanted to explore whether lipoprotein addition could affect IL-1 receptor expression in activated THP-1 macrophages. First, we treated the cells with a pro-inflammatory stimulus (LPS), and we observed that contrary to the effect of lipoproteins, the mRNA expression of both IL-1 receptors was increased. The increase in IL-1R1 expression after LPS exposure has already been described in monocytes [31]. However, the regulation of IL-1R2 expression by inflammatory stimuli in professional phagocytes is controversial: some authors have reported that LPS causes a rapid inhibition of constitutively expressed IL-1R2 mRNA in human monocytes [32], whereas others have found a greatly increased expression of IL-1R2 mRNA and cell surface receptors in neutrophils from patients with sepsis [33]. In our model, a short and intense stimulation with LPS caused an increase in IL-1R2 expression, maybe as a mechanism triggered to limit the detrimental effects of excessive IL-1 activity. However, when we pre-treated macrophages with ac-LDL or VLDL before LPS exposure, we found that lipoproteins prevented the increase in IL-1R2, but not in IL-1R1. By this mechanism,

lipoproteins could facilitate the pro-inflammatory effects of LPS through the IL-1 pathway. To explore this possibility, we determined the effect of lipoprotein pre-treatment on LPS-induced changes in IRAK-1, a key component of the IL-1 signaling complex. When this pathway is activated, either by IL-1 or by LPS, IRAK-1 undergoes phosphorylation, leading to the formation of a hyperphosphorylated IRAK-1 protein [34]. Our results show that treatment with LPS alone induced the appearance of a band of approximately 100 kDa, which corresponds to the covalent IRAK1 modification by phosphorylation. The intensity of this band was reduced by VLDL or ac-LDL pre-treatment, but there was also a concomitant decrease in the band corresponding to unmodified IRAK-1. After phosphorylation, IRAK-1 is targeted in an ubiquitin-dependent manner to the proteasome for degradation [35]. Thus, the decrease in unmodified IRAK-1 expression suggests that lipoprotein pre-incubation facilitates IL-1 signaling and accelerates IRAK-1 processing to ubiquitinylation.

Finally, we analyzed the expression of IL-1 receptor in human atherosclerotic lesions. Our results showed markedly lower levels of IL-1R2 protein in atherosclerotic lesions compared with non-atherosclerotic vessels, whereas the expression of IL-1R1 receptor was not significantly different. Again, the imbalance between the functional IL-1R1 and the decoy IL-1R2 receptor may reflect a defect in the local control of IL-1 activity. A similar situation has been described in other inflammatory diseases, such as endometriosis [36,37], and in adenocarcinoma endometrial cells transfected with IL-1R2 cDNA antisense, where reduced expression of this receptor without noticeable alterations in IL-1R1 expression was associated with a significant increase in the secretion of matrix proteases in response to IL-1 [38].

Taken together, the coherence of the data obtained in monocytes from hyperlipidemic subjects, lipoprotein-treated macrophages, and human atherosclerotic vessels, suggests a role for decreased IL-1R2 in atherosclerosis development, as this reduction may facilitate IL-1 signaling. Further studies would be necessary to assess the clinical implications of our findings.

Acknowledgements

We thank the Language Advice Service of the University of Barcelona for helpful assistance.

Grant support

This study was partly supported by grants 2009SGR0413, 2010SAF-15664, PS09/01797, Fundació Privada Catalana de Nutrició i Lípids, Spanish Pharmacology Society, European Community FEDER funds and Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (Red de Enfermedades Cardiovasculares [RECAVA], grants RD06/0014/0027, RD06/0014/0029). Alba Rebollo was supported by a grant from ISCIII. Ricardo Rodríguez-Calvo is a recipient of a Juan de la Cierva Contract (MICINN).

References

- [1] J.H. von der Thusen, J. Kuiper, T.J. van Berkel, E.A. Biessen, Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential. *Pharmacol. Rev.* 55 (2003) 133-166.
- [2] R. Elhage, A. Maret, M.T. Pieraggi, J.C. Thiers, J.F. Arnal, F. Bayard, Differential effects of interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein on fatty-streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 97 (1998) 242-244.
- [3] C.A. Dinarello, Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* 27 (2009) 519-550.
- [4] D. Neumann, C. Kollwe, M.U. Martin, D. Boraschi, The membrane form of the type II IL-1 receptor accounts for inhibitory function. *J. Immunol.* 165 (2000) 3350-3357.
- [5] G. Llaverias, J. Pou, E. Ros, D. Zambon, M. Cofan, A. Sanchez, M. Vazquez-Carrera, R.M. Sanchez, J.C. Laguna, M. Alegret, Monocyte gene-expression profile in men with familial combined hyperlipidemia and its modification by atorvastatin treatment. *Pharmacogenomics* 9 (2008) 1035-1054.
- [6] R. Zimmermann, P. Sartipy, R. Winkler, R. Zechner, E. Hurt-Camejo, G.M. Kostner, Endogenously produced glycosaminoglycans affecting the release of lipoprotein lipase from macrophages and the interaction with lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1484 (2000) 316-324.
- [7] G. Llaverias, D. Lacasa, M. Vinals, M. Vazquez-Carrera, R.M. Sanchez, J.C. Laguna, M. Alegret, Reduction of intracellular cholesterol accumulation in THP-1 macrophages by a combination of rosiglitazone and atorvastatin. *Biochem. Pharmacol.* (2004) 68: 155-163.
- [8] G. Larigauderie, C. Cuaz-Perolin, A.B. Younes, C. Furman, C. Lasselin, C. Copin, M. Jaye, J.C. Fruchart, M. Rouis, Adipophilin increases triglyceride storage in human macrophages by stimulation of biosynthesis and inhibition of beta-oxidation. *FEBS J.* 273 (2006) 3498-3510.
- [9] X. Wang, Y. Zheng, Y. Xu, J. Ben, S. Gao, X. Zhu, Y. Zhuang, S. Yue, H. Bai, Y. Chen, L. Jiang, Y. Ji, Y. Xu, L. Fan, J. Sha, Z. He, Q. Chen, A novel peptide binding to the cytoplasmic domain of class A scavenger receptor reduces lipid uptake in THP-1 macrophages. *Biochim. Biophys. Acta.* 1791 (2009) 76-83.
- [10] J.A. Gomez-Gerique, J.A. Gutierrez-Fuentes, M.T. Montoya, A. Porres, A. Rueda, A. Avellaneda, M.A. Rubio, [Lipid profile of the Spanish population: the DRECE (diet and risk of cardiovascular disease in Spain) study. DRECE study group]. *Med. Clin. (Barc.).* 113 (1999) 730-735.
- [11] G. Llaverias, M. Jove, M. Vazquez-Carrera, R.M. Sanchez, C. Diaz, G. Hernandez, J.C. Laguna, M. Alegret, Avasimibe and atorvastatin synergistically reduce cholesteryl ester content in THP-1 macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* 451 (2002) 11-17.

- [12] G. Llaverias, D. Lacasa, M. Vazquez-Carrera, R.M. Sanchez, J.C. Laguna, M. Alegret, Cholesterol regulation of genes involved in sterol trafficking in human THP-1 macrophages. *Mol. Cell Biochem.* 273 (2005) 185-191.
- [13] J. Persson, J. Nilsson, M.W. Lindholm, Interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha impede neutral lipid turnover in macrophage-derived foam cells. *BMC. Immunol.* 9 (2008) 70-81.
- [14] M. Garcia-Ramirez, J. Martinez-Gonzalez, J.O. Juan-Babot, C. Rodriguez, L. Badimon, Transcription factor SOX18 is expressed in human coronary atherosclerotic lesions and regulates DNA synthesis and vascular cell growth. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (2005) 2398-2403.
- [15] C.Q. Duong, S.M. Bared, A. bu-Khader, C. Buechler, A. Schmitz, G. Schmitz, Expression of the lysophospholipid receptor family and investigation of lysophospholipid-mediated responses in human macrophages. *Biochim. Biophys. Acta.* 1682 (2004) 112-119.
- [16] A. Akoum, C. Lawson, C. Herrmann-Lavoie, R. Maheux, Imbalance in the expression of the activating type I and the inhibitory type II interleukin 1 receptors in endometriosis. *Hum. Reprod.* 22 (2007) 1464-1473.
- [17] C. Bellehumeur, J. Blanchet, J.Y. Fontaine, N. Bourcier, A. Akoum, Interleukin 1 regulates its own receptors in human endometrial cells via distinct mechanisms. *Hum. Reprod.* 24 (2009) 2193-2204.
- [18] L. Kritharides, A. Christian, G. Stoudt, D. Morel, G.H. Rothblat, Cholesterol metabolism and efflux in human THP-1 macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18 (1998) 1589-1599.
- [19] D. Milosavljevic, A. Kontush, S. Griglio, N.G. Le, J. Thillet, M.J. Chapman, VLDL-induced triglyceride accumulation in human macrophages is mediated by modulation of LPL lipolytic activity in the absence of change in LPL mass. *Biochim. Biophys. Acta.* 1631 (2003) 51-60.
- [20] V. Saraswathi, A.H. Hasty, The role of lipolysis in mediating the proinflammatory effects of very low density lipoproteins in mouse peritoneal macrophages. *J. Lipid Res.* 47 (2006) 1406-1415.
- [21] L. Lipskaia, M.L. Pourci, C. Delomenie, L. Combettes, D. Goudouneche, J.L. Paul, T. Capiod, A.M. Lompre, Phosphatidylinositol 3-kinase and calcium-activated transcription pathways are required for VLDL-induced smooth muscle cell proliferation. *Circ. Res.* 92 (2003) 1115-1122.
- [22] S. Kosaka, S. Takahashi, K. Masamura, H. Kanehara, J. Sakai, G. Tohda, E. Okada, K. Oida, T. Iwasaki, H. Hattori, T. Kodama, T. Yamamoto, I. Miyamori, Evidence of macrophage foam cell formation by very low-density lipoprotein receptor: interferon-gamma inhibition of very low-density lipoprotein receptor expression and foam cell formation in macrophages. *Circulation* 103 (2001) 1142-1147.
- [23] W.F. Fearon, D.T. Fearon, Inflammation and cardiovascular disease: role of the interleukin-1 receptor antagonist. *Circulation* 117 (2008) 2577-2579.
- [24] J. Ma, A.A. Dempsey, D. Stamatou, K.W. Marshall, C.C. Liew, Identifying leukocyte gene expression patterns associated with plasma lipid levels in human subjects. *Atherosclerosis* 191 (2007) 63-72.

- [25] J. Persson, J., E. Degerman, J. Nilsson, M.W. Lindholm, Perilipin and adipophilin expression in lipid loaded macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363 (2007) 1020-1026.
- [26] V. Saraswathi, A.H. Hasty, The role of lipolysis in mediating the proinflammatory effects of very low density lipoproteins in mouse peritoneal macrophages. *J. Lipid Res.* 47 (2006) 1406-1415.
- [27] J. Pou, A. Rebollo, M. Alegret, The monocyte/macrophage as a therapeutic target in atherosclerosis: Focus on cholesterol homeostasis and inflammation, in: M. Vázquez-Carrera (Ed.), *New Emerging Pharmacological Targets in Metabolic Diseases*, Transworld Research Network, Kerala, 2007, pp. 27-50.
- [28] R.W. St Clair Sulistiyani. Effect of 17 beta-estradiol on metabolism of acetylated low-density lipoprotein by THP-1 macrophages in culture. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 (1997) 1691-1700.
- [29] Y.C. Hung, M.Y. Hong, G.S. Huang, Cholesterol loading augments oxidative stress in macrophages. *FEBS Lett.* 580 (2006) 849-861.
- [30] M. Napolitano, M. Avella, N.T. Goode, K.M. Botham, E. Bravo, Cholesterol esterification in human monocyte-derived macrophages is inhibited by protein kinase C with dual roles for mitogen activated protein kinases. *Cell Biol. Int.* 28 (2004) 717-725.
- [31] S. Saccani, N. Polentarutti, G. Penton-Rol, J.E. Sims, A. Mantovani. Divergent effects of LPS on expression of IL-1 receptor family members in mononuclear phagocytes in vitro and in vivo. *Cytokine.* 10 (1998) 773-780.
- [32] G. Penton-Rol, S. Orlando, N. Polentarutti, S. Bernasconi, M. Muzio, M. Introna, A. Mantovani, Bacterial lipopolysaccharide causes rapid shedding, followed by inhibition of mRNA expression, of the IL-1 type II receptor, with concomitant up-regulation of the type I receptor and induction of incompletely spliced transcripts. *J. Immunol.* 162 (1999) 2931-2938.
- [33] J.G. Giri, J. Wells, S.K. Dower, C.E. McCall, R.N. Guzman, J. Slack, T.A. Bird, K. Shanebeck, K.H. Grabstein, J.E. Sims, M.R. Alderson, Elevated levels of shed type II IL-1 receptor in sepsis. Potential role for type II receptor in regulation of IL-1 responses. *J. Immunol.* 153 (1994) 5802-5809.
- [34] C. Kollwe, A.C. Mackensen, D. Neumann, J. Knop, P. Cao, S. Li, H. Wesche, M.U. Martin, Sequential autophosphorylation steps in the interleukin-1 receptor-associated kinase-1 regulate its availability as an adapter in interleukin-1 signaling. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 5227-5236.
- [35] A. Lockett, M.G. Goebel, M.A. Harrington, Transient membrane recruitment of IRAK-1 in response to LPS and IL-1beta requires TNF R1. *Am. J. Physiol Cell Physiol.* 295 (2008) C313-C323.
- [36] A. Akoum, C. Jolicoeur, A. Kharfi, M. Aube, Decreased expression of the decoy interleukin-1 receptor type II in human endometriosis. *Am. J. Pathol.* 158 (2001) 481-489.
- [37] A. Kharfi, A. Boucher, A. Akoum, Abnormal interleukin-1 receptor type II gene expression in the endometrium of women with endometriosis. *Biol. Reprod.* 66 (2002) 401-406.

- [38] S. Guay, A. Akoum, Stable inhibition of interleukin 1 receptor type II in Ishikawa cells augments secretion of matrix metalloproteinases: possible role in endometriosis pathophysiology. *Reproduction*. 134 (2007) 525-534.

Figure legends

Figure 1. Expression of IL-1 receptors in monocytes (MO) from hypercholesterolemic and matched control subjects. (A) IL-1R1 and IL-1R2 mRNA expression in monocytes was evaluated by real-time PCR, and data were normalised by GAPDH mRNA levels. (B) IL-1R1 and IL-1R2 protein expression was assessed by Western blot analysis using whole protein extracts (40µg) from monocytes. Representative autoradiograms and quantifications are shown. To show equal loading of protein, β-actin signal from the same blots are included. Results are the mean ± S.E.M of the results obtained from five hypercholesterolemic and five control subjects. (*p<0.05).

Figure 2: Effects of lipoproteins on mRNA levels of IL-1 receptors. THP-1 macrophages were incubated with acetyl-LDL and VLDL for 24 h at different concentrations as indicated, and the mRNA levels of IL-1R2 (A and B) and IL-1R1 (E and F) were evaluated by real-time PCR. Data were normalised by GAPDH mRNA levels. (C and D) IL-1R2 protein expression was assessed by Western blot analysis using whole protein extracts (40µg) from control and lipoprotein-treated macrophages. Representative autoradiograms and quantifications are shown. signal from the same blots are included. Data were normalised by β-actin protein expression. Results are the mean ± S.E.M of four independent experiments performed in duplicate. (*p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001).

Figure 3: Mechanisms involved in lipoprotein-related IL-1R2 mRNA decrease. (A) THP-1 macrophages were treated with VLDL or ac-LDL (150 µg/ml) alone or combined with orlistat (2 µM) and chloroquine (75 µM) respectively, and IL-1R2 mRNA expression was determined by real-time PCR. Data were normalised by GAPDH mRNA levels. Results are the mean ± S.E.M of six independent experiments (*p<0.05, ***p<0.001 vs control cells. # p<0.05 vs cells treated with ac-LDL or VLDL). (B) Effect of VLDL on mRNA levels of lipoprotein lipase (LPL). THP-1 macrophages were incubated with VLDL for 24 h at different concentrations as

indicated, and the corresponding mRNA levels were evaluated by real-time PCR. Data were normalised by GAPDH mRNA levels. Results are the mean \pm S.E.M of four independent experiments performed in duplicate (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Figure 4. The ERK1/2 inhibitor U0126 prevents IL-1 R2 inhibition caused by acetyl-LDL, while the PI3 kinase inhibitor LY294002 is ineffective. Analysis of IL-1R2 mRNA levels in THP-1 macrophages incubated with acetyl-LDL (A) or VLDL (B) alone or combined with U0126 (10 μ M) or LY294002 (10 μ M) during 24 h. The inhibitors were added 30 min before the lipoproteins, and did not affect mRNA expression when used alone. IL-1R2 mRNA levels were evaluated by real-time PCR, and data were normalised by GAPDH mRNA levels. Results are the mean \pm S.E.M of three independent experiments performed in duplicate (* $p < 0.05$ versus corresponding control cells. # $p < 0.05$ vs cells treated with acetyl-LDL).

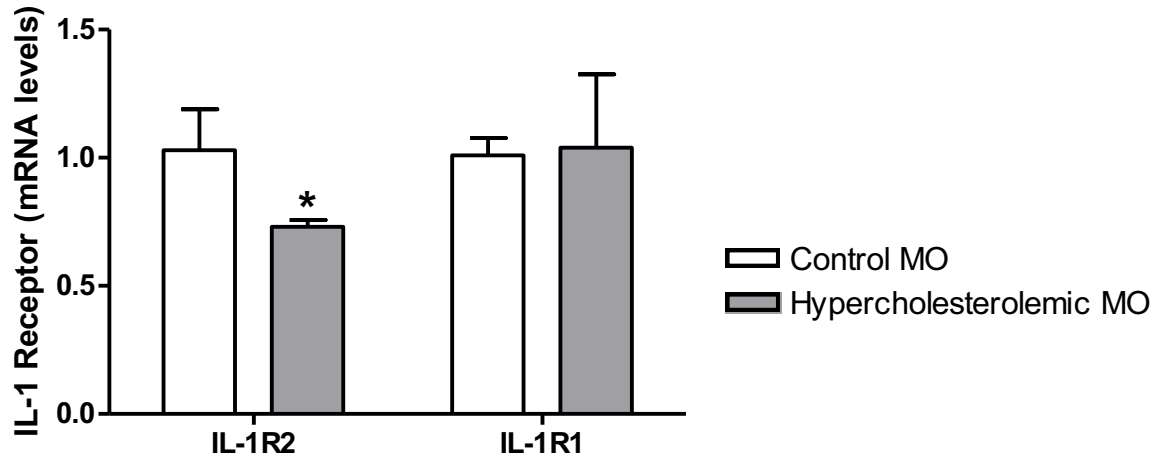
Figure 5: Effects of lipoproteins on LPS-activated macrophages. THP-1 macrophages were stimulated with LPS (1 μ M, 4 h) and then exposed to VLDL or ac-LDL (150 μ g/ml for 24 h). IL-1R1 (A) and IL-1R2 (B) mRNA levels were evaluated by real-time PCR, and data were normalised by GAPDH mRNA levels. Results are the mean \pm S.E.M of three independent experiments performed in duplicate (* $p < 0.05$ versus corresponding control cells. # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ vs cells treated with LPS). (C) Western blot showing the phosphorylation pattern of IRAK-1 and unmodified IRAK-1 expression after exposure to LPS alone or combined with lipoproteins (n=4; *** $p < 0.05$ versus corresponding control cells. ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ vs cells treated with LPS).

Figure 6: IL-1R2 expression is lower in atherosclerotic arteries compared to non-atherosclerotic samples. (A) IL-1R1 and IL-1R2 protein expression was assessed by Western blot analysis using whole protein extracts from atherosclerotic (n=4) and non-atherosclerotic control arteries (n=4). Representative autoradiograms and quantifications are shown. To show equal loading of protein, β -actin signal from the same blots are included. Results are the mean \pm S.E.M

(*** $p < 0.0001$). (B) IL-1R2 immunostaining of representative human coronary arteries without and with atheroma (top panels). Middle and lower panels correspond to high power views of squared areas in B1 (left) and B2 (right) respectively. Arrowheads indicate the position of internal and external elastic laminas. [a: adventitia; i: intima; m: media].

Figure 1

A



B

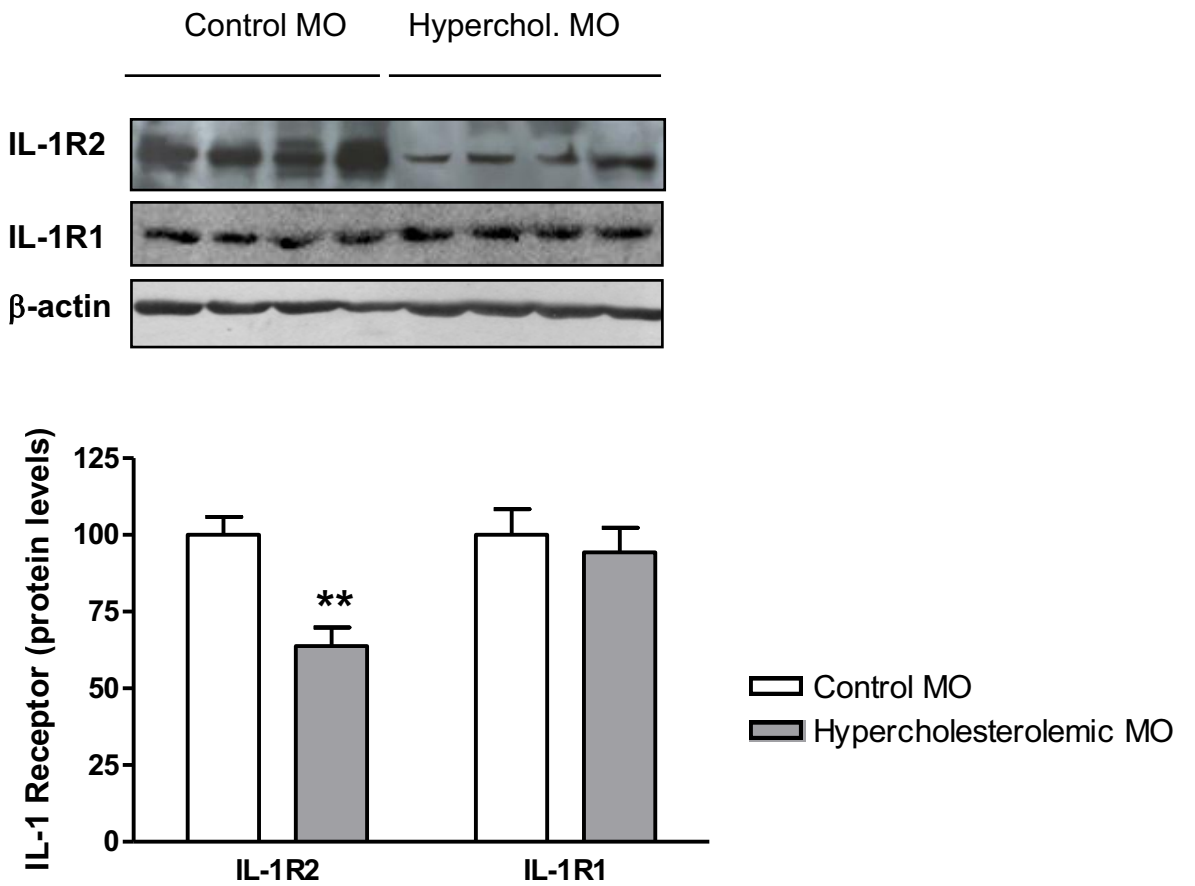
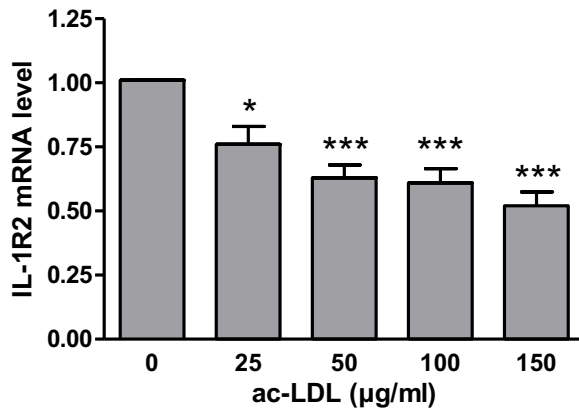


Figure 2

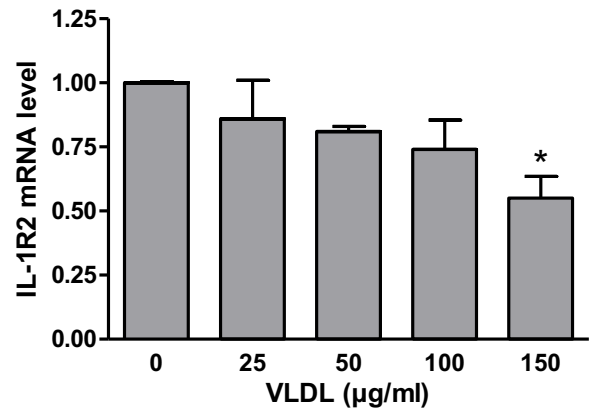
RESULTATS

Figure 2

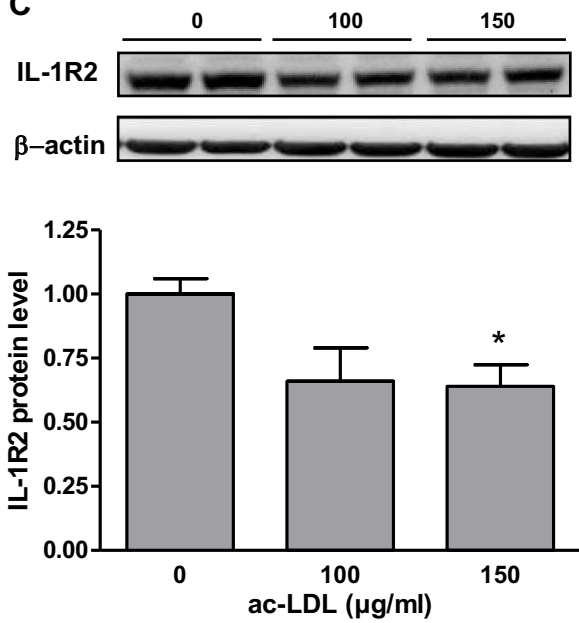
A



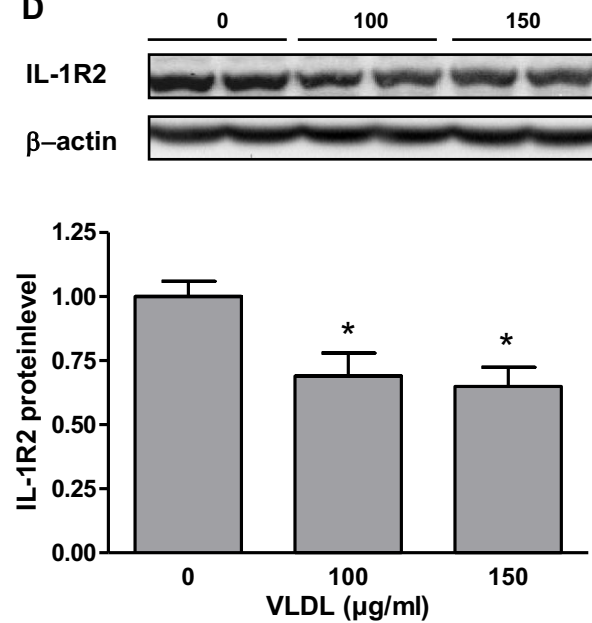
B



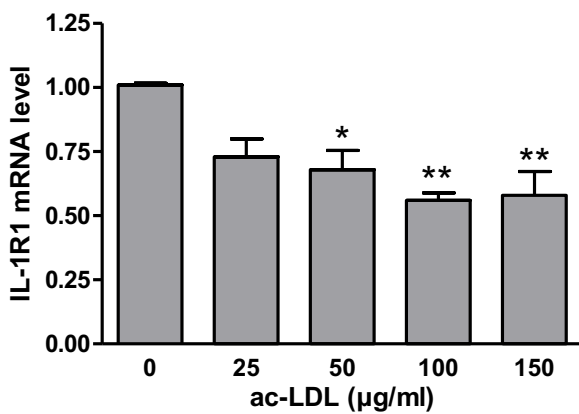
C



D



E



F

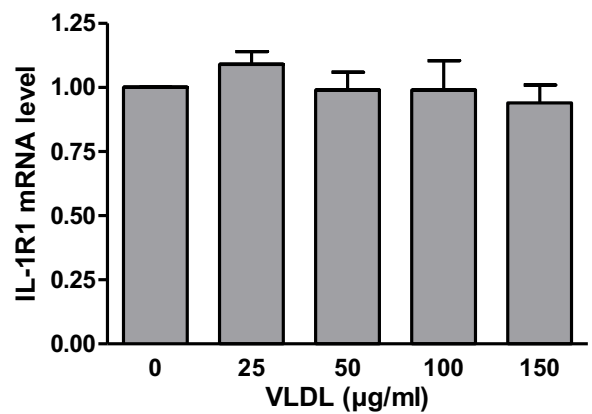
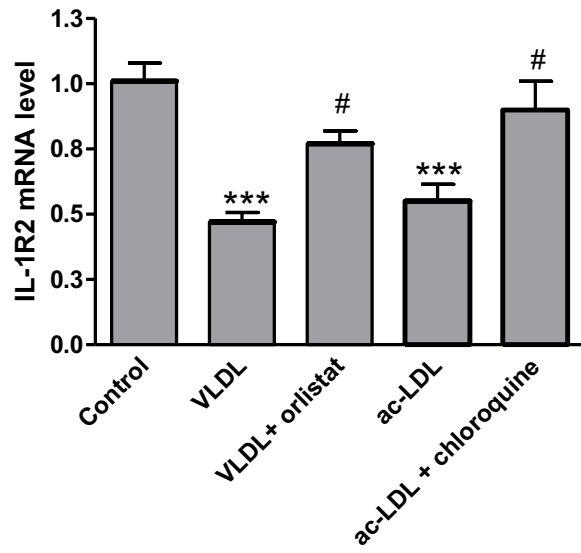


Figure 3

A



B

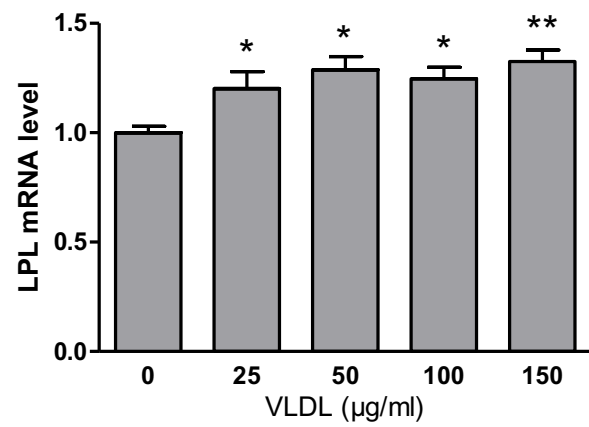
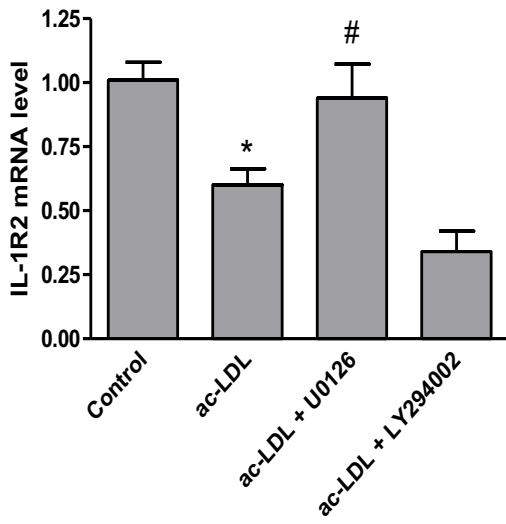


Figure 4

A



B

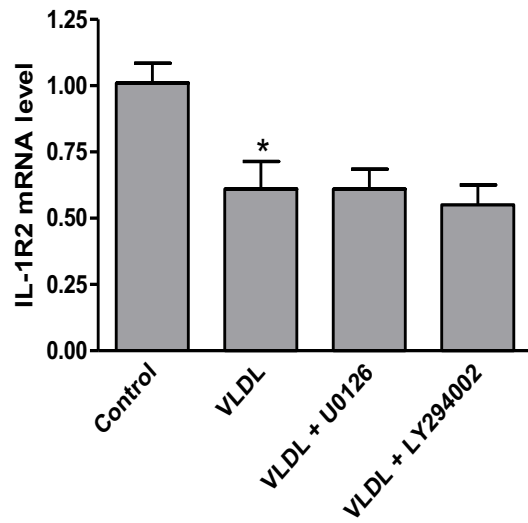


Figure 5

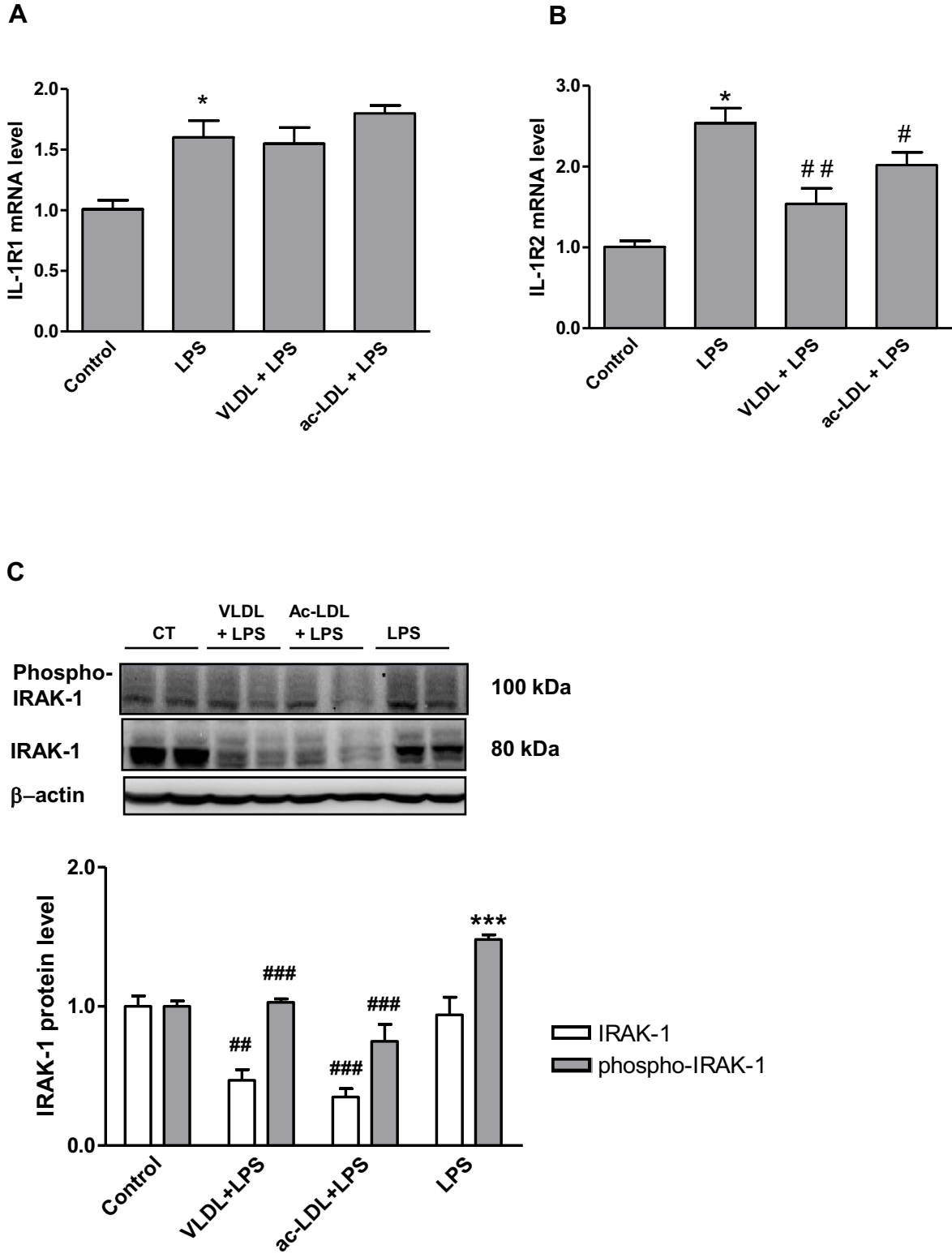
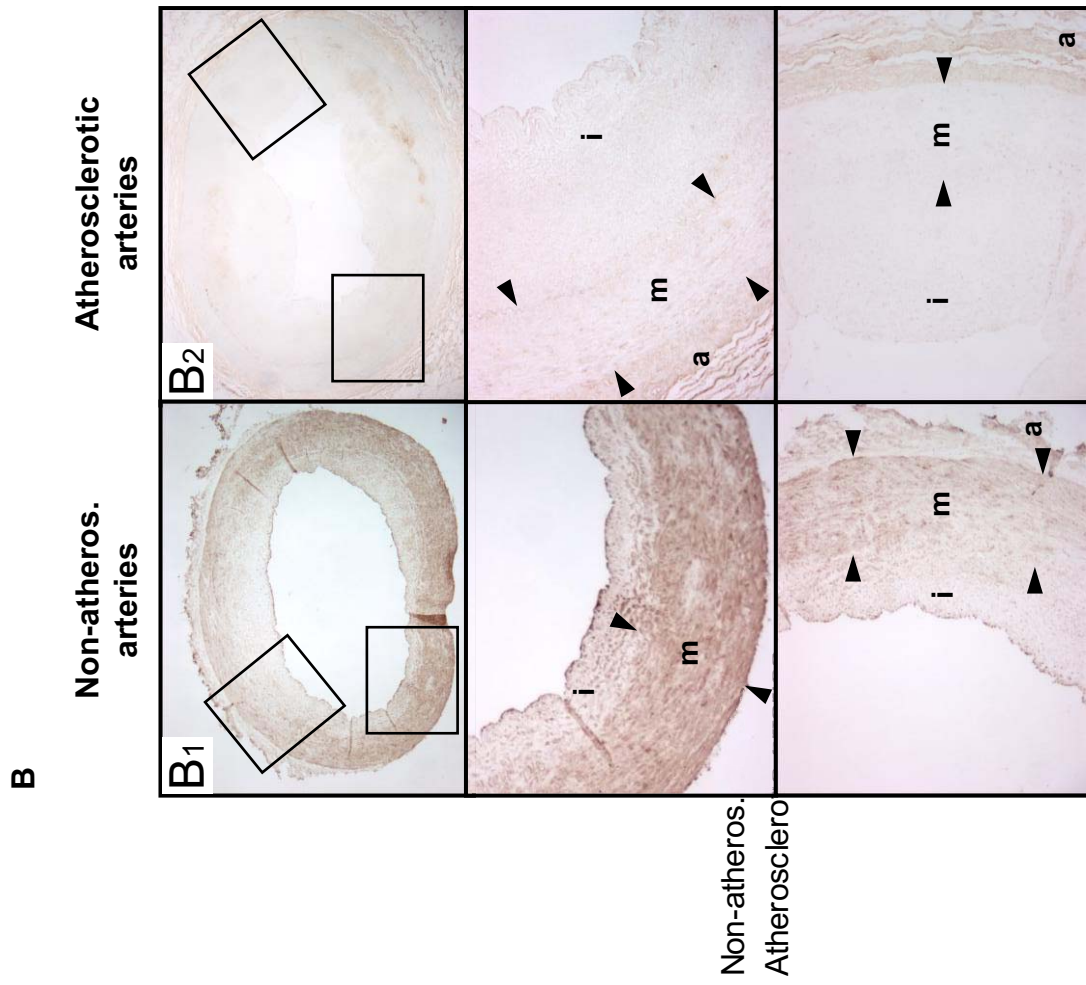
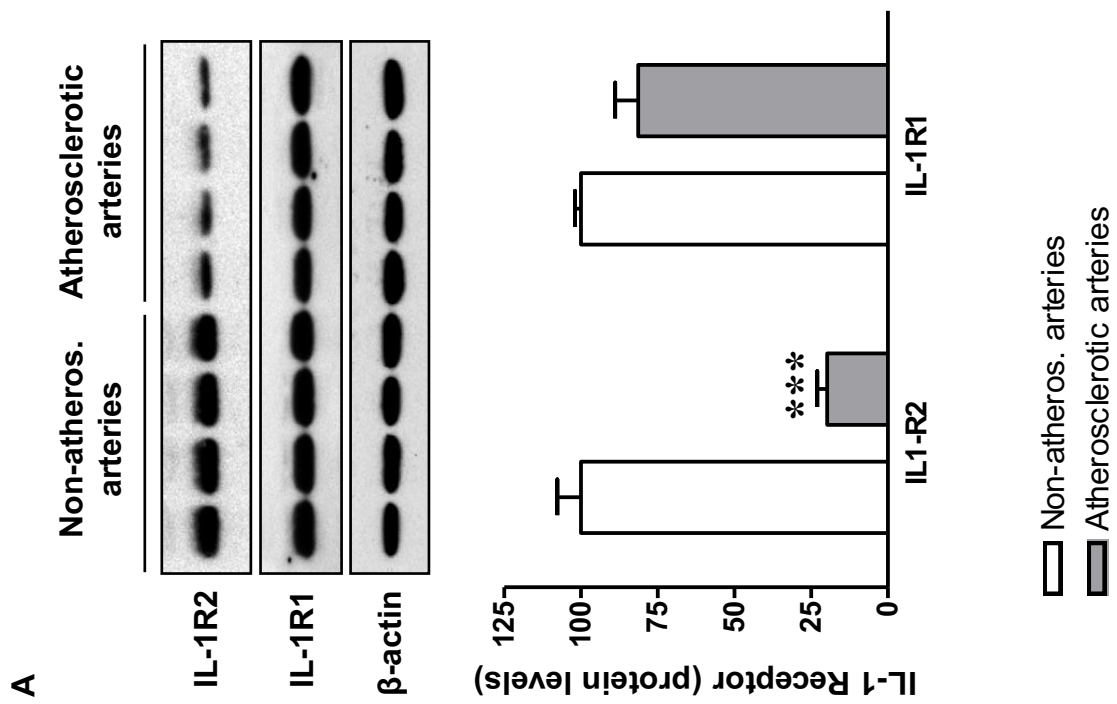


Figure 6



III. DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

L'aterosclerosi i les seves conseqüències (malaltia coronària i cerebrovascular) són la principal causa de mort en els països desenvolupats [Murray i col., 1997; Badimon i col., 2010]. Com s'ha comentat anteriorment, en el desenvolupament de les lesions ateroscleròtiques participen diversos tipus cel·lulars, com CML, CE, limfòcits, neutròfils, cèl·lules dendrítiques i mastòcits, encara que el tipus cel·lular responsable de l'inici de la lesió són els monòcits/macròfags [Stokes i col., 2006; Woollard i Geissmann, 2010]. Aquests són cèl·lules bàsiques en el desenvolupament de l'aterosclerosi, des de la migració del monòcits a l'íntima arterial, l'acumulació de lípids i la producció de mediadors inflamatoris i citocines per part del macròfag, fins a la ruptura de la placa en fases avançades de la patologia [McNeill i col., 2010].

Existeixen nombrosos factors de risc per al desenvolupament de la malaltia ateroscleròtica. Com ja s'ha comentat, a més dels que es poden denominar clàssics o tradicionals, com les dislipèmies, també hi ha altres factors de risc menys estudiats, entre els quals es pot incloure la infecció pel VIH, bé a causa de la pròpia acció del virus [El-Sadr i col., 2005; Van Wijk i col., 2006; Bukrinsky i col., 2006], bé per causa de l'ús de fàrmacs per al tractament d'aquesta infecció, entre ells els IP [Parker i col., 2005; Grunfeld, 2010]. La utilització d'IP, en particular ritonavir, en pacients amb infecció pel VIH s'associa amb un risc incrementat de desenvolupar aterosclerosi prematura, especialment en pacients joves [Mencarelli, 2010], però el mecanisme pel qual es produeixen aquests efectes no està clar encara. En estudis previs es va analitzar el paper del receptor scavenger CD36 en monòcits i macròfags, però els resultats publicats van ser contradictoris: alguns van mostrar una reducció [Serghides i col., 2002] i altres una inducció de l'expressió de CD36 [Dressman i col., 2003; Munteanu i col., 2005]. Per altra banda, no es disposava d'informació sobre possibles modificacions en l'expressió d'altres gens tan importants com CD36 en el procés d'acumulació de lípids en monòcits i macròfags, com el mediador de la sortida de colesterol SR-BI, o els transportadors de la família ABC. Per això, un dels objectius d'aquesta tesi ha estat determinar l'efecte del ritonavir sobre l'expressió de proteïnes que controlen tant l'entrada com la sortida de colesterol del macròfag, utilitzant com a model la línia cel·lular THP-1.

Cal destacar que, en contrast amb altres estudis, els nostres experiments van ser realitzats sense l'addició de lipoproteïnes, amb l'objectiu de discernir específicament els efectes del ritonavir. Un altre aspecte a considerar és que les concentracions de ritonavir usades en aquest treball es troben dins del rang farmacològic aconseguit en el plasma de pacients tractats amb aquest fàrmac a la dosi habitual (600 mg de ritonavir/12 h), que pot arribar a un màxim d'aproximadament d'11 $\mu\text{g/ml}$ [Munteanu i col., 2005]. Alguns autors utilitzen concentracions de ritonavir molt elevades (fins a 20 $\mu\text{g/ml}$) en cèl·lules THP-1 [Munteanu i col., 2005], però segons la nostra experiència, concentracions superiors a 2.5 $\mu\text{g/ml}$ resulten en citotoxicitat inacceptable.

Els resultats obtinguts en el nostre estudi van mostrar que, tot i que el tractament amb ritonavir provocava un increment en l'expressió del receptor CD36, aquest podia ser compensat per un augment en l'expressió d'ABCA1 i altres mediadors de la sortida de colesterol del macròfag, com CYP27 (Figura 1). Degut a aquests efectes contraposats, vam hipotetitzar que l'efecte del ritonavir sobre el macròfag en absència de lipoproteïnes no és clarament pro-aterogènic, encara que no es va determinar directament l'acumulació de colesterol en aquestes cèl·lules. No obstant això, els efectes podrien ser diferents en un medi ric en lipoproteïnes. En efecte, de forma paral·lela al nostre estudi, es va publicar un treball [Wilson i col., 2008] en el qual es va demostrar que el ritonavir incrementava de forma significativa l'acumulació d'èsters de colesterol induïda per incubació amb LDL agregades en macròfags THP-1. En aquest treball es va observar també un increment en els nivells de CD36, però a diferència dels nostres resultats no es va produir cap efecte sobre els nivells d'ABCA1, el que podria explicar l'acumulació intracel·lular de lípids. La discrepància podria atribuir-se també a diferències en les concentracions de ritonavir, que en l'estudi de Wilson i col. són extremadament baixes, o bé a la coincubació del fàrmac amb LDL agregades. En aquest aspecte, s'ha demostrat que alguns components de les lipoproteïnes modificades, i la càrrega de colesterol per si mateixa, són capaços d'induir canvis en l'expressió dels gens relacionats amb el transport del colesterol [Llaverias i col., 2004]. L'acumulació intracel·lular d'esterols i d'oxisterols pot activar LXR i provocar

uns nivells basals d'ABCA1 més elevats, els quals el ritonavir és incapaç d'augmentar. L'absència d'una càrrega de colesterol en el nostre model pot haver facilitat la inducció d'ABCA1 a causa del ritonavir. Resultats recents [Mukhamedova i col., 2009] han indicat que el tractament amb ritonavir de macròfags murins i humans a concentracions no citotòxiques no produïa modificacions en la sortida de colesterol de les cèl·lules. De fet, l'augment del contingut intracel·lular de colesterol apareixia únicament a dosis de ritonavir capaces d'induir l'apoptosi.

Un dels mecanismes proposats per a la inducció de CD36 deguda als IP és l'increment en l'expressió i/o activitat de PPAR γ [Serghides i col., 2002; Dressman i col., 2003]. Els nostres resultats van mostrar que la coïncubació amb un antagonista de PPAR γ (GW9662) no va ser capaç d'inhibir la inducció de CD36 mediada pel ritonavir, fet que indica que en el nostre model aquest efecte és independent de PPAR γ . No obstant, el ritonavir sí que va ser capaç d'induir un augment en l'expressió de PPAR γ . S'ha descrit que l'expressió de PPAR γ pot estar controlada per la família de factors de transcripció SREBP [Fajas i col., 1999]. D'altra banda, diversos estudis han demostrat que els IP produeixen una acumulació de SREBPs activats en el nucli del macròfag [Riddle i col., 2001; Williams i col., 2004; Zhou i col., 2005]. Els resultats del nostre estudi van mostrar un augment en els nivells de la forma madura de SREBP-1 després del tractament amb ritonavir. Aquests resultats ens permeten suggerir que l'augment de SREBP-1 madura provocat pel ritonavir podria provocar la inducció observada de PPAR γ . Podem afegir que l'activació de SREBP-1 podria ser també responsable de l'increment en l'expressió de CD36, ja que recentment s'ha demostrat que la transfecció de macròfags RAW264.7 amb siRNAs anti SREBP-1c anul·la la inducció de CD36 produïda per ritonavir [Mencarelli, 2010].

El nostre estudi també va evidenciar que el ritonavir augmenta l'expressió de CYP27, que com s'ha comentat anteriorment és un altre dels gens que intervien en la sortida de colesterol del macròfag. El producte de CYP27, el 27-hidroxicolesterol, és el lligand més afí per LXR α en macròfags, i

s'ha demostrat que la sobreexpressió de CYP27 activa el sistema LXR/RXR [Fu i col., 2001]. A més, un tractament amb 27-hidroxicolesterol provoca un augment en l'expressió gènica d'ABCA1, de manera més notòria que la d'ABCG1 [Fu i col., 2001]. En conseqüència, es podria especular que la inducció de CYP27 podria activar de forma suficient LXR com per induir l'expressió d'ABCA1, però no la d'ABCG1, en macròfags THP-1.

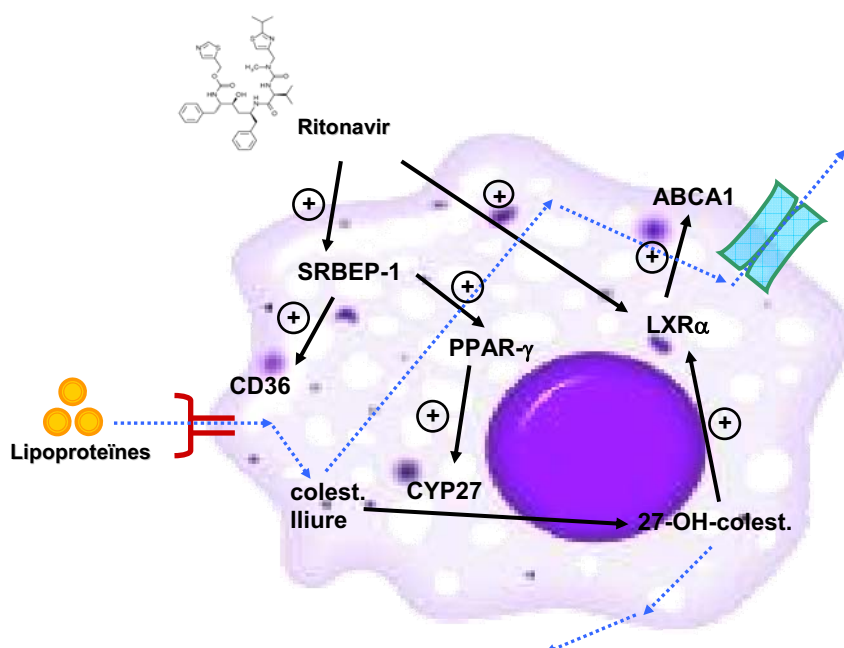


Figura 1. Resum global de la regulació en l'expressió dels principals gens implicats en la captació i/o metabolisme del colesterol en el macròfag, degut a un tractament amb ritonavir.

Com ja s'ha comentat, un dels factors de risc més destacables per al desenvolupament de la malaltia ateroscleròtica són les hiperlipèmies. Entre elles, la HFC és la hiperlipèmia genètica més comuna en humans, i s'associa amb un risc molt elevat de patir malaltia cardiovascular prematura. Es tracta d'una malaltia de base genètica complexa, i resulta complicat identificar els gens implicats en el seu desenvolupament i progressió. La recent elucidació del genoma humà i l'existència d'eines com els *arrays* de cDNA, que permeten l'estudi simultani de l'expressió d'una gran quantitat de gens, poden contribuir a

aclarir la base genètica de la HFC i a identificar nous gens i vies metabòliques que predisposin actiu en l'inici i desenvolupament de la mateixa.

En aquest context, el nostre següent treball va tractar d'identificar, mitjançant l'ús d'*arrays* de cDNA, els gens regulats de manera diferencial en pacients amb HFC. Anteriorment s'havien publicat els resultats de tres estudis d'expressió gènica diferencial en HFC utilitzant *arrays* de cDNA, dos d'ells en teixit adipós [Eurlings i col., 2002; Meex i col., 2005] i un en cèl·lules limfoblàstiques immortalitzades [Morello et al., 2004]. En el nostre cas, es va decidir utilitzar monòcits obtinguts a partir de sang perifèrica de pacients amb HFC. Degut a la seva accessibilitat, les cèl·lules sanguínies perifèriques han estat àmpliament utilitzades amb l'objectiu d'obtenir perfils d'expressió gènica de pacients amb diferents patologies [Schulz i col., 2010; Smiljanovic i col., 2010, Ong i col., 2010, Jensen i Gad, 2010]. En el cas de trastorns metabòlics que poden derivar en aterosclerosi, com és el cas de la HFC, la utilització de monòcits resulta especialment interessant, a causa del paper que desenvolupen aquestes cèl·lules en l'aterogènesi [Osterud i col., 2003].

La utilitat dels *arrays* de cDNA no es limita a l'anàlisi global de canvis en l'expressió gènica davant una determinada situació fisiopatològica, sinó que es pot estendre a la identificació de possibles dianes farmacològiques. Els resultats obtinguts en aquest tipus d'estudis permeten ampliar els nostres coneixements sobre el mecanisme d'acció de fàrmacs ja coneguts, o fins i tot servir de base per a la recerca de nous fàrmacs. És per això que en el nostre estudi els pacients amb HFC es van sotmetre a tractament amb atorvastatina, un dels fàrmacs hipolipemians més utilitzats en el tractament d'aquesta patologia, i es va procedir a aïllar novament monòcits de sang perifèrica per comparar el perfil d'expressió gènica després del tractament amb l'obtingut en la situació basal.

En analitzar els resultats dels *arrays*, es van identificar un total de 82 i de 86 gens diferencialment expressats, entre el grup de pacients HFC i individus CT, i els pacients abans i després del tractament amb ATV, respectivament. Diversos d'aquests gens diferencialment expressats estan implicats en funcions

clau del macròfag, que poden relacionar-se amb el desenvolupament de lesions ateroscleròtiques com a conseqüència de la HFC. En aquest sentit, l'estudi de les vies implicades va revelar que existia una sobre-representació d'algunes categories relacionades amb la resposta immune i inflamatòria. Resulta ben conegut que, a més d'un perfil lipoproteic aterogènic, la HFC presenta altres característiques que contribueixen a l'aterosclerosi accelerada, com un estat d'inflamació moderada [de Graaf i col., 2002; ter Avest i col., 2007]. Aquesta situació derivaria en una exposició crònica dels monòcits a un entorn proinflamatori, que pot afectar l'expressió d'aquells gens que responen a aquests estímuls o bé que es troben involucrats en les cascades inflamatòries.

No obstant això, quan vàrem determinar alguns marcadors plasmàtics d'inflamació no vam observar una diferència estadísticament significativa entre controls i pacients amb HFC. Per exemple, els nivells de PCR, un marcador d'inflamació vascular molt sensible, eren elevats tant en pacients com en controls. Cal tenir en compte que els pacients del nostre estudi presentaven un índex de massa corporal de 27.1, el que indica sobrepès, i pel propi disseny de l'estudi es van escollir controls que presentessin un índex de massa corporal similar. Tenint en compte l'associació entre el sobrepès/obesitat i la concentració de PCR [Visser i col., 1999], és possible que els controls ja presentessin una elevació d'aquest marcador a causa del sobrepès, i degut a això no s'observi diferència en relació als individus amb HFC.

En canvi, tot i que l'adipositat és similar, els pacients amb HFC presentaven concentracions plasmàtiques d'adiponectina (una adipocina antiinflamatòria), més baixes que els controls [Tilg i col., 2006]. Aquests resultats concorden amb estudis en els quals s'ha observat que en la HFC els nivells d'adiponectina estan reduïts independentment de l'adipositat [van der Vleuten i col., 2005].

Una de les nostres hipòtesis inicials era que el tractament dels pacients amb ATV podria revertir, almenys en part, els canvis en l'expressió gènica induïts per la HFC. Atès que la modificació de l'expressió gènica pot estar relacionada amb la situació d'inflamació que presenten els pacients no tractats,

la reversió de la modificació en l'expressió gènica es podria explicar pels efectes antiinflamatoris de l'ATV [Davignon, 2004], que es reflecteixen en la reducció de marcadors inflamatoris com la PCR. No obstant això, alguns dels canvis en l'expressió gènica en els monòcits de pacients amb HFC observats en el nostre estudi no van ser revertits pel tractament amb ATV. Una possible explicació rau en el fet que el tractament amb ATV no va ser capaç de corregir les anomalies metabòliques associades a una desregulació del teixit adipós a la HFC. Així, els baixos nivells d'adiponectina, van ser similars en els malalts de HFC abans i després del tractament amb ATV. De manera similar, els elevats nivells d'AGL tampoc es van veure modificats, i els nivells de TG plasmàtics van ser reduïts, però no normalitzats, a causa del tractament. La nostra hipòtesi és que aquells canvis en l'expressió gènica que estiguin directament o indirectament relacionats amb aquestes anomalies metabòliques no han estat corregits pel tractament amb ATV.

La majoria de gens diferencialment expressats en els monòcits de pacients HFC estan relacionats amb processos clau en la aterogènesi, com són el control de la supervivència, migració i diferenciació cel·lular, la resposta inflamatòria, o la degradació i control de la integritat de la MEC. No obstant això, en molts casos no s'ha estudiat de forma detallada i directa la regulació de la seva expressió en condicions proaterogèniques, pel que són bons candidats per a noves investigacions. A més, a partir dels resultats obtinguts en el nostre estudi no podem saber si les diferències en l'expressió són degudes a defectes genètics de la mateixa patologia o són respostes adaptatives de les cèl·lules davant d'alteracions en el seu entorn, sobretot pels nivells elevats de lipoproteïnes i la presència de mediadors inflamatoris.

Per tal de confirmar les hipòtesis generades en l'estudi anterior i d'aprofundir en els mecanismes implicats, era convenient establir un model *in vitro* que evités la necessitat d'obtenir contínuament mostres sanguínies de controls i pacients. Amb aquesta finalitat, es va decidir utilitzar la línia cel·lular THP-1, que ja havíem emprat en estudis anteriors, incloent l'estudi sobre l'efecte del ritonavir que forma part d'aquesta tesi. Les cèl·lules THP-1 són monòcits que es poden diferenciar a macròfags per tractament amb èsters de

forbol. Presenten característiques molt similars als macròfags que s'obtidrien per diferenciació espontània de monòcits aïllats de sang perifèrica humana. A més, són capaços d'acumular lípids al seu interior, pel que han estat àmpliament utilitzades en l'estudi *in vitro* de la formació de cèl·lules escumoses i de l'aterosclerosi [Llaverias i col., 2002 i 2004; Kohro i col., 2004; Gil-Hernández i col., 2007; Li i col., 2010].

Amb la finalitat d'induir la captació i acumulació de colesterol en macròfags, generalment s'incuben amb LDL modificades, ja sigui mitjançant oxidació o acetilació. Les LDL oxidades contenen un gran nombre de substàncies altament proinflamatòries i citotòxiques, fet que dificulta la distinció dels efectes directes d'aquests components dels efectes de la càrrega lipídica per si mateixa [Persson i col., 2006]. La utilització de LDLs acetilades (acLDL) per induir la càrrega de colesterol evita aquesta multiplicitat d'efectes i dona lloc a un augment predictable en els nivells d'èsters de colesterol en les cèl·lules THP-1 [Llaverias i col., 2002], minimitzant la resposta inflamatòria i l'estrès oxidatiu. Per altra banda, en la HFC no només es troben elevats els nivells de colesterol-LDL, sinó també els de TG-VLDL. De fet, la sobreproducció i increment dels nivells plasmàtics de VLDL és una de les principals característiques de la HFC [Meijssen i col., 2000; Aguilar-Salinas i col., 2010]. S'ha descrit que l'exposició de macròfags a VLDL indueix l'acumulació de lípids en el seu interior, especialment TG [Persson i col., 2007]. L'acumulació de lípids, ja sigui en forma d'èsters de colesterol o de TG, no només contribueix a la retenció d'aquests lípids en la paret arterial, sinó que pot alterar la biologia del macròfag modulant l'expressió de diversos gens. Per això, en els nostres posteriors treballs es va determinar l'expressió dels gens seleccionats després de l'exposició dels macròfags THP-1 a ambdós tipus de lipoproteïnes, acLDL i VLDL.

Un dels gens més sobreexpressats en els individus afectats per HFC va ser TFPI-2. Com ja s'ha comentat en la introducció, encara que el paper fisiològic de TFPI-2 encara no es coneix amb exactitud, sembla que principalment actua regulant la remodelació de la MEC [Chand, 2005]. Tenint en compte la importància de l'estabilitat i/o integritat de la MEC en els

fenòmens aterotrombòtics, alguns autors han suggerit que TFPI-2 juga un rol important en el desenvolupament de l'aterosclerosi [Crawley i col., 2002; Higashikata i col., 2006].

En analitzar l'efecte de concentracions creixents de VLDL, no es va observar un augment significatiu en l'expressió de TFPI-2. De fet, el tractament amb acLDL va produir una reducció en els nivells de mRNA de TFPI-2, com es mostra a la Figura 2 (dades no publicades). Aquests resultats estarien d'acord amb la menor expressió de TFPI-2 en plaques ateroescleròtiques, especialment en àrees susceptibles a la ruptura de la placa [Herman, 2001; Higashikata 2006]. La reducció de l'expressió de TFPI-2 en aquestes lesions avançades va acompanyada d'un important increment en l'expressió de MMPs, el que es relacionaria amb la desestabilització i ruptura de la placa. Una possible explicació per als resultats obtinguts amb acLDL és que l'efecte de l'exposició a aquestes lipoproteïnes reflectiria la resposta del macròfag en fases avançades del procés ateroescleròtic, properes a la ruptura de la placa. Tot i així, la reducció de l'expressió de TFPI-2 deguda a les acLDL i la manca d'efecte de les VLDL resulten en certa manera contradictòries en relació a l'increment de l'expressió de TFPI-2 observat en els monòcits de pacients amb HFC.

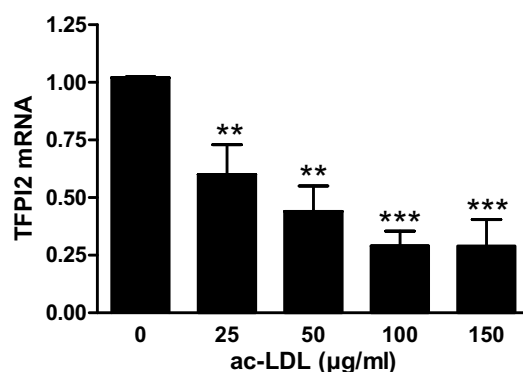


Figura 2. Efecte de les LDL acetilades sobre els nivells de mRNA de TFPI-2. Els macròfags THP-1 es van incubar amb acLDL durant 24 h a les concentracions indicades, i els nivells de mRNA de TFPI-2 es van determinar mitjançant la tècnica de PCR a temps real. Les dades es van normalitzar en relació als nivells d'expressió del gen GAPDH. Els resultats són la mitjana \pm SEM de 4 experiments independents realitzats per duplicat. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Això ens va portar a suposar que altres components de la HFC podrien ser els responsables de la inducció de TFPI-2 observada en els monòcits dels pacients amb aquesta patologia. Com s'ha comentat anteriorment, la HFC es caracteritza no només per un perfil lipoproteic aterogènic, sinó també per una situació basal d'inflamació i un fenotip protrombòtic [Georgieva i col., 2004]. L'estat protrombòtic també caracteritza la síndrome metabòlica (que com s'ha comentat està estretament relacionada amb la HFC), i es reflecteix en canvis en el sistema de coagulació, entre ells un increment en la generació de trombina [Yamashita i col., 2009]. A més, s'ha descrit que la trombina indueix l'expressió de TFPI-2 en miofibroblasts hepàtics humans [Neaud i col., 2004]. Tenint en compte aquests antecedents, vam decidir estudiar els efectes de la trombina sobre l'expressió de TFPI-2 en macròfags THP-1 i macròfags derivats de monòcits de sang perifèrica, i els nostres resultats van indicar un clar efecte inductor.

A part de la seva funció en la coagulació, la trombina exerceix potents efectes proinflamatoris en les cèl·lules vasculares, incloent entre aquestes monòcits i macròfags, i aquests efectes estan relacionats amb el desenvolupament d'aterosclerosi [Croce i Libby, 2007]. Podríem suposar que els efectes de la trombina en el nostre estudi són deguts al seu potencial proinflamatori, ja que el tractament amb trombina augmenta la fosforilació d'I κ B en macròfags THP-1, i que la inducció de TFPI-2 per trombina pot prevenir-se mitjançant pre-incubació amb un inhibidor de NF- κ B. En aquest sentit, s'ha descrit que l'expressió de TFPI-2 és regulada per nombrosos mediadors inflamatoris [Iino i col., 1998]. De fet, vàrem comprovar que la incubació de macròfags THP-1 amb un estímul inflamatori ben conegut, com és el lipopolisacàrid (LPS), indueix de forma molt marcada l'expressió de TFPI-2 (Figura 3, dades no publicades). A més, les vies implicades són les mateixes que en el cas de la trombina, ja que en ambdues situacions la inducció de TFPI-2 va ser previnguda per un pre-tractament amb inhibidors de la MEK1/2 (U0126 i PD98059).

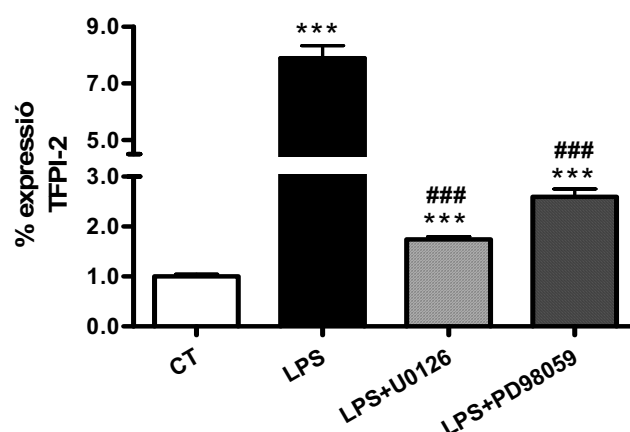


Figura 3. El tractament amb LPS va provocar un marcat augment en l'expressió de TFPI-2, i la pre-incubació amb els inhibidors d'ERK1/2 U0126 i PD98059 va revertir de forma parcial però significativa aquesta inducció. Dades expressades en mitjana \pm SEM (n = 3). *** p < 0.001 vs. CT. ### p < 0.001 vs LPS.

L'acció proinflamatòria de la trombina també pot ser la responsable de l'increment en l'expressió de la COX-2, un dels gens diana de NF- κ B. La inducció produïda per la trombina en els nivells de mRNA de COX-2 es va evitar pre-tractant les cèl·lules amb inhibidors d'ERK i JNK, de forma similar a la inducció de TFPI-2, la qual cosa suggereix la participació d'aquestes vies en els dos casos.

Però quin és el paper de TFPI-2 i la seva inducció en macròfags en el context de les dislipèmies i l'aterosclerosi? Com ja s'ha comentat, les cèl·lules productores de TFPI-2 secreten la proteïna a la MEC, contribuint a la seva remodelació. A més, pot exercir efectes sobre els diferents tipus cel·lulars de l'entorn de la lesió, incloent el propi macròfag, ja que controla processos clau com la migració i proliferació cel·lular i l'apoptosi. Així, la inducció de TFPI-2 inhibeix la proliferació de CE i CML, efectes que es consideren antiaterogènics i antiangiogènics [Iino i col., 1998, Xu i col., 2006; Ekstrand i col., 2010]. Recentment s'ha descrit que TFPI-2 promou l'apoptosi de macròfags, fet que pot limitar la cel·lularitat de la lesió en fases primerenques de la aterogènesi [Pan i col., 2011]. D'altra banda, l'efecte de TFPI-2 com a inhibidor de la

plasmina i les MMP implica que un augment en la seva expressió contribuiria a estabilitzar la placa d'ateroma en fases més tardanes del procés [Crawley et al., 2002]. De fet, aquests autors van demostrar que en artèries coronàries ateroscleròtiques l'expressió de TFPI-2 era superior que en artèries sanes, encara que altres autors [Higashikata i col., 2006] van obtenir resultats oposats. En realitat, els canvis en l'expressió observats en aquests estudis podrien reflectir canvis en el patró d'expressió de TFPI-2 més que increments o reduccions en l'expressió en cèl·lules individuals. Així, en artèries sanes, en les quals pràcticament no hi ha infiltració de macròfags, l'expressió de TFPI-2 se circumscriu a les CE, mentre que en lesions ateroscleròtiques l'expressió més elevada de TFPI-2 es deu al macròfag. En conclusió, la inducció de TFPI-2 en el context de l'aterosclerosi podria representar un mecanisme fisiològic de compensació d'una excessiva activitat de les MMPs en els llocs d'inflamació, com és el cas dels macròfags de les plaques d'ateroma, que contribuiria a l'estabilització d'aquestes.

Un altre dels gens l'expressió del qual va resultar alterada en els individus afectats per HFC, i que vam considerar d'interès per continuar el nostre estudi, va ser IL-1R2, un receptor decoy que actua com a regulador negatiu de l'activitat de la IL-1 [Mantovani i col., 1998; Gabay y col., 2010]. Els nostres resultats indiquen que en monòcits de pacients amb HFC l'expressió d'IL-1R2 (mRNA i proteïna) és menor que en els corresponents controls. En aquest cas, l'exposició de macròfags THP-1 tant a VLDL com a acLDL també va reduir l'expressió proteica i gènica d'IL-1R2, el que suggereix que l'efecte observat en monòcits de pacients amb HFC podria ser conseqüència de l'exposició d'aquestes cèl·lules a nivells elevats de lipoproteïnes. A més, l'expressió d'IL-1R2 és marcadament inferior en lesions ateroscleròtiques humanes en comparació amb artèries sanes.

Amb l'objectiu de discriminar si els efectes de les lipoproteïnes en l'expressió d'IL-1R2 són deguts a l'acumulació de lípids a l'interior del macròfag, o bé directament es poden relacionar amb processos de senyalització mitjançant receptors de la superfície cel·lular, vam utilitzar diferents inhibidors, tant de receptors que participen en la captació de tots dos

tipus de lipoproteïnes, com del processament i acumulació intracel·lular de lípids. Els nostres resultats van indicar que únicament amb els pre-tractaments amb cloroquina (que inhibeix el processament d'èsters de colesterol) i orlistat (que bloqueja l'acumulació de triglicèrids) s'evita la repressió gènica d'IL-1R2 degut a les acLDL i VLDL, respectivament. Aquest fet ens permet postular la hipòtesi que l'efecte inhibitor d'ambdues lipoproteïnes és degut a la seva capacitat d'induir càrrega de lípids a l'interior del macròfag.

En el cas del receptor funcional IL-1R1, la seva expressió no va resultar modificada ni en monòcits de pacients amb HFC ni en lesions ateroscleròtiques, i únicament les acLDL van reduir la seva expressió en macròfags THP-1. El tractament d'aquestes cèl·lules amb lipoproteïnes tampoc va alterar l'expressió d'altres proteïnes de la família, com la proteïna accessòria (IL-1RAcP) o l'antagonista natural (IL-1Ra). D'altra banda, el tractament amb VLDL produeix un increment en la forma soluble del receptor IL-1R2, efecte que no s'observa en el cas de les acLDL (Figura 4, dades no publicades). Com ja s'ha comentat, la generació d'IL-1R2 soluble és un altre mecanisme que contribueix a atenuar la resposta mediada per IL-1, ja que disminueix la disponibilitat d'aquesta citocina unint-se a ella. No obstant això, cap d'aquests efectes sembla traduir-se en diferències entre les lipoproteïnes en relació a la seva capacitat de facilitar la senyalització a través de la via d'IL-1.

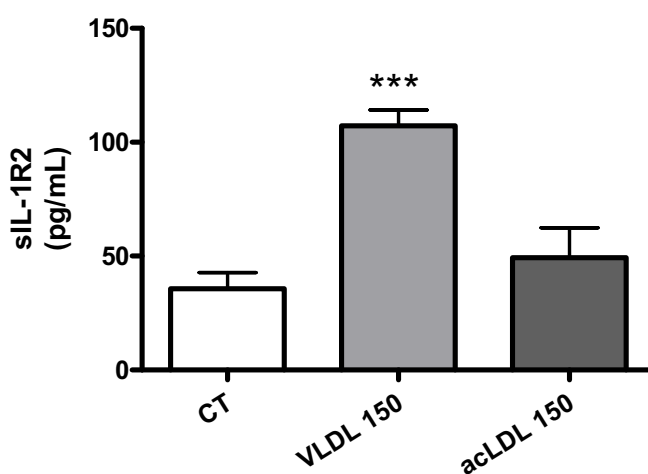


Figura 4. Nivells del receptor soluble d'IL-1R2 determinats mitjançant la tècnica d'ELISA (R&D Systems). Dades expressades en mitjana \pm SEM (n=4). ***p<0.001.

La coherència dels resultats obtinguts en tres models diferents (monòcits circulants de pacients hiperlipèmics, macròfags exposats a lipoproteïnes i lesions ateroscleròtiques humanes) suggereixen que la reducció en l'expressió d'IL-1R2 pot estar relacionada d'alguna manera amb el desenvolupament de l'aterosclerosi. Tenint en compte la funció d'IL-1R2 com a inhibidor de l'activitat de la IL-1, es podria especular que la reducció en l'expressió d'aquest receptor en relació amb el receptor funcional IL-1R1 implica un desequilibri que afavoriria l'acció de la IL-1. Com ja s'ha comentat anteriorment, aquesta citocina és proinflamatòria i juga un paper molt important en el procés ateroscleròtic, facilitant l'adhesió i transmigració de leucòcits, la formació de cèl·lules escumoses i estries grasses [Apostolakis i col., 2008; Chamberlain i col., 2009]. Per tant, la nostra hipòtesi és que nivells elevats de lipoproteïnes pro-aterogèniques, en produir una reducció en l'expressió d'IL-1R2, facilitarien l'activitat de IL-1 el que al seu torn afavoriria el desenvolupament de les lesions ateroscleròtiques. Per avaluar aquesta possibilitat, en primer lloc vàrem tractar macròfags THP-1 amb una molècula inflamatòria (LPS) en absència o en presència de lipoproteïnes, i determinàrem l'expressió dels receptors d'IL-1. Ambdós receptors van resultar induïts després de l'exposició a LPS, però la pre-incubació amb lipoproteïnes únicament va evitar l'increment en IL-1R2. De nou, els nostres resultats suggereixen que el desequilibri en l'expressió d'aquests receptors pot facilitar la senyalització d'IL-1.

Com ja s'ha comentat, l'activació de la via de senyalització de la IL-1 bé pel seu lligand natural, bé per LPS, comporta la fosforilació de diverses, entre elles IRAK-1 [Kollewe i col., 2004]. Els nostres resultats mostren que un tractament amb LPS va induir l'aparició d'una banda d'aproximadament 100 KDa, que correspondria a la proteïna IRAK-1 modificada per fosforilació covalent. El tractament de les cèl·lules amb acLDLs o VLDLs va produir una disminució d'aquesta banda, però també es va observar una disminució concomitant de la banda de 80 KDa, corresponent a la forma no modificada d'IRAK-1. S'ha descrit que després de ser fosforilada, IRAK-1 és ubiquitinizada per ser degradada pel proteasoma [Lockett i col., 2008]. Encara que no hem determinat directament la ubiquitinització d'IRAK-1, és plausible que el tractament amb lipoproteïnes, en afavorir la senyalització a través de la via d'IL-

1, hagi facilitat el processament i degradació d'IRAK-1, el que es reflectiria en una reducció dels nivells totals d'aquesta proteïna.

Per finalitzar, i com a resum global de la present tesi, podríem dir que els estudis realitzats en monòcits i macròfags d'origen humà (ja siguin primaris o de la línia THP-1) ens han permès identificar canvis en l'expressió gènica induïts per fàrmacs (ritonavir, atorvastatina) o per condicions pro-aterogèniques (dislipèmies, lipoproteïnes, trombina) que podrien relacionar-se amb el procés ateroscleròtic. Per a algun d'aquests gens (TFPI-2 i IL-1R2) la connexió amb aquest procés era fins ara poc coneguda, de manera que els nostres estudis poden haver contribuït al seu millor coneixement.

CONCLUSIONS

Les principals conclusions del treball experimental de la present tesi doctoral han estat les següents:

- El tractament de macròfags THP-1 durant 24 hores amb ritonavir indueix un increment en l'expressió de CD36, però alhora incrementa l'expressió d'ABCA1 i CYP27, mentre que l'expressió proteica de SR-BI resulta reduïda.
- El ritonavir també incrementa l'expressió de PPAR γ , efecte que es relaciona amb l'increment de CYP27 però no amb els canvis en l'expressió de CD36 o ABCA1.
- L'augment en l'expressió de CD36 es relaciona amb l'efecte del ritonavir augmentant la forma madura, activa, de SREBP, mentre que la inducció d'ABCA1 es relaciona amb l'increment en l'expressió i activitat de LXR.
- Els monòcits de pacients amb HFC presenten un perfil d'expressió gènica diferent dels individus controls sans. Els gens diferencialment expressats corresponen a proteïnes amb funcions clau en els monòcits, relacionades amb el procés ateroscleròtic, com són la resposta inflamatòria, el metabolisme lipídic o la composició de la MEC. Entre els canvis detectats destaquen una major expressió de TFPI-2 i una reducció de la d'IL-1R2.
- El tractament dels pacients amb HFC amb ATV durant un mes dona lloc a efectes antiinflamatoris (evidenciats per la reducció dels nivells de PCR) i reverteix alguns dels canvis en el patró d'expressió gènica dels monòcits circulants en relació a la situació basal, abans del tractament .
- El tractament amb ATV, en canvi, no normalitza els baixos nivells d'adiponectina ni l'increment dels AGL que presenten els pacients amb HFC.
- El tractament amb trombina provoca l'augment de l'expressió, tant gènica com proteica, de TFPI-2 en macròfags THP-1 i en cultius primaris de macròfags derivats de monòcits humans.

- La inducció de TFPI-2 per trombina es produeix per un mecanisme que no depèn de COX-2 ni d'EGFR, sinó que està mediat per AMPc, amb la participació de les vies ERK1/2 i JNK, que finalment condueixen a l'activació de NF- κ B.
- L'expressió d'IL1R2 es troba reduïda en macròfags THP-1 tractats amb acLDL i VLDL i també en lesions ateroscleròtiques.
- La repressió de l'expressió d'IL-1R2 observada en els tractaments amb lipoproteïnes es deuria a la càrrega de lípids intracel·lulars al macròfag, i en el cas de les acLDL hi participaria directament la via ERK1/2.
- En macròfags activats per LPS, les lipoproteïnes eviten la inducció d'IL-1R2, i redueixen els nivells de proteïna total i fosforilada d'IRAK-1, una cinasa clau en la via de senyalització d'IL-1.

IV. BIBLIOGRAFIA

(LIPID) Study Group (1998). *Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease*. N. Engl. J. Med. 339, 1349-1357.

A

Adler-Wailes,D.C., Guiney,E.L., Koo,J., i Yanovski,J.A. (2008). *Effects of ritonavir on adipocyte gene expression: evidence for a stress-related response*. Obesity. (Silver. Spring) 16, 2379-2387.

Aguilar-Salinas,C., Gomez-Perez,F.J., Rull,J., Villalpando,S., Barquera,S., i Rojas,R. (2010). *Prevalence of dyslipidemias in the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006*. Salud Publica Mex. 52 Suppl 1, S44-S53.

Aguilar-Salinas,C., Gomez-Diaz,R., i Tusie-Luna,M.T. (2010). *[Fifty years studying hiperlipidemias: the case of familial combined hyperlipidemia]*. Invest Clin. 51, 145-158.

Aiello,R.J., Brees,D., Bourassa,P.A., Royer,L., Lindsey,S., Coskran,T., Haghpassand,M., i Francone,O.L. (2002). *Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 22, 630-637.

Albert,M.A., Danielson,E., Rifai,N., i Ridker,P.M. (2001). *Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study*. JAMA 286, 64-70.

Allayee,H., Krass,K.L., Pajukanta,P., Cantor,R.M., van der Kallen,C.J., Mar,R., Rotter,J.I., de Bruin,T.W., Peltonen,L., i Lusis,A.J. (2002). *Locus for elevated apolipoprotein B levels on chromosome 1p31 in families with familial combined hyperlipidemia*. Circ. Res. 90, 926-931.

Allayee,H., Ghazalpour,A., i Lusis,A.J. (2003). *Using mice to dissect genetic factors in atherosclerosis*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23, 1501-1509.

Allayee,H., Castellani,L.W., Cantor,R.M., de Bruin,T.W., i Lusic,A.J. (2003). *Biochemical and genetic association of plasma apolipoprotein A-II levels with familial combined hyperlipidemia*. Circ. Res. 92, 1262-1267.

Alonso,R., Castillo,S., Civeira,F., Puzo,J., de la Cruz,J.J., Pocovi,M., i Mata,P. (2002). *[Heterozygous familial hypercholesterolemia in Spain. Description of 819 non related cases]*. Med. Clin. (Barc.) 118, 487-492.

Amalinei,C., Caruntu,I.D., Giusca,S.E., i Balan,R.A. (2010). *Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions* . Rom. J. Morphol. Embryol. 51, 215-228.

Apostolakis,S., Vogiatzi,K., Krambovitis,E., i Spandidos,D.A. (2008). *IL-1 cytokines in cardiovascular disease: diagnostic, prognostic and therapeutic implications*. Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem. 6, 150-158.

Arai,T., Wang,N., Bezouevski,M., Welch,C., i Tall,A.R. (1999). *Decreased atherosclerosis in heterozygous low density lipoprotein receptor-deficient mice expressing the scavenger receptor BI transgene*. J. Biol. Chem. 274, 2366-2371.

Arend,W.P., Malyak,M., Smith,M.F., Jr., Whisenand,T.D., Slack,J.L., Sims,J.E., Giri,J.G., i Dower,S.K. (1994). *Binding of IL-1 alpha, IL-1 beta, and IL-1 receptor antagonist by soluble IL-1 receptors and levels of soluble IL-1 receptors in synovial fluids*. J. Immunol. 153, 4766-4774.

Aronow,H.D., Topol,E.J., Roe,M.T., Houghtaling,P.L., Wolski,K.E., Lincoff,A.M., Harrington,R.A., Califf,R.M., Ohman,E.M., Kleiman,N.S., Keltai,M., Wilcox,R.G., Vahanian,A., Armstrong,P.W., i Lauer,M.S. (2001). *Effect of lipid-lowering therapy on early mortality after acute coronary syndromes: an observational study*. Lancet 357, 1063-1068.

Auron,P.E. (1998). *The interleukin 1 receptor: ligand interactions and signal transduction*. Cytokine Growth Factor Rev. 9, 221-237.

Austin,M.A., Wijsman,E., Guo,S.W., Krauss,R.M., Brunzell,J.D., i Deeb,S. (1991). *Lack of evidence for linkage between low-density lipoprotein subclass*

phenotypes and the apolipoprotein B locus in familial combined hyperlipidemia. Genet. Epidemiol. 8, 287-297.

B

Badimon,J.J., Santos-Gallego,C.G., i Badimon,L. (2010). *[Importance of HDL cholesterol in atherothrombosis: how did we get here? Where are we going?]*. Rev. Esp. Cardiol. 63 Suppl 2, 20-35.

Badimon,J.J. i Ibanez,B. (2010). *Increasing high-density lipoprotein as a therapeutic target in atherothrombotic disease.* Rev. Esp. Cardiol. 63, 323-333.

Badimon,L., Badimon,J.J., Vilahur,G., Segales,E., i Llorente,V. (2002). *Pathogenesis of the acute coronary syndromes and therapeutic implications.* Pathophysiol. Haemost. Thromb. 32, 225-231.

Baigent,C., Keech,A., Kearney,P.M., Blackwell,L., Buck,G., Pollicino,C., Kirby,A., Sourjina,T., Peto,R., Collins,R., i Simes,R. (2005). *Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins.* Lancet 366, 1267-1278.

Baldan,A., Tarr,P., Lee,R., i Edwards,P.A. (2006). *ATP-binding cassette transporter G1 and lipid homeostasis.* Curr. Opin. Lipidol. 17, 227-232.

Barter,P. (2005). *The inflammation: lipoprotein cycle.* Atheroscler. Suppl 6, 15-20.

Barton,J.L., Herbst,R., Bosisio,D., Higgins,L., i Nicklin,M.J. (2000). *A tissue specific IL-1 receptor antagonist homolog from the IL-1 cluster lacks IL-1, IL-1ra, IL-18 and IL-18 antagonist activities.* Eur. J. Immunol. 30, 3299-3308.

Berg,K.K., Madsen,H.O., Garred,P., Wiseth,R., Gunnes,S., i Videm,V. (2009). *The additive contribution from inflammatory genetic markers on the severity of cardiovascular disease.* Scand. J. Immunol. 69, 36-42.

Bessis,N., Guery,L., Mantovani,A., Vecchi,A., Sims,J.E., Fradelizi,D., i Boissier,M.C. (2000). *The type II decoy receptor of IL-1 inhibits murine collagen-induced arthritis*. Eur. J. Immunol. 30, 867-875.

Bohn,H. i Sedlacek,H. (1975). *[Comparative studies on placenta specific proteins in man and subhuman primates (author's transl)]*. Arch. Gynakol. 220, 105-121.

Bohn,H. i Winckler,W. (1977). *[Isolation and characterization of the placental protein pp5 (author's transl)]*. Arch. Gynakol. 223, 179-186.

Bomsztyk,K., Sims,J.E., Stanton,T.H., Slack,J., McMahan,C.J., Valentine,M.A., i Dower,S.K. (1989). *Evidence for different interleukin 1 receptors in murine B- and T-cell lines*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 86, 8034-8038.

Bonetti,P.O., Lerman,L.O., Napoli,C., i Lerman,A. (2003). *Statin effects beyond lipid lowering--are they clinically relevant?* Eur. Heart J. 24, 225-248.

Boring,L., Gosling,J., Cleary,M., i Charo,I.F. (1998). *Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis*. Nature 394, 894-897.

Bowie,A. i O'Neill,L.A. (2000). *The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products*. J. Leukoc. Biol. 67, 508-514.

Brown,M.S. i Goldstein,J.L. (1983). *Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis*. Annu. Rev. Biochem. 52, 223-261.

Brown,M.S. i Goldstein,J.L. (1986). *A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis*. Science 232, 34-47.

Bukrinsky,M. i Sviridov,D. (2006). *Human immunodeficiency virus infection and macrophage cholesterol metabolism*. J. Leukoc. Biol. 80, 1044-1051.

Bulut,Y., Faure,E., Thomas,L., Equils,O., i Arditi,M. (2001). *Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and*

Borrelia burgdorferi outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. *J. Immunol.* 167, 987-994.

Burns,K., Martinon,F., Esslinger,C., Pahl,H., Schneider,P., Bodmer,J.L., Di,M.F., French,L., i Tschopp,J. (1998). *MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling.* *J. Biol. Chem.* 273, 12203-12209.

Burns,K., Clatworthy,J., Martin,L., Martinon,F., Plumpton,C., Maschera,B., Lewis,A., Ray,K., Tschopp,J., i Volpe,F. (2000). *Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor.* *Nat. Cell Biol.* 2, 346-351.

Butzow,R., Huhtala,M.L., Bohn,H., Virtanen,I., i Seppala,M. (1988). *Purification and characterization of placental protein 5.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150, 483-490.

C

Carr,A., Samaras,K., Burton,S., Law,M., Freund,J., Chisholm,D.J., i Cooper,D.A. (1998). *A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors.* *AIDS* 12, F51-F58.

Cernuda-Morollon,E. i Ridley,A.J. (2006). *Rho GTPases and leukocyte adhesion receptor expression and function in endothelial cells.* *Circ. Res.* 98, 757-767.

Chamberlain,J., Francis,S., Brookes,Z., Shaw,G., Graham,D., Alp,N.J., Dower,S., i Crossman,D.C. (2009). *Interleukin-1 regulates multiple atherogenic mechanisms in response to fat feeding.* *PLoS. One.* 4, e5073.

Chand,H.S., Foster,D.C., i Kisiel,W. (2005). *Structure, function and biology of tissue factor pathway inhibitor-2.* *Thromb. Haemost.* 94, 1122-1130.

Chapman,J.M., Guerin,M., i Bruckert,E. (2001). *[Role of anomalies of low density lipoproteins (LDL) in atherogenicity].* *Bull. Acad. Natl. Med.* 185, 35-37.

Chen,Y., Wermeling,F., Sundqvist,J., Jonsson,A.B., Tryggvason,K., Pikkarainen,T., i Karlsson,M.C. (2010). *A regulatory role for macrophage class A scavenger receptors in TLR4-mediated LPS responses*. Eur. J. Immunol. 40, 1451-1460.

Chinetti,G., Lestavel,S., Bocher,V., Remaley,A.T., Neve,B., Torra,I.P., Teissier,E., Minnich,A., Jaye,M., Duverger,N., Brewer,H.B., Fruchart,J.C., Clavey,V., i Staels,B. (2001). *PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway*. Nat. Med. 7, 53-58.

Chong,P.H., Seeger,J.D., i Franklin,C. (2001). *Clinically relevant differences between the statins: implications for therapeutic selection*. Am. J. Med. 111, 390-400.

Choudhury,R.P., Lee,J.M., i Greaves,D.R. (2005). *Mechanisms of disease: macrophage-derived foam cells emerging as therapeutic targets in atherosclerosis*. Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med. 2, 309-315.

Colotta,F., Re,F., Muzio,M., Bertini,R., Polentarutti,N., Sironi,M., Giri,J.G., Dower,S.K., Sims,J.E., i Mantovani,A. (1993). *Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4*. Science 261, 472-475.

Colotta,F., Dower,S.K., Sims,J.E., i Mantovani,A. (1994). *The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1*. Immunol. Today 15, 562-566.

Coon,H., Myers,R.H., Borecki,I.B., Arnett,D.K., Hunt,S.C., Province,M.A., Djousse,L., i Leppert,M.F. (2000). *Replication of linkage of familial combined hyperlipidemia to chromosome 1q with additional heterogeneous effect of apolipoprotein A-I/C-III/A-IV locus. The NHLBI Family Heart Study*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 20, 2275-2280.

Coon,H., Singh,N., Dunn,D., Eckfeldt,J.H., Province,M.A., Hopkins,P.N., Weiss,R., Hunt,S.C., i Leppert,M.F. (2004). *TXNIP gene not associated with familial combined hyperlipidemia in the NHLBI Family Heart Study*. Atherosclerosis 174, 357-362.

Costet,P., Luo,Y., Wang,N., i Tall,A.R. (2000). *Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor*. J. Biol. Chem. 275, 28240-28245.

Covey,S.D., Krieger,M., Wang,W., Penman,M., i Trigatti,B.L. (2003). *Scavenger receptor class B type I-mediated protection against atherosclerosis in LDL receptor-negative mice involves its expression in bone marrow-derived cells*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23, 1589-1594.

Crawley,J.T., Goulding,D.A., Ferreira,V., Severs,N.J., i Lupu,F. (2002). *Expression and localization of tissue factor pathway inhibitor-2 in normal and atherosclerotic human vessels*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 22, 218-224.

Crawley,J.T. i Efthymiou,M. (2008). *Cytoprotective effect of activated protein C: specificity of PAR-1 signaling*. J. Thromb. Haemost. 6, 951-953.

Croce,K. i Libby,P. (2007). *Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis*. Curr. Opin. Hematol. 14, 55-61.

Cushing,S.D., Berliner,J.A., Valente,A.J., Territo,M.C., Navab,M., Parhami,F., Gerrity,R., Schwartz,C.J., i Fogelman,A.M. (1990). *Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 87, 5134-5138.

D

Dale,M., Hammond,D.W., Cox,A., i Nicklin,M.J. (1998). *The human gene encoding the interleukin-1 receptor accessory protein (IL1RAP) maps to chromosome 3q28 by fluorescence in situ hybridization and radiation hybrid mapping*. Genomics 47, 325-326.

Dale,M. i Nicklin,M.J. (1999). *Interleukin-1 receptor cluster: gene organization of IL1R2, IL1R1, IL1RL2 (IL-1Rrp2), IL1RL1 (T1/ST2), and IL18R1 (IL-1Rrp) on human chromosome 2q*. Genomics 57, 177-179.

Davies,M.J., Richardson,P.D., Woolf,N., Katz,D.R., i Mann,J. (1993). *Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content*. Br. Heart J. 69, 377-381.

Davignon,J. (2004). *Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins*. Circulation 109, III39-III43.

de Bruin,T.W., Maily,F., van Barlingen,H.H., Fisher,R., Castro,C.M., Talmud,P., linga-Thie,G.M., i Humphries,S.E. (1996). *Lipoprotein lipase gene mutations D9N and N291S in four pedigrees with familial combined hyperlipidaemia*. Eur. J. Clin. Invest 26, 631-639.

de,G.J., Veerkamp,M.J., i Stalenhoef,A.F. (2002). *Metabolic pathogenesis of familial combined hyperlipidaemia with emphasis on insulin resistance, adipose tissue metabolism and free fatty acids*. J. R. Soc. Med. 95 Suppl 42, 46-53.

Dean,M., Rzhetsky,A., i Allikmets,R. (2001). *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily*. Genome Res. 11, 1156-1166.

Dimitrova,Y., Dunoyer-Geindre,S., Reber,G., Mach,F., Kruithof,E.K., i de,M.P. (2003). *Effects of statins on adhesion molecule expression in endothelial cells*. J. Thromb. Haemost. 1, 2290-2299.

Dinarello,C.A. (1998). *Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist*. Int. Rev. Immunol. 16, 457-499.

Dollery,C.M. i Libby,P. (2006). *Atherosclerosis and proteinase activation*. Cardiovasc. Res. 69, 625-635.

Doria,A., Shoenfeld,Y., Wu,R., Gambari,P.F., Puato,M., Ghirardello,A., Gilburd,B., Corbanese,S., Patnaik,M., Zampieri,S., Peter,J.B., Favaretto,E., Iaccarino,L., Sherer,Y., Todesco,S., i Pauletto,P. (2003). *Risk factors for subclinical atherosclerosis in a prospective cohort of patients with systemic lupus erythematosus*. Ann. Rheum. Dis. 62, 1071-1077.

Downs,J.R., Clearfield,M., Weis,S., Whitney,E., Shapiro,D.R., Beere,P.A., Langendorfer,A., Stein,E.A., Kruyer,W., i Gotto,A.M., Jr. (1998). *Primary*

prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. JAMA 279, 1615-1622.

Dressman,J., Kincer,J., Matveev,S.V., Guo,L., Greenberg,R.N., Guerin,T., Meade,D., Li,X.A., Zhu,W., Uittenbogaard,A., Wilson,M.E., i Smart,E.J. (2003). *HIV protease inhibitors promote atherosclerotic lesion formation independent of dyslipidemia by increasing CD36-dependent cholesteryl ester accumulation in macrophages. J. Clin. Invest 111, 389-397.*

Du,X., Chand,H.S., i Kisiel,W. (2003). *Human tissue factor pathway inhibitor-2 does not bind or inhibit activated matrix metalloproteinase-1. Biochim. Biophys. Acta 1621, 242-245.*

E

Edwards,P.A. i Ericsson,J. (1999). *Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. Annu. Rev. Biochem. 68, 157-185.*

Einstein,R., Jackson,J.R., D'Alessio,K., Lillquist,J.S., Sathe,G., Porter,T., i Young,P.R. (1996). *Type I IL-1 receptor: ligand specific confirmation differences and the role of glycosylation in ligand binding. Cytokine 8, 206-213.*

Ekstrand,J., Razuvaev,A., Folkersen,L., Roy,J., i Hedin,U. (2010). *Tissue factor pathway inhibitor-2 is induced by fluid shear stress in vascular smooth muscle cells and affects cell proliferation and survival. J. Vasc. Surg. 52, 167-175.*

El-Sadr,W.M., Mullin,C.M., Carr,A., Gibert,C., Rappoport,C., Visnegarwala,F., Grunfeld,C., i Raghavan,S.S. (2005). *Effects of HIV disease on lipid, glucose and insulin levels: results from a large antiretroviral-naive cohort. HIV. Med. 6, 114-121.*

Elhage,R., Maret,A., Pieraggi,M.T., Thiers,J.C., Arnal,J.F., i Bayard,F. (1998). *Differential effects of interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor*

binding protein on fatty-streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. Circulation 97, 242-244.

Elkind,M.S. (2009). *Inflammatory markers and stroke.* Curr. Cardiol. Rep. 11, 12-20.

Eurlings,P.M., van der Kallen,C.J., Geurts,J.M., Kouwenberg,P., Boeckx,W.D., i de Bruin,T.W. (2002). *Identification of differentially expressed genes in subcutaneous adipose tissue from subjects with familial combined hyperlipidemia.* J. Lipid Res. 43, 930-935.

F

Fajas,L., Schoonjans,K., Gelman,L., Kim,J.B., Najib,J., Martin,G., Fruchart,J.C., Briggs,M., Spiegelman,B.M., i Auwerx,J. (1999). *Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism.* Mol. Cell Biol. 19, 5495-5503.

Falk,E., Shah,P.K., i Fuster,V. (1995). *Coronary plaque disruption.* Circulation 92, 657-671.

Fallon,P.G., Allen,R.L., i Rich,T. (2004). *Primitive Toll signalling: bugs, flies, worms and man.* Trends Immunol. 22, 63-66.

Febbraio,M., Abumrad,N.A., Hajjar,D.P., Sharma,K., Cheng,W., Pearce,S.F., i Silverstein,R.L. (1999). *A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism.* J. Biol. Chem. 274, 19055-19062.

Febbraio,M., Hajjar,D.P., i Silverstein,R.L. (2001). *CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism.* J. Clin. Invest 108, 785-791.

Fernandez-Botran,R., Chilton,P.M., i Ma,Y. (1996). *Soluble cytokine receptors: their roles in immunoregulation, disease, and therapy.* Adv. Immunol. 63, 269-336.

Fredrickson,D.S. i Levy,R.I. (1970). *Treatment of essential hyperlipidaemia*. Lancet 1, 191-192.

Friis-Moller,N., Weber,R., Reiss,P., Thiebaut,R., Kirk,O., d'Arminio,M.A., Pradier,C., Morfeldt,L., Mateu,S., Law,M., El-Sadr,W., De,W.S., Sabin,C.A., Phillips,A.N., i Lundgren,J.D. (2003). *Cardiovascular disease risk factors in HIV patients--association with antiretroviral therapy. Results from the DAD study*. AIDS 17, 1179-1193.

Fruchart,J.C., Nierman,M.C., Stroes,E.S., Kastelein,J.J., i Duriez,P. (2004). *New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment*. Circulation 109, III15-III19.

Fu,X., Menke,J.G., Chen,Y., Zhou,G., MacNaul,K.L., Wright,S.D., Sparrow,C.P., i Lund,E.G. (2001). *27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells*. J. Biol. Chem. 276, 38378-38387.

Fujii,C., Sakakibara,H., Kondo,T., Yatsuya,H., Tamakoshi,K., i Toyoshima,H. (2006). *Plasma fibrinogen levels and cardiovascular risk factors in Japanese schoolchildren*. J. Epidemiol. 16, 64-70.

Full,L.E., Ruisanchez,C., i Monaco,C. (2009). *The inextricable link between atherosclerosis and prototypical inflammatory diseases rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus*. Arthritis Res. Ther. 11, 217.

Furst,D.E., Breedveld,F.C., Kalden,J.R., Smolen,J.S., Burmester,G.R., Bijlsma,J.W., Dougados,M., Emery,P., Keystone,E.C., Klareskog,L., i Mease,P.J. (2005). *Updated consensus statement on biological agents, specifically tumour necrosis factor {alpha} (TNF{alpha}) blocking agents and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra), for the treatment of rheumatic diseases, 2005*. Ann. Rheum. Dis. 64 Suppl 4, iv2-14.

Fuster,V., Badimon,L., Badimon,J.J., i Chesebro,J.H. (1992). *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1)*. N. Engl. J. Med. 326, 242-250.

Fuster,V., Badimon,L., Badimon,J.J., i Chesebro,J.H. (1992). *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2)*. N. Engl. J. Med. 326, 310-318.

G

Gabay,C., Lamacchia,C., i Palmer,G. (2010). *IL-1 pathways in inflammation and human diseases*. Nat. Rev. Rheumatol. 6, 232-241.

Gaddi,A., Cicero,A.F., Odoó,F.O., Poli,A.A., i Paoletti,R. (2007). *Practical guidelines for familial combined hyperlipidemia diagnosis: an up-date*. Vasc. Health Risk Manag. 3, 877-886.

Georgieva,A.M., Cate,H.T., Keulen,E.T., van,O.R., Govers-Riemslog,J.W., Hamulyak,K., van der Kallen,C.J., van Greevenbroek,M.M., i de Bruin,T.W. (2004). *Prothrombotic markers in familial combined hyperlipidemia: evidence of endothelial cell activation and relation to metabolic syndrome*. Atherosclerosis 175, 345-351.

Ghivizzani,S.C., Lechman,E.R., Kang,R., Tio,C., Kolls,J., Evans,C.H., i Robbins,P.D. (1998). *Direct adenovirus-mediated gene transfer of interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha soluble receptors to rabbit knees with experimental arthritis has local and distal anti-arthritic effects*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 95, 4613-4618.

Gil,H.A., Ramirez Tortosa,M.C., guilera Garcia,M.C., i Mesa,G. (2007). *[Experimental models of cardiovascular disease]*. Nutr. Hosp. 22, 169-177.

Glass,C.K. i Witztum,J.L. (2001). *Atherosclerosis. the road ahead*. Cell 104, 503-516.

Goldstein,J.L., Rawson,R.B., i Brown,M.S. (2002). *Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis*. Arch. Biochem. Biophys. 397, 139-148.

Gomez,M., Valle,V., Aros,F., Sanz,G., Sala,J., Fiol,M., Bruguera,J., Elosua,R., Molina,L., Marti,H., Covas,M.I., Rodriguez-Llorian,A., Fito,M., Suarez-

Pinilla,M.A., Amezaga,R., i Marrugat,J. (2009). *Oxidized LDL, lipoprotein (a) and other emergent risk factors in acute myocardial infarction (FORTIAM study)*. Rev. Esp. Cardiol. 62, 373-382.

Gonzalez,L.O., Pidal,I., Junquera,S., Corte,M.D., Vazquez,J., Rodriguez,J.C., Lamelas,M.L., Merino,A.M., Garcia-Muniz,J.L., i Vizoso,F.J. (2007). *Overexpression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in mononuclear inflammatory cells in breast cancer correlates with metastasis-relapse*. Br. J. Cancer 97, 957-963.

Gosling,J., Slaymaker,S., Gu,L., Tseng,S., Zlot,C.H., Young,S.G., Rollins,B.J., i Charo,I.F. (1999). *MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B*. J. Clin. Invest 103, 773-778.

Gould,A.L., Rossouw,J.E., Santanello,N.C., Heyse,J.F., i Furberg,C.D. (1998). *Cholesterol reduction yields clinical benefit: impact of statin trials*. Circulation 97, 946-952.

Gray,L., Hart,C.L., Smith,G.D., i Batty,G.D. (2010). *What is the predictive value of established risk factors for total and cardiovascular disease mortality when measured before middle age? Pooled analyses of two prospective cohort studies from Scotland*. Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil. 17, 106-112.

Grinspoon,S.K., Grunfeld,C., Kotler,D.P., Currier,J.S., Lundgren,J.D., Dube,M.P., Lipshultz,S.E., Hsue,P.Y., Squires,K., Schambelan,M., Wilson,P.W., Yarasheski,K.E., Hadigan,C.M., Stein,J.H., i Eckel,R.H. (2008). *State of the science conference: Initiative to decrease cardiovascular risk and increase quality of care for patients living with HIV/AIDS: executive summary*. Circulation 118, 198-210.

Grunfeld,C. i Feingold,K.R. (1992). *Metabolic disturbances and wasting in the acquired immunodeficiency syndrome*. N. Engl. J. Med. 327, 329-337.

Grunfeld,C. (2010). *Dyslipidemia and its Treatment in HIV Infection*. Top. HIV. Med. 18, 112-118.

Gupta,A., Guyomard,V., Zaman,M.J., Rehman,H.U., i Myint,P.K. (2010). *Systematic review on evidence of the effectiveness of cholesterol-lowering drugs*. Adv. Ther. 27, 348-364.

Gutstein,D.E. i Fuster,V. (1999). *Pathophysiology and clinical significance of atherosclerotic plaque rupture*. Cardiovasc. Res. 41, 323-333.

H

Hadigan,C., Jeste,S., Anderson,E.J., Tsay,R., Cyr,H., i Grinspoon,S. (2001). *Modifiable dietary habits and their relation to metabolic abnormalities in men and women with human immunodeficiency virus infection and fat redistribution*. Clin. Infect. Dis. 33, 710-717.

Han,J., Hajjar,D.P., Febbraio,M., i Nicholson,A.C. (1997). *Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36*. J. Biol. Chem. 272, 21654-21659.

Han,K.H., Ryu,J., Hong,K.H., Ko,J., Pak,Y.K., Kim,J.B., Park,S.W., i Kim,J.J. (2005). *HMG-CoA reductase inhibition reduces monocyte CC chemokine receptor 2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated monocyte recruitment in vivo*. Circulation 111, 1439-1447.

Hansson,G.K. (2001). *Immune mechanisms in atherosclerosis*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 21, 1876-1890.

Hansson,G.K., Libby,P., Schonbeck,U., i Yan,Z.Q. (2002). *Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis*. Circ. Res. 91, 281-291.

Hansson,G.K. (2005). *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. N. Engl. J. Med. 352, 1685-1695.

Hartvigsen,K., Chou,M.Y., Hansen,L.F., Shaw,P.X., Tsimikas,S., Binder,C.J., i Witztum,J.L. (2009). *The role of innate immunity in atherogenesis*. J. Lipid Res. 50 Suppl, S388-S393.

Haubrich,R.H., Riddler,S.A., DiRienzo,A.G., Komarow,L., Powderly,W.G., Klingman,K., Garren,K.W., Butcher,D.L., Rooney,J.F., Haas,D.W., Mellors,J.W., i Havlir,D.V. (2009). *Metabolic outcomes in a randomized trial of nucleoside, nonnucleoside and protease inhibitor-sparing regimens for initial HIV treatment.* AIDS 23, 1109-1118.

Heinecke,J.W. (2006). *Lipoprotein oxidation in cardiovascular disease: chief culprit or innocent bystander?* J. Exp. Med. 203, 813-816.

Henry,K., Melroe,H., Huebsch,J., Hermundson,J., Levine,C., Swensen,L., i Daley,J. (1998). *Severe premature coronary artery disease with protease inhibitors.* Lancet 351, 1328.

Herman,M.P., Sukhova,G.K., Kisiel,W., Foster,D., Kehry,M.R., Libby,P., i Schonbeck,U. (2001). *Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis.* J. Clin. Invest 107, 1117-1126.

Higashikata,T., Yamagishi,M., Higashi,T., Nagata,I., Iihara,K., Miyamoto,S., Ishibashi-Ueda,H., Nagaya,N., Iwase,T., Tomoike,H., i Sakamoto,A. (2006). *Altered expression balance of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human carotid plaque disruption: results of quantitative tissue analysis using real-time RT-PCR method.* Atherosclerosis 185, 165-172.

Holzl,B., Kraft,H.G., Wiebusch,H., Sandhofer,A., Patsch,J., Sandhofer,F., i Paulweber,B. (2000). *Two novel mutations in the lipoprotein lipase gene in a family with marked hypertriglyceridemia in heterozygous carriers. Potential interaction with the polymorphic marker D1S104 on chromosome 1q21-q23.* J. Lipid Res. 41, 734-741.

Hopkins,P.N., Heiss,G., Ellison,R.C., Province,M.A., Pankow,J.S., Eckfeldt,J.H., i Hunt,S.C. (2003). *Coronary artery disease risk in familial combined hyperlipidemia and familial hypertriglyceridemia: a case-control comparison from the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study.* Circulation 108, 519-523.

Hruz,P.W., Yan,Q., Struthers,H., i Jay,P.Y. (2008). *HIV protease inhibitors that block GLUT4 precipitate acute, decompensated heart failure in a mouse model of dilated cardiomyopathy*. FASEB J. 22, 2161-2167.

Huertas-Vazquez,A., del Rincon,J.P., Canizales-Quinteros,S., Riba,L., Vega-Hernandez,G., Ramirez-Jimenez,S., uron-Gomez,M., Gomez-Perez,F.J., guilar-Salinas,C.A., i Tusie-Luna,M.T. (2004). *Contribution of chromosome 1q21-q23 to familial combined hyperlipidemia in Mexican families*. Ann. Hum. Genet. 68, 419-427.

Huertas-Vazquez,A., Plaisier,C., Weissglas-Volkov,D., Sinsheimer,J., Canizales-Quinteros,S., Cruz-Bautista,I., Nikkola,E., Herrera-Hernandez,M., vila-Cervantes,A., Tusie-Luna,T., Taskinen,M.R., guilar-Salinas,C., i Pajukanta,P. (2008). *TCF7L2 is associated with high serum triacylglycerol and differentially expressed in adipose tissue in families with familial combined hyperlipidaemia*. Diabetologia 51, 62-69.

Huff,M.W. i Burnett,J.R. (1997). *3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors and hepatic apolipoprotein B secretion*. Curr. Opin. Lipidol. 8, 138-145.

I

Ibanez,B., Vilahur,G., Cimmino,G., Speidl,W.S., Pinero,A., Choi,B.G., Zafar,M.U., Santos-Gallego,C.G., Krause,B., Badimon,L., Fuster,V., i Badimon,J.J. (2008). *Rapid change in plaque size, composition, and molecular footprint after recombinant apolipoprotein A-I Milano (ETC-216) administration: magnetic resonance imaging study in an experimental model of atherosclerosis*. J. Am. Coll. Cardiol. 51, 1104-1109.

Igel,M., Sudhop,T., i von,B.K. (2002). *Pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins), including rosuvastatin and pitavastatin*. J. Clin. Pharmacol. 42, 835-845.

lino,M., Foster,D.C., i Kiesel,W. (1998). *Quantification and characterization of human endothelial cell-derived tissue factor pathway inhibitor-2*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18 , 40-46.

Inoue,S., Egashira,K., Ni,W., Kitamoto,S., Usui,M., Otani,K., Ishibashi,M., Hiasa,K., Nishida,K., i Takeshita,A. (2002). *Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice*. *Circulation* 106, 2700-2706.

J

Jennings,L.K. (2009). *Role of platelets in atherothrombosis*. *Am. J. Cardiol.* 103, 4A-10A.

Jensen,S.S. i Gad,M. (2010). *Differential induction of inflammatory cytokines by dendritic cells treated with novel TLR-agonist and cytokine based cocktails: targeting dendritic cells in autoimmunity*. *J. Inflamm. (Lond)* 7, 37.

Jerico,C., Knobel,H., Montero,M., Sorli,M.L., Guelar,A., Gimeno,J.L., Saballs,P., Lopez-Colomes,J.L., i Pedro-Botet,J. (2005). *Hypertension in HIV-infected patients: prevalence and related factors*. *Am. J. Hypertens.* 18, 1396-1401.

Jerico,C., Knobel,H., Calvo,N., Sorli,M.L., Guelar,A., Gimeno-Bayon,J.L., Saballs,P., Lopez-Colomes,J.L., i Pedro-Botet,J. (2006). *Subclinical carotid atherosclerosis in HIV-infected patients: role of combination antiretroviral therapy*. *Stroke* 37, 812-817.

Jessup,W., Wilson,P., Gaus,K., i Kritharides,L. (2002). *Oxidized lipoproteins and macrophages*. *Vascul. Pharmacol.* 38, 239-248.

Jialal,I., Stein,D., Balis,D., Grundy,S.M., ms-Huet,B., i Devaraj,S. (2001). *Effect of hydroxymethyl glutaryl coenzyme a reductase inhibitor therapy on high sensitive C-reactive protein levels*. *Circulation* 103, 1933-1935.

Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) World Health Organization (WHO). *AIDS: epidemic update*. 1-12-2004.

Jousilahti,P., Vartiainen,E., Tuomilehto,J., i Puska,P. (1999). *Sex, age, cardiovascular risk factors, and coronary heart disease: a prospective follow-up study of 14 786 middle-aged men and women in Finland*. *Circulation* 99, 1165-1172.

Joyce,C.W., Amar,M.J., Lambert,G., Vaisman,B.L., Paigen,B., Najib-Fruchart,J., Hoyt,R.F., Jr., Neufeld,E.D., Remaley,A.T., Fredrickson,D.S., Brewer,H.B., Jr., i Santamarina-Fojo,S. (2002). *The ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) modulates the development of aortic atherosclerosis in C57BL/6 and apoE-knockout mice*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 407-412.

K

Keys,A., Menotti,A., Aravanis,C., Blackburn,H., Djordevic,B.S., Buzina,R., Dontas,A.S., Fidanza,F., Karvonen,M.J., Kimura,N., i . (1984). *The seven countries study: 2,289 deaths in 15 years*. *Prev. Med.* 13, 141-154.

Kim,S.H., Reznikov,L.L., Stuyt,R.J., Selzman,C.H., Fantuzzi,G., Hoshino,T., Young,H.A., i Dinarello,C.A. (2001). *Functional reconstitution and regulation of IL-18 activity by the IL-18R beta chain*. *J. Immunol.* 166, 148-154.

Klag,M.J., Ford,D.E., Mead,L.A., He,J., Whelton,P.K., Liang,K.Y., i Levine,D.M. (1993). *Serum cholesterol in young men and subsequent cardiovascular disease*. *N. Engl. J. Med.* 328, 313-318.

Koh,K.K., Han,S.H., i Quon,M.J. (2005). *Inflammatory markers and the metabolic syndrome: insights from therapeutic interventions*. *J. Am. Coll. Cardiol.* 46, 1978-1985.

Kohro,T., Tanaka,T., Murakami,T., Wada,Y., Aburatani,H., Hamakubo,T., i Kodama,T. (2004). *A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage*. *J. Atheroscler. Thromb.* 11, 88-97.

Kollewe,C., Mackensen,A.C., Neumann,D., Knop,J., Cao,P., Li,S., Wesche,H., i Martin,M.U. (2004). *Sequential autophosphorylation steps in the interleukin-1*

receptor-associated kinase-1 regulate its availability as an adapter in interleukin-1 signaling. J. Biol. Chem. 279, 5227-5236.

Kong,D., Ma,D., Bai,H., Guo,H., Cai,X., Mo,W., Tang,Q., i Song,H. (2004). *Expression and characterization of the first kunitz domain of human tissue factor pathway inhibitor-2.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 324, 1179-1185.

Kozarsky,K.F., Donahee,M.H., Glick,J.M., Krieger,M., i Rader,D.J. (2000). *Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse.* Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 20, 721-727.

Kristoffersen,U.S., Kofoed,K., Kronborg,G., Giger,A.K., Kjaer,A., i Lebech,A.M. (2009). *Reduction in circulating markers of endothelial dysfunction in HIV-infected patients during antiretroviral therapy.* HIV. Med. 10, 79-87.

Kunjathoor,V.V., Febbraio,M., Podrez,E.A., Moore,K.J., Andersson,L., Koehn,S., Rhee,J.S., Silverstein,R., Hoff,H.F., i Freeman,M.W. (2002). *Scavenger receptors class A-III and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages.* J. Biol. Chem. 277, 49982-49988.

Kusuhara,M., Isoda,K., i Ohsuzu,F. (2006). *Interleukin-1 and occlusive arterial diseases.* Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem. 4, 229-235.

L

LaBelle,M., Austin,M.A., Rubin,E., i Krauss,R.M. (1991). *Linkage analysis of low-density lipoprotein subclass phenotypes and the apolipoprotein B gene.* Genet. Epidemiol. 8, 269-275.

Lagathu,C., Kim,M., Maachi,M., Vigouroux,C., Cervera,P., Capeau,J., Caron,M., i Bastard,J.P. (2005). *HIV antiretroviral treatment alters adipokine expression and insulin sensitivity of adipose tissue in vitro and in vivo.* Biochimie 87, 65-71.

Ledru,E., Christeff,N., Patey,O., de,T.P., Melchior,J.C., i Gougeon,M.L. (2000). *Alteration of tumor necrosis factor-alpha T-cell homeostasis following potent antiretroviral therapy: contribution to the development of human immunodeficiency virus-associated lipodystrophy syndrome*. Blood 95, 3191-3198.

Lee,G.A., Rao,M.N., i Grunfeld,C. (2005). *The effects of HIV protease inhibitors on carbohydrate and lipid metabolism*. Curr. HIV. /AIDS Rep. 2, 39-50.

Lee,J.C., Lusic,A.J., i Pajukanta,P. (2006). *Familial combined hyperlipidemia: upstream transcription factor 1 and beyond*. Curr. Opin. Lipidol. 17, 101-109.

Lee,R.T. i Libby,P. (1997). *The unstable atheroma*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17, 1859-1867.

Li,H., Song,Y., Li,F., Zhang,L., Gu,Y., Zhang,L., Jiang,L., Dong,W., Ye,J., i Li,Q. (2010). *Identification of lipid droplet-associated proteins in the formation of macrophage-derived foam cells using microarrays*. Int. J. Mol. Med. 26, 231-239.

Liu,Z.K., Hu,M., Baum,L., Thomas,G.N., i Tomlinson,B. (2010). *Associations of polymorphisms in the apolipoprotein A1/C3/A4/A5 gene cluster with familial combined hyperlipidaemia in Hong Kong Chinese*. Atherosclerosis 208, 427-432.

Llaverias,G., Jove,M., Vazquez-Carrera,M., Sanchez,R.M., Diaz,C., Hernandez,G., Laguna,J.C., i Alegret,M. (2002). *Avasimibe and atorvastatin synergistically reduce cholesteryl ester content in THP-1 macrophages*. Eur. J. Pharmacol. 451, 11-17.

Llaverias,G., Lacasa,D., Vinals,M., Vazquez-Carrera,M., Sanchez,R.M., Laguna,J.C., i Alegret,M. (2004). *Reduction of intracellular cholesterol accumulation in THP-1 macrophages by a combination of rosiglitazone and atorvastatin*. Biochem. Pharmacol. 68, 155-163.

Lockett,A., Goebel,M.G., i Harrington,M.A. (2008). *Transient membrane recruitment of IRAK-1 in response to LPS and IL-1beta requires TNF R1*. Am. J. Physiol Cell Physiol 295, C313-C323.

Lopez-Ruiz,A., Jarabo,M.M., Martinez-Triguero,M.L., Morales-Suarez-Varela,M., Sola,E., Banuls,C., Casado,M., i Hernandez-Mijares,A. (2009). *Small and dense LDL in familial combined hyperlipidemia and N291S polymorphism of the lipoprotein lipase gene*. Lipids Health Dis. 8, 12.

Lopez,A.D., Mathers,C.D., Ezzati,M., Jamison,D.T., i Murray,C.J. (2006). *Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data*. Lancet 367, 1747-1757.

Lusis,A.J. (2000). *Atherosclerosis*. Nature 407, 233-241.

Lusis,A.J., Fogelman,A.M., i Fonarow,G.C. (2004). *Genetic basis of atherosclerosis: part I: new genes and pathways*. Circulation 110, 1868-1873.

M

Maclouf,J., Folco,G., i Patrono,C. (1998). *Eicosanoids and iso-eicosanoids: constitutive, inducible and transcellular biosynthesis in vascular disease*. Thromb. Haemost. 79, 691-705.

Mangas,R.A. i Gomez,R.F. (2007). *[Multifactorial treatment of atherosclerosis]*. Med. Clin. (Barc.) 129 , 785-796.

Mangoni,A.A. i Jackson,S.H. (2002). *Homocysteine and cardiovascular disease: current evidence and future prospects*. Am. J. Med. 112, 556-565.

Mantovani,A., Muzio,M., Ghezzi,P., Colotta,C., i Introna,M. (1998). *Regulation of inhibitory pathways of the interleukin-1 system*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 840, 338-351.

Mantovani,A., Locati,M., Vecchi,A., Sozzani,S., i Allavena,P. (2001). *Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines*. Trends Immunol. 22, 328-336.

Manuel,O., Thiebaut,R., Darioli,R., i Tarr,P.E. (2005). *Treatment of dyslipidaemia in HIV-infected persons*. *Expert. Opin. Pharmacother.* 6, 1619-1645.

Mar,R., Pajukanta,P., Allayee,H., Groenendijk,M., linga-Thie,G., Krauss,R.M., Sinsheimer,J.S., Cantor,R.M., de Bruin,T.W., i Lusic,A.J. (2004). *Association of the APOLIPOPROTEIN A1/C3/A4/A5 gene cluster with triglyceride levels and LDL particle size in familial combined hyperlipidemia*. *Circ. Res.* 94, 993-999.

Marrugat,J., Gil,M., Masia,R., Sala,J., Elosua,R., i Anto,J.M. (2001). *Role of age and sex in short-term and long term mortality after a first Q wave myocardial infarction*. *J. Epidemiol. Community Health* 55, 487-493.

Martinez-Gonzalez,J., Berrozpe,M., Varela,O., i Badimon,L. (2001). *Heterogeneity of smooth muscle cells in advanced human atherosclerotic plaques: intimal smooth muscle cells expressing a fibroblast surface protein are highly activated by platelet-released products*. *Eur. J. Clin. Invest* 31, 939-949.

Martinez-Hervas,S., Real,J.T., Priego,A., Sanz,J., Martin,J.M., Carmena,R., i Ascaso,J.F. (2006). *[Familial combined hyperlipidemia, metabolic syndrome and cardiovascular disease]*. *Rev. Esp. Cardiol.* 59, 1195-1198.

Mary-Krause,M., Cotte,L., Simon,A., Partisani,M., i Costagliola,D. (2003). *Increased risk of myocardial infarction with duration of protease inhibitor therapy in HIV-infected men*. *AIDS* 17, 2479-2486.

Masia-Canuto,M., Bernal-Morell,E., i Gutierrez-Rodero,F. (2006). *[Lipid alterations and cardiovascular risk associated with antiretroviral therapy]*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 24, 637-648.

Matsuzaki,M., Kita,T., Mabuchi,H., Matsuzawa,Y., Nakaya,N., Oikawa,S., Saito,Y., Sasaki,J., Shimamoto,K., i Itakura,H. (2002). *Large scale cohort study of the relationship between serum cholesterol concentration and coronary events with low-dose simvastatin therapy in Japanese patients with hypercholesterolemia*. *Circ. J.* 66, 1087-1095.

McMahan,C.J., Slack,J.L., Mosley,B., Cosman,D., Lupton,S.D., Brunton,L.L., Grubin,C.E., Wignall,J.M., Jenkins,N.A., Brannan,C.I., i . (1991). *A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types*. EMBO J. 10, 2821-2832.

McNeill,E., Channon,K.M., i Greaves,D.R. (2010). *Inflammatory cell recruitment in cardiovascular disease: murine models and potential clinical applications*. Clin. Sci. (Lond) 118, 641-655.

McNeish,J., Aiello,R.J., Guyot,D., Turi,T., Gabel,C., Aldinger,C., Hoppe,K.L., Roach,M.L., Royer,L.J., de,W.J., Broccardo,C., Chimini,G., i Francone,O.L. (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, 4245-4250.

Medzhitov,R. (2001). *Toll-like receptors and innate immunity*. Nat. Rev. Immunol. 1, 135-145.

Meex,S.J., van der Kallen,C.J., van Greevenbroek,M.M., Eurlings,P.M., El,H.M., Evelo,C.T., Lindsey,P.J., Luiken,J.J., Glatz,J.F., i de Bruin,T.W. (2005). *Up-regulation of CD36/FAT in preadipocytes in familial combined hyperlipidemia*. FASEB J. 19, 2063-2065.

Meijssen,S., Cabezas,M.C., Twickler,T.B., Jansen,H., i Erkelens,D.W. (2000). *In vivo evidence of defective postprandial and postabsorptive free fatty acid metabolism in familial combined hyperlipidemia*. J. Lipid Res. 41, 1096-1102.

Mencarelli,A., Cipriani,S., Renga,B., Francisci,D., Palladino,G., Distrutti,E., Baldelli,F., i Fiorucci,S. (2010). *The bile acid sensor FXR protects against dyslipidemia and aortic plaques development induced by the HIV protease inhibitor ritonavir in mice*. PLoS. One. 5, e13238.

Methe,H., Kim,J.O., Kofler,S., Nabauer,M., i Weis,M. (2005). *Statins decrease Toll-like receptor 4 expression and downstream signaling in human CD14+ monocytes*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 25, 1439-1445.

Miller,L.S., Pietras,E.M., Uricchio,L.H., Hirano,K., Rao,S., Lin,H., O'Connell,R.M., Iwakura,Y., Cheung,A.L., Cheng,G., i Modlin,R.L. (2007). *Inflammasome-mediated production of IL-1beta is required for neutrophil recruitment against Staphylococcus aureus in vivo*. J. Immunol. 179, 6933-6942.

Miyagi,Y., Koshikawa,N., Yasumitsu,H., Miyagi,E., Hirahara,F., Aoki,I., Misugi,K., Umeda,M., i Miyazaki,K. (1994). *cDNA cloning and mRNA expression of a serine proteinase inhibitor secreted by cancer cells: identification as placental protein 5 and tissue factor pathway inhibitor-2*. J. Biochem. 116, 939-942.

Moore,K.J. i Freeman,M.W. (2006). *Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 26, 1702-1711.

Morello,F., de Bruin,T.W., Rotter,J.I., Pratt,R.E., van der Kallen,C.J., Hladik,G.A., Dzau,V.J., Liew,C.C., i Chen,Y.D. (2004). *Differential gene expression of blood-derived cell lines in familial combined hyperlipidemia*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 24, 2149-2154.

Mukhamedova,N., Rose,H., Cui,H.L., Grant,A., Tchoua,U., Dart,A., Bukrinsky,M., i Sviridov,D. (2009). *Antiretroviral compounds and cholesterol efflux from macrophages*. Atherosclerosis 206, 439-443.

Munteanu,A., Zingg,J.M., Ricciarelli,R., i Azzi,A. (2005). *CD36 overexpression in ritonavir-treated THP-1 cells is reversed by alpha-tocopherol*. Free Radic. Biol. Med. 38, 1047-1056.

Murphy,J.E., Tedbury,P.R., Homer-Vanniasinkam,S., Walker,J.H., i Ponnambalam,S. (2005). *Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors*. Atherosclerosis 182, 1-15.

Murphy,N., Grimsditch,D.C., Parkin,S., Vidgeon-Hart,M.P., Overend,P., Groot,P.H., Graham,A., i Benson,G.M. (2002). *Hypercholesterolaemia and circulating levels of CXC chemokines in apoE*3 Leiden mice*. Atherosclerosis 163, 69-77.

Murray,C.J. i Lopez,A.D. (1997). *Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study*. Lancet 349, 1436-1442.

N

Nagase,H., Visse,R., i Murphy,G. (2006). *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs*. Cardiovasc. Res. 69, 562-573.

Nagy,L., Tontonoz,P., Alvarez,J.G., Chen,H., i Evans,R.M. (1998). *Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma*. Cell 93, 229-240.

Nakashima,Y., Fujii,H., Sumiyoshi,S., Wight,T.N., i Sueishi,K. (2007). *Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 27, 1159-1165.

Neaud,V., Hisaka,T., Monvoisin,A., Bedin,C., Balabaud,C., Foster,D.C., Desmouliere,A., Kisiel,W., i Rosenbaum,J. (2000). *Paradoxical pro-invasive effect of the serine proteinase inhibitor tissue factor pathway inhibitor-2 on human hepatocellular carcinoma cells*. J. Biol. Chem. 275, 35565-35569.

Neaud,V., Duplantier,J.G., Mazzocco,C., Kisiel,W., i Rosenbaum,J. (2004). *Thrombin up-regulates tissue factor pathway inhibitor-2 synthesis through a cyclooxygenase-2-dependent, epidermal growth factor receptor-independent mechanism*. J. Biol. Chem. 279, 5200-5206.

Nelken,N.A., Coughlin,S.R., Gordon,D., i Wilcox,J.N. (1991). *Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques*. J. Clin. Invest 88, 1121-1127.

Newby,A.C. (2005). *Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture*. Physiol Rev. 85, 1-31.

Newby,A.C. (2008). *Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 28, 2108-2114.

Niessner,A., Steiner,S., Speidl,W.S., Pleiner,J., Seidinger,D., Maurer,G., Goronzy,J.J., Weyand,C.M., Kopp,C.W., Huber,K., Wolzt,M., i Wojta,J. (2006). *Simvastatin suppresses endotoxin-induced upregulation of toll-like receptors 4 and 2 in vivo*. *Atherosclerosis* 189, 408-413.

Ninomiya-Tsuji,J., Kishimoto,K., Hiyama,A., Inoue,J., Cao,Z., i Matsumoto,K. (1999). *The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway*. *Nature* 398, 252-256.

Noor,M.A., Parker,R.A., O'Mara,E., Grasela,D.M., Currie,A., Hodder,S.L., Fiedorek,F.T., i Haas,D.W. (2004). *The effects of HIV protease inhibitors atazanavir and lopinavir/ritonavir on insulin sensitivity in HIV-seronegative healthy adults*. *AIDS* 18, 2137-2144.

Nozaki,S., Kashiwagi,H., Yamashita,S., Nakagawa,T., Kostner,B., Tomiyama,Y., Nakata,A., Ishigami,M., Miyagawa,J., Kameda-Takemura,K., i . (1995). *Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects*. *J. Clin. Invest* 96, 1859-1865.

O

O'Donnell,C.J. i Elosua,R. (2008). *[Cardiovascular risk factors. Insights from Framingham Heart Study]*. *Rev. Esp. Cardiol.* 61, 299-310.

O'Neill,L.A. i Bowie,A.G. (2007). *The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling*. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 353-364.

Oakley,F.D., Abbott,D., Li,Q., i Engelhardt,J.F. (2009). *Signaling components of redox active endosomes: the redoxosomes*. *Antioxid. Redox. Signal.* 11, 1313-1333.

Oakley,F.D., Smith,R.L., i Engelhardt,J.F. (2009). *Lipid rafts and caveolin-1 coordinate interleukin-1beta (IL-1beta)-dependent activation of NFkappaB by controlling endocytosis of Nox2 and IL-1beta receptor 1 from the plasma membrane*. *J. Biol. Chem.* 284, 33255-33264.

Ong,L.L., Li,W., Oldigs,J.K., Kaminski,A., Gerstmayer,B., Piechaczek,C., Wagner,W., Li,R.K., Ma,N., i Steinhoff,G. (2010). *Hypoxic/normoxic preconditioning increases endothelial differentiation potential of human bone marrow CD133+ cells*. *Tissue Eng Part C. Methods* 16, 1069-1081.

Osterud,B. i Bjorklid,E. (2003). *Role of monocytes in atherogenesis*. *Physiol Rev.* 83, 1069-1112.

P

Pajukanta,P. i Palotie,L. (1998). *[Genetics of hereditary dyslipidemia now becoming clear]*. *Duodecim* 114, 1447, 1449.

Pajukanta,P., Nuotio,I., Terwilliger,J.D., Porkka,K.V., Ylitalo,K., Pihlajamaki,J., Suomalainen,A.J., Syvanen,A.C., Lehtimaki,T., Viikari,J.S., Laakso,M., Taskinen,M.R., Ehnholm,C., i Peltonen,L. (1998). *Linkage of familial combined hyperlipidaemia to chromosome 1q21-q23*. *Nat. Genet.* 18, 369-373.

Pajukanta,P., Lilja,H.E., Sinsheimer,J.S., Cantor,R.M., Lusi,A.J., Gentile,M., Duan,X.J., Soro-Paavonen,A., Naukkarinen,J., Saarela,J., Laakso,M., Ehnholm,C., Taskinen,M.R., i Peltonen,L. (2004). *Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (USF1)* . *Nat. Genet.* 36, 371-376.

Pan,J.J., Shi,H.M., Luo,X.P., Ma,D., Li,Y., Zhu,J., Liang,W., Mu,J.G., i Li,J. (2011). *Recombinant TFPI-2 enhances macrophage apoptosis through upregulation of Fas/FasL*. *Eur. J. Pharmacol.* 654, 135-141.

Parker,R.A., Flint,O.P., Mulvey,R., Elosua,C., Wang,F., Fenderson,W., Wang,S., Yang,W.P., i Noor,M.A. (2005). *Endoplasmic reticulum stress links dyslipidemia to inhibition of proteasome activity and glucose transport by HIV protease inhibitors*. *Mol. Pharmacol.* 67 , 1909-1919.

Pasceri,V. i Yeh,E.T. (1999). *A tale of two diseases: atherosclerosis and rheumatoid arthritis*. *Circulation* 100, 2124-2126.

- Pedersen,T.R., Kjekshus,J., Berg,K., Haghfelt,T., Faergeman,O., Faergeman,G., Pyorala,K., Miettinen,T., Wilhelmsen,L., Olsson,A.G., i Wedel,H. (2004). *Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)*. 1994. *Atheroscler. Suppl* 5, 81-87.
- Pei,W., Baron,H., Muller-Myhsok,B., Knoblauch,H., Al-Yahyaee,S.A., Hui,R., Wu,X., Liu,L., Busjahn,A., Luft,F.C., i Schuster,H. (2000). *Support for linkage of familial combined hyperlipidemia to chromosome 1q21-q23 in Chinese and German families*. *Clin. Genet.* 57, 29-34.
- Pemberton,P.W., Ahmad,Y., Bodill,H., Lokko,D., Hider,S.L., Yates,A.P., Walker,M.G., Laing,I., i Bruce,I.N. (2009). *Biomarkers of oxidant stress, insulin sensitivity and endothelial activation in rheumatoid arthritis: a cross-sectional study of their association with accelerated atherosclerosis*. *BMC. Res. Notes* 2, 83.
- Penton,R.G., Polentarutti,N., Sironi,M., Sacconi,S., Introna,M., i Mantovani,A. (1997). *Gene transfer-mediated expression of physiological numbers of the type II decoy receptor in a myelomonocytic cellular context dampens the response to interleukin-1*. *Eur. Cytokine Netw.* 8, 265-269.
- Perez-Camacho,I., Camacho,A., Torre-Cisneros,J., i Rivero,A. (2009). *[Cardiovascular risk factors associated with antiretroviral therapy]*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 27 Suppl 1, 24-32.
- Periard,D., Telenti,A., Sudre,P., Cheseaux,J.J., Halfon,P., Reymond,M.J., Marcovina,S.M., Glauser,M.P., Nicod,P., Darioli,R., i Mooser,V. (1999). *Atherogenic dyslipidemia in HIV-infected individuals treated with protease inhibitors. The Swiss HIV Cohort Study*. *Circulation* 100, 700-705.
- Persson,J., Nilsson,J., i Lindholm,M.W. (2006). *Cytokine response to lipoprotein lipid loading in human monocyte-derived macrophages*. *Lipids Health Dis.* 5, 17.
- Persson,J., Degerman,E., Nilsson,J., i Lindholm,M.W. (2007). *Perilipin and adipophilin expression in lipid loaded macrophages*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363, 1020-1026.

Plaisier,C.L., Horvath,S., Huertas-Vazquez,A., Cruz-Bautista,I., Herrera,M.F., Tusie-Luna,T., guilar-Salinas,C., i Pajukanta,P. (2009). *A systems genetics approach implicates USF1, FADS3, and other causal candidate genes for familial combined hyperlipidemia*. PLoS. Genet. 5, e1000642.

Preas,H.L., Reda,D., Tropea,M., Vandivier,R.W., Banks,S.M., Agosti,J.M., i Suffredini,A.F. (1996). *Effects of recombinant soluble type I interleukin-1 receptor on human inflammatory responses to endotoxin*. Blood 88, 2465-2472.

Pruefer,D., Scalia,R., i Lefer,A.M. (1999). *Simvastatin inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against inflammatory processes in normocholesterolemic rats*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19, 2894-2900.

Purnell,J.Q., Zambon,A., Knopp,R.H., Pizzuti,D.J., Achari,R., Leonard,J.M., Locke,C., i Brunzell,J.D. (2000). *Effect of ritonavir on lipids and post-heparin lipase activities in normal subjects*. AIDS 14, 51-57.

Q

Qiao,J.H., Tripathi,J., Mishra,N.K., Cai,Y., Tripathi,S., Wang,X.P., Imes,S., Fishbein,M.C., Clinton,S.K., Libby,P., Lulis,A.J., i Rajavashisth,T.B. (1997). *Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice*. Am. J. Pathol. 150, 1687-1699.

R

Rao,C.N., Cook,B., Liu,Y., Chilukuri,K., Stack,M.S., Foster,D.C., Kisiel,W., i Woodley,D.T. (1998). *HT-1080 fibrosarcoma cell matrix degradation and invasion are inhibited by the matrix-associated serine protease inhibitor TFPI-2/33 kDa MSPI*. Int. J. Cancer 76, 749-756.

Rao,C.N., Mohanam,S., Puppala,A., i Rao,J.S. (1999). *Regulation of ProMMP-1 and ProMMP-3 activation by tissue factor pathway inhibitor-2/matrix-associated serine protease inhibitor*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 255, 94-98.

Re,F., Muzio,M., De,R.M., Polentarutti,N., Giri,J.G., Mantovani,A., i Colotta,F. (1994). *The type II "receptor" as a decoy target for interleukin 1 in polymorphonuclear leukocytes: characterization of induction by dexamethasone and ligand binding properties of the released decoy receptor.* J. Exp. Med. 179, 739-743.

Re,F., Sironi,M., Muzio,M., Matteucci,C., Introna,M., Orlando,S., Penton-Rol,G., Dower,S.K., Sims,J.E., Colotta,F., i Mantovani,A. (1996). *Inhibition of interleukin-1 responsiveness by type II receptor gene transfer: a surface "receptor" with anti-interleukin-1 function.* J. Exp. Med. 183, 1841-1850.

Ribalta, J., Castro-Cabezas, M, Plana, N, i Masana, L. *Visión actualizada de la hiperlipidemia familiar combinada aplicada a la mejora de su diagnóstico.* 17. Clin Invest Arterioscl. 34-47. 2005. J Ribalta a, M Castro-Cabezas b, N Plana a, L Masana.

Riddle,T.M., Kuhel,D.G., Woollett,L.A., Fichtenbaum,C.J., i Hui,D.Y. (2001). *HIV protease inhibitor induces fatty acid and sterol biosynthesis in liver and adipose tissues due to the accumulation of activated sterol regulatory element-binding proteins in the nucleus.* J. Biol. Chem. 276, 37514-37519.

Ridker,P.M., Rifai,N., Pfeffer,M.A., Sacks,F., i Braunwald,E. (1999). *Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators .* Circulation 100, 230-235.

Rios,F.J., Jancar,S., Melo,I.B., Ketelhuth,D.F., i Gidlund,M. (2008). *Role of PPAR-gamma in the modulation of CD36 and FcgammaRII induced by LDL with low and high degrees of oxidation during the differentiation of the monocytic THP-1 cell line.* Cell Physiol Biochem. 22, 549-556.

Ross,A.C., Armentrout,R., O'Riordan,M.A., Storer,N., Rizk,N., Harrill,D., El,B.D., i McComsey,G.A. (2008). *Endothelial activation markers are linked to HIV status and are independent of antiretroviral therapy and lipotrophy.* J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. 49, 499-506.

Ross,R. (1986). *The pathogenesis of atherosclerosis--an update*. N. Engl. J. Med. 314, 488-500.

Ross,R. (1993). *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature 362, 801-809.

Ross,R. (1999). *Atherosclerosis is an inflammatory disease*. Am. Heart J. 138, S419-S420.

S

Sabol,S.L., Brewer,H.B., Jr., i Santamarina-Fojo,S. (2005). *The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver*. J. Lipid Res. 46, 2151-2167.

Sacks,F.M., Pfeffer,M.A., Moye,L.A., Rouleau,J.L., Rutherford,J.D., Cole,T.G., Brown,L., Warnica,J.W., Arnold,J.M., Wun,C.C., Davis,B.R., i Braunwald,E. (1996). *The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators*. N. Engl. J. Med. 335, 1001-1009.

Schaffler,A., Orso,E., Palitzsch,K.D., Buchler,C., Drobnik,W., Furst,A., Scholmerich,J., i Schmitz,G. (1999). *The human apM-1, an adipocyte-specific gene linked to the family of TNF's and to genes expressed in activated T cells, is mapped to chromosome 1q21.3-q23, a susceptibility locus identified for familial combined hyperlipidaemia (FCH)*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 260, 416-425.

Schulz,A., Toedt,G., Zenz,T., Stilgenbauer,S., Lichter,P., i Seiffert,M. (2011). *Inflammatory cytokines and signaling pathways are associated with survival of primary chronic lymphocytic leukemia cells in vitro: a dominant role of CCL2*. Haematologica 96, 408-416.

Serghides,L., Nathoo,S., Walmsley,S., i Kain,K.C. (2002). *CD36 deficiency induced by antiretroviral therapy*. AIDS 16, 353-358.

Shah,P.K., Falk,E., Badimon,J.J., Fernandez-Ortiz,A., Mailhac,A., Villareal-Levy,G., Fallon,J.T., Regnstrom,J., i Fuster,V. (1995). *Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture.* Circulation 92, 1565-1569.

Shah,P.K. i Galis,Z.S. (2001). *Matrix metalloproteinase hypothesis of plaque rupture: players keep piling up but questions remain.* Circulation 104, 1878-1880.

Shepherd,J. (1995). *The West of Scotland Coronary Prevention Study: a trial of cholesterol reduction in Scottish men.* Am. J. Cardiol. 76, 113C-117C.

Shinoda,E., Yui,Y., Hattori,R., Tanaka,M., Inoue,R., Aoyama,T., Takimoto,Y., Mitsui,Y., Miyahara,K., Shizuta,Y., i Sasayama,S. (1999). *Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel mitogen for vascular smooth muscle cells.* J. Biol. Chem. 274, 5379-5384.

Shoulders,C.C. i Naoumova,R.P. (2004). *USF1 implicated in the aetiology of familial combined hyperlipidaemia and the metabolic syndrome.* Trends Mol. Med. 10, 362-365.

Shoulders,C.C., Jones,E.L., i Naoumova,R.P. (2004). *Genetics of familial combined hyperlipidemia and risk of coronary heart disease.* Hum. Mol. Genet. 13 Spec No 1, R149-R160.

Silva,E.F., Bassichetto,K.C., i Lewi,D.S. (2009). *Lipid profile, cardiovascular risk factors and metabolic syndrome in a group of AIDS patients.* Arq Bras. Cardiol. 93, 113-118.

Singaraja,R.R., Fievet,C., Castro,G., James,E.R., Hennuyer,N., Clee,S.M., Bissada,N., Choy,J.C., Fruchart,J.C., McManus,B.M., Staels,B., i Hayden,M.R. (2002). *Increased ABCA1 activity protects against atherosclerosis.* J. Clin. Invest 110, 35-42.

Smiljanovic,B., Grun,J.R., Steinbrich-Zollner,M., Stuhlmuller,B., Haupl,T., Burmester,G.R., Radbruch,A., Grutzkau,A., i Baumgrass,R. (2010). *Defining*

TNF-alpha- and LPS-induced gene signatures in monocytes to unravel the complexity of peripheral blood transcriptomes in health and disease. J. Mol. Med. 88, 1065-1079.

Smith,D.E., Renshaw,B.R., Ketchem,R.R., Kubin,M., Garka,K.E., i Sims,J.E. (2000). *Four new members expand the interleukin-1 superfamily.* J. Biol. Chem. 275, 1169-1175.

Smith,J.D., Trogan,E., Ginsberg,M., Grigaux,C., Tian,J., i Miyata,M. (1995). *Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 92, 8264-8268.

Sporri,B., Wiesmann,U.N., Ochsenbein,R.M., Loetscher,M., Waelti,E.R., Lottaz,D., i Bickel,M. (1998). *Soluble IL-1 receptor type I binds to human dermal fibroblasts and induces calcium flux.* FEBS Lett. 434, 283-288.

Sary,H.C., Chandler,A.B., Dinsmore,R.E., Fuster,V., Glagov,S., Insull,W., Jr., Rosenfeld,M.E., Schwartz,C.J., Wagner,W.D., i Wissler,R.W. (1995). *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association.* Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 15, 1512-1531.

Sterne,J.A., Hernan,M.A., Ledergerber,B., Tilling,K., Weber,R., Sendi,P., Rickenbach,M., Robins,J.M., i Egger,M. (2005). *Long-term effectiveness of potent antiretroviral therapy in preventing AIDS and death: a prospective cohort study.* Lancet 366, 378-384.

Stokes,K.Y. (2006). *Microvascular responses to hypercholesterolemia: the interactions between innate and adaptive immune responses.* Antioxid. Redox. Signal. 8, 1141-1151.

Stokes,K.Y., Calahan,L., Russell,J.M., Gurwara,S., i Granger,D.N. (2006). *Role of platelets in hypercholesterolemia-induced leukocyte recruitment and arteriolar dysfunction.* Microcirculation. 13, 377-388.

Stulc,T., Vrablik,M., Kasalova,Z., Marinov,I., Svobodova,H., i Ceska,R. (2008). *Leukocyte and endothelial adhesion molecules in patients with hypercholesterolemia: the effect of atorvastatin treatment*. *Physiol Res.* 57, 184-194.

Subramaniam,S., Stansberg,C., i Cunningham,C. (2004). *The interleukin 1 receptor family*. *Dev. Comp Immunol.* 28, 415-428.

Suviolahti,E., Lilja,H.E., i Pajukanta,P. (2006). *Unraveling the complex genetics of familial combined hyperlipidemia*. *Ann. Med.* 38, 337-351.

T

Takemoto,M. i Liao,J.K. (2001). *Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 1712-1719.

Takeuchi,S., Kawashima,S., Rikitake,Y., Ueyama,T., Inoue,N., Hirata,K., i Yokoyama,M. (2000). *Cerivastatin suppresses lipopolysaccharide-induced ICAM-1 expression through inhibition of Rho GTPase in BAEC*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269, 97-102.

Tascilar,N., Ekem,S., Aciman,E., Ankarali,H., Mungan,G., Ozen,B., i Unal,A. (2009). *Hyperhomocysteinemia as an independent risk factor for cardioembolic stroke in the Turkish population*. *Tohoku J. Exp. Med.* 218, 293-300.

Tedgui,A. i Mallat,Z. (2006). *Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways*. *Physiol Rev.* 86, 515-581.

Ter,A.E., Holewijn,S., van Tits,L.J., de Wit,H.M., Stalenhoef,A.F., i de,G.J. (2007). *Endothelial function in familial combined hyperlipidaemia*. *Eur. J. Clin. Invest* 37, 381-389.

Tilg,H. i Moschen,A.R. (2006). *Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity*. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 772-783.

Tontonoz,P., Nagy,L., Alvarez,J.G., Thomazy,V.A., i Evans,R.M. (1998). *PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL*. Cell 93, 241-252.

Toschi,V., Gallo,R., Lettino,M., Fallon,J.T., Gertz,S.D., Fernandez-Ortiz,A., Chesebro,J.H., Badimon,L., Nemerson,Y., Fuster,V., i Badimon,J.J. (1997). *Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques*. Circulation 95, 594-599.

Triant,V.A., Brown,T.T., Lee,H., i Grinspoon,S.K. (2008). *Fracture prevalence among human immunodeficiency virus (HIV)-infected versus non-HIV-infected patients in a large U.S. healthcare system*. J. Clin. Endocrinol. Metab 93, 3499-3504.

Trigatti,B., Rayburn,H., Vinals,M., Braun,A., Miettinen,H., Penman,M., Hertz,M., Schrenzel,M., Amigo,L., Rigotti,A., i Krieger,M. (1999). *Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 96, 9322-9327.

Tsukamoto,K., Tangirala,R., Chun,S.H., Pure,E., i Rader,D.J. (1999). *Rapid regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of ApoE in ApoE-deficient mice*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19, 2162-2170.

U

Ueda,Y., Gong,E., Royer,L., Cooper,P.N., Francone,O.L., i Rubin,E.M. (2000). *Relationship between expression levels and atherogenesis in scavenger receptor class B, type I transgenics*. J. Biol. Chem. 275, 20368-20373.

V

van der Wal,A.C., Becker,A.E., van der Loos,C.M., i Das,P.K. (1994). *Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology*. Circulation 89, 36-44.

van Wijk, J.P., de Koning, E.J., Cabezas, M.C., Joven, J., op't, R.J., Rabelink, T.J., i Hoepelman, A.M. (2006). *Functional and structural markers of atherosclerosis in human immunodeficiency virus-infected patients*. J. Am. Coll. Cardiol. 47, 1117-1123.

van, d., V, van Tits, L.J., den, H.M., Lemmers, H., Stalenhoef, A.F., i de, G.J. (2005). *Decreased adiponectin levels in familial combined hyperlipidemia patients contribute to the atherogenic lipid profile*. J. Lipid Res. 46, 2398-2404.

van, E.M., Bos, I.S., Kaminski, W.E., Orso, E., Rothe, G., Twisk, J., Bottcher, A., Van Amersfoort, E.S., Christiansen-Weber, T.A., Fung-Leung, W.P., Van Berkel, T.J., i Schmitz, G. (2002). *Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 99, 6298-6303.

van, E.M., Singaraja, R.R., Ye, D., Hildebrand, R.B., James, E.R., Hayden, M.R., i Van Berkel, T.J. (2006). *Macrophage ATP-binding cassette transporter A1 overexpression inhibits atherosclerotic lesion progression in low-density lipoprotein receptor knockout mice*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 26, 929-934.

Veerkamp, M.J., de, G.J., Hendriks, J.C., Demacker, P.N., i Stalenhoef, A.F. (2004). *Nomogram to diagnose familial combined hyperlipidemia on the basis of results of a 5-year follow-up study*. Circulation 109, 2980-2985.

Velez-Castrillon, S, Camargo, J-C, Correa, P-A, i Anaya, J-M. *Bases moleculares de la familia de la interleuquina-1*. 11. Revista Colombiana de Reumatología, 11-39. 1-4-2004.

Villarroya, F., Domingo, P., i Giralt, M. (2010). *Drug-induced lipotoxicity: lipodystrophy associated with HIV-1 infection and antiretroviral treatment*. Biochim. Biophys. Acta 1801, 392-399.

Visser, M., Bouter, L.M., McQuillan, G.M., Wener, M.H., i Harris, T.B. (1999). *Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults*. JAMA 282, 2131-2135.

von der Thusen,J.H., Kuiper,J., Van Berkel,T.J., i Biessen,E.A. (2003). *Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential*. Pharmacol. Rev. 55, 133-166.

W

Wagenknecht,L., Wasserman,B., Chambless,L., Coresh,J., Folsom,A., Mosley,T., Ballantyne,C., Sharrett,R., i Boerwinkle,E. (2009). *Correlates of carotid plaque presence and composition as measured by MRI: the Atherosclerosis Risk in Communities Study*. Circ. Cardiovasc. Imaging 2, 314-322.

Wallberg-Jonsson,S., Ohman,M., i Rantapaa-Dahlqvist,S. (2004). *Which factors are related to the presence of atherosclerosis in rheumatoid arthritis?* Scand. J. Rheumatol. 33, 373-379.

Weissglas-Volkov,D., Huertas-Vazquez,A., Suviolahti,E., Lee,J., Plaisier,C., Canizales-Quinteros,S., Tusie-Luna,T., guilar-Salinas,C., Taskinen,M.R., i Pajukanta,P. (2006). *Common hepatic nuclear factor-4alpha variants are associated with high serum lipid levels and the metabolic syndrome*. Diabetes 55, 1970-1977.

Weitz-Schmidt,G., Welzenbach,K., Brinkmann,V., Kamata,T., Kallen,J., Bruns,C., Cottens,S., Takada,Y., i Hommel,U. (2001). *Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site*. Nat. Med. 7, 687-692.

Weitz-Schmidt,G. (2002). *Statins as anti-inflammatory agents*. Trends Pharmacol. Sci. 23, 482-486.

Weitz-Schmidt,G. (2003). *Lymphocyte function-associated antigen-1 blockade by statins: molecular basis and biological relevance*. Endothelium 10, 43-47.

Wesche,H., Gao,X., Li,X., Kirschning,C.J., Stark,G.R., i Cao,Z. (1999). *IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family*. J. Biol. Chem. 274, 19403-19410.

Wierzbicki,A.S., Graham,C.A., Young,I.S., i Nicholls,D.P. (2008). *Familial combined hyperlipidaemia: under - defined and under - diagnosed?* Curr. Vasc. Pharmacol. 6, 13-22.

Wiesbauer,F., Blessberger,H., Azar,D., Goliasch,G., Wagner,O., Gerhold,L., Huber,K., Widhalm,K., Abdolvahab,F., Sodeck,G., Maurer,G., i Schillinger,M. (2009). *Familial-combined hyperlipidaemia in very young myocardial infarction survivors (< or =40 years of age)*. Eur. Heart J. 30, 1073-1079.

Williams,D. i Feely,J. (2002). *Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors*. Clin. Pharmacokinet. 41, 343-370.

Williams,H.T. (1988). *Finding the high-risk patient with coronary artery disease*. JAMA 260, 635.

Williams,K., Rao,Y.P., Natarajan,R., Pandak,W.M., i Hylemon,P.B. (2004). *Indinavir alters sterol and fatty acid homeostatic mechanisms in primary rat hepatocytes by increasing levels of activated sterol regulatory element-binding proteins and decreasing cholesterol 7alpha-hydroxylase mRNA levels*. Biochem. Pharmacol. 67, 255-267.

Wilson,M.E., Sengoku,T., i Allred,K.F. (2008). *Estrogen prevents cholesteryl ester accumulation in macrophages induced by the HIV protease inhibitor ritonavir*. J. Cell Biochem. 103, 1598-1606.

Wilson,P.W. i Culleton,B.F. (1998). *Epidemiology of cardiovascular disease in the United States*. Am. J. Kidney Dis. 32, S56-S65.

Wolter,S., Mushinski,J.F., Saboori,A.M., Resch,K., i Kracht,M. (2002). *Inducible expression of a constitutively active mutant of mitogen-activated protein kinase kinase 7 specifically activates c-JUN NH2-terminal protein kinase, alters expression of at least nine genes, and inhibits cell proliferation*. J. Biol. Chem. 277, 3576-3584.

Woollard,K.J. i Geissmann,F. (2010). *Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions*. Nat. Rev. Cardiol. 7, 77-86.

X

Xu,Y., Tao,X., Shen,B., Horng,T., Medzhitov,R., Manley,J.L., i Tong,L. (2000). *Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains*. Nature 408, 111-115.

Xu,Z., Maiti,D., Kisiel,W., i Duh,E.J. (2006). *Tissue factor pathway inhibitor-2 is upregulated by vascular endothelial growth factor and suppresses growth factor-induced proliferation of endothelial cells*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 26, 2819-2825.

Y

Yamashita,A., Matsuda,S., Matsumoto,T., Moriguchi-Goto,S., Takahashi,M., Sugita,C., Sumi,T., Imamura,T., Shima,M., Kitamura,K., i Asada,Y. (2009). *Thrombin generation by intimal tissue factor contributes to thrombus formation on macrophage-rich neointima but not normal intima of hyperlipidemic rabbits*. Atherosclerosis 206, 418-426.

Yamashita,S., Hirano,K., Kuwasako,T., Janabi,M., Toyama,Y., Ishigami,M., i Sakai,N. (2007). *Physiological and pathological roles of a multi-ligand receptor CD36 in atherogenesis; insights from CD36-deficient patients*. Mol. Cell Biochem. 299, 19-22.

Yancey,P.G., Bortnick,A.E., Kellner-Weibel,G., de,I.L.-M., Phillips,M.C., i Rothblat,G.H. (2003). *Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23, 712-719.

Yeh,E.T., Anderson,H.V., Pasceri,V., i Willerson,J.T. (2001). *C-reactive protein: linking inflammation to cardiovascular complications*. Circulation 104, 974-975.

Yeh,E.T. (2004). *CRP as a mediator of disease*. Circulation 109, II111-II114.

Yilmaz,A., Lipfert,B., Cicha,I., Schubert,K., Klein,M., Raithel,D., Daniel,W.G., i Garlichs,C.D. (2007). *Accumulation of immune cells and high expression of*

chemokines/chemokine receptors in the upstream shoulder of atherosclerotic carotid plaques. Exp. Mol. Pathol. 82, 245-255.

Yonemura,A., Momiyama,Y., Fayad,Z.A., Ayaori,M., Ohmori,R., Higashi,K., Kihara,T., Sawada,S., Iwamoto,N., Ogura,M., Taniguchi,H., Kusuvara,M., Nagata,M., Nakamura,H., Tamai,S., i Ohsuzu,F. (2005). *Effect of lipid-lowering therapy with atorvastatin on atherosclerotic aortic plaques detected by noninvasive magnetic resonance imaging.* J. Am. Coll. Cardiol. 45, 733-742.

Yoshida,M., Sawada,T., Ishii,H., Gerszten,R.E., Rosenzweig,A., Gimbrone,M.A., Jr., Yasukochi,Y., i Numano,F. (2001). *Hmg-CoA reductase inhibitor modulates monocyte-endothelial cell interaction under physiological flow conditions in vitro: involvement of Rho GTPase-dependent mechanism.* Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 21, 1165-1171.

Z

Zambon,D., Ros,E., Rodriguez-Villar,C., Laguna,J.C., Vazquez,M., Sanllehy,C., Casals,E., Sol,J.M., i Hernandez,G. (1999). *Randomized crossover study of gemfibrozil versus lovastatin in familial combined hyperlipidemia: additive effects of combination treatment on lipid regulation.* Metabolism 48, 47-54.

Zeldin,R.K. i Petruschke,R.A. (2004). *Pharmacological and therapeutic properties of ritonavir-boosted protease inhibitor therapy in HIV-infected patients.* J. Antimicrob. Chemother. 53 , 4-9.

Zhou,H., Pandak,W.M., Jr., Lyall,V., Natarajan,R., i Hylemon,P.B. (2005). *HIV protease inhibitors activate the unfolded protein response in macrophages: implication for atherosclerosis and cardiovascular disease.* Mol. Pharmacol. 68, 690-700.

Zhou,M., Zhang,Y., Ardans,J.A., i Wahl,L.M. (2003). *Interferon-gamma differentially regulates monocyte matrix metalloproteinase-1 and -9 through tumor necrosis factor-alpha and caspase 8.* J. Biol. Chem. 278, 45406-45413.

