

## **5. DISCUSSIÓ**



## I. PROTEOGLICANS I ATEROGENÈSI

Els PGs són rellevants tant en l'inici com en el desenvolupament de l'aterogènesi, tot i això, no està clara l'aportació específica de cada tipus de PG en el desenvolupament del procés ateroscleròtic. Els CSPG i HSPG presenten importants diferències estructurals i funcionals així com de localització en la paret vascular (veure *introducció secció III.2.2*), diferències que en part, han estat també evidenciades en el present treball experimental. Ens hem centrat a estudiar la contribució dels PGs en l'aterogènesi, analitzant la seva rellevància en la retenció de lipoproteïnes i en la internalització de LDL modificades per les CML, processos clau en la iniciació i progressió de la lesió ateroscleròtica (*article I i II*).

Mitjançant microscòpia electrònica observarem que la MEC de les CML i dels fibroblasts estava constituïda per una malla de filaments de col·lagen entrelaçada per filaments de PGs que eren completament degradats amb el tractament amb HSI i ChABC. D'altra banda, els estudis cromatogràfics i autoradiogràfics evidenciaren diferències significatives en la composició de PGs de les fraccions cel·lular i de la MEC entre les CML i els fibroblasts. Així, les CML presentaven un major contingut de CSPG que les MEF amb un patró de bandes clarament diferent, mentre que en les MEF els HSPG eren més abundants que en les CML. Pel que fa a les CML, els HSPG que sintetitzaven fonamentalment era perlecà mentre que el sindecà era el PG sintetitzat majoritàriament per les MEF. Aquest patró de PGs observat concorda amb el ja descrit en la bibliografia tant per les MEF (Brown CT 1999) com per les CML (Cizmeci-Smith G 1993, Lemire JM 1999).

Les diferències en el patró i propietats dels PGs segons el tipus cel·lulars, així com, la diferent distribució dels PGs en les fraccions cel·lulars evidencien l'específica contribució de cada tipus de PGs en el funcionament de la paret vascular.

### I.1. CSPG i modificació de LDL

Varis estudis han posat de manifest l'important paper que juguen els PGs en facilitar la retenció subendotelial de les lipoproteïnes (Williams KJ 1995, Skalén K 2002), fet que es considera com el procés patogènic central en l'aterogènesi (Srinivasan SR 1991, Wissler RW 1991, Simionescu N 1993, Stara HC 1994, Williams KJ 1995, Skalén K 2002). S'ha observat que els CSPG tenen capacitat per induir modificacions en les LDL (<sup>a,b</sup>Camejo G 1991, Hurt-Camejo E 1997, Camejo G 1998, Maor I 1999, Tirziu D 1999, Williams KJ 2001, *article I*).

Concretament, s'ha demostrat que l'expressió del versicà (CSPG), secretat per les CML, està incrementada en les plaques ateroscleròtiques (Wagner WD 1988, Wight TN 1989) i la seva estructura amb llargues cadenes de GAGs li confereixen una elevada afinitat per les LDL (<sup>a</sup>Camejo G 1993).

D'acord amb aquests resultats, nosaltres (*article I*) hem demostrat que el versicà presenta elevada capacitat d'agregació i fusió de les LDL inclús per exposició de les LDL durant un temps curts (2 h) i amb poques molècules de versicà (relació 1:100 proteïna de versicà: proteïna de LDL), i sota condicions fisiològiques com ja havien descrit Camejo i col·laboradors (<sup>ab</sup>Camejo G 1991), els quals observaren que la interacció dels CSPG amb l'apo-B100 induïa modificacions estructurals en aquesta (<sup>a</sup>Camejo G 1990, 1991). Les partícules fusionades obtingudes de la interacció de les LDL amb el versicà tenien un tamany semblant a les LDL obtingudes per agitació intensa (Pentikäinen MO 1996) i a les que s'han trobat en lesions ateroscleròtiques (Guyton JR 1991, Aviram M 1995). Però, així com la modificació de les LDL per agitació intensa induïa la fusió de la majoria de partícules de LDL (Pentikäinen MO 1996) permetent la separació entre partícules monomèriques i fusionades mitjançant centrifugació a baixa velocitat, la modificació de LDL per interacció amb versicà induïa una parcial fusió de les LDL, de manera que les partícules generades no podien ser separades de les partícules monomèriques mitjançant aquesta centrifugació. S'ha descrit que les modificacions estructurals produïdes pel versicà depenen de la força d'interacció entre versicà i LDL (<sup>b</sup>Hurt-Camejo E 1997). En el nostre protocol experimental, la formació de complexos versicà-LDL es realitzava mitjançant un tampó de baixa força iònica que facilitava la interacció entre el versicà i les LDL. Després de la centrifugació, la fracció precipitada era resuspensa en un tampó fisiològic amb major força iònica que afavoria la separació del versicà de les LDL, fet que feia reversible el procés d'interacció entre versicà i LDL. La reversibilitat del procés d'agregació, facilitat per les condicions d'incubació, i l'heterogeneïtat de les LDL (Nigon F 1991, <sup>b</sup>Camejo G 1993) podrien explicar la presència de partícules monomèriques i de petits agregats de LDL juntament amb les LDL fusionades de la fracció precipitable de les versicà-LDL. D'altra banda, les partícules monomèriques de les fraccions no precipitables i de la fracció filtrada de les versicà-LDL, en ésser caracteritzades, mostraren característiques electroforètiques i de tamany semblants a les LDLn.

Evidenciada la rellevància del CSPG com a agents aterogènics, deguda a la seva capacitat de modificació de LDL (*article I*), ens plantejarem estudiar la possible implicació d'aquests PGs en la internalització de LDL modificades (*article II*). Posarem de manifest que

els CSPG no contribueixen en els processos d'internalització de lipoproteïnes ni en les CML ni en els fibroblasts.

Els nostres resultats confirmen d'una banda, el paper proaterogènic que presenten els CSPG puix que són capaços de retenir i modificar les LDL de la paret vascular i evidencien un nou mecanisme mitjançant el qual els CSPG contribueixen a l'acumulació lipídica en la paret vascular sense intervenir, però, en el propi procés d'internalització. El paper dels CSPG en la progressiva acumulació de lípid en la paret vascular pot ser rellevant *in vivo* ja que s'ha descrit que la internalització de determinades LDL modificades porta a un increment en la biosíntesi de CSPG en els MØ (Ghiselli G 1998) i que el contingut de CSPG es troba incrementat durant la progressió de les lesions ateroscleròtiques (Völber W 1989, Cherchi GM 1990, Radhakrishnamurthy B 1990, Wight TN 1996).

## **I.2. HSPG i internalització de LDLag en les cèl·lules musculars llises**

Els HSPG, a diferència dels CSPG, contribueixen directament al catabolisme de diferents lligants (Mulder M 1993, Zhong-Sheng J 1993, 1997, Seo T 1997), ja que alguns d'aquests HSPG resten retinguts a la membrana cel·lular (Williams KJ 1997, Iozzo RV 1999). En l'*article II* ens proposàrem estudiar la contribució dels HSPG en la internalització de LDLag comparant els resultats entre CML i fibroblasts MEF, on prèviament s'havien realitzat la majoria d'estudis d'internalització de lligants. Nosaltres observàrem que els HSPG poden unir i internalitzar les LDLag en absència de LRP com ho demostren els resultats en els fibroblasts deficientes en LRP (PEA13). Els HSPG són essencials per l'acumulació de CE en els fibroblasts, tot i que, el LRP pot facilitar la internalització de les LDLag. Resultats que concorden amb estudis previs on s'havia descrit la contribució dels HSPG als mecanismes d'internalització cel·lulars (Williams KJ 1992, 1997, Ji ZS 1993) i amb el fet que existeix una via independent del LRP que implica els HSPG com a receptors en els fibroblasts (Al-Haideri M 1997, Zhong-Sheng J 1998, Sarafanov AG 2001) i en els MØ (Obunike JC 1994, Kounnas MZ 1995, Sehayek E 1996, Seo T 1997, Halvorsen B 1998). La cooperació entre HSPG i LRP observada en els nostres resultats és anomenat procés de transferència de lligant i ha estat demostrat per altres lligants com lipoproteïnes remanents riques en triglicèrids i apoE, i VLDL (Mulder M 1993, Zhong-Sheng J 1993, Beisiegel U 1994, Mahley RW 1994, Kounnas MZ 1995, Rohlmann A 1998, Sarafanov AG 2001). Tot i això, cal destacar que existeixen importants diferències entre el paper que exerceixen els HSPG en les CML respecte a la funció que realitzen en els fibroblasts. En les CML els HSPG no poden actuar com a receptors

---

ja que l'absència de LRP no permet la internalització de les LDLag. Així doncs, el LRP és el principal responsable de la internalització de les LDLag en les CML, tot i que, igual que en els fibroblasts hi ha certa cooperació entre LRP i HSPG. La diferent contribució dels HSPG en la captació de LDLag entre fibroblasts i CML podria ser deguda al fet que els fibroblasts expressen un elevat nombre i varietat de HSPG a diferència de les CML. En el cas dels fibroblasts, el principal HSPG de la fracció cel·lular són els sindecans. Les característiques estructural tant del nucli proteic com dels GAGs dels sindecans els confereixen una elevada afinitat amb els seus lligants fet que els fa altament eficients en els processos d'internalització. Així doncs, els sindecans podrien actuar per si mateixos com a receptors *in vitro* i podrien representar un component fisiològic important (independent de receptors) pel catabolisme de lipoproteïnes aterogèniques i d'altres lligants *in vivo* (Fuki IV 1996, 1997, Williams KJ 1997). De fet, s'ha considerat als sindecans com un dels principals HSPG que faciliten més ràpidament el catabolisme de lipoproteïnes *in vitro* (Fuki IV 1997). En canvi, en les CML el principal HSPG és el perlecà, un altre HSPG que es troba anclat a la superfície cel·lular, el qual s'ha descrit que és bastant ineficient pel què fa a la internalització de lligants però que és capaç de cooperar amb receptors de la família del rLDL (Fuki IV 1996, 2000). D'altra banda, en les diferències observades entre CML i fibroblasts també hi podria influir els nivells d'expressió i distribució del LRP en la membrana cel·lular. Així, en els fibroblast la distribució del LRP en la membrana és molt espaiada la qual cosa podria dificultar la unió de les LDLag al receptor ja que les LDLag són un lligant multimèric que per ser internalitzat requereix probablement de la unió al mateix temps a varies molècules receptores presents a la superfície cel·lular. Al contrari, les CML expressen una elevada quantitat de LRP a la membrana cel·lular (Llorente-Cortés V 2000) que podria ser suficient per unir les LDLag sense la cooperació d'altres receptors. Cal dir però, que a part dels nivells d'expressió del LRP a la membrana cel·lular, i del tipus i quantitat de HSPG expressats, en l'eficiència d'internalització també hi influeix el tamany del lligant. S'ha descrit que lligants de petit tamany com l'inhibidor de la via del factor tissular (TF), podrien ser internalitzats a través del LRP sense dependre dels HSPG en els fibroblasts (Warshawsky I 1996), fet que suggereix que la naturalesa del lligant podria ser important, també, per determinar la contribució del LRP i dels HSPG en la internalització de cada tipus de lligant.

Els nostres resultats evidencien el paper dels HSPG en la internalització de les LDLag, demostrant un nou mecanisme pel qual els HSPG contribueixen a la transformació de les cèl·lules vasculares en cèl·lules escumoses. Aquests resultats podrien tenir una gran rellevància

*in vivo* ja que s'ha observat una major expressió d'aquest tipus de PGs amb la progressió de la lesió ateroscleròtica (Hollmann J 1989, Goldberg IJ 1998) i s'ha demostrat la seva contribució en la internalització de LDL modificades les quals són responsables de la transformació de les cèl·lules vasculars en cèl·lules escumoses, elements claus al llarg de tot el procés aterogènic.

## II. PAPER DEL LRP COM A RECEPTOR LIPOPROTEIC EN L'ATEROGÈNESI

Durant l'aterogènesi a part de l'acumulació lipídica extracel·lular (Guyton JR 1994, Öörni K 2000), resultat de la retenció subendotelial de lipoproteïnes, també té lloc l'acumulació lipídica intracel·lular deguda a la transformació de MØ i CML en cèl·lules escumoses (Aqel 1985, Ross 1986). Estudis *in vitro* han evidenciat que aquesta acumulació lipídica intracel·lular deriva de la internalització de LDL modificades (Goldstein JL 1979, Yamada Y 1998) per receptors que no són regulats a la baixa pel colesterol intracel·lular (Mehta JL 1998, Tsukamoto K 2002). S'han descrit nombroses modificacions que poden patir les LDL en ésser retingudes a la paret arterial i, consegüentment, són varis els receptors capaços d'internalitzar aquestes LDL aterogèniques en les cèl·lules vasculars (veure *introducció secció II.2*). Pel que fa a les CML, el receptor més altament expressat és el LRP, receptor capaç d'internalitzar gran nombre de lligants (veure *introducció secció IV*) i que recentment en el nostre grup s'ha demostrat que és el responsable de la internalització de les LDLag, les quals indueixen una forta acumulació lipídica intracel·lular en les CML humanes (Llorente-Cortés V 2000). Donada la facilitat del versicà de modificar les LDL i la gran semblança estructural d'aquestes versicà-LDL amb les LDLag ens plantejarem analitzar si aquestes versicà-LDL eren també internalitzades pel LRP en les CML humanes en cultiu.

### II.1. LRP i acumulació lipídica intracel·lular per la captació de LDL agregades en les cèl·lules musculars llises

En l'*article I* posarem de manifest que en les CML humanes la captació de LDL modificades per interacció amb versicà portava a la formació de cèl·lules escumoses. La interacció de les LDL amb el versicà generava dos tipus de partícules, partícules fusionades i/o agregades i partícules monomèriques. Ambdós tipus de partícules eren capaces d'induir

acumulació lipídica intracel·lular però en diferent grau. Analitzant el receptor capaç de la internalització d'ambdós tipus de partícules evidenciarem que els receptors *scavenger* i els asialoglucoproteics no estaven implicats en la captació de les versicà-LDL, sinó que aquestes LDL modificades eren internalitzades per receptors de la família del rLDL. Les partícules monomèriques, igual que les LDLn, eren captades pel rLDL i, curiosament, tot i tenir característiques físiques semblants a les LDLn i de ser internalitzades pel mateix receptor, a diferència d'aquestes, induïen certa acumulació lipídica intracel·lular (encara que menor a la produïda per les fusionades i/o agregades), acumulació que es saturava ràpidament degut a la regulació a la baixa del rLDL pels nivells intracel·lulars de colesterol. La capacitat d'aquestes partícules monomèriques per produir acumulació lipídica intracel·lular podria explicar-se per la selectivitat del versicà per interaccionar amb partícules de LDL petites i denses (Hurt-Camejo E 1990), LDL amb propietats aterogèniques que tot i presentar menor afinitat pel rLDL que la resta de LDLn (degut al canvi conformacional que presenten en l'apo B) tenen un major contingut de CE (Galeano NF 1998). Els nostres resultats concorden amb els descrits per Hurt E 1990 i Hurt-Camejo E 1992 i difereixen dels estudis realitzats per Vijayagopal i col·laboradors (Vijayagopal P 1988, Vijayagopal P 1993) que indicaven que el rLDL no estava implicat en la captació dels complexos PG-LDL. Aquesta controvèrsia podria explicar-se tenint en compte la naturalesa dels complexos formats. En els seus estudis Vijayagopal i col·laboradors treballaven amb complexos significativament diferents als nostres ja que empraven una proporció de PG vers LDL superior a la que usàvem nosaltres i, realitzaven la interacció PG i LDL en un tampó que estabilitzava més la unió de PG amb les LDL, fet que podria portar a una total fusió i/o agregació de les LDL (i absència de partícules monomèriques) les quals, com han demostrat, no entren pel rLDL. Mentre que, en les nostres condicions experimentals obtinguérem unes versicà-LDL constituïdes per partícules monomèriques, que eren internalitzades pel rLDL, i de partícules fusionades que eren internalitzades pel LRP i, induïen una important i progressiva acumulació lipídica intracel·lular, segons una dosi-resposta, comparable a la produïda per les LDLag (Llorente-Cortés V 2000). Resultats que concorden amb els obtinguts en l'*article II* on hem demostrat que la presència del LRP és essencial per la internalització de les LDLag en les CML i que l'absència d'aquest receptor impedeix la formació de cèl·lules escumoses derivades de les CML. A més concorden amb el fet que les LDLag, partícules de gran similitut estructural a les versicà-LDL, són internalitzades pel LRP (Llorente-Cortés V 2000).



Així doncs, el LRP sembla ser un receptor lipoproteic fonamental per la internalització de LDL modificades en les CML humanes. Cal dir però, que el paper del LRP com a receptor lipoproteic no sempre té lloc mitjançant un mecanisme independent, sinó que, com s'ha esmentat, en funció del tipus cel·lular i de la naturalesa del lligant, aquest mecanisme pot requerir de la cooperació d'altres molècules com els HSPG. Així en els fibroblasts, tot i que el LRP contribueix a la captació de les LDLag, aquest receptor no és fonamental en el procés d'internalització de LDLag, a diferència del què succeeix en les CML. En els fibroblasts, és indispensable la presència de HSPG, sense els quals no té lloc l'adhesió de les LDLag a la superfície cel·lular, i no es produeix acumulació de CE intracel·lular.

La rellevància del LRP com a receptor clau per l'acumulació lipídica en la paret vascular ha quedat palesa amb les dades de l'*article IV*, que demostren una acumulació lipídica intracel·lular superior en aquelles CML que procedeixen de lesions ateroscleròtiques, cèl·lules que també presenten nivells d'expressió del LRP superiors al de les CML derivades de regions sanes. També hem evidenciat que l'expressió del LRP es troba incrementada amb la progressió de les lesions ateroscleròtiques, dades que concorden amb estudis previs (Moestrup SK 1992, Daugherty A 1994, Luoma J 1994, <sup>a,b</sup>Hiltunen TP 1998).

El fet que el LRP sigui un dels receptors lipoproteics més altament expressats per les CML fa que la internalització de LDL agregades (per la interacció amb PGs) mitjançant el LRP pugui ser un dels principals mecanismes implicats en la formació de cèl·lules escumoses.

## **II.2. Internalització de LDLag i expressió del LRP en les cèl·lules musculars llises**

El LRP és un receptor endocític altament expressat tant en vasos sans com en lesions ateroscleròtiques (Kristensen T 1990, Strickland DK 1990, Moestrup SK 1992, Luoma J 1994, <sup>a,b</sup>Hiltunen TP 1998). En el present treball experimental hem confirmat que el LRP és el receptor més altament expressat en les CML, de fet hem observat que el seu nivell d'expressió és molt superior al del rLDL independentment de si les CML procedeixen de regions sanes o de zones amb lesions ateroscleròtiques. Els resultats obtinguts demostraren que el contingut lipídic intracel·lular i l'entorn lipídic regulen a l'alça l'expressió del LRP. Així, observarem que l'increment lipídic intracel·lular produït per la captació de LDLag indueix una forta regulació a l'alça del LRP a nivell transcripcional, que repercuteix en una forta inducció de l'expressió proteica del receptor (*article III*). Inducció que es dona de manera més moderada per la captació de les LDLn, lipoproteïnes que produeixen una molt baixa acumulació de colesterol intracel·lular (Llorente-Cortés V 2000). Resultats que corroboren els estudis previs

---

realitzats *in vivo* en la paret vascular (Moestrup SK 1992, Luoma J 1994, <sup>a,b</sup>Hiltunen TP 1998) i amb els nostres estudis *in vivo* en model porcí (**article III**) on demostrarem un increment en l'expressió del LRP en la paret vascular d'animals amb hipercolesterolèmia induïda per dieta. Dades que també concorden amb estudis *in vivo* amb dietes riques en colesterol que produeixen un increment en els nivells d'ARNm del LRP en cèl·lules mononuclears sanguínies (Boucher P 1998) i, amb estudis en aortes de conills Watanabe que mostraren la inducció de l'expressió del LRP (Watanabe Y 1994), tot i això, cal dir que en aquest model el component cel·lular majoritari tant en les lesions primerenques com avançades són MØ infiltrats. En concordància amb aquests resultats, en l'**article IV** evidenciem que en CML procedents de regions riques en lípid (lesions ateroscleròtiques) eren capaces d'acumular major contingut lipídic intracel·lular i tenien incrementats els nivells d'ARNm i de proteïna del LRP respecte a les CML que procedien de vasos sans. Estudis *in vivo* corroboraren aquests resultats, ja que permeteren comprovar que amb la progressió de la lesió ateroscleròtica en humans s'incrementa la deposició lipídica en la paret vascular i l'expressió del LRP, i és d'aquestes regions riques en lípid d'on procedeixen les CML que expressen uns nivells més elevats del LRP (**article IV**).

D'altra banda, com a control s'analitzà l'efecte del lípid en l'expressió del rLDL. I es confirmà que el contingut lipídic intracel·lular regula a la baixa l'expressió del rLDL (Brown MS 1986) ja que la internalització de LDL<sub>g</sub> redueix quasi completament els nivells d'aquest receptor (**article III**). Aquests resultats concorden amb les dades obtingudes en l'**article IV** on es demostrà que els nivells del rLDL eren molt més baixos en aquelles cèl·lules que procedien de lesions ateroscleròtiques (regions riques en lípid) les quals *in vitro* eren capaces d'acumular uns nivells lipídics intracel·lulars superiors a les cèl·lules procedents de regions sanes (**article IV**).

Així doncs, hem demostrat que l'expressió del LRP es troba incrementada en aquelles cèl·lules que deriven d'un entorn ric en lípid i en CML que presenten elevada acumulació lipídica intracel·lular. Fet que, juntament amb la capacitat del LRP d'internalitzar LDL modificades que hem demostrat, fan pensar en el caràcter proaterogènic del LRP i la seva repercussió durant la iniciació i progressió del procés ateroscleròtic.

Com s'ha esmentat, molts gens implicats en el metabolisme lipídic estant regulats pel colesterol intracel·lular mitjançant vies de control a nivell transcripcional (rLDL, HMGCoA reductasa, Browns MS 1997) que impliquen les proteïnes SREBPs. Els resultats obtinguts

evidenciaren una regulació a la baixa de l'ARNm del SREBP-2 tant per la captació de LDLn com de LDLag, fet que explicaria perquè ambdós tipus de lipoproteïnes regulen a la baixa el rLDL. Aquesta regulació a la baixa del rLDL es veié inhibida amb el tractament amb ALLN, que en inhibir l'enzim que degrada els SREBPs mantenia uns nivells elevats del receptor, confirmant així, la implicació d'aquestes proteïnes en la regulació gènica del rLDL. El LRP, tot i formar part de la família del rLDL, no presenta seqüències SRE-1 en el seu promotor però si que se n'han localitzat en posicions poc habituals en regions 5' no traduïdes (Gaeta BA 1994). Així doncs, analitzàrem si els SREBPs també estaven implicats en la regulació de l'expressió del LRP pel contingut lipídic intracel·lular. El tractament amb ALLN demostrà que la regulació a la baixa dels SREBP-2 per la captació de LDLn i/o LDLag està implicada en la regulació a la baixa del rLDL, com ja estava descrit, i també s'ha demostrat per primera vegada que està implicada en la regulació a l'alça de l'expressió i funcionalitat del LRP. Cal dir però, que el fet que les LDLag tinguin una major capacitat d'incrementar el LRP i el fet que ambdues lipoproteïnes tinguin igual eficiència de bloquejar l'expressió del SREBP-2, indica que en el mecanisme de regulació transcripcional del LRP hi podrien intervenir altres factors de transcripció a part del SREBP-2. Els nostres resultats realitzats en CML humanes van en la mateixa línia que els publicats en MØ, on s'ha descrit que el LRP estar regulat a l'alça en cèl·lules incubades amb colesterol i amb 25-hidroxicolesterol (Kütt H 1989). A més concorden amb el fet que altres proteïnes com la proteïna microsomal de transferència de triglicèrids o la 7- $\alpha$ -hidroxilasa també es troben regulades a l'alça mitjançant una regulació a la baixa dels SREBPs (Peet DJ 1998, Sato R 1999).

La regulació a la baixa del SREBP-2 pel lípid intracel·lular observada *in vitro* concorda amb la regulació a la baixa del SREBP-2 prèviament descrita en el nostre grup en aortes d'animals hipercolesterolèmics (Rodríguez C 2001), dades que explicarien com la hipercolesterolèmia regula a l'alça l'expressió del LRP en la paret vascular mitjançant una davallada del SREBP-2 en la mateixa.

### **II.3. Internalització de LDLag mitjançant el LRP i supervivència de les CML**

L'elevada acumulació lipídica intracel·lular acaba transformant les CML en cèl·lules escumoses, fet que indica que les cèl·lules puguin patir substancials canvis a nivell fenotípic però també a nivell funcional. Durant la progressió de la lesió ateroscleròtica, procés on s'observa un increment en la deposició lipídica (*article IV*), hi ha una substancial reducció del nombre de CML en l'íntima arterial, resultats que hem confirmat per immunohistoquímica en

---

*l'article IV*. Ens proposàrem estudiar en cultius de CML si la captació de lipoproteïnes modifica l'estat proliferatiu/apoptòtic inicial de les CML ja que les CML en cultiu conserven les característiques proliferatives i el grau d'apoptosi que mostren en el teixit (Bennet MR 1995). Els nostres resultats demostren que les CML procedents de regions amb lesions ateroscleròtiques tenen menor capacitat proliferativa, menor resposta en ésser estimulades amb PDGF-BB i menor índex Bcl<sub>2</sub>/Bax respecte a CML obtingudes de coronàries sanes. Resultats que indiquen una certa tendència a l'apoptosi en les cèl·lules derivades de zones amb lesió, però cal dir que, les cèl·lules en cultiu no presentaven apoptosi ja que no s'observà sobreexpressió del gen apoptòtic CPP32. En aquestes CML procedents de lesió hem observat una major expressió del LRP i una menor proliferació, resultats que concorden amb els obtinguts per Bennet i col·laboradors (Bennet MR 1995, 1998, 1999) que demostraren que el LRP limita la proliferació de les CML (Loukinova E 2002, Boucher P 2002, 2003). El fet que les CML procedents de lesió presentin una major expressió del LRP i en conseqüència una major capacitat de captació de les LDLag fa pensar que aquesta incrementada capacitat d'acumulació lipídica podria ser la responsable de la menor proliferació d'aquestes cèl·lules i del baix índex de supervivència que presenten. Però els nostres estudis demostraren que la captació de LDLag pel LRP no era el responsable de la baixa supervivència d'aquestes cèl·lules doncs la captació de LDLag induïa un augment en la proliferació cel·lular en les CML de regions amb lesió sense modificar l'índex Bcl<sub>2</sub>/Bax ni els nivells de CPP32. Resultats que concorden amb els trobats a la bibliografia on s'ha descrit un efecte inhibitori de les LDLag en l'apoptosi induïda en MØ (Kubo N 1997) i amb altres estudis que han descrit que el LRP, l'expressió del qual es troba induïda per les LDLag, sembla tenir un paper protector front l'apoptosi (Lutz C 2002).