



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

Inflamació i Aterosclerosi

Mònica Tous Márquez
Departament de Bíoquímica i Biotecnologia
Facultat de Química
2005

Índex

R esum	5
---------------------	---

1. Introducció i objectius

1.1. Etiopatogènesi de l'aterosclerosi	6
1.2. Factors de risc de l'aterosclerosi: paper de la inflamació	10
1.3. Models animals emprats per a l'estudi de l'aterosclerosi	29
1.4. Objectius	44
Annex 1 (Taules i figures)	45
Annex 2 (Procediments normalitzats de treball)	54

2. D iscussió i C onclusions	89
--	----

B ibliografia	92
----------------------------	----

3. Resultats

Estudi 1: Aspirin attenuates the initiation but not the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice fed a high-fat, high-cholesterol diet	115
Estudi 2: Feeding apolipoprotein E-knockout mice with cholesterol and fat enriched diets may be a model of non-alcoholic steatohepatitis	120
Estudi 3: Turpentine-induced inflammation reduces the hepatic expression of the multiple drug resistance gene, the plasma cholesterol concentration and the development of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice	126

A graïments	133
--------------------------	-----

L listat de publicacions	135
---------------------------------------	-----

Resum

Resum

Els resultats d'aquesta tesi es presenten en forma de 3 articles (estudis 1, 2 i 3). En els estudis 1 i 3 s'avalua l'efecte que l'ús d'un agent antiinflamatori, pel seu potencial de reduir la inflamació vascular, té sobre l'aterogènesi. En l'estudi 3, a més, ens vam proposar determinar els efectes a llarg termini d'una inflamació crònica sobre l'inici i el desenvolupament de les lesions ateroscleròtiques en el ratolí deficient en apo E. En l'estudi 2 s'investiga l'efecte que una dieta aterogènica té sobre el desenvolupament de l'esteatohepatitis així com les relacions existents entre l'extensió i la mida de les lesions ateroscleròtiques i la severitat de les lesions hepàtiques induïdes per una dieta aterogènica en el ratolí deficient en apo E.

L'estudi 1 ha estat publicat en la revista *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, i en aquest es descriu l'efecte que l'administració d'altres dosis d'aspirina té sobre l'inici i el desenvolupament de l'aterosclerosi en el ratolí deficient en apolipoproteïna E alimentat amb una dieta aterogènica. Els resultats ens indiquen que l'aspirina té un efecte temps-dependent. En estadis inicials del procés ateroscleròtic (a les 16 setmanes d'edat) el tractament amb aspirina disminueix significativament la mida de les lesions ateroscleròtiques dels ratolins deficients en apo E, a les 24 setmanes d'edat no s'observa cap diferència pel que fa a la mida de les lesions ateroscleròtiques en relació amb els ratolins control i contràriament, en un estadi més avançat, a les 32 setmanes d'edat, aquells ratolins tractats amb aspirina presenten lesions que són significativament superiors als ratolins control. En aquest estudi es conclou que l'ús de dietes suplementades amb greix i colesterol podria ser un factor que estigués influenciant l'efecte de l'aspirina sobre l'aterogènesi i s'especula que l'efecte transitori de l'aspirina sobre l'aterogènesi podria ser conseqüència de la inhibició continuada de l'enzim ciclooxigenasa.

L'estudi 2, publicat en la revista *Molecular and Cellular Biochemistry* descriu l'efecte que una dieta amb un alt contingut en greix i colesterol té sobre l'aterogènesi i sobre el desenvolupament d'alteracions hepàtiques,

compatibles amb l'esteatohepatitis, en el ratolí deficient en apo E. Els resultats indiquen que una dieta suplementada amb greix i colesterol, no tant sols induïx el desenvolupament de l'aterosclerosi, sinó que també porta a esteatosi hepàtica en el ratolí deficient en apo E. Els efectes observats poden ser modulats dependent del tipus de dieta amb el que els ratolins són alimentats; la dieta enriquida amb oli de palma i colesterol produeix majors lesions tant hepàtiques com en l'artèria aorta dels ratolins deficients en apolipoproteïna E. S'observa una estreta relació cronològica i quantitativa entre l'esteatohepatitis i l'aterosclerosi, indicant que ambdós processos poden ser activats per un mecanisme comú i alhora poden ser agreujats mútuament.

L'estudi 3, ha estat publicat en la revista *Biochimica et Biophysica Acta*. En aquest s'estudien els efectes a llarg termini d'una inflamació crònica induïda per l'administració d'un agent inflamatori estèril i els efectes que els agents antiinflamatoris tenen sobre l'aterogènesi en aquest model animal. L'administració crònica d'un agent inflamatori, com és l'oli de turpentina, provoca una inflamació localitzada i estèril en el lloc on s'injecta la turpentina i un increment significatiu en les concentracions plasmàtiques de TNF- α i SAA. L'administració d'altres dosis d'aspirina en aquest model animal, alimentat amb una dieta pobre en greixos no produeix cap efecte sobre la mida de les lesions ateroscleròtiques. A més, els resultats obtinguts ens indiquen que tot i que, en principi, esperariem trobar que una inflamació crònica podria accelerar el procés ateroscleròtic, contràriament, observem que l'administració crònica de turpentina produeix una disminució significativa en les concentracions plasmàtiques de colesterol i en la mida de les lesions ateroscleròtiques. S'observa que la disminució en les concentracions plasmàtiques de colesterol està significativament correlacionada amb una disminució en l'expressió hepàtica del gen *mdr1b* i per tant, s'especula que els productes del gen *mdr1b* podrien jugar un paper fonamental en la regulació de la concentració plasmàtica de colesterol i en l'aterogènesi en el ratolí deficient en apo E.

I ntroducció i O bjectius

1. Introducció i Objectius

1.1. Etiopatogènesi de l'aterosclerosi

1.1.1. Definició:

El mot arteriosclerosi engloba un conjunt de trastorns del sistema vascular que fan referència a l'engruiximent i rigidesa de la paret arterial. L'aterosclerosi és una forma d'arteriosclerosi que normalment afecta a artèries de gran tamany i implica el cúmul de dipòsits de greix, colesterol, *debris* cel·lular i d'altres substàncies en la part més interna de l'artèria (1) i que poden arribar a reduir o a obstruir el flux sanguini (2) (Figura 1).

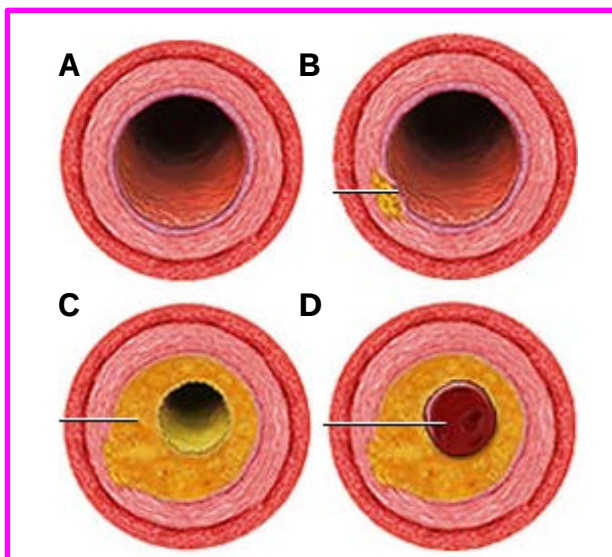


Figura 1. Desenvolupament d'una lesió ateroscleròtica en un vas sanguini.
A) Artèria sana. B) Lesió ateroscleròtica inicial.
C) Estria grassa. D) Les lesions que tenen dipòsits trombòtics visibles amb o sense hemorràgia, s'anomenen plaques fibroateromatoses complicades.

1.1.2. Patologia i patogènesi:

L'aterosclerosi és una malaltia lenta, complexa i progressiva que s'inicia en la infància i normalment progressa durant tota la vida (3). Les plaques ateroscleròtiques apareixen aviat a la vida de l'individu i al final de la segona dècada de la vida es troben lesions asimptomàtiques en la majoria dels individus de les societats occidentals. Tanmateix, l'aterosclerosi, no

mostra cap símptoma fins que el vas sanguini no està seriosament compromès. Quan les plaques es fan grans, poden limitar el flux sanguini, produint els símptomes de la isquèmia crònica, mentre que si la progressió és ràpida i va acompanyada de trombosi luminal, es produeixen les síndromes agudes (4-8). D'altra banda, les observacions clíniques i patològiques indiquen que les plaques més vulnerables i les més trombogèniques són les més riques en lípids, més que les plaques riques en col·lagen que són dures i fibroses.

Ja fa gairebé més d'un centenar d'anys, que William Osler va descriure l'aterosclerosi com una malaltia en la que es produïa un enduriment dels vasos sanguinis com a conseqüència del procés d'envelliment. Més recentment, s'ha considerat la hipercolesterolèmia com el principal causant de l'aterosclerosi. Tanmateix, els dipòsits de colesterol en la paret arterial no expliquen tots els processos que tenen lloc en el desenvolupament de la placa ateroscleròtica.

Malgrat que s'han proposat un gran nombre de teories sobre el procés ateroscleròtic, actualment s'accepta que la inflamació juga un paper fonamental en tots els estadis de l'aterogènesi (9).

L'aterogènesi s'entén com un procés complex entre els factors de risc i les cèl·lules de la paret arterial, les cèl·lules inflamatòries que són reclutades a la paret arterial i mediadors que estimulen la senyal entre les cèl·lules inflamatòries i les cèl·lules que componen la paret arterial (10-12). (Figura 2).

El desenvolupament de la placa ateroscleròtica s'inicia amb l'activació de les cèl·lules endotelials (13,14) (Figura 3.1, Annex 1). L'endoteli és reconegut com un òrgan dinàmic que participa en funcions metacrines, paracrines i endocrines, i no com un òrgan passiu (15,16). Les cèl·lules endotelials constitueixen una barrera entre la circulació sanguínia i la paret arterial, podent-se activar i transcriure així respostes a estímuls patogènics.

L'endoteli pot ser activat com a conseqüència de la interacció amb qualsevol estímul inflamatori: certs productes bacterians, o factors de risc com hiperlipèmia, hormones vasoconstrictores, els productes de glicosilació

associats amb la hiperglucèmia, o citokines proinflamatòries (4) (Figura 4).

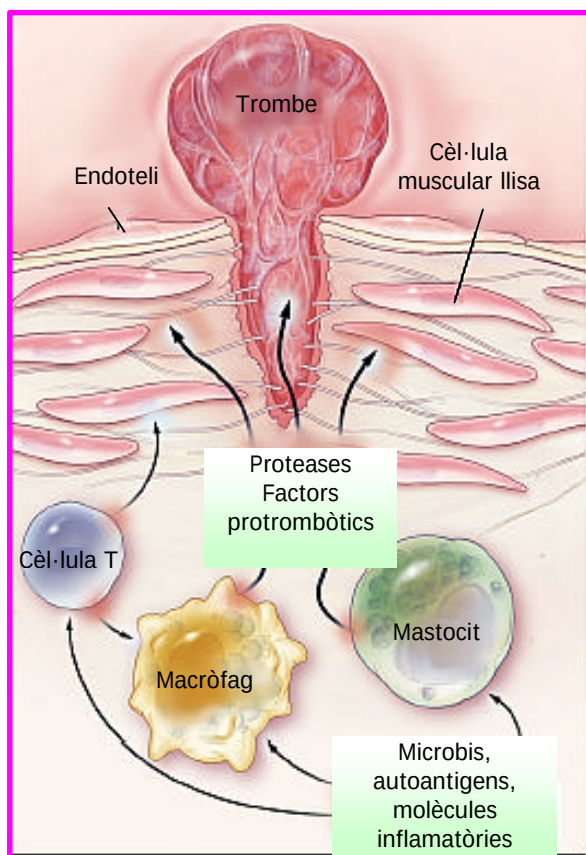


Figura 2. Inici i desenvolupament del procés ateroscleròtic. Microbis, autoantígens i molècules inflammatòries poden activar els macròfags, cèl·lules T i mastocits portant a la secreció de citokines inflamatòries que redueixen l'estabilitat de la placa. Aquestes cèl·lules també poden secretar factors protrombòtics i procoagulants que directament porten a la formació del trombe en el lloc on s'ha produït la ruptura de la placa.

Hansson. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. NEJM 2005;352.

S'ha proposat que aquests factors de risc poden actuar a través de factors de transcripció comuns, l' $\text{NF-}\kappa\text{B}$, que és responsable de l'expressió gènica inapropiada de les cèl·lules endotelials, tot i que hi poden participar moltes altres vies de senyalització.

Són varies les respostes de l'endoteli davant d'un estímul patològic: augment de la permeabilitat endotelial, l'agregació plaquetària, l'adhesió dels leucòcits i la generació de citokines (Figura 3.2, Annex 1). Una d'aquestes

respostes i la que es considera el primer pas fonamental en la formació de la lesió

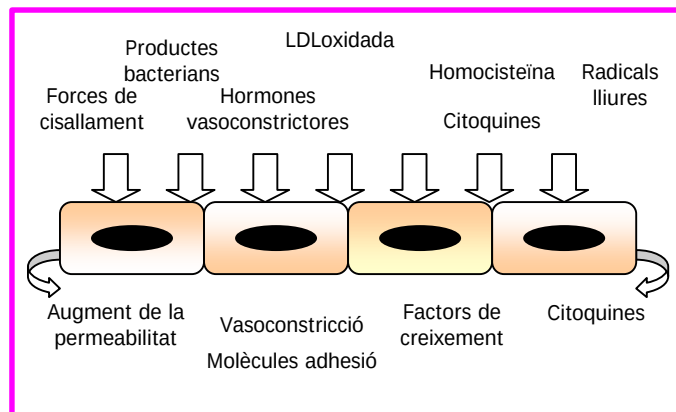


Figura 4. Factors que afecten la disfunció endotelial i conseqüències de l'activació de les cèl·lules endotelials.

ateroscleròtica, és l'augment de l'expressió de molècules d'adhesió que pertanyen a la família d'integrines i selectines i que promouen l'adhesió dels leucòcits a la superfície de la paret arterial (17).

L'endoteli activat expressa la molècula tipus 1 d'adhesió de cèl·lules vasculars (VCAM-1) i els monòcits i limfòcits que expressen receptors per VCAM-1, aconseguixen així adherir-se a la superfície endotelial (17) (Figura 3.3, Annex 1). Contràriament, l'endoteli sa resisteix a l'adhesió dels leucòcits en la seva superfície. La disminució o pèrdua de la producció d'òxid nítric, una molècula que ajuda a mantenir la reactivitat de l'endoteli i limita la trombosi i la inflamació (18,19) és una altra resposta de l'endoteli i que es considera de gran importància. A més, la pèrdua d'òxid nítric incrementa la modificació oxidativa de les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL), un pas que es considera fonamental en l'aterogènesi. L'endoteli activat també produeix substàncies vasoconstrictores com l'endotelina i angiotensina II. La secreció d'endotelina està modulada per l'acció de lipoproteïnes oxidades, per la velocitat de cisallament, per interferó gamma ($\text{IFN-}\gamma$), per interleucina-1 beta ($\text{IL-1}\beta$) i per trombina (20-22). L'endotelina i angiotensina II, promouen la proliferació de les cèl·lules musculars llises, per tant, contribuint a la formació de la placa (23). En la Taula 1 (Annex 1) s'especifiquen les funcions de totes les

cèl·lules que estan presents en la paret arterial en un vas sa i en el cas en que en aquest s'hagi iniciat un procés ateroescleròtic.

Un cop que els monòcits han migrat i s'han adherit a la superfície endotelial, travessen la superfície endotelial entre la zona d'unió de dues cèl·lules endotelials (Figura 3.4, Annex 1). La transmigració dels leucòcits adherits a la superfície endotelial depèn en part de l'expressió de molècules quimioatàctiques (LDL oxidada, lipoproteïna a [Lp(a)], proteïna quimiotàctica específica per als monòcits [MCP-1], IL-1 i el factor de necrosi tumoral-alfa [TNF- α]), regulades per senyals que s'associen amb factors de risc de l'ateroesclerosi. Un cop que els monòcits han migrat a l'interior de la paret arterial, aquests es transformen en macròfags (els quals tenen la capacitat d'ingerir lípids), per acció d'una citocina / factor de creixement produït en l'íntima inflamada i que s'anomena factor estimulador de colònies de macròfags (M-CSF). L'exposició continuada dels macròfags a M-CSF permet que aquests sobrevisquin i els possibilita la seva multiplicació en les lesions ateroescleròtiques (24). Aquest pas és de vital importància per al desenvolupament de la placa d'ateroma i està associat amb la sobreexpressió de receptors *scavenger* i receptors *toll-like* (TLRs). Els receptors *scavenger* internalitzen endotoxines, fragments cel·lulars apoptòtics i partícules LDL oxidades (25). Si el colesterol derivat de la captació de partícules LDL no pot ser mobilitzat, llavors s'acumula en el citoplasma dels macròfags, convertint-se en cèl·lules escumoses (Figura 3.5, Annex 1). D'altra banda els receptors TLRs poden iniciar una cascada de senyals que porta a l'activació dels macròfags (26) (Figura 3.6, Annex 1). El macròfag activat produeix citocines inflamatòries, proteases (metal·loproteïnases) i molècules citotòxiques entre d'altres (Figura 3.7, Annex 1). La generació de citocines i de molècules diverses per part dels macròfags / cèl·lules escumoses, porta a un major cúmul de monòcits a la placa, amplificant el seu reclutament a l'interior de la lesió (Figura 3.8, Annex 1).

Efectes similars són observats en les cèl·lules dendrítiques, mastòcits i cèl·lules endotelials que també expressen TLRs.

En la placa ateroescleròtica també són presents els limfòcits T (27, 28). En la placa d'ateroma es secreten citocines que activen la

resposta Th1. Els limfòcits T activats comencen a produir INF- γ , que activa a macròfags i cèl·lules vasculars, i per tant augmentant el procés inflamatori en la paret vascular. Per la seva banda, la producció d'INF- γ estimularà la secreció d'altres citocines inflamatòries (TNF- α i IL-1) (28) (Figura 3.8, Annex 1). La producció d'un gran nombre de citocines per les cèl·lules de la placa ateroescleròtica, pot activar una resposta inflamatòria sistèmica.

Les cèl·lules musculars llises en les lesions ateroescleròtiques mostren un fenotip diferenciat quan es comparen amb cèl·lules musculars llises d'un vas normal (29-31). Aquest canvi es caracteritza per una reducció en l'expressió de proteïnes que són típiques de les cèl·lules musculars llises diferenciades, com són les isoformes de proteïnes contràctils, alteracions en la regulació del creixement i en el metabolisme lipídic i una contractilitat disminuïda. Aquests canvis provoquen, entre d'altres, la proliferació i migració de les cèl·lules musculars llises de l'íntima a la mitja, que es considera que té un paper rellevant en el desenvolupament de la placa d'ateroma. Les cèl·lules musculars llises proliferen i constitueixen una complexa matriu extracel·lular. Juntament amb les cèl·lules endotelials i els macròfags, les cèl·lules musculars llises secreten metal·loproteïnases en resposta a senyals oxidatives, hemodinàmiques, inflamatòries i autoimmunes (Figura 3.9, Annex 1). Les metal·loproteïnases modulen un gran nombre de funcions en les cèl·lules vasculars, doncs, promouen l'activació, proliferació, migració i mort cel·lular així com la formació de nous vasos, remodelació, dany i destrucció de la matriu extracel·lular de les artèries i del miocardi (32). Malgrat tot, encara es desconeix si els canvis en l'estat de diferenciació de les cèl·lules musculars llises són la causa o conseqüència del procés patològic.

Certs constituents de la matriu extracel·lular uneixen lipoproteïnes, unint-les a l'íntima i fent-les més susceptibles a ser modificades (33). Els productes finals de la modificació de lipoproteïnes (fosfolípids oxidats i productes glicosilats), propaguen la resposta inflamatòria (34,35). En conjunt, els mediadors d'inflamació que són secretats en la placa ateroescleròtica, poden contribuir al cúmul addicional de leucòcits, la proliferació de

cèl·lules musculars llises i a la remodelació de la matriu extracel·lular.

A més de la proliferació cel·lular, la mort cel·lular (apoptosi) també té lloc en lesions ateroscleròtiques avançades (36) (Figura 3.10, Annex 1). La mort dels macròfags plens de greixos (cèl·lules escumoses) pot portar al dipòsit extra- cel·lular del factor tissular (TF) (37).

A mida que la lesió progressa, es pot produir calcificació de la mateixa (38). De fet, les plaques varien en la seva composició i consistència. Les plaques fibroses són dures, estables i sovint resistents al trencament. Són sovint innòcues, però poden desencadenar episodis d'isquèmia quan el flux està compromès (Figura 5B).

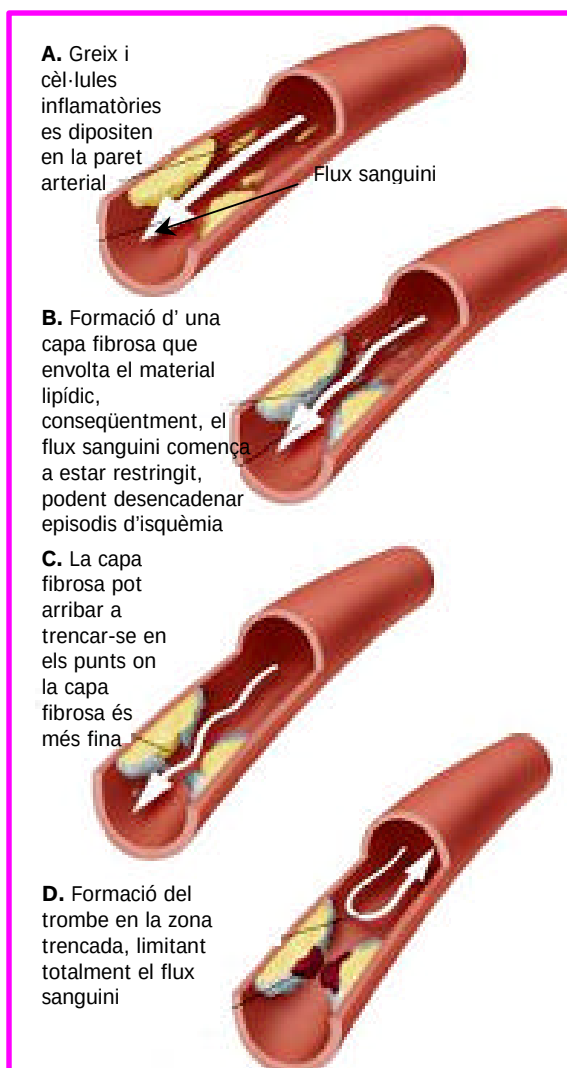


Figura 5. Progressió de la placa d'ateroma: formació d'un trombe.

Una placa vulnerable consisteix en un core ric en lípids (format pels lípids extracel·lulars que s'acumulen en l'íntima) separats del lumen vascular per una capa de teixit fibrós. Aquest core ateromatós no està vascularitzat, és hipocel·lular, sense suport de col·lagen, ric en èsters de colesterol i molt tou (39).

El trencament de la placa es dona als punts més febles, normalment aquest punt és on el cap fibrós és més fi i conté un nombre superior de cèl·lules escumoses (Figura 5C).

La integritat d'aquesta capa fibrosa està determinada per un balanç de forces entre la síntesi de materials de la matriu extracel·lular i la seva degradació, ambdós molt influenciats per estímuls inflamatoris.

Resultats de diversos estudis mostren que les metal·loproteïnases i d'altres substàncies expressades pels macròfags porten a la degradació de la capa fibrosa, resultant en una placa inestable que és susceptible a la ruptura (40).

El trencament de les plaques vulnerables té com a resultat en l'exposició de restes de la placa altament trombòtiques a la sang circulant. La trombogeneicitat de la placa està directament correlacionada amb el seu contingut de factor tissular.

Un cop que s'ha produït el trencament de la capa fibrosa, el factor tissular és exposat a la superfície de la placa i porta a la formació del trombe el qual pot arribar a colapsar tota la llum arterial (Figura 5D).

Un trombe que es desprèn de la zona on s'ha format i va cap a una altra zona de l'organisme s'anomena èmbol. Si el trombe bloqueja tota la superfície arterial d'un vas que irriga el cor es produeix un infart de miocardi i si es produeix en un vas que irriga al cervell llavors causa un accident vascular cerebral. Si l'aport de sang als braços i cames és reduït pot dificultar el moviment i causar gangrena.

1.2. Factors de risc de l'aterosclerosi: paper de la inflamació

Els factors de risc per la malaltia cardiovascular han estat identificats mitjançant llargs estudis prospectius com l'estudi *Framingham* i l'estudi dels set països (41,42). La major part dels factors de risc poden ser modificats, tractats o controlats (dislipèmia, hipertensió arterial, tabaquisme, diabetis 'mellitus', obesitat i sedentarisme), (comentats en 1.2.1). Tanmateix, existeixen alguns factors de risc que no són modificables (factors de risc hereditaris, sexe, edat...).

Una proporció substancial d'episodis cardiovasculars tenen lloc en individus sense aquests factors de risc establerts. Per tant, en els darrers anys, han estat proposats un gran nombre de nous factors de risc com a predictors de l'aterosclerosi i les seves complicacions. Entre aquests destaquen la PCR, Lp(a), fibrinògen i homocisteïna. (comentats en 1.2.2). Aquests, juntament amb els factors de risc convencionals són àmpliament emprats en la pràctica clínica per tal d'identificar pacients amb un alt risc cardiovascular i que necessiten prevenció primària.

1.2.1. El paper dels factors de risc convencionals

Hiperlipidèmia

Diversos estudis d'intervenció mostren que la reducció de les concentracions plasmàtiques de LDL-colesterol redueix significativament la morbiditat i mortalitat per malaltia cardiovascular (43-47). En aquest sentit, ha representat un gran avanç el desenvolupament de nous fàrmacs que ajuden a reduir les concentracions plasmàtiques de colesterol. El tractament amb estatines redueix de forma significativa les concentracions plasmàtiques de LDL-colesterol.

L'associació americana del cor (*American Heart Association*, AHA) considera que la concentració plasmàtica de LDL-colesterol més recomanable per a un individu adult depèn de l'existència o no d'altres factors de risc:

- < 160 mg/dL: per a individus que no tenen malaltia cardiovascular,

diabetis, i tenen com a màxim 1 factor de risc.

- < 130mg/dL: per a individus que no tenen malaltia cardiovascular, diabetis, i tenen 2 o més factors de risc.
- < 100 mg/dL: per a individus amb existència de malaltia cardiovascular o diabetis.

No obstant, sembla ser que el grau de benefici proporcionat per una disminució en els valors de LDL-colesterol és limitat, doncs tant sols s'aconsegueix reduir entre un 22 i un 35% la incidència de nous episodis cardíacs. És per aquesta raó, que ha augmentat l'interès pel control (juntament amb l'LDL-colesterol) d'altres factors de risc, com són les concentracions d'HDL-colesterol que permetin explicar la morbiditat i mortalitat residual trobada en els estudis esmentats. Les concentracions plasmàtiques d'HDL-colesterol estan inversament correlacionades amb el risc de malaltia cardiovascular (48). Aquells individus que presenten concentracions plasmàtiques d'HDL-colesterol inferiors a 40 mg/dL tenen un major risc per malaltia cardiovascular. Estudis epidemiològics indiquen que l'increment d'una unitat (1 mg/dL) en la concentració plasmàtica d'HDL-colesterol s'associa amb una disminució d'un 2-3% del risc cardiovascular (49-51).

Tot i que el concepte de transport revers de colesterol dels macròfags al fetge és el mecanisme més comú per tal d'explicar l'habilitat de l'HDL-colesterol per a inhibir l'aterosclerosi, han estat demostrades altres propietats 'in vitro' de l'HDL-colesterol que podrien contribuir als seus efectes antiaterogènics (52). Per tant, s'està fent un gran esforç per a desenvolupar noves teràpies a més de les ja existents (per exemple, els fibrats) per tal d'augmentar les concentracions plasmàtiques d'HDL-colesterol i reduir així la incidència de malaltia cardiovascular.

Els triglicèrids representen el tipus de greix més comú que es troba en l'organisme. Molts pacients amb malaltia cardiovascular o diabetis tenen concentracions plasmàtiques elevades de triglicèrids. La combinació d'elevades concentracions plasmàtiques de triglicèrids amb elevades concentracions de LDL-colesterol i

baixes concentracions d'HDL-colesterol accelera el desenvolupament de l'aterosclerosi.

Hipertensió arterial

Per a un adult sa, es considera que la pressió arterial ha de ser inferior a 120/80 mm Hg. Una pressió sanguínia elevada, incrementa l'activitat del cor, fent-lo més gran i dèbil. Aquesta qualitat fa que ambdós, el cor i les artèries siguin més susceptibles a patir una lesió. La hipertensió arterial (HTA) incrementa el risc d'infart de miocardi, apoplexies, fallida renal, i aterosclerosi. La tensió arterial tendeix a incrementar amb l'edat. La reducció d'1mm Hg. en la pressió sanguínia disminueix entre un 2-3 % el risc d'infart de miocardi. El seguiment d'una dieta adequada, la pèrdua de pes, la pràctica d'exercici regularment, la restricció del consum de sal i l'administració de fàrmacs (antihipertensius) poden ser prescrits per tal de disminuir la tensió arterial. Els fàrmacs que normalment s'utilitzen per tal de reduir la pressió arterial són els inhibidors de l'enzim que converteix l'angiotensina (ACE), bloquejadors del receptor de l'angiotensina II i antagonistes del calci. Els inhibidors d'ACE interfereixen amb la producció d'angiotensina, una molècula que causa vasoconstricció de les arterioles. Els estudis HOPE (*Heart outcomes prevention evaluation*) i EUROPA (*European trial on reduction of cardiac events with perindopril in stable coronary artery disease*) conclouen que un inhibidor d'ACE redueix significativament els events cardiovasculars (53,54).

Tabaquisme

Des de l'any 1960, en que es va proposar el tabaquisme com un factor de risc cardiovascular, s'han portat a terme un gran nombre d'estudis per tal de determinar l'activitat proaterogènica del consum de cigarretes. El risc que presenten els individus fumadors a patir un event cardiovascular és més de 2 vegades superior que el que presenten individus no fumadors. A més, els fumadors que han patit un infart de miocardi tenen més probabilitat de morir sobtadament que els no fumadors. La deshabituació del consum de cigarretes ràpidament disminueix el risc cardiovascular. El consum de cigarretes modula el perfil lipídic (augmenta la concentració de LDL-colesterol, triglicèrids i baixa la concentració d'HDL-

colesterol) (55), incrementa la capacitat d'oxidació de les partícules de LDL (56), incrementa els marcadors d'inflamació (57,58), modula la funció plaquetària (59,60), altera el metabolisme dels estrògens (61,62), augmenta els nivells de monòxid de carboni (63), modula les interaccions entre les cèl·lules endotelials i els limfòcits (64) i entre les cèl·lules endotelials i les plaquetes (65), i promou la disfunció endotelial (66,67). Aquestes dades suggereixen que el consum de cigarretes modula una gran varietat de sistemes fisiològics involucrats en l'inici i progressió del procés ateroscleròtic. D'altres estudis suggereixen que l'exposició indirecta al tabaquisme (fumadors passius) també incrementa el risc de desenvolupar una malaltia cardiovascular (68,69). Un estudi publicat recentment, proposa un mecanisme a través del qual el consum de cigarretes podria promoure la disfunció endotelial (70). Segons els autors, els metalls continguts en una cigarreta, promouen l'oxidació de proteïnes que causarien la pèrdua de la funció microtubular, desencadenant en la contracció de les cèl·lules de l'endoteli vascular.

Diabetis '*mellitus*'

La mortalitat per infart de miocardi en pacients diabètics és significativament superior que en pacients no diabètics (71,72). Tanmateix, en absència de síndrome metabòlic, la prevalença de malaltia cardiovascular en pacients diabètics és baixa (7.5 %) similar a la de la població sense diabetis (8.7 %). Es considera que un individu és diabètic quan la concentració plasmàtica de glucosa que aquest presenta en dejú és superior a 126 mg/dL. La obesitat i la inactivitat física són dos factors de risc per la diabetis de tipus II, la forma més comuna en que es manifesta aquesta malaltia. Estudis epidemiològics han dilucidat la importància del síndrome metabòlic en la diabetis '*mellitus*'. Quan ambdues condicions coexisteixen, com normalment succeeix, la prevalença de la malaltia cardiovascular és d'un 19.2 %. Els pacients diabètics normalment presenten baixes concentracions d'HDL-colesterol i concentracions elevades de triglicèrids. Molts pacients diabètics també presenten hipertensió arterial, incrementant així el risc de patir una malaltia cardiovascular. La diabetis accelera l'aterosclerosi en un gran nombre de models

animals, però en molts d'aquests models animals la diabetis també causa hiperlipidèmia severa (73-76). Tanmateix, sembla ser que la diabetis *per se* té efectes directes sobre l'aterogènesi. Renard et al. (77), van induir diabetis en el ratolí LDLR^{-/-} mitjançant la destrucció autoimmune dels illots pancreàtics i van observar que els ratolins tractats i alimentats amb una dieta pobre en colesterol, presentaven lesions ateroscleròtiques que pel que fa a la mida, eren significativament superiors als controls. A més l'administració d'insulina a aquest model animal va corregir la hiperglicèmia i la deficiència en insulina i va reduir significativament la mida de les lesions ateroscleròtiques. Sembla ser que la hiperglicèmia indueix la formació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) que pot portar a la disfunció endotelial, doncs disminueix la viabilitat d'òxid nítric i prostaciclina i incrementa la síntesi de vasoconstrictors com prostanoids i endotelina, promovent així la formació de la placa ateroscleròtica (78). També s'ha trobat que la diabetis pot afectar la progressió de les plaques ateroscleròtiques ja formades. Resultats d'estudis previs, demostren que la hiperglicèmia augmenta l'expressió de metal·loproteïnases (79) i que la infiltració dels macròfags i la formació del trombe està incrementada en les plaques avançades de pacients diabètics (80,81). D'altra banda, el factor tisular, que juga un paper fonamental en la cascada de coagulació, està incrementat en pacients diabètics que tenen poc control glicèmic (82,83).

Obesitat

Les persones amb excés de pes, tenen un risc més elevat de patir hipertensió, hipercolesterolèmia, hipertrigliceridèmia, diabetis i malaltia cardiovascular. El *Body mass index* (BMI) és una mida que es correlaciona amb el greix que una persona té en el seu organisme. El BMI es calcula relativitzant el pes d'un individu a la seva alçada.

- Valors de BMI de 18.5 a 24.9 són considerats normals,
- Si el BMI està comprés entre 25 i 29 es considera que l'individu té excés de pes.
- Si el BMI és = 30 es considera que l'individu és obès.

Petites pèrdues de greix (que representin entre un 5-10 % del greix total) poden ajudar a reduir

la hipertensió i les concentracions plasmàtiques de colesterol. A més, en alguns casos, petites pèrdues de pes, poden ajudar a controlar la diabetis.

La AHA recomana que una dona adulta consumeixi entre 1200-1550 calories/dia, mentre que un home adult hauria de consumir entre 1550-1800 calories/dia per tal de reduir el seu pes.

Sedentarisme

L'activitat física aporta molts beneficis. Les persones que practiquen exercici regularment, tendeixen a viure més anys i presenten menys malalties cardiovasculars que les que no practiquen cap mena d'exercici (84). La inactivitat física és un factor de risc per la malaltia cardiovascular. La combinació de inactivitat física i una dieta amb un contingut elevat de greixos pot desencadenar hipercolesterolèmia i excés de pes, en conjunt, facilitant l'aparició de diabetis. L'exercici regular i moderat és important per tal de reduir el risc per malaltia cardiovascular. L'activitat física pot ajudar a controlar la colesterolèmia, la diabetis i la obesitat, així com també, en alguns casos, ajudar a reduir la tensió arterial.

1.2.2. Altres factors de risc

En els darrers anys un gran nombre de nous candidats de factors de risc o marcadors han estat proposats com a predictors significatius de l'aterosclerosi i les seves complicacions (Taula 2, Annex 1). Alguns d'ells són emprats en la pràctica clínica i d'altres podrien ser utilitzats en un futur proper.

Hiperhomocisteïnèmia

La homocisteïna (Hcys) és un aminoàcid molt reactiu que és format com a producte del metabolisme de l'aminoàcid essencial metionina (85). Les cèl·lules metabolitzen la Hcys per un gran nombre de vies metabòliques involucrant enzims diversos, els quals utilitzen folat, cobalamina i piridoxina com a substrats o cofactors. Entre els anys 1960 i 1970 han estat descrites 3 mutacions diferents en el gen que codifica per la Hcys que tenen en comú que els individus que presenten aquestes mutacions presenten concentracions elevades d'Hcys en el plasma i en la orina (86,87). La meitat dels

afectats desenvolupen trombosi venosa o arterial prematura.

Aquest factor de risc pot ser parcialment millorat amb la suplementació d'altres dosis de vitamina B, comportant una disminució parcial de les concentracions d'Hcys.

Resultats d'estudis posteriors han permès associar concentracions plasmàtiques lleugerament incrementades o moderades d'homocisteïna amb la malaltia cardiovascular (88,89). Una mutació força comuna en un gen que codifica per un enzim que metabolitza la Hcys (5,10-metil-tetrahidro-folat reductasa [MTHFR]) porta a un increment moderat de les concentracions d'Hcys (25%) (90). Dos estudis confirmen increments estadísticament significatius en el *ischemic Heart disease* en individus homozigots per l'al·lel mutat (TT) comparat amb homozigots per a la forma salvatge (CC) (91,92). Estudis mecanístics han demostrat que la Hcys pot induir dany endotelial promovent l'activació plaquetària, l'estrès oxidatiu, disfunció endotelial, hipercoagulabilitat i proliferació de les cèl·lules musculars llises (85, 93,94).

Estudis recents han detectat nivells elevats de l'anió superòxid (O_2^{2-}) en pacients amb hiperhomocisteïnèmia (HHcys), resultant en una vasodilatació alterada dependent de l'òxid nítric. (85-97). L'òxid nítric regula el consum d'oxigen inhibint l'enzim citocrom c oxidasa en la cadena respiratòria mitocondrial (98-100). En el sistema cardiovascular, l'òxid nítric és sintetitzat en les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis per la sintasa endotelial d'òxid nítric, la qual té com a substrat la L-arginina. Tanmateix, l'òxid nítric reacciona ràpidament amb les espècies reactives d'oxigen i la degradació d'òxid nítric per O_2^{2-} ha estat demostrat en estudis d'aterosclerosi, hipertensió, hipercolesterolèmia, fallida cardíaca, hipertròfia cardíaca i envelliment (101-102). Un estudi recent mostra que la inactivació d'òxid nítric està significativament correlacionada amb les concentracions plasmàtiques d'Hcy; que el tractament amb antioxidants pot restaurar la regulació normal del consum d' O_2^{2-} per òxid nítric en rates amb HHcys; i que en rates amb HHcys, el O_2^{2-} produït per NADPH oxidasa redueix la viabilitat de l'òxid nítric per regular la funció mitocondrial en el miocardi (103). A més, aquest

efecte és proporcional a les concentracions plasmàtiques d'Hcys.

Lipoproteïna (a)

La Lp(a) és una *LDL-like particle* en la qual l'apolipoproteïna (a) [apo (a)] està unida mitjançant un pont disulfur a l'apo-B (104). Les concentracions de Lp(a) estan controlades per factors genètics i varien substancialment entre individus, dependent de la mida de la isoforma d'apo (a) present. A diferència d'altres lipoproteïnes com LDL i HDL, els nivells de Lp(a) varien poc amb la dieta o l'exercici físic (105). El gran rang de concentracions plasmàtiques de Lp(a) en la població és degut en part per la gran variació de repeticions *plasminogen-like kringle* IV i a la correlació existent (inversa) entre el nombre de repeticions *kringle* IV tipus 2 en el gen apo(a) i la concentració plasmàtica de Lp(a) (106). La funció biològica de Lp(a) és encara desconeguda, tot i que hi han estudis que evidencien que podria respondre a lesions vasculars, la prevenció de la invasió de patògens infecciosos a les cèl·lules i promoure la curació de les lesions formades (107). La Lp(a) és una proteïna de fase aguda que s'uneix a les cèl·lules endotelials, macròfags, fibroblasts, plaquetes i a la matriu extracel·lular, on pot promoure la proliferació de les cèl·lules musculars llises i la quimiotaxi dels monòcits (108-112). Tanmateix, es considera que la Lp(a) pot jugar un paper més important en l'aterotrombosi, inhibint el procés de fibrinolisi en els llocs on existeix dany tissular. Sembla ser que la Lp(a) podria competir amb el plasminògen per la unió als receptors de plasminògen, fibrinogen i fibrina (113). Un metaanàlisi d'un total de 27 estudis prospectius indica que aquells individus que presentaven concentracions basals més elevades de Lp(a) tenien major risc cardiovascular (114). Malgrat aquests resultats, la utilització de la Lp(a) com a eina per tal d'explorar l'existència o no de malaltia té algunes limitacions, com per exemple, el mètode de determinació de Lp(a) no està estandarditzat. A més, les concentracions de Lp(a) quasi bé no són modulables per les teràpies que s'utilitzen per a disminuir les concentracions d'altres lipoproteïnes, a excepció de la teràpia amb àcid nicotínic, la qual sovint no és tolerada (115). Per aquesta raó ha

estat difícil poder demostrar l'efecte de les concentracions de Lp(a) sobre la malaltia cardiovascular, doncs no s'han pogut portar a terme estudis d'intervenció i d'altra banda, tampoc s'han dissenyat estudis amb models animals d'aterosclerosi que tinguin per objectiu determinar el paper que la Lp(a) juga en l'inici i progressió de l'aterosclerosi.

Fibrinògen

El fibrinògen és una glicoproteïna circulant que actua en el darrer pas de la cascada de coagulació com a resposta a lesions vasculars i tissulars (116). A més del seu paper en la trombosi, el fibrinògen es considera que podria participar en:

- la regulació de l'adhesió de cèl·lules, quimiotaxi i proliferació (117)
- la vasoconstricció en zones on s'ha produït lesió vascular (116)
- l'estimulació de l'agregació plaquetària (118)
- la determinació de la viscositat sanguínia (119)

A més el fibrinògen és una proteïna de fase aguda; la seva síntesi hepàtica pot incrementar fins a 4 vegades com a resposta a un agent infeccios o inflamatori (120)

Estudis previs indiquen que existeix una associació independent entre concentracions plasmàtiques elevades de fibrinògen i la morbiditat i mortalitat cardiovascular. Així, dos metaanàlisis recents demostren un factor de risc significatiu per als individus en el quartil superior de la concentració basal de fibrinògen comparat amb aquells que estan en el quartil inferior (118,121). D'altres estudis han demostrat associacions entre el fibrinògen i la isquèmia (120, 122,123) i la malaltia vascular perifèrica (124,125), independentment dels factors de risc clàssics. La concentració plasmàtica de fibrinògen pot ser modulada per molts factors, a més de la inflamació. Existeix una relació dosi-dependent entre el nombre de cigarretes fumades i els nivells de fibrinògen (126). Les concentracions de fibrinògen tendeixen a ser superiors en pacients amb diabetis, hipertensió arterial, obesitat i en aquells individus amb un estil de vida sedentari (121). S'ha descrit que els fibrats i la niacina poden disminuir els nivells de fibrinògen. Per contra, l'aspirina i les estatines no són capaços de modular les concentracions

de fibrinògen (127). A més, certs estudis mostren que malgrat una reducció en la concentració de fibrinògen, no s'obté una reducció en la incidència d'events cardiovasculars (128). Són necessaris d'altres estudis clínics que permetin establir si el fibrinògen és un factor de risc cardiovascular o tant sols desenvolupa un paper en l'aterotrombosi.

Lipoproteïnes remanents

Concentracions elevades de LDL-colesterol s'associen amb un increment de risc per malaltia cardiovascular, per això, la mesura de LDL-colesterol continua constituint la principal diana per a la prevenció de la malaltia cardiovascular. No obstant, s'ha de tenir en compte la heterogeneïtat de les partícules LDL així com el grau d'aterogeneïtat d'altres lipoproteïnes, com per exemple les lipoproteïnes remanents. Les partícules LDL petites i denses són molt aterogèniques i concentracions elevades de LDL oxidada incrementen el risc per malaltia cardiovascular. Concentracions elevades de triglicèrids augmenten el risc per futurs events cardiovasculars, però la concentració de partícules remanents associades amb l'apo C-III estan més relacionades amb el desenvolupament de l'aterosclerosi que les concentracions de triglicèrids *per se* (129). Estudis previs evidencien una relació inversa entre el la mida de les lipoproteïnes i la seva habilitat a creuar la barrera endotelial per tal de penetrar en l'íntima arterial. Per tant, certes lipoproteïnes riques en triglicèrids són aterogèniques, mentre que d'altres no ho són. Un estudi realitzat amb pacients amb diabetis '*mellitus*' tipus 2 que no rebien cap teràpia per tal de reduir les concentracions plasmàtiques de lípids, va concloure que la severitat de la malaltia cardiovascular està relacionada amb el nombre de partícules remanents riques en triglicèrids que presentaven aquests pacients en dejú (130). En l'estudi *Framingham Offspring*, la mitjana de les partícules remanents (colesterol i triglicèrids) va resultar ser significativament més elevada en pacients diabètics que en els respectius controls (131). Alguns autors especulen que la quantitat de lipoproteïnes remanents en dejú podrien ser un reflex del nombre de lipoproteïnes remanents que s'acumularien en el postpandri i predir futurs

events cardiovasculars independentment d'altres factors de risc. Els resultats del *Monitored Atherosclerosis Regresión Study* evidencien que existeix una forta correlació entre la progressió de la malaltia cardiovascular i les concentracions de les lipoproteïnes remanents riques en triglicèrids (132). Un estudi recent realitzat amb un total de 1156 individus procedents del Japó, reforça l'ús dels valors basals de lipoproteïnes remanents (riques en colesterol i riques en triglicèrids), doncs les concentracions de lipoproteïnes remanents s'associen significativament amb la malaltia cardiovascular, independentment de l'existència d'altres factors de risc, colesterol total o HDL- i LDL-colesterol (133). Malgrat els resultats, els autors d'aquest estudi conclouen que els valors de les concentracions de lipoproteïnes remanents no aporten informació addicional sobre el risc per malaltia cardiovascular a la que aportarien les concentracions de triglicèrids.

1.2.3. Marcadors d'inflamació: Inflamació i aterosclerosi

L'aterosclerosi és una malaltia caracteritzada per la presència d'una inflamació crònica en l'artèria. Per aquesta raó, resulta d'especial interès la possibilitat d'identificar estadis subclínic de l'aterosclerosi mitjançant la mesura de molècules inflamatòries circulants. D'entre la gran varietat de marcadors d'inflamació que s'han proposat en els darrers anys, la mesura de la PCR, constitueix una de les determinacions més emprades en la pràctica clínica diària per tal de predir el risc per malaltia cardiovascular.

Proteïna C-reactiva

La PCR és una proteïna de fase aguda expressada quasi bé exclusivament pels hepatòcits durant la resposta inflamatòria que s'inicia com a conseqüència del dany tisular o infecció (134). La síntesi hepàtica de PCR és estimulada per la IL-6 i d'altres citoquines proinflamatòries i la seva concentració plasmàtica pot augmentar fins a 100 vegades en les 24-48 primeres hores durant un procés inflamatori. Ridker et al. van ser els primers que van determinar que les concentracions basals de PCR poden predir el risc per al desenvolupament d'infart de miocardi en individus aparentment sans (135). Posteriorment, es va trobar la

mateixa associació en dones aparentment sanes que participaven en el *Women's Health Study* (Figura 6) (136).

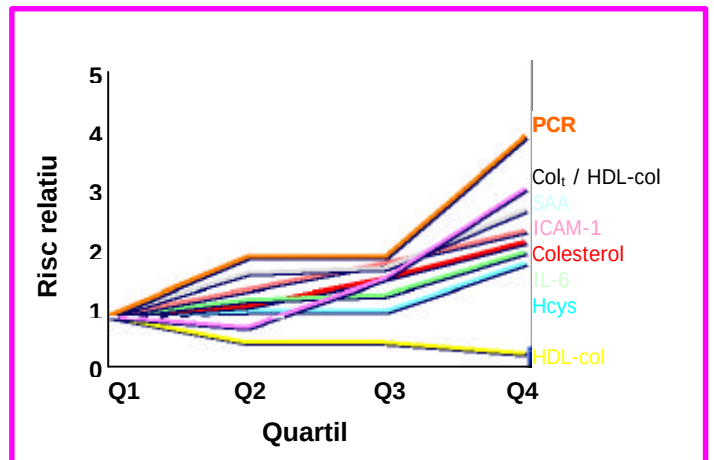


Figura 6. Marcadors d'inflamació i risc per malaltia cardiovascular: resultats del *Women's Heart Study*.

A més, en el *Women's Health Study* també es van mesurar d'altres marcadors d'inflamació, com la proteïna sèrica amiloide A (SAA), IL-6 i ICAM-1. Tanmateix, la concentració sèrica de PCR continua essent el millor predictor del risc per la malaltia cardiovascular.

La concentració sèrica de PCR pot ser incrementada per factors diversos: el consum de cigarretes, existència de malalties amb un component inflamatori, obesitat i els nivells d'estrogens. D'altra banda, l'aspirina, les estatines i tiazolidineones tendeixen a disminuir les concentracions sèriques de PCR. Es considera que aquells individus amb concentracions sèriques de PCR < 1 mg/L tenen un baix risc per malaltia cardiovascular; si el valor està comprès entre 1-3 mg/L llavors es considera que tenen un risc moderat i si les concentracions de PCR > 3 mg/L es considera que aquests individus tenen un alt risc per malaltia cardiovascular.

Tot i que la PCR és un marcador molt utilitzat que prediu el risc per malaltia cardiovascular, no està clar si la PCR podria participar directament en l'amplificació de la resposta immune i per tant resultant en un dany tisular superior. De fet, diversos estudis mostren que la PCR té la capacitat d'unir-se a teixits danyats, a antígens nuclears, a lipoproteïnes i a cèl·lules apoptòtiques. A més, participa en l'activació del

complement (137). Tal com es descriu en l'apartat 3.2.2.3 F, s'han atribuït funcions diverses a la PCR que suggereixen que la PCR no és únicament un marcador d'inflamació, sinó que també podria amplificar la resposta inflamatòria que té lloc en la paret vascular. Tanmateix, resultats d'estudis recents realitzats en models murítics d'aterosclerosi no suporten la hipòtesis que la PCR té un paper proaterogènic 'in vivo' (Veure 3.2.2.3. F)). S'ha de tenir en compte que tal com comenta Reifenberg et al. no està clar si la PCR i el complex PCR/LDL poden tindre la mateixa capacitat d'activar el complement en ratolins respecte a humans (138). En la figura 7 es resumeixen algunes de les explicacions possibles de l'associació existent entre els nivells de PCR i el risc per malaltia cardiovascular.

Molècules d'adhesió solubles (P-selectina, ICAM-1, VCAM-1)

L'adherència i conseqüent migració dels leucòcits a través de l'endoteli vascular està mediat per les molècules d'adhesió vascular i cel·lular. Després de l'activació per part de les citokines, les molècules d'adhesió són expressades en la superfície endotelial i dels leucòcits. Tot i que no està clar el paper que podrien tindre les molècules d'adhesió circulants, aquestes molècules podrien servir com a marcadors de l'activació endotelial i la inflamació que està tenint lloc en la paret vascular.

Els resultats del *Women's Health Study* suggereixen que la P-selectina és un factor de risc independent per la malaltia cardiovascular (136). Es considera que el risc per futurs episodis cardiovasculars entre les dones que estan en el quartil superior, és 2.2 vegades més gran que aquelles dones que estan en el quartil inferior ($p=0.01$).

D'altra banda, resultats del *Physicians' Health Study* (PHS) apunten que els nivells basals de la forma soluble sICAM-1 són predictors independents del risc cardiovascular (139). L'estudi *atherosclerosis Risk in Communities* conclou que sICAM-1 és un predictor independent per la malaltia cardiovascular (140). Pel que fa a la forma soluble VCAM-1, cap dels dos estudis esmentats han trobat una associació entre els nivells de VCAM-1 i el risc per malaltia cardiovascular. De fet, en la placa d'ateroma, ICAM-1 s'expressa en les cèl·lules endotelials i macròfags, mentre que VCAM-1 no s'expressa tant eficientment i només es troba en les cèl·lules endotelials. Tal com es comenta en el punt 3.2.2.3., en estudis en models murítics d'aterosclerosi en que s'ha inactivat els gens que codifiquen per P, E-selectina, VCAM-1 i ICAM-1 s'ha observat que en cadascun d'aquests models animals, la mida de les plaques ateroscleròtiques és significativament inferior als respectius controls, suggerint, que la concentració plasmàtica d'aquestes molècules està associada al procés ateroscleròtic que està tenint lloc en la placa d'ateroma.

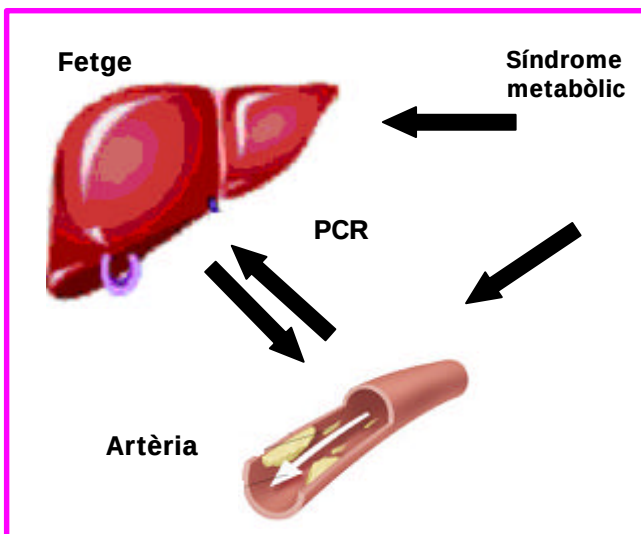


Figura 7. Possible explicació de l'associació entre la Proteïna C-reactiva (PCR) i la malaltia cardiovascular.

- (1) Les citokines que s'alliberen de les artèries amb aterosclerosi indueixen l'expressió de PCR en el fetge.
- (2) Les alteracions metabòliques acceleren tant el desenvolupament de la placa ateroscleròtica com també la producció hepàtica de PCR.
- (3) la producció hepàtica de PCR pot accelerar el desenvolupament de les lesions ateroscleròtiques.

Nilsson J. CRP-Marker or maker of cardiovascular disease?
A,T,VB 2005;25:1527-1528

Citoquines proinflamàtòries (IL-6, TNF- α)

Concentracions plasmàtiques elevades de TNF- α en una fase estable després de l'infart de miocardi, s'han associat amb un risc incrementat d'episodis vasculars recurrents (141). D'altra banda, els valors basals de TNF- α també poden predir el risc per malaltia cardiovascular.

Tanmateix, el temps de vida mitja de TNF- α en el plasma és baix, una característica que limita el seu ús en la pràctica clínica com a eina de diagnòstic. En un anàlisi posterior del PHS es va trobar que els nivells basals d'IL-6 van ser superiors en individus aparentment sans que posteriorment van tindre un infart de miocardi (142). La PCR va ser la variable que es va trobar estar més associada a la IL-6, doncs la IL-6 estimula la producció hepàtica de PCR. La relació nivell IL-6 i risc cardiovascular, ha de ser avaluada després d'haver ajustat per la concentració de PCR.

Un anàlisi posterior del WHS, apunta al fet que afegir la mesura de PCR, IL-6, SAA o ICAM-1 als valors obtinguts en el test lipídic, millora la predicció del risc cardiovascular comparat amb els valors aportats tant sols pel test lipídic.

El paper que la IL-6 i TNF- α podrien tenir en l'aterogènesi, es comenta en l'apartat 3.2.2.3.

Altres proteïnes de fase aguda

Existeixen un gran nombre de proteïnes de fase aguda que permeten seguir un procés inflamatori agut, doncs generalment, les seves concentracions són elevades poques hores després d'haver induït una resposta inflamatòria i al llarg del temps, retornen als seus valors basals (Figura 8). Segons s'observa en la figura 8, les concentracions de PCR i SAA varien substancialment davant d'un procés inflamatori agut.

El fetge expressa SAA1 i SAA2 com a resposta a una inflamació sistèmica. Les cèl·lules extrahepàtiques, com són els macròfags i adipòcits són la principal font de producció de SAA3, com a resposta també a un estímul inflamatori (143,144). SAA4 és expressat constitutivament en el fetge (145).

En humans, només existeixen tres gens funcionals, doncs SAA3 és un *pseudogen* que no és transcrit. Tot i que SAA és produït pel fetge, SAA1, SAA2 i SAA4 també poden ser expressats per cèl·lules extrahepàtiques (146).

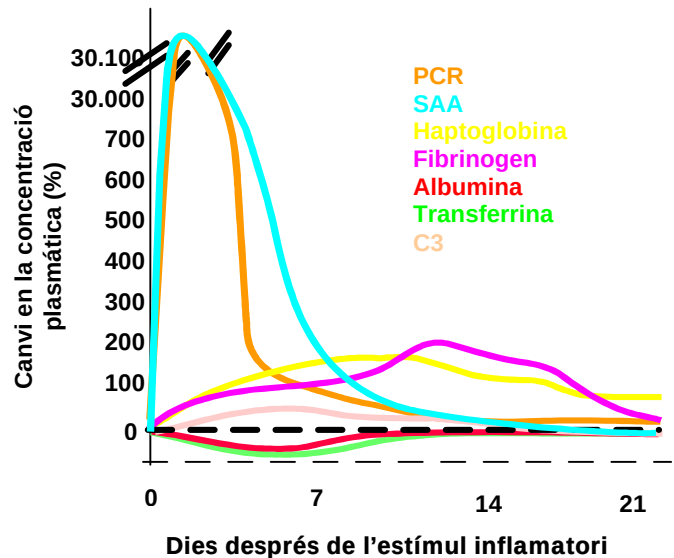


Figura 8. Canvi en la concentració plasmàtica dels principals marcadors d'inflamació (expressat en %) fins a 21 dies després d'haver induït una resposta inflamatori.

Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. N Engl J Med 1999;340:448-454.

És d'especial interès destacar que s'ha detectat mRNA de SAA en els principals tipus cel·lulars que constitueixen les lesions ateroscleròtiques (146).

Tant en humans com en ratolins, les concentracions plasmàtiques de SAA1 i SAA2 poden augmentar significativament com a resposta a un estímul inflamatori (147,148). L'expressió de SAA de la mateixa manera que la PCR, és induïda per TNF- α i IL-6 i pot predir futurs events cardiovasculars (141,142). Estudis recents han demostrat l'associació entre les concentracions de PCR i de SAA amb un increment del risc cardiovascular (149-152). Tanmateix, concentracions elevades de SAA s'associen amb un gran nombre de factors de risc ateroscleròtics, com són la obesitat, la resistència a la insulina, el síndrome metabòlic i l'artritis reumatoide (153-158). No està clar si SAA és tant sols un marcador del risc cardiovascular, o bé també podria desenvolupar algun paper en el procés ateroscleròtic. La major part del SAA circula en el plasma amb les HDL, però també amb les VLDLs (159) i també es pot trobar de forma lliure. Els remanents d'HDL i VLDL s'acumulen en les

lesions ateroscleròtiques. SAA conté dominis d'unió a proteoglicans, per tant, és possible que SAA pogués mitjançar la retenció de les partícules HDL en la matriu extracel·lular (159,160).

Un estudi recent en el que s'utilitzen ratolins apo E^{-/-} i LDLR^{-/-} demostra l'existència de SAA en les plaques ateroscleròtiques que desenvolupen aquests models murítics d'aterosclerosi i suggereix que SAA podria augmentar la retenció de les partícules VLDL en la lesió ateroscleròtica (544) (Veure 3.2.2.3.). D'altra banda, un estudi en el que s'utilitzen ratolins LDLR^{-/-} mostra que alimentar a aquests ratolins amb dietes suplementades amb greix i colesterol incrementa les concentracions plasmàtiques de SAA, sense afectar a les concentracions plasmàtiques dels lípids circulants (161). Nosaltres hem trobat que l'administració d'un agent inflamatori (turpentina) causa en el ratolí apo E^{-/-} un increment de fins a 30 vegades en les concentracions plasmàtiques de SAA (Estudi 3). D'altres funcions han estat atribuïdes a SAA: mitjançar l'expressió de proteïnases que podrien degradar la matriu extracel·lular (162,163), promoure la unió d'HDL a macròfags i cèl·lules endotelials (164), alterar el flux de colesterol per mecanismes dependents i independents d'ABCA1 (165), promoure la quimiotaxi i l'adhesió de monòcits, leucòcits polimorfomuclears i limfòcits T (166-168) i incrementar la quantitat de colesterol alliberat a les cèl·lules perifèriques (169,170). SAA pot tindre tant efectes aterogènics com anti-aterogènics (171).

Estudis '*in vitro*' han demostrat que SAA pot desplaçar l'apo A1 de les HDL (172). La composició de les partícules d'HDL pot variar com a resposta a una inflamació aguda induïda per LPS (173). Per tant, aquests canvis es podrien traduir en canvis a nivell de l'expressió hepàtica d'aquelles apolipoproteïnes que constitueixen l'HDL, particularment, SAA, l'apo A1 i paraoxonasa.

Son necessaris futurs estudis per tal d'aclarir si SAA desenvolupa un paper proaterogènic o anti-aterogènic en l'aterogènesi.

El que està clar és que nivells elevats de SAA circulants indiquen que està tenint lloc una resposta inflamatòria en l'organisme i per tant, s'ha d'esbrinar quina és la causa inicial que ha

portat a l'increment de SAA. D'entre les possibles causes que poden desencadenar aquesta resposta inflamatòria, s'ha de tenir en compte que (1) un procés ateroscleròtic pot portar a un increment en la concentració plasmàtica de SAA i (2) que qualsevol procés inflamatori extravascular pot afavorir la formació de la placa ateroscleròtica.

Paraoxonasa

L'enxim paraoxonasa (PON) pertany al grup d'esterases de tipus A, que protegeixen a les cèl·lules del dany cel·lular provocat per diversos compostos organofosforats (174, 175).

Existeixen tres gens paraoxonasa coneguts: PON1, PON2 i PON3. La isoforma PON1 és sintetitzada en el fetge i transportada en el plasma unida a l'HDL (176). L'activitat enzimàtica i les concentracions de proteïna de PON1 són inhibides durant la resposta de fase aguda, tant en animals com en humans (177-179). L'expressió de PON1 en cèl·lules HepG2 que estan exposades a LDL oxidada disminueix i també en teixit hepàtic de ratolins alimentats amb una dieta aterogènica (180, 181). La deficiència en PON1 resulta en un increment de la mida de les lesions ateroscleròtiques i s'associa amb un increment en la quantitat de fosfolípids oxidats (182, 183).

A més, els ratolins que sobreexpressen PON1 estan protegits davant de l'aterosclerosi i les LDL aïllades d'aquests animals semblen tenir menys lípids oxidats (184).

Estudis '*in vitro*' demostren que l'enzim PON1 associat a l' HDL inhibeix la peroxidació lipídica i a més degrada lípids oxidats presents en les partícules LDL (185, 186-190).

En conjunt aquestes dades suggereixen que l'enzim PON1 associat a les HDL pot previndre l'aterosclerosi inhibint l'oxidació lipídica (186,192).

Alguns estudis han trobat una associació entre l'existència de polimorfismes en la posició 192 de PON1 i el risc per malaltia cardiovascular (193, 194). Posteriorment, s'ha proposat que l'activitat enzimàtica més que l'existència de polimorfismes juga un paper important en la malaltia cardiovascular (195).

Tanmateix, no és ben coneguda la funció fisiològica específica de PON1 en l'organisme. Aquesta, junt amb d'altres

limitacions com per exemple, que el substrat de la PON1, l'ió paraoxon és molt tòxic, fan que no sigui gaire freqüent la seva mesura com a indicador del grau de risc cardiovascular.

Nombre de leucòcits

L'aterosclerosi és un procés inflamatori crònic que es caracteritza pel reclutament inicial de leucòcits i que perdura durant la maduració de la placa i el procés de ruptura. Varis tipus de cèl·lules inflamatòries (monòcits, limfòcits, eosinòfils i neutròfils) han estat implicats en la malaltia cardiovascular (196,197). Nombrosos estudis clínics i epidemiològics han demostrat que l'augment en el nombre de leucòcits circulants és un marcador de risc cardiovascular (198, 199). D'aquests, un gran nombre d'estudis s'han portat a terme en poblacions en que aparentment, no tenien malaltia cardiovascular i a més de mostrar una clara correlació entre el comptatge de leucòcits i el risc per malaltia cardiovascular (200-203), es va observar que la correlació persistia després d'haver ajustat per d'altres factors de risc (204-206). A més aquesta correlació sembla ser especialment elevada en individus fumadors. Un estudi retrospectiu de 5 anys de duració, va mostrar que no tant sols nivells basals elevats del nombre de leucòcits estaven correlacionats amb el desenvolupament de síndromes coronaris aguts, sinó que també els valors basals del nombre de leucòcits eren significativament superiors en pacients amb malaltia cardiovascular establerta que en aquells pacients que no tenien malaltia cardiovascular significativa (207).

Diversos estudis han demostrat que a més, el comptatge del nombre de leucòcits poden tenir valor pronòstic de futurs events cardiovasculars en aquells pacients que ja tenen la malaltia establerta (208-217).

Els possibles mecanismes d'acció pels quals els leucòcits poden influenciar el desenvolupament de la malaltia cardiovascular es mostren a la taula 3 (Annex 1).

Respecte a l'associació entre el nombre de leucòcits amb d'altres factors de risc cardiovascular; el comptatge de leucòcits s'ha associat amb les següents variables:

tabaquisme, concentracions plasmàtiques de colesterol, triglicèrids, hematocrit, nivells de glucosa basals i pressió sanguínia diastòlica.

D'altra banda, s'ha vist que el nombre de

leucòcits està inversament correlacionat amb la concentració sèrica d'HDL-colesterol.

Una teoria que explicaria la relació existent entre el nombre de leucòcits, hiperlipidèmia i resistència a la insulina, podria ser que els triglicèrids i la glucosa poden induir l'activació dels leucòcits, tal com s'ha demostrat '*in vitro*' (219,220) i en pacients hipertrigliceridèmics (221).

van Oostrom et al. han demostrat que en el postpandri, un cop que els triglicèrids i la glucosa han augmentat, el comptatge de neutròfils incrementa, a més s'observa un augment en la producció de citokines i en l'estrès oxidatiu, per tant, contribuint a la disfunció endotelial (222,223). Aquests mateixos autors, han observat que en la fase postpandrial, a mida que augmenta la concentració plasmàtica de triglicèrids, hi ha un increment temporal del contingut de greix en els neutròfils, a més, també s'observa que augmenta l'expressió dels marcadors d'activació de neutròfils i monòcits. Tot i que els neutròfils no s'expressen en les plaques ateroscleròtiques, els autors suggereixen que l'activació dels neutròfils que resideixen a prop de l'endoteli vascular podria donar lloc a la producció de mediadors pro-inflamatoris, com citokines i espècies reactives d'oxigen que en conjunt, portarien a la disfunció endotelial (224).

D'acord amb aquesta hipòtesi, un estudi realitzat en un model animal d'aterosclerosi, demostra la 'invasió' de neutròfils a la placa ateroscleròtica (225). A més, l'expressió incrementada de molècules d'adhesió i d'altres marcadors de neutròfils i monòcits ha estat descrita en pacients amb síndromes coronaris aguts (226,227). Els neutròfils poden facilitar el trencament de la placa ateroscleròtica, per l'alliberació de radicals superòxid, enzims proteolítics i metabòlits de l'àcid araquidònic. A més, juntament amb les plaquetes, els neutròfils es poden agregar, promovent isquèmia/ infart de miocardi (218, 228-231).

Recentment, hem iniciat un estudi que té per objectiu determinar el conjunt de canvis que tenen lloc en les cèl·lules inflamatòries durant el postpandri en ratolins apo E^{-/-} i LDLR^{-/-}. Tot i que el projecte es troba en una fase molt inicial, resultats preliminars ens indiquen que durant el postpandri, en els ratolins apo E^{-/-} i LDLR^{-/-} de la mateixa manera que en els humans, hi ha un

augment en el nombre de leucòcits coincidint amb l'increment en les concentracions plasmàtiques de triglicèrids i a més, s'observa un increment en la quantitat de greix present en l'interior dels neutròfils (Figura 9). D'acord amb els resultats obtinguts per van Oostrom et al. aquest increment en el nombre de leucòcits aniria acompanyat per una activació dels neutròfils, per tant, suggerint que la hiperlipidèmia (durant el postpandri) pot induir una resposta inflamatòria la qual alhora, podria induir a llarg termini el desenvolupament de plaques ateroescleròtiques. Són necessaris futurs estudis que ajudin a dilucidar el paper que els leucòcits tenen sobre l'aterogènesi, així com determinar possibles mides terapèutiques que tinguessin per objectiu disminuir el conjunt de canvis que tenen lloc durant el postpandri en les cèl·lules inflamatòries.

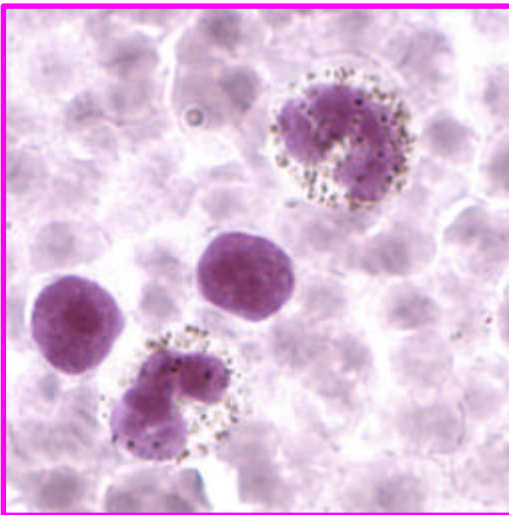


Figura 9. Fotografia representativa de la tinció específica per lípids (Sudan black) de sang corresponent a ratlins LDLR^{-/-}, MCP-1^{-/-} després d'haver estat en dejú o/n.

Complement

El complement activat té diverses funcions; la iniciació de la inflamació, el reclutament de leucòcits, l'aclariment de complexes immunes, la neutralització de patògens, la regulació de respostes davant d'anticossos i el trencament de membranes cel·lulars. El sistema complement pot ser activat per la via clàssica, alternativa i

per la via de la lectina. Aquestes tres vies tenen en comú que porten a la ruptura de C3, donant lloc a un fragment proinflamatori C3a i un fragment més gran, el C3b.

El fragment C3b pot actuar com una opsonina i donar lloc a la part terminal de la cascada, la qual acaba en la formació del complex terminal del complement (TCC) en la superfície de la molècula diana, conseqüentment, es produeix la citolisi de la cèl·lula diana. L'activació de les proteïnes terminals del complement C5 – C9 genera complexos heteropolimèrics C5b-7, C5b-8 i C5b-9. Col·lectivament, aquests complexos s'anomenen complexos terminals del complement.

Estudis previs, han demostrat que les immunoglobulines, components del complement i proteïnes inhibidores del complement són presents en la paret arterial d'humans amb lesions ateroescleròtiques (233). Nivells de mRNA de components del complement són superiors en plaques fibroses quan es compara amb artèries normals. Els components del complement poden derivar del plasma i també poden ser produïts localment en la paret arterial (232,233). S'ha trobat que el complex C5b-9 està dipositat en la paret arterial ateroescleròtica (234). La presència de C5b-9 en la paret arterial suggereix que l'activació del complement té lloc *'in situ'* en la paret arterial i constitueix una part activa del procés ateroescleròtic (235). Els dipòsits de C5b-9 s'han associat amb *debris* cel·lular, cristalls de colesterol i cèl·lules intactes (236,237). A més, C5b-9 s'ha trobat colocalitzant amb LDLs- enzimàticament modificades en lesions humanes inicials (238). Aquestes dades, suggereixen que l'activació del complement pot portar a la lisi cel·lular. Les cèl·lules musculars llises constitueixen una diana important per a l'activació del complement, doncs aquestes no expressen CD59, una molècula que protegeix a les cèl·lules de la lisi cel·lular induïda pel complement (239). Un dels activadors de la via clàssica del complement és la PCR. La PCR es troba dipositada en l'íntima arterial i freqüentment es troba colocalitzant amb el complex C5b-9 (240). La PCR s'uneix a LDL modificades, oxidades i cèl·lules apoptòtiques (241, 242). La unió de la PCR accelera el procés d'activació del complement. Estudis *'in vitro'* demostren que el complement pot ser activat també per lípids que

continguin colesterol, com són les LDL oxidades i modificades (243-245). Els cristalls de colesterol també són activadors del sistema complement *'in vitro'* (246). Les fraccions lipídiques aïllades d'una aorta d'humà, també poden activar la via alternativa del complement i a més es va observar que aquesta activació era dosi-dependent (244). S'ha demostrat que l'activació de la via alternativa del complement també pot ser portada a terme per partícules subcel·lulars i *debris* cel·lular presents en la paret ateroscleròtica (247). D'altra banda, *Clamydia pneumoniae* és un activador de la via alternativa del sistema complement i també ha estat implicat en la patogènesi de l'aterosclerosi (248,249).

Estudis en models experimentals d'aterosclerosi han mostrat que el dipòsit de C5b-9 en la paret arterial és previ a la infiltració dels monòcits i a la formació de les cèl·lules escumoses (244). Conills deficients en el component C6 del complement, van ser utilitzats per tal d'estudiar el paper del sistema complement en l'aterosclerosi (250,251). Els resultats d'aquests estudis mostren que tot i que el perfil lipídic dels conills deficients en C6 és similar als conills control, els conills C6-deficients, presentaven lesions ateroscleròtiques macroscòpicament visibles, mentre que les lesions eren absents en els conills control. No obstant, la deficiència en C5 no té cap efecte sobre el desenvolupament de les lesions ateroscleròtiques en ratolins deficients en apo E (252). L'efecte de la deficiència en C3 també ha estat avaluada en el ratolí deficient en el receptor de les LDL (LDLR^{-/-}, C3^{-/-}) i els resultats mostren que tot i que el perfil lipídic era similar als ratolins LDLR^{-/-}, els ratolins dobles *knockout* (LDLR^{-/-}, C3^{-/-}) presentaven lesions ateroscleròtiques amb un major contingut de macròfags, menys contingut de cèl·lules musculars llises i col·lagen (253). Un estudi posterior en ratolins apo E^{-/-}, LDLR^{-/-}, C3^{-/-}, corrobora que la mida de les lesions ateroscleròtiques de ratolins deficients en C3 són superiors als respectius controls, però contràriament a Buono et al. aquest estudi mostra que a més, els ratolins apo E^{-/-}, LDLR^{-/-}, C3^{-/-}, presentaven concentracions sèriques de triglicèrids significativament superiors als controls, així com un perfil lipídic molt més aterogènic (254). Aquests resultats mostren que l'activació del complement per la via clàssica o

per la via de la lectina porta efectes ateroprotectors, possiblement a través de la regulació del metabolisme lipídic.

D'altra banda, gC1q-R és una proteïna que s'expressa en plaquetes, cèl·lules endotelials, cèl·lules musculars llises, limfòcits i cèl·lules fagocítiques. gC1q-R s'uneix a C1q i ha estat demostrat que aquesta unió pot modular l'activació del complement (255).

Un estudi recent en que s'han explorat lesions ateroscleròtiques humanes, mostra que gC1q-R i els seus lligands C1q i HK estan localitzats en les lesions ateroscleròtiques, suggerint que gC1q-R pot jugar un paper important en l'aterogènesi, promovent la inflamació i la trombosi en lesions ateroscleròtiques (256).

En resum, els resultats obtinguts dels experiments que s'han realitzat en els darrers anys indiquen que l'activació del complement està directament involucrada en l'aterogènesi. El sistema pot ser activat per les tres vies possibles. Sembla ser que el colesterol derivat de partícules LDL acumulades en l'artèria, podria activar el complement. D'entre les diverses respostes es produiria l'estimulació de cèl·lules endotelials, monòcits/macròfags i cèl·lules musculars llises, derivant en la producció de factors de creixement i citoquines. Les cèl·lules musculars llises constitueixen una diana important per a l'activació del complement. Com a conseqüència d'aquesta activació, les cèl·lules musculars llises expressarien MCP-1, explicant així el reclutament inicial de monòcits en la paret arterial. Per tant, l'activació del complement no només té un paper fonamental en l'inici del procés ateroscleròtic, sinó també en la progressió de les lesions ateroscleròtiques.

Influència d'una infecció/ inflamació crònica no vascular sobre l'aterosclerosi

Durant el curs d'una infecció i inflamació tenen lloc un conjunt de canvis en l'estructura, composició i funció de les lipoproteïnes. Estudis previs suggereixen que el risc i la incidència de la malaltia cardiovascular, és superior en pacients amb una infecció/inflamació crònica establerta (257-260). La prevalença de la malaltia cardiovascular és superior en pacients amb infecció per *Clamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, infecció dental crònica, infeccions cròniques en el tracte urinari, bronquitis crònica i d'altres infeccions en les

quals els microorganismes no estan localitzats en la paret arterial (261-264). La presència d'endotoxina també prediu futurs events cardiovasculars (264). Finalment, també s'ha trobat que existeix un increment en la incidència de malaltia cardiovascular en pacients amb malalties inflamatòries cròniques com l'artritis reumatoide, psoriasis i lupus eritematós (265-268). A més, algunes de les malalties que predisposen a l'aterosclerosi, com són l'obesitat, la diabetis '*mellitus*', el síndrome metabòlic estan també associades amb la inflamació (269-273).

Canvis proaterogènics en els lípids i metabolisme de lipoproteïnes durant la infecció/inflamació

Alguns autors proposen que els canvis que tenen lloc en l'estructura i funcionalitat de les lipoproteïnes plasmàtiques durant la resposta de fase aguda podrien explicar l'associació existent entre infecció / inflamació i aterosclerosi (274). Les lipoproteïnes riques en triglicèrids (VLDLs) són aterogèniques. Aquestes tenen la capacitat d'interaccionar amb receptors per apoB-48 expressats en monòcits i macròfags, resultant en una captació augmentada de lípids i conseqüentment, en la formació de cèl·lules escumoses (275). A més, s'ha observat que les VLDLs secretades pel fetge després de l'administració de lipopolisacàrid (LPS) estan enriquides amb esfingolípids. L'enriquiment amb esfingolípids pot portar a una disminució en l'aclariment de VLDLs, resultant en el cúmul de partícules remanents aterogèniques. Respecte al metabolisme de les LDLs, s'ha observat que en pacients infectats pel virus de la immunodeficiència humana (VIH), la disminució en els nivells de LDL, està associada amb una disminució de la mida d'aquestes partícules, resultant en partícules LDLs petites i denses (276), les quals s'ha demostrat que són més aterogèniques (276,277-279). També s'ha demostrat que diversos marcadors de la peroxidació lipídica estan incrementats tant en sèrum com en LDL circulants en animals tractats amb LPS (280). A més, s'observa que les LDL aïllades dels animals tractats amb LPS són més susceptibles a l'oxidació. D'altra banda, durant la resposta inflamatòria (de fase aguda), la concentració de PCR augmenta significativament; considerant que la PCR pot unir-se a LDL i fosfolípids oxidats, l'augment en

les concentracions sèriques de PCR augmenta així la captació per part dels macròfags de LDL, promovent la formació de cèl·lules escumoses (281).

D'altra banda, durant la infecció i inflamació, l'increment en *secretory fosfolipasa A2* (sPLA2) podria també induir l'aterogènesi, doncs aquest enzim porta a la producció d'àcids grassos poliinsaturats que poden ser oxidats i posteriorment modificar les LDL i fer que aquestes s'oxidin (282). De fet, els ratolins transgenics que expressen la forma humana de sPLA2, desenvolupen lesions aterocleròtiques significatives, quan són alimentats amb una dieta pobre en greixos (283). Pel que fa a la composició de les partícules LDL, durant la inflamació/infecció, les LDL circulants estan més enriquides amb esfingolípids (284,285). Les concentracions plasmàtiques d'esfingomielina també estan incrementades en models animals d'aterosclerosi amb malaltia cardiovascular (286,287). Sembla ser que els esfingolípids diversos que estan incrementats durant la resposta de fase aguda, incrementen l'aterogènesi de les lipoproteïnes.

Finalment, en el metabolisme de les HDL, també es produeixen un gran nombre de canvis durant la inflamació/infecció. Per una banda, es produeix una forta disminució en les proteïnes que constitueixen les HDL i que són anti-aterogèniques, com són, l'apo A-I, LCAT, CETP, lipasa hepàtica (LH) i SR-BI (288-290).

Conseqüentment, hi ha un major cúmul de colesterol en els macròfags, promovent així l'aterosclerosi. Una altra funció important que desenvolupen les HDL és protegir de la oxidació a les LDL. Durant la resposta de fase aguda, algunes de les proteïnes associades a les HDL, com són la PON1, PON3, ceruloplasmina, transferrina, apoA-I disminueixen la seva concentració, disminuint així el potencial antioxidant de les HDL (291,292).

Finalment, durant la infecció/inflamació poden existir canvis en la funcionalitat dels macròfags; per exemple, LPS i les citoquines poden induir als macròfags a acumular lípids (293-295). Els macròfags estimulats per LPS, acumulen més triglicèrids i èsters de colesterol que els que no ho estan (296).

En resum, durant la infecció / inflamació es produeixen un gran nombre de canvis en l'estructura i composició de les lipoproteïnes així

com en cèl·lules del sistema immunitari que poden promoure l'aterogènesi.

Tanmateix, durant la resposta de fase aguda, a més dels canvis lipídics també tenen lloc d'altres canvis que podrien, en conjunt, promoure l'aterogènesi. En les cèl·lules inflammatòries, com monòcits i macròfags i en cèl·lules endotelials i cèl·lules musculars llises en cultiu, nivells d'endotoxina similars als que es donen en pacients amb septicèmia, provoquen un gran nombre de respostes inflammatòries, tals com la sobreexpressió de molècules d'adhesió cel·lular, un increment en la producció de citoquines, espècies reactives d'oxigen (ROS) i espècies reactives de nitrogen, prostaglandines i factor tissular; la pèrdua de la integritat i funcionalitat de la monocapa de Cèl·lules endotelials i apoptosi (297).

Malalties autoimmunes i aterosclerosi

El lupus eritomatós és una malaltia sistèmica autoimmune que pot afectar molts òrgans i inclou manifestacions varies, tals com, nefritis, artritis, pleuritis, pericarditis i vasculitis. Diversos estudis han demostrat l'associació existent entre lupus eritomatós i la malaltia cardiovascular (298-301). Els mecanismes involucrats no estan molt clars, però sembla que la disfunció endotelial promoguda per l'existència d'una inflamació sistèmica, podria ser la causa. Estudis recents indiquen que una combinació de factors de risc convencionals i no convencionals per la malaltia cardiovascular són característics en pacients amb lupus eritomatós, tals com certs marcadors d'inflamació (augment de proteïnes de fase aguda i $\text{TNF-}\alpha$), dislipèmia, augment de l'oxidació de les partícules LDL, presència d'anticossos que reaccionen davant de fosfolípids i concentracions elevades d'homocisteïna. En la figura 10 es resumeixen els factors de risc que poden contribuir al major risc per la malaltia cardiovascular que tenen els pacients amb lupus eritomatós.

El lupus eritomatós i l'artritis reumatoide, són malalties del teixit connectiu. L'artritis reumatoide és una altra malaltia associada amb una mortalitat incrementada per malaltia cardiovascular (302,303). Existeix una gran similitud entre la sinovitis reumatoide i la placa ateroscleròtica (304). Sembla ser que la inflamació associada amb l'artritis reumatoide podria contribuir a l'acceleració del procés

ateroscleròtic en pacients amb artritis reumatoide. Del Rincón et al. van trobar que en pacients amb artritis reumatoide existia una forta correlació entre la velocitat de sedimentació dels eritròcits i la PCR amb la IMT (Gruix íntima-mitja) (305).

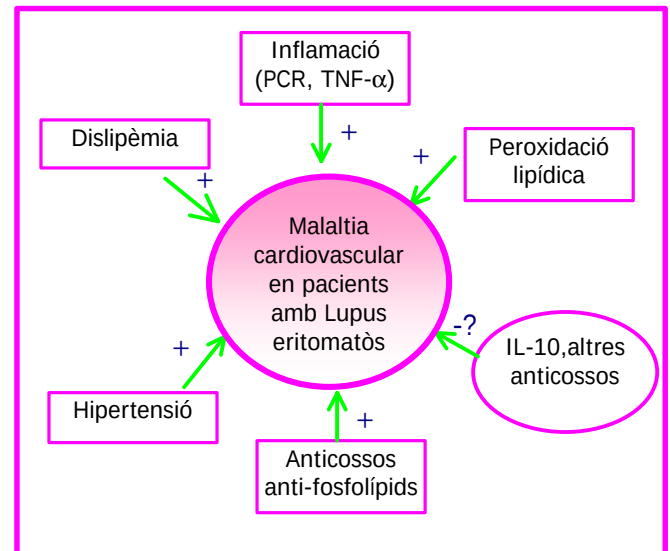


Figura 10. Combinació dels factors de risc tradicionals i no tradicionals que predisposen a la malaltia cardiovascular en pacients amb lupus eritomatós.

Frostegard J. Atherosclerosis in patients with autoimmune disorders. *A, T, VB* 2005;25:1776-1785)

La velocitat de sedimentació dels eritròcits i la concentració de PCR mesuren cadascun d'ells, diferents components de la resposta de fase aguda. La velocitat de sedimentació dels eritròcits reflecteix una concentració incrementada de fibrinògen com a resposta a una inflamació sistèmica. Un estudi en el que es va fer un seguiment durant un període de 18-76 mesos en pacients amb artritis reumatoide, mostra que els pacients amb artritis reumatoide presenten un increment anual de la IMT superior que el que presenten els controls (306). A més es va trobar que els nivells de PCR, la velocitat de sedimentació dels eritròcits, el comptatge de leucòcits, el comptatge de plaquetes i el ratio del calci / creatinina present en la orina són factors de risc independents que estaven associats amb un major increment en la IMT. Tal com s'ha indicat anteriorment (1.3.2 Altres factors de risc) la presència d'aterosclerosi està associada amb increments en el nombre de leucòcits, neutròfils, i monòcits, per tant,

proposant que la presència d'aquests factors de risc fan més susceptibles als pacients amb artritis reumatoide a desenvolupar aterosclerosi en les seves artèries. Un altre possible mecanisme que els autors proposen per tal d'explicar aquesta associació, és que els pacients amb artritis reumatoide amb un major increment en la IMT al llarg del temps, presenten major resorció òssia. L'administració de fàrmacs *anti resorptive bone* en pacients amb diabetis '*mellitus*' pot previndre d'un major augment en la IMT al llarg del temps (307). Un estudi en pacients amb artritis reumatoide, evidencia l'associació de la inflamació amb l'artritis reumatoide. Concretament, els autors indiquen que un polimorfisme en el promotor del gen MCP-1 està altament associat amb la susceptibilitat de pacients amb artritis reumatoide (308). De fet, s'ha demostrat que en pacients amb artritis reumatoide, les concentracions plasmàtiques de MCP-1 en el fluid sinovial són superiors que les concentracions sèriques de MCP-1, evidenciant, una producció local de MCP-1 (309,310). D'altra banda, l'existència del polimorfisme en la regió del promotor de MCP-1 (-2518 (A/G)), porta a una major producció de proteïna, suggerint que els pacients amb artritis reumatoide, podrien desencadenar una resposta inflamatòria més potent i conseqüentment, portant a un major dany tissular.

Recentment, Gonzalez-Gay et al. han trobat que la magnitud de la resposta inflamatòria mesurada per la PCR es correlaciona directament amb la presència d'aterosclerosi en pacients amb artritis reumatoide (311). Per tant, sembla ser que en pacients amb artritis reumatoide, la presència d'una inflamació sistèmica portaria a la disfunció endotelial. A més, d'altres factors de risc implicats en la patogènesi de l'aterosclerosi, com els indicats anteriorment i la HHcys i un increment en l'estrés oxidatiu podrien ser d'altres mecanismes que portarien a que els pacients amb artritis reumatoide presentin una major predisposició i incidència a l'aterosclerosi.

Malalties infeccioses i aterosclerosi

Estudis previs han demostrat una correlació directa entre la incidència de la malaltia cardiovascular i la presència de microorganismes infecciosos, tals com els virus *Herpes virus*

simple-1, el virus de la hepatitis A, i la presència de bacteris tals com *Chlamydia Pneumoniae*, *Helicobacter pylori* (312-318). Aquests organismes han estat detectats en lesions ateromatoses en artèries coronaries i en d'altres òrgans obtinguts en una autopsia. Tanmateix, no existeix cap evidència directa de que aquests organismes puguin causar les lesions ateroscleròtiques.

D'altres estudis han demostrat que la combinació d'una resposta inflamatòria sistèmica podria precipitar la disfunció endotelial i la inflamació, ambdós processos que predisposen a l'aterosclerosi.

Els resultats d'un estudi recent, indiquen que el tractament de la periodontitis reverteix la disfunció endotelial en un total de 30 pacients amb periodontitis severa (319), indicant que la disfunció endotelial podria ser el mecanisme inicial que acceleraria el procés ateroscleròtic en pacients amb malalties infeccioses.

VIH i aterosclerosi

Els pacients infectats amb VIH presenten aterosclerosi prematura (320-323). La teràpia antiretroviral basada en inhibidors de proteases, produeix una sèrie de canvis aterogènics en el metabolisme de les lipoproteïnes (323) i a més, s'ha vist que l'ús d'inhibidors de proteases està associat amb disfunció endotelial i l'increment de la IMT (324-327).

Tanmateix, el paper de la teràpia antiretroviral en l'acceleració de l'aterosclerosi en pacients amb VIH és controvertit. El VIH, tal com d'altres agents infecciosos, podrien contribuir '*per se*' a l'inici i progressió de les lesions ateroscleròtiques.

Matzen et al. han descrit que la proteïna Tat del VIH, juntament amb la citoquina TNF- α (en pacients amb VIH es troben concentracions sèriques elevades de TNF- α) promouen l'adhesió dels leucòcits a les cèl·lules endotelials, tant '*in vivo*' com '*in vitro*' (328). La infecció per VIH s'associa amb una expressió incrementada de CD36 en els monòcits circulants i el tractament antiretroviral no modifica la seva expressió (329).

Recentment, s'ha descrit l'associació existent entre la presència de polimorfismes en el gen MCP-1-2518G i la presència de lesions ateroscleròtiques subclíniques en pacients infectats pel VIH (330). La presència d'aquest

polimorfisme porta a concentracions plasmàtiques superiors de MCP-1. Els resultats indiquen que els pacients infectats pel VIH amb presència de lesions ateroscleròtiques presentaven concentracions plasmàtiques de MCP-1 significativament superiors als pacients sense lesions.

Donats els resultats comentats en les línies anteriors, és d'especial interès controlar els diversos factors de risc cardiovasculars que poden afectar a pacients infectats pel VIH i en funció del nombre de factors de risc que aquests presentin, amb l'ús de les teràpies que es disposen en l'actualitat fer prevenció primària.

Esteatohepatitis i aterosclerosi.

El colesterol de la dieta una molècula inflamatòria

La '*non alcoholic fatty liver disease*' (NAFLD) és una causa important de malaltia crònica hepàtica i una condició amb una prevalença bastant elevada en pacients amb dislipèmia (331,332). NAFLD inclou una varietat de síndromes clínico-patològics que s'associen amb diferents graus del risc de progressió a cirrosi, però tant sols una petita part de pacients desenvolupa cirrosi hepàtica (333,334).

La hipòtesi anomenada '*two-hit hypothesis*' identifica una fase inicial de deposició progressiva de greix en el fetge, seguida d'una segona fase caracteritzada per un increment de l'estrés oxidatiu (335). Prèviament, hem descrit que una dieta suplementada amb greix i colesterol, no tant sols indueix el desenvolupament de l'aterosclerosi, sinó que també porta a esteatosis hepàtica en el ratolí deficient en apo E (336) (Estudi 2). Les lesions hepàtiques observades consistien en un important cúmul de greix, proliferació de macròfags i inflamació. Els efectes observats podien ser modulats dependent del tipus de dieta amb el que van ser alimentats; la dieta enriquida amb oli de palma i colesterol va produir majors lesions tant hepàtiques com en l'artèria aorta dels ratolins apo E^{-/-}. Vam observar una estreta relació cronològica i quantitativa entre l'esteatohepatitis i l'aterosclerosi. A més, els ratolins alimentats amb les dietes suplementades, presentaven macròfags i nòduls d'inflamació en la unió gastro-esofàgica. Per contra, els ratolins alimentats amb una dieta estàndard de ratolí no

presenten cap d'aquestes alteracions histològiques.

Altres autors també han suggerit que l'esteatosi hepàtica està associada amb un major risc per desenvolupar aterosclerosi (337,338). Volzke et al. proposen que l'associació entre l'esteatosi hepàtica i l'aterosclerosi, és deguda a una distribució paralela dels diversos factors de risc de l'aterosclerosi, com la diabetis, obesitat, hipertensió arterial i alteracions lipídiques (337). Brea et al. en un estudi cas-control investiguen la relació de NAFLD amb la IMT carotídea i troben que els pacients amb NAFLD presenten una major aterosclerosi carotídea determinada per la mesura de la IMT (338). Els autors hipotetitzen que NAFLD és una característica del síndrome metabòlic i que el cúmul hepàtic de greix podria ser un factor de risc aterogènic. Tanmateix, no queda clar si l'esteatosi hepàtica juga un paper fonamental en el desenvolupament de factors de risc metabòlics que alhora podrien afectar el desenvolupament de lesions ateroscleròtiques o per sí mateix pot induir l'aterosclerosi. Liao et al. troben que el consum d'una dieta aterogènica durant un període de 5-15 setmanes provoca en una soca de ratolí susceptible a l'aterosclerosi (C57BL/6J) la inducció de l'expressió hepàtica de *saa* (339). A més, aquests autors troben que la mida de les lesions ateroscleròtiques estava significativament correlacionat amb el grau d'expressió hepàtica de *saa-1*, *hemo oxigenasa* i l'activació dels factors de transcripció NFκ-B. El cúmul de diens conjugats en el fetge porta a una activació dels principals gens hepàtics relacionats amb la resposta inflamatòria. Els diens conjugats s'acumularien en els teixits dels animals alimentats amb una dieta aterogènica, portant a l'oxidació dels lípids acumulats en aquests teixits, donant lloc a espècies semblants a LDL oxidada, induint la resposta inflamatòria i l'aterogènesi.

Per tant, en aquest estudi queda clar que, la inflamació hepàtica i l'aterosclerosi induïdes per una dieta aterogènica poden ser desencadenades per una via comuna, com és la generació i el cúmul d'espècies reactives d'oxigen en ambdós teixits.

Aquests resultats concorden amb un estudi del nostre grup (pendent de ser publicat) en el que hem trobat que els ratolins apo E^{-/-} alimentats amb una dieta amb un alt contingut en greix i

colesterol presenten una marcada hipercolesterolèmia, un increment en l'expressió hepàtica i aòrtica de *mcp-1*, un major grau d'inflamació hepàtica i lesions ateroscleròtiques que en tamany són significativament superiors als ratolins que han estat alimentats amb una dieta estàndard de ratolí amb o sense greix afegit.

A més, els ratolins que van mostrar lesions hepàtiques i ateroscleròtiques més severes, presenten concentracions hepàtiques i plasmàtiques de colesterol significativament augmentades respecte a aquells ratolins amb lesions més moderades.

Tot i que els ratolins alimentats amb dietes suplementades presenten concentracions hepàtiques de triglicèrids superiors als ratolins controls, les diferències observades no són significatives i a més, a diferència de les concentracions hepàtiques de colesterol, les concentracions de triglicèrids no estaven associades ni amb el grau d'inflamació hepàtica ni tampoc amb els nivells de mRNA de *mcp-1*. La hipercolesterolèmia que presenten aquests animals induïda per la dieta, portaria a un cúmul de colesterol tant en el fetge com en l'artèria aorta i probablement, el colesterol acumulat en ambdós teixits seria l'agent causant de l'esteatosi hepàtica i l'aterosclerosi.

El colesterol podria actuar com una molècula prooxidant portant al cúmul de lípids oxidats en l'artèria i en el fetge, i desencadenant en una resposta inflamatòria en ambdós teixits.

Si aquests resultats es confirmessin, seria interessant dilucidar si el colesterol de la dieta podria actuar de forma indirecta (a través de la oxidació de lípids acumulats en ambdós teixits) o bé de forma directa (a través de la interacció amb factors de transcripció que activessin l'expressió de gens inflamatoris) en el desenvolupament de l'esteatosi hepàtica i l'aterosclerosi.

Ús de fàrmacs antiinflamatoris

Tenint en compte que l'aterosclerosi és una malaltia inflamatòria, l'ús d'agents antiinflamatoris, pel seu potencial de disminuir la inflamació vascular, s'ha de considerar en la pràctica clínica. Un gran nombre de fàrmacs antiinflamatoris que tenen en comú que incideixen sobre la via d'inflamació NF- κ B són

emprats per tal de reduir la incidència de la malaltia cardiovascular.

Concretament, l'aspirina és emprada en la prevenció secundària de la malaltia cardiovascular. Dades experimentals mostren que la COX-2, l'activitat enzimàtica de la qual s'inhibeix per acció de l'aspirina, s'expressa en la placa ateroscleròtica i que l'aspirina inhibeix l'adhesió de monòcits a l'endoteli vascular (340) així com també inhibeix la proliferació de les cèl·lules musculars llises (341) i protegeix de l'oxidació a les LDLs (342). Fins a la data actual s'han portat a terme un gran nombre d'estudis en models animals per tal de dilucidar el paper que els agents antiinflamatoris poden tenir sobre l'inici i progressió de l'aterosclerosi. Alguns d'ells mostren un efecte positiu de l'aspirina sobre l'aterogènesi, mentre que existeixen estudis que mostren resultats contraris.

Paul et al. han demostrat prèviament que en el ratolí deficient en apo E, l'administració continuada d'altres dosis d'aspirina (0.5 mg d'àcid acetilsalílic per dia) durant 10 setmanes redueix entre un 30 i un 40 % l'àrea de la lesió ateroscleròtica en aquest model animal (343). Els mateixos efectes són observats en els ratolins LDLR^{-/-} alimentats amb una dieta aterogènica i tractats amb baixes dosis d'aspirina durant 26 setmanes (344) i en el mateix model animal tractat amb indometacina, un agent antiinflamatori amb propietats similars a l'aspirina (345). Tanmateix, en els ratolins apo E^{-/-} als quals s'ha induït la lesió en l'artèria femoral i tractats amb aspirina no s'observa reducció en la formació de la neoïntima, a diferència dels ratolins els quals s'havien tractat amb Sulindac, en els que hi ha una disminució significativa en la formació de les lesions en l'artèria femoral (346).

A més, s'ha descrit que el tractament amb un antagonista del receptor de tromboxà S18886, però no amb altres dosis d'aspirina inhibeix l'aterogènesi en els ratolins apo E^{-/-} (347). Per tal d'explorar l'efecte que l'aspirina té a curt i llarg plaç, ens hem proposat allargar el tractament de ratolins deficientes en apo E amb aspirina i estudiar a diferents punts d'evolució de la malaltia, la mida i composició de la lesió ateroscleròtica que presenten aquests animals. Els resultats ens indiquen (Estudi 1), que en estadis inicials del procés ateroscleròtic (a les 16 setmanes d'edat), el tractament amb aspirina

disminueix significativament la mida de les lesions ateroscleròtiques dels ratolins apo E^{-/-} que han estat alimentats amb una dieta aterogènica. A les 24 setmanes d'edat no s'observa cap diferència pel que fa a la mida de les lesions ateroscleròtiques que presenten els ratolins que han estat tractats amb aspirina en comparació amb els ratolins control. Contràriament, en un estadi més avançat, a les 32 setmanes d'edat, aquells ratolins tractats amb aspirina presenten lesions que són significativament superiors als ratolins control. L'ús de dietes suplementades amb greix i colesterol podria ser un factor que estigués influenciant l'efecte de l'aspirina sobre l'aterogènesi. De fet, tots els resultats que mostren un efecte beneficiós sobre l'aterogènesi han estat realitzats en models d'aterosclerosi els quals han estat alimentats amb una dieta aterogènica. És per aquesta raó que convindria fer estudis amb models animals sense l'ús de dietes hiperlipidèmiques. D'altra banda, una altra explicació que podria aclarir l'efecte transitori de l'aspirina sobre l'aterogènesi, és que com a conseqüència de la inhibició de l'enzim ciclooxigenasa, l'àcid araquidònic pot ser alternativament processat per la via de la 5-lipooxigenasa, resultant en un increment en la producció de leucotriens que tenen capacitat inflamatòria. Aiello et al. han demostrat que els antagonistes del receptor del leucotriè B₄, redueixen la formació de cèl·lules escumoses en el ratolí.

Posteriorment, hem portat a terme dos estudis per tal d'explorar el paper dels antiinflamatoris en l'inici i progressió de l'aterosclerosi en el ratolí apo E^{-/-} alimentat amb una dieta estàndard de ratolí.

1) En el primer d'ells es va utilitzar oli de turpentina, per tal d'induir una inflamació crònica i estèril en els ratolins apo E^{-/-} (Estudi 3). En aquest estudi, ens proposàvem determinar els efectes a llarg termini d'una inflamació crònica i els efectes que els agents antiinflamatoris tenen sobre l'aterosclerosi. L'administració crònica de l'oli de turpentina va provocar una inflamació localitzada i estèril, caracteritzada pel cúmul de cèl·lules inflamatòries en el teixit on es va administrar la turpentina i donant lloc a una resposta sistèmica

caracteritzada per un augment en les concentracions plasmàtiques de SAA i TNF- α . Els ratolins als quals es va administrar turpentina i aspirina (0.5 mg d'àcid acetilsalílic per dia) van mostrar concentracions plasmàtiques de SAA relativament inferiors als que només havien rebut l'administració de turpentina. Tanmateix, els ratolins tractats amb aspirina, mostraven concentracions plasmàtiques de SAA significativament superiors als ratolins control. Tot i les conegudes accions antiinflamatòries de l'aspirina, l'administració d'altres dosis d'aspirina no produeix cap efecte sobre la mida de les lesions ateroscleròtiques dels ratolins apo E^{-/-} tractats amb un agent inflamatori, com és la turpentina, durant 12 setmanes i alimentats amb una dieta pobre en greixos. Aquests resultats confirmen la hipòtesi postulada sobre el paper de la dieta en els estudis en els que s'avaluen els efectes de l'aspirina sobre l'aterogènesi. A més, els resultats obtinguts ens indiquen que tot i que, en principi, una inflamació crònica podria accelerar el procés ateroscleròtic, contràriament, observem que l'administració crònica de turpentina produeix una disminució significativa en les concentracions plasmàtiques de colesterol i en la mida de les lesions ateroscleròtiques. La mida de les lesions ateroscleròtiques es va trobar que estava significativament correlacionat amb les concentracions plasmàtiques de colesterol i no amb els marcadors d'inflamació. La disminució en les concentracions plasmàtiques de colesterol estava significativament correlacionada amb una disminució en l'expressió hepàtica del gen *mdr1b*. Els productes del gen *mdr1b* podrien jugar un paper fonamental en la regulació de la concentració plasmàtica de colesterol i en l'aterogènesi en el ratolí deficient en apo E.

2) En el segon d'ells, ens vam proposar determinar l'efecte de l'administració d'un agent antiinflamatori, com és la dexametasona sobre l'aterogènesi (Dades no publicades). Fins a la data actual, els estudis realitzats amb corticoids, limitats a conills, han demostrat que els animals tractats amb glucocorticoids, presenten menys aterosclerosi que els animals controls, tot i que les seves concentracions plasmàtiques de

colesterol, són significativament superiors (348,349).

Els resultats obtinguts, ens indiquen que l'administració d'una dosi diària de 1µg de dexametasona (Fortecortin) accelera l'aterogènesi en el ratolí apo E^{-/-}. A més, hem trobat que l'administració de dexametasona produeix un increment significatiu en les concentracions plasmàtiques de colesterol. S'ha trobat una correlació directa entre les concentracions plasmàtiques de colesterol i la mida de les lesions ateroscleròtiques que aquests animals presenten en el sinus aòrtic.

Donats els resultats obtinguts, ens hem proposat esbrinar els mecanismes involucrats en la hiperlipidèmia induïda per la dexametasona i els resultats obtinguts són els següents:

- L'administració de dexametasona produeix un increment en el colesterol contingut en les lipoproteïnes VLDL i LDLs, una disminució en les concentracions hepàtiques de colesterol i triglicèrids i una disminució en l'excrecció fecal de colesterol, indicant que podria existir una reabsorció intestinal incrementada induïda per l'administració de dexametasona.
- S'ha trobat una forta associació entre el tractament que havien rebut els animals, l'extensió de les lesions ateroscleròtiques, l'expressió de *mdr1b* i les concentracions plasmàtiques de colesterol. Respecte als controls, l'expressió hepàtica de *mdr1b* va ser superior en els ratolins tractats amb turpentina i dexametasona, i inferior en aquells que només havien estat tractats amb turpentina.
- L'administració d'altres dosis de rIL-6, va disminuir significativament el desenvolupament de les lesions ateroscleròtiques i l'expressió hepàtica del gen *mdr1b*. Aquests efectes són els mateixos que ja s'havien observat en els ratolins als quals s'havia administrat turpentina, malgrat que en els que vam administrar rIL-6, no vam observar canvis en les concentracions

plasmàtiques de colesterol. Les nostres dades suggereixen que les variacions en l'expressió de *mdr1b*, estan subjectes a canvis en les concentracions d'IL-6.

S'ha de tenir en compte que la inducció d'una inflamació, o bé la inhibició d'aquesta mitjançant l'ús d'agents antiinflamatoris, estan associats amb canvis en l'expressió d'un gran nombre de gens que podrien portar a canvis no desitjables i que s'han de tenir en compte abans de recomanar la seva aplicació en la pràctica clínica.

1.3. Models animals emprats per a l'estudi de l'aterosclerosi

L'aterosclerosi és una malaltia prolongada, crònica que progressa asimptomàticament durant tota la vida adulta, es manifesta a partir de la tercera i quarta dècada de la vida i és difícil de predir. El desenvolupament o no de la malaltia és funció tant de factors genètics com ambientals. Degut a les evidents dificultats que representa estudiar els mecanismes patogènics en l'humà, l'ús de models animals ha aportat nous coneixements sobre la seqüència d'aconteixements i els mecanismes responsables en l'inici i la formació de les lesions ateroscleròtiques (350-353)

En les darreres dècades s'han portat a terme un gran nombre d'estudis d'aterosclerosi en diferents models animals. D'entre la varietat de models animals existents, actualment, el ratolí constitueix el model animal més comunament emprat per a l'estudi de l'aterosclerosi (Taula 4, Annex 1). Els ratolins són fàcils de mantenir, es reproduïen amb facilitat, es té un gran coneixement sobre el seu genoma i es pot manipular la seva expressió gènica. Els ratolins genèticament modificats desenvolupen lesions ateroscleròtiques amb relativa facilitat i aquestes són fàcilment quantificables (354). A més, els resultats que s'obtenen són representatius del procés que es desenvolupa en els humans (355-358)

1.3.1. Aterosclerosi induïda per la dieta

El ratolí constitueix la millor espècie d'entre els mamífers per tal d'estudiar les contribucions genètiques a aquesta malaltia. Malauradament, els ratolins són molt resistents a desenvolupar aterosclerosi. Els ratolins alimentats amb una dieta pobre en greixos i colesterol, presenten concentracions plasmàtiques de colesterol inferiors a 100 mg/dL, la major part del qual es troba contingut en les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) i no desenvolupen aterosclerosi. La única excepció és la soca de ratolí C57BL/6J. L'any 1969, Thompson va caracteritzar el primer model de ratolí per a l'estudi de l'aterosclerosi (359). Thompson va induir lesions ateroscleròtiques en la soca C57BL/6J amb una dieta que contenia un

50 % de greix, 5 % de colesterol i 2 % d'àcid còlic durant 5 setmanes. Tanmateix, tenia l'inconvenient que donada la toxicitat de la dieta, els ratolins perdien pes i existia una elevada mortalitat. Posteriorment, Paigen et al. van desenvolupar una dieta, l'anomenada dieta de Paigen que contenia un 15 % de greix, 1.25 % de colesterol i un 0.5 % d'àcid còlic. Els ratolins C57BL/6J quan eren alimentats amb la dieta de Paigen durant 10 setmanes presentaven lesions ateroscleròtiques notables i contràriament a la dieta desenvolupada per Thompson, la taxa de mortalitat (dels ratolins C57BL/6J) era baixa (360).

No obstant, aquest model animal presenta un gran nombre d'inconvenients. Les lesions ateroscleròtiques que desenvolupen els ratolins de 4 a 5 mesos d'edat, són relativament petites, les lesions estan confinades únicament a l'arc aòrtic i normalment es troben en un estadi molt inicial.

1.3.2. Models animals creats per manipulació de gens

Actualment, els models animals més comunament emprats per a l'estudi de l'aterosclerosi són els ratolins en que s'ha inactivat el gen de l'apolipoproteïna E (apo E) i el gen del receptor de les LDLs (LDLR), '*knock out*' d'apo E (apo E^{-/-}) i de LDLR (LDLR^{-/-}) respectivament. Concretament, els ratolins són creats introduïnt en cèl·lules mare embrionàries un vector d'inserció en la seqüència que s'ha seleccionat seguit de la injecció en blastocists per tal de crear ratolins quimèrics, anul·lant així un al·lel específic (Figura 11). La tècnica de recombinació homòloga en cèl·lules mare embrionàries s'ha emprat per a anul·lar gens que codifiquen per proteïnes involucrades en el metabolisme lipídic. Això ha fet possible estudiar les conseqüències de la sobreexpressió i inhibició de gens implicats en el metabolisme de lipoproteïnes.

1.3.2.1. Ratolí *knockout* d' apo E

L'apo E és una glicoproteïna d'aproximadament 34 kD sintetitzada principalment en el fetge i el cervell tant en humans com en animals i forma part de totes les lipoproteïnes a excepció de les

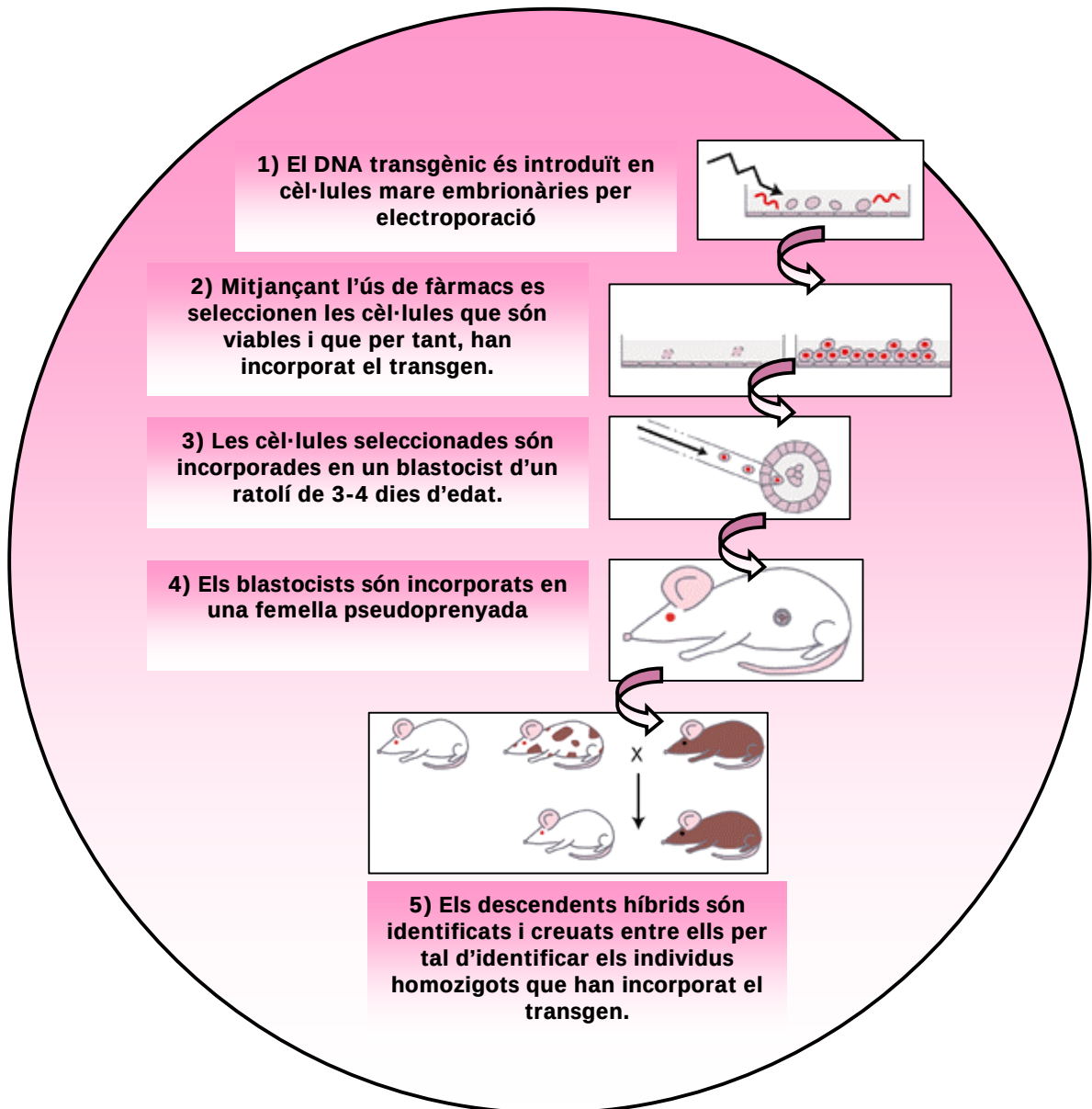


Figura 11. Estratègia emprada per a la generació del ratolí deficient en apo E mitjançant tècniques de recombinaçió homòloga.

LDLs. La principal funció de l'apo E és funcionar com a lligand per a receptors que aclareixen quilomicrons i remanents de lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDLs), permetent la captació específica pel fetge de partícules que contenen apo E. A més, l'apo E és sintetitzada per monòcits i macròfags presents en la paret vascular i es pensa que té efectes locals en la homeostasi del colesterol i en les reaccions inflamatòries que tenen lloc en els vasos amb aterosclerosi. També s'especula que l'apo E

podria tenir alguna funció associada amb l'absorció i eliminació biliar de colesterol (361).

L'apo E humana és una proteïna polimòrfica i consisteix en 3 isoproteïnes (apo E-2, apoE-3 i apoE-4) de les quals l'apo E-3 és la forma més comuna (362) (Figura 12). Els tres al·lels del gen de l'apo E estan associats amb variacions de la concentració plasmàtica de LDL-colesterol, la qual és superior en e4 (Freqüència ~ 30 %) i inferior en e2 (Freqüència ~ 10 %) comparant-ho amb e3 (Freqüència ~ 60 %) (363). La homozigositat pel gen de l'apo E2

s'associa amb la hiperlipoproteinèmia de tipus III, la qual es caracteritza per concentracions elevades de colesterol i triglicèrids, la presència de xantomes i el desenvolupament d'aterosclerosi a una edat prematura.

A més en la població humana s'han detectat formes mutants de l'apo E que predisposen a la hiperlipoproteinèmia de tipus III. Una d'aquestes, E3-Leiden causa la forma dominant de la hiperlipoproteinèmia de tipus III (364-366). Aquesta variant de l'apo E ha estat expressada en ratolins transgènics els quals presenten concentracions elevades de colesterol i triglicèrids en les fraccions VLDL i LDL, doncs presenten una unió deficient de l'apo E3 Leiden contingut en les lipoproteïnes remanents al receptor de les LDL i al receptor relacionat amb el receptor de les LDL. Aquesta característica els converteix en animals susceptibles al desenvolupament de l'aterosclerosi induïda per la dieta (367). Els ratolins apo E3-Leiden presenten una gran similitud amb pacients que pateixen hiperlipoproteinèmia de tipus III, constituint un model de gran utilitat per tal d'estudiar els factors ambientals i genètics que influeixen l'expressió d'aquesta malaltia.



La deficiència d'apo E en el ratolí porta a hipercolesterolèmia espontània, aterosclerosi accelerada i lesions similars a les que es desenvolupen en l'humà (368-371). Els ratolins deficients en l'apo E (apo E^{-/-}) van ser desenvolupats per primera vegada l'any 1992 quasi bé simultàniament en dos laboratoris independents per manipulació de gens (*gene*

targeting) (368,372). Els ratolins homozigots i heterozigots pel gen de l'apo E són viables i fèrtils. Respecte al perfil lipídic existeixen un gran nombre de diferències fenotípiques entre animals normals (que expressen el gen de l'apo E) i homozigots (Taula 5). El ratolí apo E^{-/-} alimentat amb una dieta normal de ratolí, que és pobre en greix (4.5 %) i colesterol (0.01 %) presenta concentracions plasmàtiques de colesterol, que són 5 vegades superiors als animals normals (d'aprox. 400-500 mg/dL) mentre que les concentracions d'HDL colesterol són inferiors als animals normals (371). La major part del colesterol està present en les lipoproteïnes VLDL i les lipoproteïnes de densitat intermèdia (IDL).

Els ratolins apo E^{-/-} a partir de les 5-6 setmanes d'edat ja presenten monòcits adherits a la superfície endotelial de l'artèria aorta (Figura 13) (373). Aproximadament a partir de les 6 a 10 setmanes d'edat el ratolí apo E^{-/-} desenvolupa lesions ateroscleròtiques (estria grassa) que estan constituïdes principalment per cèl·lules escumoses i cèl·lules musculars llises (Figura 13). Aquestes lesions del tipus estria grassa ràpidament progressen a lesions avançades, les quals són heterogènies però normalment estan constituïdes per un *core* necròtic, envoltat per cèl·lules musculars llises i quantitats variables de col·lagen i elastina. Contràriament als ratolins C57BL/6J en els que s'indueixen lesions ateroscleròtiques per acció de la dieta, els ratolins apo E^{-/-} desenvolupen lesions ateroscleròtiques al llarg de tot l'arbre arterial, amb una major predilecció pel sinus aòrtic. Quan aquests ratolins s'alimenten amb una dieta que conté un 21 % de greix i un 0.15 % de colesterol, l'anomenada dieta aterogènica presenten concentracions plasmàtiques de colesterol d'aproximadament 1800mg/dL i s'accelera el desenvolupament de les lesions ateroscleròtiques que tenen una mida de 3 a 4 vegades superior a les observades quan s'alimenten amb una dieta estàndard de ratolí (355) (Figura 13). Actualment s'estan emprant ratolins que a més de ser deficients en el gen de l'apo E, també són deficients en altres gens que es considera que estan relacionats amb el procés ateroscleròtic, són els anomenats dobles o triples *knockout* (Veure 1.3.2.3, Altres models animals).

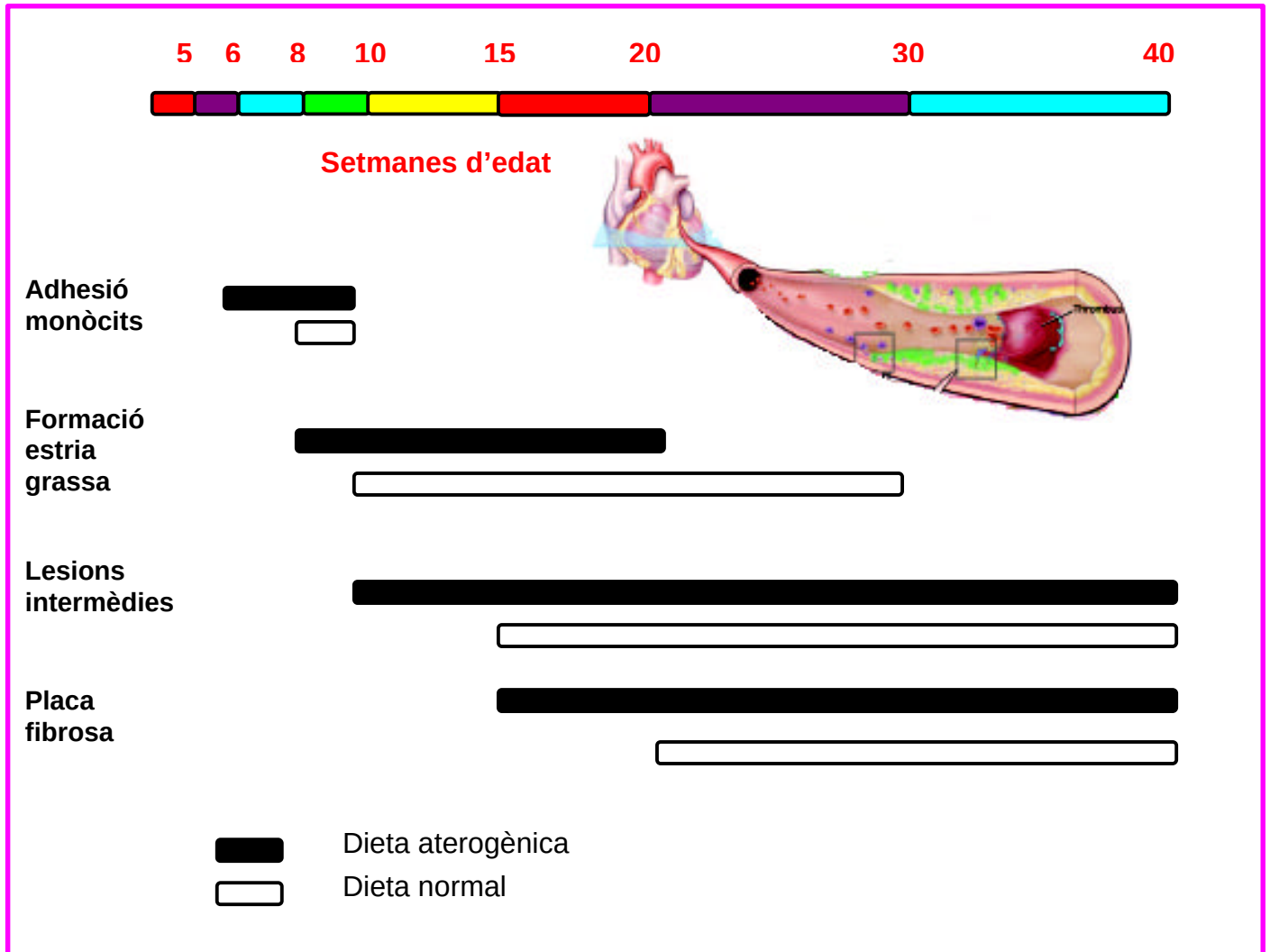


Figura 13. Diagrama en el què es representa com la formació de la lesió arterioscleròtica en els ratolins alimentats amb una dieta aterogènica està accelerada en comparació amb ratolins alimentats amb una dieta normal.

Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:133-140.

1.3.2.2. Ratolí *knockout* de LDLR

Els receptors de LDL de la superfície cel·lular reconeixen l'apolipoproteïna B (apoB) en les lipoproteïnes LDL i apo E en les lipoproteïnes IDL i a través d'un procés d'unió d'elevada afinitat s'internalitzen aquestes lipoproteïnes de la circulació. La deficiència en el receptor de les LDL, causa hipercolesterolèmia pronunciada amb complicacions cardiovasculars en humans. L'any 1993 Ishibashi et al. van crear els ratolins deficients per al receptor de les LDLs

(LDLR^{-/-}) per tècniques de manipulació de gens de cèl·lules embrionàries (374). Aquests ratolins presenten un perfil lipídic no tant alterat com els ratolins apo E^{-/-}, amb un increment en el colesterol contingut en les fraccions lipoproteïques IDL i LDL resultant en una concentració plasmàtica de colesterol de 250 mg/dL quan són alimentats amb una dieta normal.

Els ratolins LDLR^{-/-} sota aquestes condicions no desenvolupen aterosclerosi. Tanmateix, és un

model que respon a la dieta. Així doncs, quan són alimentats amb la dieta de Paigen les seves concentracions plasmàtiques de colesterol incrementen fins a 1500 mg/dL i presenten abundants lesions ateroscleròtiques. A més els ratolins LDLR^{-/-} també desenvolupen lesions ateroscleròtiques i presenten concentracions plasmàtiques de colesterol d'aproximadament 1200 mg/dL quan s'alimenten amb una dieta menys tòxica però amb un alt contingut en greix, com és la dieta aterogènica (375). El perfil lipídic plasmàtic que presenten els LDLR^{-/-} són més similars als que presenten els humans amb hiperlipèmia que els ratolins apo E^{-/-}.

És important destacar que, independentment del model animal que s'utilitzi per a estudiar l'aterosclerosi, s'ha de tenir en compte que en diverses espècies, incloent-hi el ratolí han estat descrites diferències en l'extensió i la mida de les lesions ateroscleròtiques en funció del sexe. Tangirala et al. van determinar si en el ratolí deficient en apo E i en LDLR també existien aquestes diferències (376). Els resultats obtinguts es mostren a la taula 6 (Annex 1). S'observa que en ambdós models animals, el la mida de les lesions ateroscleròtiques és significativament superior en mascles que en femelles, i l'extensió de l'aterosclerosi observada en els mascles apo E^{-/-} és similar a la que presenten els mascles LDLR^{-/-}.

1.3.2.3. Altres models animals:

Experiments realitzats amb ratolins transgènics han revelat que existeixen més de 100 gens que poden influenciar el desenvolupament de les lesions ateroscleròtiques.

A) Gens associats amb el metabolisme lipídic: Transport de colesterol en l'organisme

Existeix un gran nombre de gens que estan associats amb el transport de colesterol en l'organisme que s'han relacionat amb el desenvolupament de l'aterosclerosi.

Ratolins transgènics de l'apo A-I i *knockout* d'apo E

L'apolipoproteïna A-I (apo A-I) és el principal component proteic de les HDL i constitueix

aproximadament el 70 % del contingut d'apolipoproteïnes de les partícules HDL (377-379) (Figura 14) . Com a resultat, les concentracions plasmàtiques d'apo A-I es correlacionen estretament amb les concentracions plasmàtiques d'HDL-colesterol.

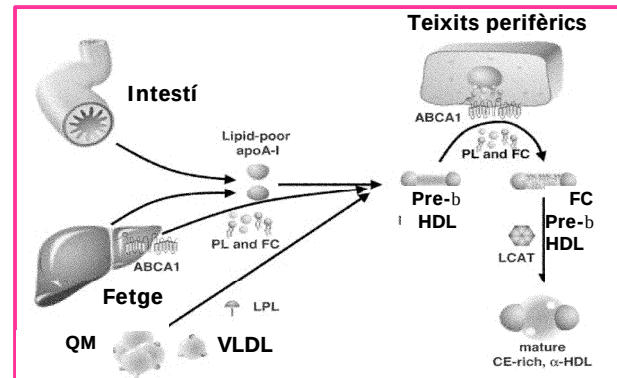


Figura 14. L'apo A-I és el principal component proteic de les HDL. El procés de maduració de les HDL, comença amb la secreció a nivell hepàtic i intestinal de partícules pobres en lipídies que contenen apo A-I, seguit de la captació de colesterol i fosfolípids via ABCA1 a més de la captació a través dels quilomicrons i VLDLs. Posteriorment aquestes partícules s'aniran enriquint progressivament de colesterol i fosfolípids procedents dels teixits perifèrics.

Lewis, Rader. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. Circ.Res. 2005;96:1221-1232.

L'apo A-I, també es troba present en petites quantitats als quilomicrons. L'apo A-I actua com a lligand del receptor *scavenger* de classe B tipus I (SR-BI) participant per tant, en la captació per part del fetge i dels teixits estereiodogènics del colesterol transportat per les HDL (380,381) (Figura 15) i és el cofactor de l'enzim lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT). Estudis epidemiològics mostren que el risc de patir cardiopatia isquèmica està inversament relacionat amb les concentracions d'apo A-I en el plasma (382). La sobreexpressió d'apo A-I en el ratolí deficient en apo E porta associat un increment en la concentració plasmàtica d'HDL-colesterol (2 vegades superior respecte al ratolí apo E^{-/-}) i una disminució substancial de la placa ateroscleròtica (383-386) . El greix contingut en la dieta, l'alcohol, els estrògens, andrògens, la

hormona tiroide, els retinoids, glucocorticoids, fibrats, niacina i els inhibidors de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzim A (HMG-CoA) reductasa són alguns dels factors que poden influenciar la inducció transcripcional del gen de l'apo A-I.

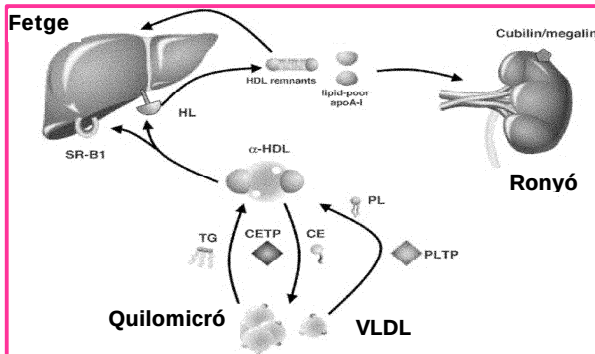


Figura 15. L'apo A-I actua com a lligand del receptor SR-B1 participant per tant, en la captació per part del fetge i dels teixits estereiodogènics del colesterol transportat per les HDL.

Lewis, Rader. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. Circ.Res. 2005;96:1221-1232.

Promoure la transcripció del gen de l'apo A-I i la biosíntesi és una atractiva diana terapèutica per al desenvolupament de nous fàrmacs, doncs tal com s'ha indicat, la deficiència d'apo A-I va associada a la deficiència d'HDL. Tanmateix, estudis *in vivo* en l'humà mostren que l'aclariment de l'apo A-I, més que la seva taxa de producció, és el principal determinant de la variabilitat en la concentració plasmàtica d'HDL-colesterol i apo A-I.

Ratolins transgènics de l'Apo B humana

L'apo B és el principal constituent proteic de les VLDL, IDL, LDL, Lp(a) i quilomicrons sintetitzats per l'intestí. La seva funció principal és el reconeixement del receptor de les LDL, permetent la internalització i processament de les LDL i proveir de colesterol als teixits perifèrics i al fetge. A més, l'apo B és l'apolipoproteïna més aterogènica que es coneix tant en humans com en models animals. Concentracions elevades d'apo B constitueixen un factor de risc ben establert per malaltia cardiovascular. La forma completa de l'apo B,

l'apo B-100 i la forma truncada que conté un 48 % de l'extrem N-terminal de l'apo B-100, anomenada apo B-48, són el producte d'un mateix gen i d'un mateix RNA missatger. En humans, l'apo B-48 és produïda només en l'intestí, mentre que en el fetge i intestí de rosegadors es secreta l'apo B-48. Els ratolins transgènics per l'apo B humana sintetitzen l'apo B exclusivament en el fetge, ja que, el *enhancer* intestinal no està present en les construccions d'aquests transgènics. Aquests ratolins presenten concentracions plasmàtiques de LDL-colesterol i de colesterol total incrementades (387,388).

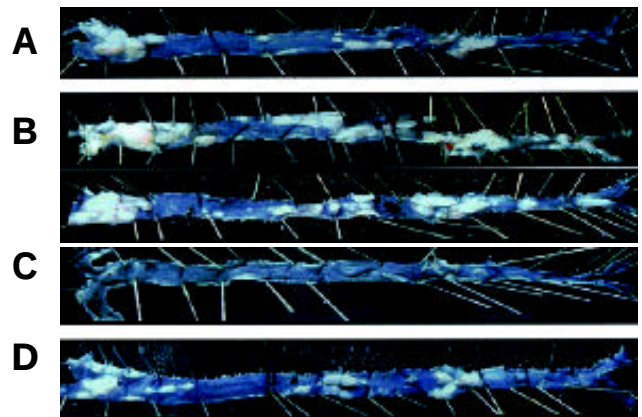


Figura 16. Imatges representatives d'artèria aorta de ratolins Apob^{+/+}/Apoe^{-/-} (A), Apob^{38.9+/+}/Apoe^{-/-} (B), Apob^{38.9/38.9+/+}/Apoe^{-/-} (C), i d'apob^{+/+}/Apoe^{+/+} (D), com a control negatiu.

El ratolí transgènic de l'apo B és també un model que respon a la dieta, doncs al ser alimentats amb una dieta de Paigen, la concentració plasmàtica de colesterol assoleix valors de 300 mg/dL.

Malgrat que no s'observen lesions ateroescleròtiques quan els animals són alimentats amb una dieta estàndard, quan aquests són alimentats amb una dieta aterogènica com és la de Paigen desenvolupen lesions ateroescleròtiques en el seu arbre arterial (389,390).

Tanmateix, es desconeixen els mecanismes pels quals l'apo B pot resultar aterogènica. Recentment s'ha creat un ratolí que presenta una delecció en el gen de l'apo B en la mateixa posició que la mutació apo B-38.9 que presenten humans amb hipobetalipoproteinèmia

familiar (FHBL), en els que s'observa un cúmul hepàtic de triglicèrids (391).

Els resultats d'aquest estudi, mostren que la deleció de l'extrem C-terminal de la seqüència de l'apo B, donant lloc a l'apo B 38.9, no impedeix la capacitat per a transportar colesterol i tampoc per a produir aterosclerosi, delimitant per tant la regió aterogènica de l'apo B (Figura 16). Són necessaris futurs estudis per tal de dilucidar quina és exactament la regió aterogènica de l'apo B i com mitjançant l'ús de determinades tècniques es podria controlar la seva expressió en l'humà.

Ratolins dobles *knockout* d'apo E i LDLR

Els ratolins dobles *knockout* per al gen de l'apo E i del LDLR constitueixen un bon model animal que desenvolupa espontàniament hiperlipidèmia severa i aterosclerosi (392,393). S'ha observat que quan els ratolins apo E^{-/-}, LDLR^{-/-} són alimentats amb una dieta estàndard de ratolí, la progressió de l'aterosclerosi és més marcada que en els ratolins apo E^{-/-} (394). Per tant, el ratolí apo E^{-/-}, LDLR^{-/-} és un bon model animal en el que es pot estudiar l'efecte antiaterogènic de determinats components sense l'aport d'una dieta aterogènica.

Ratolins *knockout* d'ACAT 1 i ACAT 2

L'esterificació intracel·lular de colesterol és catalitzada per l'enzim acil coenzim A colesterol aciltransferasa (ACAT). Existeixen dos enzims amb activitat ACAT: ACAT-1 i ACAT-2. En el ratolí ACAT 1^{-/-} no hi ha activitat ACAT en els macròfags com tampoc en el còrtex adrenal (395). La troballa que el cúmul de colesterol esterificat en els macròfags derivats de ratolins ACAT-1^{-/-} era molt inferior a la que presentaven ratolins control, ha portat a la cerca de nous inhibidors d'ACAT i el seu ús en el tractament de l'aterosclerosi (395).

Contràriament als resultats anteriors, quan els ratolins LDLR^{-/-} van ser reconstituïts amb macròfags derivats del ratolí ACAT^{-/-}, es va veure que aquests desenvolupaven lesions ateroscleròtiques més grans i aquestes contenien un 50 % més de colesterol lliure que el que presentaven ratolins ACAT^{+/+} LDLR^{-/-} (396). D'altra banda, la deficiència d'ACAT 2^{-/-} porta a una alteració en l'absorció intestinal de colesterol i en l'esterificació de colesterol en el fetge (397).

En la Taula 7 (Annex 1) es resumeixen els estudis que fins a la data actual s'han portat a terme en diferents models animals en els que s'ha estudiat el paper que ACAT-1 i ACAT-2 poden jugar en el desenvolupament de l'aterosclerosi.

Ratolins *knockout* de LCAT

La reacció de síntesi dels èsters de colesterol en la fracció d'HDL-colesterol és catalitzada per l'enzim lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) (409). L'enzim LCAT juga un paper fonamental en el transport de colesterol dels teixits perifèrics cap al fetge (410). Els ratolins dobles *knockout* de LCAT i LDLR (LCAT^{-/-}, LDLR^{-/-}), alimentats amb una dieta aterogènica durant 16 setmanes, mostren concentracions plasmàtiques de colesterol total i apo B similars al ratolí LDLR^{-/-}, però la concentració d'HDL-colesterol està significativament disminuïda (411). A més, les lesions ateroscleròtiques observades presenten un increment del 70 % en la quantitat de colesterol esterificat en relació amb el ratolí LDLR^{-/-}. La deficiència de LCAT en el ratolí apo E^{-/-}, resulta també en un increment en el contingut de colesterol en l'aorta, però en aquest cas la quantitat és inferior a l'observada en el ratolí LCAT^{-/-}, LDLR^{-/-} (411). Tanmateix, s'ha descrit que el ratolí apo E^{-/-}, LCAT^{-/-} presenta una disminució en la mida de les lesions ateroscleròtiques (412). Els autors atribueixen la reducció de l'aterosclerosi a una millora en l'estrès oxidatiu, ja que, la paraoxonasa està redistribuïda entre d'altres lipoproteïnes plasmàtiques. D'altra banda, s'ha descrit que la sobreexpressió de LCAT en el ratolí resulta en la formació alterada de l'HDL i un increment en l'aterosclerosi induïda per la dieta.

Ratolins transgènics de CETP humana

La proteïna transferidora d'èsters de colesterol (CETP) catalitza la reacció d'intercanvi dels èsters de colesterol entre les diverses lipoproteïnes plasmàtiques (413, 414). Aquesta proteïna és de gran interès, doncs s'ha determinat que mutacions en el gen que codifica per CETP estan correlacionades amb la concentració plasmàtica de lípids i el risc de patir malaltia cardiovascular (415-418). La introducció del gen CETP en el ratolí, doncs de forma natural el ratolí no expressa CETP, porta a

una disminució o bé un augment en l'aterosclerosi, depenent del model animal que s'estudia. Així doncs, mentre que en el ratolí LDLR^{-/-} la introducció de CETP porta a un augment en l'aterosclerosi, en el ratolí apo E^{-/-}, i en els ratolins transgènics d'apo AI i d'apo CIII, suposa una disminució de la mida de les lesions ateroscleròtiques (419,420). Així el paper de la CETP en la determinació de la susceptibilitat a l'aterosclerosi no està del tot aclarit i calen més estudis sobre els efectes pro o antiaterogènics de la modulació de les lipoproteïnes.

Ratolins transgènics de PLTP humana

La proteïna transportadora de fosfolípids (PLTP) facilita la transferència de fosfolípids entre mitocondries, microsomes, membranes cel·lulars i lipoproteïnes plasmàtiques. La PLTP incrementa la superfície d'unió de les HDL i millora la seva habilitat a promoure el flux de colesterol i fosfolípids (421). En ratolins LDLR^{-/-} que expressen la forma humana de PLTP (hPLTP), alimentats amb una dieta aterogènica, presenten concentracions plasmàtiques de VLDL- i LDL- colesterol que són significativament inferiors al grup control (422). D'altra banda, s'ha vist que la sobreexpressió de hPLTP porta a una disminució del 90 % en la concentració plasmàtica de colesterol i un augment d'un 40% en la secreció d'àcids biliars fecals (423). Aquests resultats posen de manifest el paper beneficiós que PLTP juga en l'eliminació del colesterol de l'organisme.

B) Gens associats amb el metabolisme lipídic: absorció de colesterol

La quantitat de colesterol present en l'organisme és el resultat d'un balanç, altament regulat, entre la síntesi *de novo* de colesterol, el colesterol que s'absorbeix a partir de la dieta i l'excreció biliar de colesterol.

Els mecanismes que controlen la síntesi i l'excreció de colesterol són ben coneguts. Tanmateix, fins fa relativament poc temps, que es va identificar la proteïna *Niemann-Pick C1 like 1* (NPC1L1), els mecanismes que controlen l'absorció de colesterol en l'organisme eren quasi bé desconeguts.

Ratolins *knockout* i transgènics de Cyp7a1

La formació de sals biliars a partir del colesterol representa la major part del colesterol que és

metabolitzat i eliminat de l'organisme dels mamífers. La ruta de biosíntesi de sals biliars és iniciada per la 7 α -hidroxilació del colesterol catalitzada per un enzim que és limitant d'aquesta ruta, el colesterol 7 α -hidroxilasa (CYP7A1) (424). En algunes espècies, el consum de colesterol en quantitats que excedeixen els requeriments nutricionals resulta en una resposta homeostàtica que consisteix en la inducció de l'expressió de *cyp7a1* i la síntesi incrementada de sals biliars. La síntesi reduïda de sals biliars i/o l'expressió reduïda de *cyp7a1* està relacionada amb dues malalties ben conegudes: la colelitiasis i l'aterosclerosi. Els pacients tractats amb molècules que sequestrin els àcids biliars, mostren una expressió de *cyp7a1* incrementada i hipertrigliceridèmia com a conseqüència d'un increment en la síntesi *de novo* de VLDLs (425-427). D'acord amb aquests estudis, els ratolins que sobreexpressen *cyp7a1* tenen una producció incrementada de VLDLs (428) i la deficiència del gen *cyp7a1* en el ratolí APOE*3-Leiden, disminueix la producció de VLDL, com a conseqüència de la disminució en la biosíntesi d'àcids biliars, resultant en una disminució en la concentració plasmàtica de triglicèrids, mentre que no s'aprecien canvis en la concentració plasmàtica de colesterol (429). Ratolins C57BL/6J que constitutivament expressen el transgen *cyp7a1* alimentats amb una dieta aterogènica presenten concentracions plasmàtiques de colesterol total disminuïdes i una disminució significativa en la mida de les plaques ateroscleròtiques respecte a ratolins C57BL/6J (430). Aquest estudi posa de manifest el paper que CYP7A1 té en el manteniment de la homeostasi de colesterol hepàtic i per tant, en l'aterogènesi.

Ratolins *knockout* d'ABCA1, ABCG5 i ABCG8

Els transportadors ABC són membres d'una família de proteïnes de membrana que transporten substrats a través de les membranes. La proteïna ABCA1 és crítica en el flux de l'excés de colesterol intracel·lular cap a acceptors apo A, com per exemple apo AI, el primer pas en el transport revers de colesterol. S'han detectat mutacions en el gen *ABCA1* en pacients amb la malaltia de Tangier, en la qual hi ha absència d'HDL-colesterol i un cúmul d'èsters de colesterol en les cèl·lules dels teixits

perifèrics (431,432). Estudis en què s'han trasplantat cèl·lules de la medul·la òssia deficientes amb ABCA1, mostren que la inactivació selectiva d'ABCA1 en macròfags porta a un increment en la mida de les lesions ateroscleròtiques, malgrat que no s'observen canvis en les concentracions plasmàtiques de colesterol (433,434). Contràriament, l'expressió d'ABCA1 humana en ratolins predisposats a patir aterosclerosi, redueix l'extensió de les lesions ateroscleròtiques (435,436). Els transportadors ABCG5 i ABCG8 han estat identificats com gens responsables d'una altra malaltia genètica, la siterolèmia (437,438). Els pacients amb siterolèmia, mostren un excés d'absorció de colesterol i una disminució en la secreció biliar d'esterols, així com hipercolesterolèmia i desenvolupen malaltia cardiovascular prematura. Els ratolins dobles *knockout* ABCG5^{-/-}, ABCG8^{-/-} presenten un increment en l'absorció d'esterols provinents de la dieta, i un increment d'un 30 % en la concentració plasmàtica de sitosterol (439,440).

Contràriament, els ratolins que sobreexpressen ABCG5 i ABCG8 d'humana, presenten una reducció d'un 50 % en l'absorció del colesterol de la dieta i un important increment en la secreció biliar d'esterols (441). Tot aquests estudis demostren que els transportadors ABCG5 i ABCG8 aporten un sistema eficaç per a l'eliminació d'esterols, dirigint-los a la producció d'èsters de colesterol (442-444), tot i que cap d'aquests mecanismes semblen estar implicats en la captació inicial de colesterol.

Ratolins *knockout* de NPC1L1

NPC1L1 presenta un 50 % d'homologia amb NPC1 (445), un gen que està alterat en pacients amb la malaltia anomenada *Niemann-Pick type C* (NP-C) i participa en el transport intracel·lular de colesterol (446).

NPC1L1 s'expressa en el tracte gastrointestinal, essent l'intestí prim l'òrgan on l'expressió és més elevada (447).

Per tal d'investigar el paper de NPC1L1 en l'absorció del colesterol *in vivo*, Altmann et al. van estudiar el percentatge de colesterol absorbit a través de la dieta en ratolins NPC1L1^{-/-} comparant-ho amb els valors obtinguts en ratolins NPC1L1^{+/-} i NPC1L1^{+/+} (447). Els resultats d'aquest estudi indiquen que els ratolins

NPC1L1^{-/-} absorbeixen un 69 % menys de colesterol que els ratolins NPC1L1^{+/+} ($P < 0.001$) suggerint que NPC1L1 juga un paper fonamental en l'absorció intestinal de colesterol i que NPC1L1 podria ser la molècula diana sobre la que actua l'ezetimibe, un fàrmac que inhibeix l'absorció del colesterol procedent de la dieta i que està acceptada la seva aplicació en pacients amb hipercolesterolèmia.

Ratolins *knockout* de *mdr1a* i *mdr1b*

La glicoproteïna P de membrana, codificada pel gen *multiple-drug resistance* (MDR) està involucrada en el transport de colesterol lliure des de la membrana al reticle endoplasmàtic, on s'esterifica per acció de la ACAT. Durant la resposta inflammatòria, s'ha demostrat en rates i ratolins que hi ha una disminució en l'expressió de *mdr1* (448,449). Estudis previs suggereixen que *mdr1* està involucrat directament en l'aterogènesi. Així doncs, en artèries d'humans s'ha demostrat que existeix una correlació directa entre l'expressió de *mdr1* i la mida de les lesions ateroscleròtiques (450-452). A més, els ratolins deficientes en *mdr1a* i *mdr1b* presenten concentracions plasmàtiques de colesterol disminuïdes, suggerint que aquest gen pot tenir un paper important en l'homeostasi del colesterol (453,454). Recentment, hem trobat que com a resposta a una inflamació crònica, en el ratolí apo E^{-/-} es produeix una disminució en l'expressió hepàtica del gen *mdr1b* i una disminució significativa en la concentració plasmàtica de colesterol, resultant en la reducció de la mida de les lesions ateroscleròtiques que presenten aquests animals (Estudi 3)(455). Seria d'especial interès realitzar estudis futurs portats a terme en ratolins dobles *knockout* per al gen de l'apo E i el gen del *mdr1b*, per tal de poder determinar el paper antiaterogènic que desenvolupa *mdr1b* a través de la seva regulació sobre la concentració plasmàtica de colesterol.

C) Gens associats amb la inflamació: molècules d'adhesió

La inflamació és un procés primordial per a l'inici i el progrés de l'aterosclerosi. Estudis en models animals evidencien que la inflamació arterial que precedeix el desenvolupament de les plaques ateroscleròtiques està causada pel cúmul de partícules LDL en la matriu extracel·lular del vas sanguini (Figura 17) (456-458). Aquestes partícules de LDL són modificades per un gran

nombre de mecanismes, incloent la degradació enzimàtica i l'oxidació resultant en la inducció d'un gran nombre de gens inflamatoris els quals porten al reclutament, retenció i activació de cèl·lules inflammatòries en la paret arterial (459-463).

Fins a la data actual s'han portat a terme un gran nombre d'estudis en models animals per tal de determinar el paper que determinats gens inflamatoris poden jugar en el desenvolupament de l'aterosclerosi (Taules 8-11, Annex 1).

Ratolins *knockout* de M-CSF

La importància que els monòcits/macròfags tenen en el desenvolupament del procés arterioscleròtic, ha estat confirmada per experiments en els què s'ha afectat molècules involucrades en la via d'activació dels monòcits/macròfags. Així doncs s'han creat ratolins que presenten una mutació per al gen M-CSF resultant en una reducció del nombre de macròfags. Aquest ratolí *osteopetrotic* (op) s'ha creuat amb el ratolí apo E^{-/-} donant com a resultat ratolins dobles *knockout* (M-CSF^{-/-}, apo E^{-/-}) els quals desenvolupen lesions més petites que els ratolins control apo E^{-/-} (Taula 8, línia 1) (464). En aquest mateix experiment s'ha observat que els ratolins heterozigots (M-CSF^{+/-}) també presenten una disminució en la mida de les lesions ateroscleròtiques en comparació amb els ratolins control, tot i que la reducció d'aquestes és inferior que en el cas dels ratolins homozigots. A més, resultats d'un altre experiment *in vivo*, mostren que l'administració d'un anticòs anti-M-CSF redueix també la mida de les lesions ateroscleròtiques en el ratolí apo E^{-/-} (465) (Taula 8, línia 2).

Ratolins *knockout* de P-selectina, E-selectina, ICAM-1 i VCAM-1

En totes les fases del procés ateroscleròtic l'expressió de molècules d'adhesió juga un paper molt important, doncs faciliten el *rolling* i l'adhesió dels monòcits en l'endoteli vascular (Figura 18). L'expressió de VCAM-1 i de P-selectina està augmentada en lesions arterioscleròtiques (466,467). S'ha demostrat que la deficiència en P-selectina disminueix la mida de les lesions ateroscleròtiques tant en el ratolí deficient en apo E com en el deficient en el LDLR (468-470), (Taula 8, línies 3, 4 i 6). En els

ratolins dobles *knockout* (P-selectina^{-/-}, apo E^{-/-}) també es va observar que aquesta reducció va romandre significativa al llarg del temps i que les lesions en aquests animals tenien un contingut inferior de macròfags i cèl·lules musculars llises que els controls (468). Aquests resultats indiquen que la P-selectina pot estar implicada en el desenvolupament de lesions ateroscleròtiques inicials.

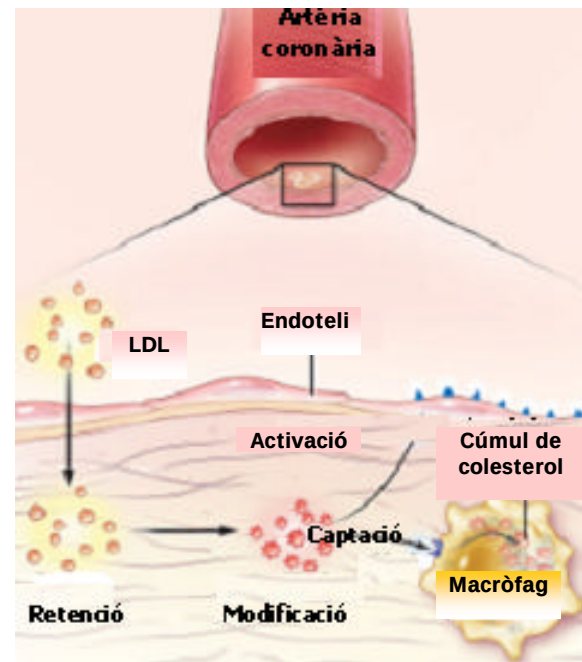


Figura 17. En pacients amb hipercolesterolèmia, l'excés de LDL s'infiltra en l'artèria i és retingut en l'íntima. Les partícules LDL es modifiquen per reaccions oxidatives i enzimàtiques, induint així a les cèl·lules endotelials a expressar molècules d'adhesió.

Hansson. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. NEJM 2005;352.

Els ratolins deficients en E-selectina i apo E / LDLR també presenten una reducció en la mida de les lesions ateroscleròtiques (468,470) (Taula 8, línies 5 i 6).

VCAM-1 s'expressa en les cèl·lules endotelials, s'uneix als monòcits i als limfòcits T, que són precisament les cèl·lules que en un estadi inicial es troben en la placa d'ateroma. El ratolins deficients en VCAM-1 presenten una interrupció en el desenvolupament de la placa d'ateroma (472) (Taula 8, línia 7), mentre que els

deficients en ICAM-1 presenten lesions significativament inferiors que els controls (468) (Taula 8, línia 8). D'altra banda, un estudi recent, mostra que (1) les concentracions plasmàtiques de VCAM-1 i P-selectina d'un model animal resistent al desenvolupament de l'aterosclerosi (BALB/c.apoE^{-/-}) eren significativament més baixes que les que presentaven els ratolins B6.apoE^{-/-}, i (2) que un increment en la mida de les lesions ateroscleròtiques estava acompanyat per concentracions plasmàtiques de VCAM-1 i P-selectina augmentades (473). A més, els resultats obtinguts apunten al fet que les concentracions plasmàtiques de colesterol podrien determinar els nivells circulants de VCAM-1 en el ratolí apo E^{-/-}. Possiblement, en un futur proper, la mesura de les concentracions de VCAM-1 puguin ajudar a predir el risc per malaltia cardiovascular d'un individu.

D) Gens associats amb la inflamació: citoquines i els seus receptors

Les citoquines són proteïnes que dirigeixen els leucòcits circulants als llocs d'inflamació o dany.

Ratolins *knockout* i transgènics de MCP-1 i CCR2

MCP-1, també coneguda com CCL2, és una citoquina que actua a través del seu receptor CC *chemokine receptor 2* (CCR2), en monòcits, macròfags i limfòcits T.

Estudis recents indiquen que MCP-1 juga un paper fonamental en l'inici i patofisiologia de les malalties cardiovasculars. Resultats d'estudis *in vitro* mostren que les cèl·lules de l'endoteli vascular i les cèl·lules musculars llises expressen MCP-1 després de ser tractades amb LDL mínimament modificades i LDL enzimàticament alterades (E-LDL) (474,475), el primer pas en la formació de la lesió ateroscleròtica.

L'absència de MCP-1 disminueix de forma significativa la mida de les lesions ateroscleròtiques en el ratolí LDLR^{-/-} (Taula 9, línia 1) (476) i en el ratolí que sobreexpressa l'apo B humana (477).

L'absència del seu receptor, CCR2 causa una disminució en la mida de les lesions ateroscleròtiques en el ratolí apo E^{-/-} alimentat amb una dieta normal (478) o bé amb una dieta aterogènica (479) (Taula 9, línies 2-5)

(Figura 19). Contràriament, els ratolins apo E^{-/-} irradiats, en els quals cèl·lules de la medulla òssia han estat substituïdes per cèl·lules que sobreexpressen MCP-1, tenen lesions ateroscleròtiques molt més grans que els ratolins control (480) (Taula 9, línia 6). Diversos estudis evidencien el fet que MCP-1 podria ser una diana terapèutica important per al tractament de l'aterosclerosi. Per exemple, s'ha demostrat que el bloqueig de MCP-1 mitjançant la transfecció amb una forma mutada del gen *mcp-1* (7ND), limita la progressió de lesions ateroscleròtiques ja existents en l'arc aòrtic de ratolins apo E^{-/-} (481) (Taula 9, línia 7).

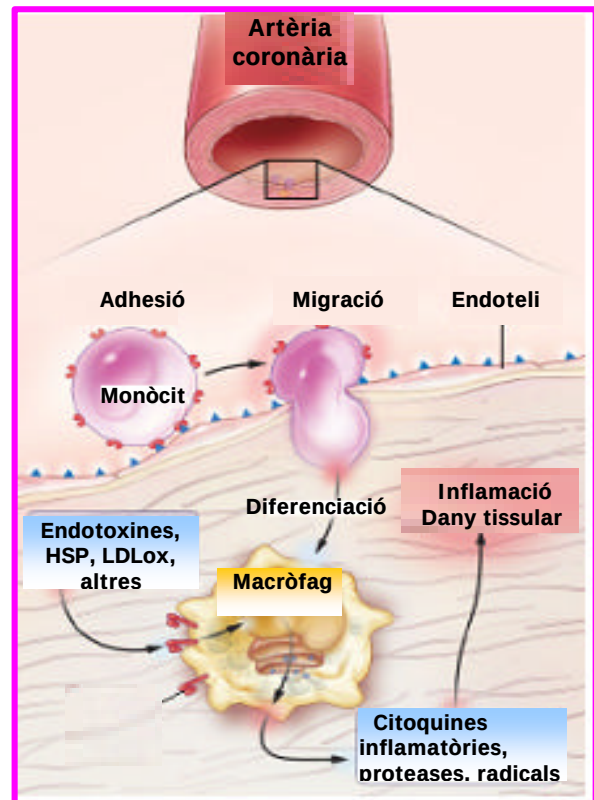


Figura 18. Els monòcits reclutats a través de l'activació de l'endoteli es transformen en macròfags. Les partícules de LDLox, endotoxines, HSP, són reconeguts per receptors específics, portant a l'activació dels macròfags i permetent així la secreció de citoquines inflammatòries induint un procés inflamatori en l'artèria.

Hansson. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. NEJM 2005;352.

Ratolins *knockout* de CD154^{-/-}

El paper dels limfòcits T en l'aterogènesi ha estat investigat mitjançant l'estudi d'alteracions genètiques que poden alterar la interacció CD40-CD154 (482) o mitjançant l'administració d'anticossos anti-CD154 (483) (Figura 20). Els ratolins LDLR^{-/-} alimentats amb una dieta amb un alt contingut en greixos, i tractats amb un anticòs anti-CD54, presenten una reducció en l'expressió de les molècules d'adhesió i en la mida de les lesions ateroscleròtiques (483). D'altra banda, els ratolins dobles *knockout* Apo E^{-/-}, CD154^{-/-}, presenten una disminució fins a 5 vegades en la mida de la lesió arterioscleròtica, a més que les plaques són més estables, ja que, presenten un augment en el contingut de col·lagen i una disminució en el nombre de macròfags i limfòcits T (Taula 9, línia 8).

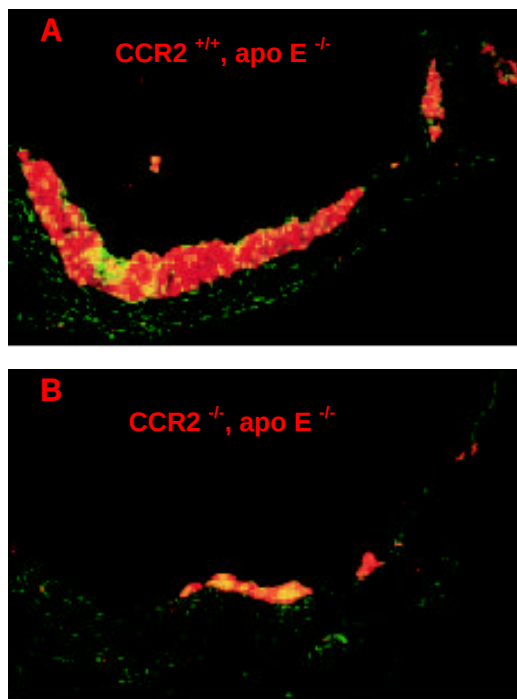


Figura 19. Seccions representatives de lesions ateroscleròtiques localitzades en la regió del sinus aòrtic de ratolins CCR2^{+/+}, apo E^{-/-} (A) i ratolins CCR2^{-/-}, apo E^{-/-} (B).

Ratolins *knockout* del receptor d'IFN-γ

Resultats semblants s'han observat en el ratolí deficient en el receptor de l'interferó gamma (IFN-γR) (484) (Taula 9, línia 9)

Ratolins *knockout* per a CXCR2

CXCR2 és el receptor per interleucina 8 i *growth-regulated oncogene* (GRO α) i predominantment s'expressa en neutròfils. D'altra banda, la IL-8 atrau principalment leucòcits polimorfonuclears però també activa monòcits i pot dirigir-los cap a les lesions vasculars (487, 490). Els ratolins LDLR^{-/-} irradiats, i en els quals les cèl·lules de la medulla òssia s'han reemplaçat amb cèl·lules de ratolins que no tenen l'homòleg a CXCR2, presenten menys cúmul de macròfags i lesions ateroscleròtiques de menor la mida que els seus controls (485) (taula 9, línia 10) indicant que aquest mecanisme és també important en l'aterogènesi. S'especula que MIP-2, secretada per cèl·lules mononuclears i que juga un paper fonamental en el reclutament de neutròfils en el desenvolupament de la inflamació, pot tenir la mateixa funció quimiotàctica que la IL-8 en l'humà, doncs en ratolí no existeix la IL-8.

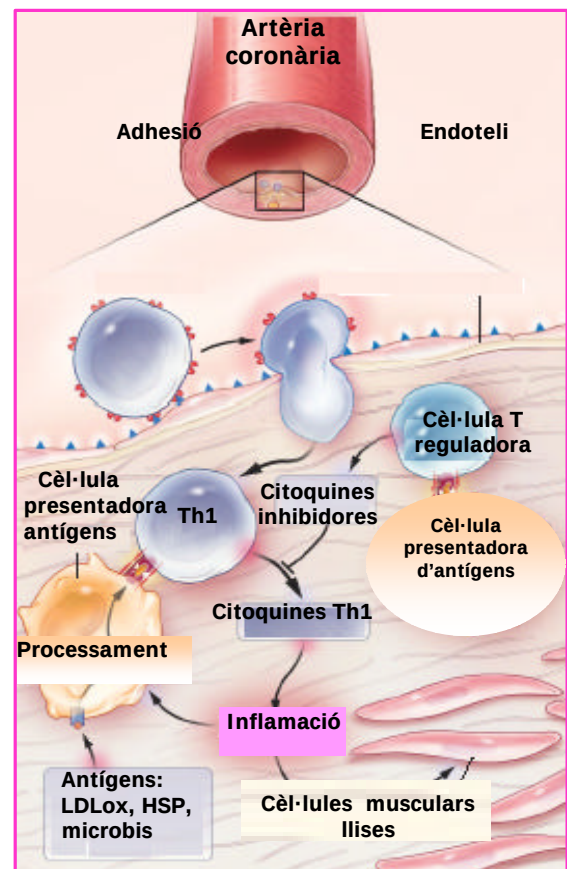


Figura 20. Els antígens presentats per macròfags i cèl·lules dendrítiques porten a l'activació de les cèl·lules T. La major part de les cèl·lules T activades produeixen citocines Th1 (ex. IFN-γ) que activen macròfags i cèl·lules vasculars, induint una resposta inflamatòria

Hansson. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. NEJM 2005;352.

Ratolins dobles *knockout* d'IL-1 β i apo E

La IL-1 β és una citoquina proinflamatòria induïda majoritàriament en monòcits pel contacte directe amb limfòcits T estimulats. Els ratolins dobles *knockout* per la IL-1 β i l'apo E (Apo E^{-/-}, IL-1 β ^{-/-}) presenten una disminució en la mida de les lesions ateroscleròtiques, a més d'observar una disminució significativa dels nivells de mRNA de *vcam-1* i *mcp-1* en l'aorta en comparació amb els ratolins Apo E^{-/-}, IL-1 β ^{+/+} (488) (Taula 9, línia 11).

Ratolins *knockout* d'IL-1Ra i dobles *knockout* d'IL-1Ra i apo E

L'antagonista del receptor d'IL-1 (IL-1Ra) és un homòleg d'IL-1, que s'uneix al receptor d'IL-1 amb una alta afinitat i la seva constant d'associació és similar a la d'IL-1, però és incapaç d'activar la senyal intracel·lular per IL-1 (490, 491). El tractament amb IL-1Ra recombinant ha estat demostrat ser una teràpia eficient per al tractament de l'aterosclerosi en ratolins apo E^{-/-} (492) (Taula 9, línia 12). Els ratolins deficientes en IL-1Ra i apo E (apo E^{-/-}, IL-1Ra^{+/+}) a les 16 setmanes d'edat, presenten lesions ateroscleròtiques que tenen una mida significativament superior als ratolins apo E^{-/-}, IL-1Ra^{+/+} (493) (Taula 9, línia 13). Aquests resultats concorden amb un estudi previ en el que es va demostrar que el ratolí IL-1Ra^{-/-} presentava un increment en les lesions ateroscleròtiques respecte als controls quan era alimentat amb una dieta aterogènica (494).

Ratolins *knockout* i dobles *knockout* del receptor d' IL-6 i d'IL-6 i apo E

Els macròfags, monòcits, limfòcits T, cèl·lules endotelials, fibroblasts, cèl·lules musculars llises, osteoblasts i condrocits produeixen IL-6. Els principals efectes biològics que s'atribueixen a la IL-6 són la proliferació i diferenciació dels limfòcits B i T, així com la regulació de la resposta de fase aguda (495). Els ratolins dobles *knockout* Apo E^{-/-}, IL-6^{-/-}, presenten lesions ateroscleròtiques que són significativament superiors que les que presenten els ratolins Apo E^{-/-}, IL-6^{+/+} i presenten concentracions plasmàtiques de colesterol superiors als controls (497, 498) (Taula 9, línia 14). Per tant, els resultats d'aquests estudis apunten al fet la IL-6 pot tenir un paper important en l'inhibició de l'aterogènesi.

Per contra, l'administració d'altres dosis d'IL-6 recombinant (rIL-6), resulta en un augment significatiu de la mida de les lesions ateroscleròtiques en ratolins apo E^{-/-} (496) (Taula 9, línies 15 i 16). Recentment, hem realitzat un estudi en el que s'ha administrat dos cops per setmana rIL-6 (50 ng/dosi) a ratolins apo E^{-/-}, durant 12 setmanes (Dades no publicades) i els resultats indiquen que l'administració de rIL-6 provoca en aquest model animal, una disminució significativa en la mida de les lesions ateroscleròtiques mesurades en el sinus aòrtic, per tant, confirmant el paper antiaterogènic de la IL-6.

Ratolins dobles *knockout* d'IL-10 i apoE / d'IL-18 i apo E.

La deficiència en IL-10 també ha estat estudiada en ratolins apo E^{-/-} i els resultats indiquen que la IL-10 té un paper ateroprotector (499) (Taula 9, línia 17). A més, la transferència del plàsmid que conté IL-10 murídic a ratolins apo E^{-/-} disminueix significativament l'àrea de la placa ateroscleròtica i l'àrea ocupada per macròfags (500) (Taula 9, línia 18). Contràriament, sembla ser que la deficiència d'IL-18 en el mateix model animal redueix la mida de les lesions ateroscleròtiques, a més de que aquestes presenten un fenotip més estable (501), (Taula 9, línia 19).

Ratolins dobles *knockout* deTNF- α i apo E

El factor de necrosi tumoral és secretat per les cèl·lules T CD4⁺. Aquestes promouen l'activació dels macròfags i la inflamació. Un estudi en animals apo E^{-/-} mostra que el tractament amb TNF- α recombinant (rTNF- α), no inhibeix l'aterogènesi en aquest model animal (502) (Taula 9, línia 20). Tanmateix, els resultats d'un estudi en el que s'utilitzen ratolins dobles *knockout* (apo E^{-/-}, TNF- α ^{-/-}) mostren que tant la mida de la lesió ateroscleròtica com l'expressió de *icam-1*, *vcam-1* i *mcp-1* és significativament inferior en els ratolins apo E^{-/-}, TNF- α ^{-/-} comparat amb els ratolins apo E^{-/-} (503) (Taula 9, línia 21). Per tant, aquests resultats indiquen que TNF- α juga un paper aterogènic molt important.

Ratolins dobles *knockout* de CX3CL1 i apo E

La fractalquina (CX3CL1) és una proteïna que s'expressa tant en la forma soluble, com unida a la membrana en la superfície de l'endoteli inflammat. La fractalquina possibilita no tant sols la unió de monòcits i limfòcits a l'endoteli, sinó que també la forma soluble pot actuar com una citoquina (504, 505). Ambdós, la fractalquina i el seu receptor (CX3CR1) són expressats en les lesions ateroscleròtiques d'humans i ratolins (506). Els ratolins dobles *knockout* CX3CR1/apo E, presenten lesions ateroscleròtiques significativament inferiors als ratolins CX3CR1^{+/+}, a més d'una reducció del 50 % del cúmul de macròfags a nivell del sinus aòrtic (507) (Taula 9, línia 22). D'altra banda, la deficiència del seu lligand en el mateix model animal produeix també una disminució en la mida de les lesions ateroscleròtiques examinades en l'arc aòrtic (35%) i en l'arc braqueo-encefàlic (50%) (508) (Taula 9, línia 23), confirmant el paper que la fractalquina i el seu receptor tenen sobre l'aterogènesi.

Ratolins *knockout* de RANTES i CCR5

La citoquina *regulated on activated normal T-Cell expressed and secreted* (CCL5/RANTES) és una proteïna soluble de 7.8 kDa secretada per diferents tipus cel·lulars com cèl·lules endotelials, cèl·lules musculars llises, cèl·lules T activades, macròfags i plaquetes (509, 510). RANTES interacciona amb els receptors de citoquines CCR1, CCR3 i CCR5 (511, 512), mitjançant la transmigració dels monòcits en l'endoteli activat. RANTES ha estat detectada en el plasma d'humans amb malalties cardiovasculars (513) i a més s'ha demostrat la presència de RANTES en les artèries caròtides de ratolins apo E^{-/-} així com en cèl·lules T de plaques ateroscleròtiques d'humà (511, 514). Recentment s'han publicat diversos estudis en que es relacionen determinats polimorfismes existents en el gen que codifica per RANTES amb un major risc d'aterosclerosi (515, 516). El ratolí deficient en RANTES mostra una alteració en el reclutament de cèl·lules T i monòcits als teixits inflamats (517) (Taula 9, línia 24), mentre que el tractament amb l'antagonista de RANTES (Met-RANTES) inhibeix el reclutament de monòcits en l'endoteli, la formació de la neointima i el cúmul de

macròfags després d'haver induït lesió arterial, així com també disminueix la progressió d'aterosclerosi en artèries de ratolins deficients en apo E /LDLR (511, 519) (Taula 9, línia 25). Per contra, un estudi publicat per Kuziel et al. apunta que la deficiència en el seu receptor, CCR5 (expressat en cèl·lules T, macròfags, cèl·lules musculars llises i cèl·lules endotelials) no protegeix al ratolí apo E^{-/-} de l'aterogènesi en estadis inicials (520).

Un estudi realitzat en ratolins deficients per al gen MCP-1 (MCP-1^{-/-}) mostra que els macròfags MCP-1^{-/-} tenen una major expressió de RANTES, MIP-1 α i β i MIP-2. Contràriament, el tractament de macròfags MCP-1^{-/-} amb MCP-1 exògena, selectivament va suprimir l'expressió de RANTES, MIP-1 α i β , suggerint que en els macròfags, MCP-1 regula negativament l'expressió d'aquestes citoquines (521).

Ratolins *knockout* de Toll-like receptors

Els receptors *toll-like receptors* (TLR), formen part d'una família de receptors que activen vies de senyalització inflammatòries com a resposta a la presència de microorganismes patògens (522). Les cèl·lules presents en lesions ateroscleròtiques d'humans expressen un gran espectre de TLRs i es postula que la inflamació de la placa pot dependre en part d'aquest mecanisme (523). L'expressió del TLR1, 2 i 4 està augmentada en lesions ateroscleròtiques d'humans (523). El peptidoglicà (PGN) és un lligand de TLR2 que ha estat demostrat en plaques ateroscleròtiques (524, 525). També, d'altres lligands per TLR2, en concret *heat shock proteins* (Hsp)60 i Hsp70 han estat trobats en plaques de ratolins deficients en apoE (526). La deficiència de MyD88 o TLR4, redueix la mida de les lesions ateroscleròtiques en el ratolí apo E^{-/-}, a més de trobar que les plaques contenen menys macròfags i lípids, una menor expressió de COX-2 i concentracions plasmàtiques de MCP-1 i IL-12 disminuïdes respecte als ratolins controls (527) (Taula 9, línia 26).

E) Gens associats amb la inflamació: mediadors d'inflamació

Els mediadors de la inflamació aguda, com són la histamina, prostaglandines, leucotriens i tromboxans també han estat estudiats per tal de determinar el paper que poden jugar en el desenvolupament de l'aterosclerosi.

Ratolins *knockout* de iNOS i eNOS

L'òxid nítric sintasa endotelial, neuronal i la induïble s'expressen en les lesions arterioscleròtiques.

S'ha demostrat que hi ha una disminució en l'aterogènesi en ratolins dobles *knockout* iNOS^{-/-}, apo E^{-/-}, possiblement causat per una disminució en l'estrès oxidatiu en la paret vascular (528) (Taula 10, línia 1).

D'acord amb aquest estudi, s'ha demostrat que la deficiència en eNOS que s'expressa constitutivament en l'endoteli, porta a un increment en la mida de les lesions ateroscleròtiques (529) (Taula 10, línia 2).

Ratolins dobles *knockout* de la 12/15 Lipoxigenasa i apo E

Malgrat que no està clar el paper que els inhibidors de la COX-2 tenen sobre l'aterogènesi, s'ha estudiat com influeix la deficiència de la 12/15-lipoxigenasa sobre el desenvolupament de l'aterosclerosi en ratolins apo E^{-/-}. Els resultats d'aquests estudis indiquen que la 12/15 lipoxigenasa té un paper aterogènic, doncs la seva deficiència disminueix la mida de les lesions ateroscleròtiques i la peroxidació lipídica (530-532) (Taula 10, línies 3 -6).

F) Gens associats amb la inflamació: proteïnes de fase aguda

Les cèl·lules inflammatòries de la placa ateroscleròtica porten a la producció d'una gran quantitat de citokines inflammatòries, que indueixen la secreció d'IL-6. La IL-6 causa la producció de proteïnes de fase aguda, que poden ser detectades en la circulació perifèrica, iniciant així una potent cascada inflammatòria tant a nivell de la lesió arterioscleròtica com a nivell sistèmic (Figura 21).

Ratolins transgènics de la PCR i marcadors de la inflamació

En humans, concentracions elevades de la PCR s'associen amb un major risc de patir aterosclerosi. Estudis *'in vitro'* han posat de manifest que la PCR té efectes directes sobre la progressió de l'aterosclerosi. Entre aquests, destaquen la capacitat d'unir-se i activar el

complement, la inducció d'un conjunt de molècules d'adhesió, la mediació de la captació de LDL per macròfags de l'endoteli, la inducció del reclutament de monòcits a la paret arterial i l'augment de la producció de MCP-1 (533-537). Tanmateix, en ratolí, es troben petites quantitats de PCR circulant (petites traces) i la seva concentració gairebé no varia durant un procés inflamatori (538). Per aquesta raó s'han creat ratolins transgènics que expressen la PCR humana (CRPtg) (539).

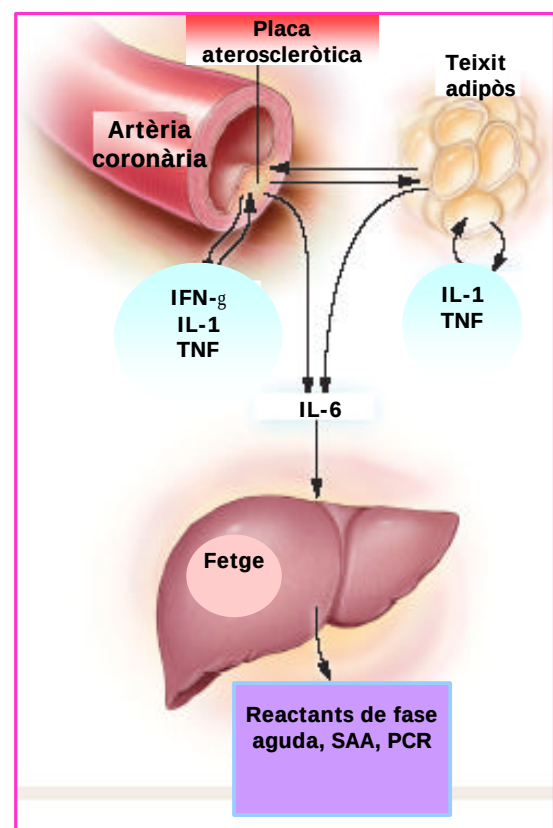


Figura 21. Les cèl·lules activades de la placa secreten citokines inflammatòries que indueixen a la producció d'IL-6. La IL-6 també pot ser produïda en d'altres teixits com a resposta a la infecció i en el teixit adipós en pacients amb síndrome metabòlic.

Hansson. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. NEJM 2005;352.

Danenberg et al. van avaluar l'impacte de la PCR humana sobre la reparació vascular *'in vivo'* en ratolins CRPtg i van trobar que la resposta a una lesió arterial induïda en ratolins CRPtg era superior i resultava en un augment en l'oclusió trombòtica comparat amb ratolins control (540). Prèviament a l'estudi fet per Paul et al. no estava clar si la PCR era tant sols un marcador que determinava el risc de patir aterosclerosi, o bé, tenia *'in vivo'* algun efecte directe sobre l'aterogènesi. Paul et al van estudiar en ratolins deficientes en apo E que sobreexpressaven la PCR humana, l'efecte que aquesta tenia sobre el desenvolupament de l'aterosclerosi (Taula 11, línies 1 i 2).

Els resultats d'aquest estudi, mostren que l'expressió de la PCR humana en el ratolí, accelera la progressió de les lesions ateroscleròtiques (541), per tant, demostrant l'efecte directe que *'in vivo'* té aquesta proteïna sobre l'aterogènesi. Per contra, dos estudis recents mostren resultats contraris. Trion et al. van estudiar l'efecte de la sobreexpressió de la PCR humana en el ratolí apo E*3 Leiden i no van trobar cap diferència en la mida de les lesions ateroscleròtiques que aquests ratolins presentaven a les 40-45 setmanes d'edat (542) (Taula 11, línia 3). Reifenberg et al. van introduir el gen de la PCR de conill en el ratolí apo E^{-/-} i van concloure que la PCR no influència el desenvolupament de les lesions ateroscleròtiques en aquest model animal (543) (Taula 11, línia 4). Per tant, aquests dos darrers estudis posen en dubte el paper que la PCR pot jugar en el desenvolupament de l'aterosclerosi i fan pensar que almenys en l'humà la PCR representa tant sols un marcador d'inflamació molt útil per la predicció del risc cardiovascular.

Les proteïnes sèriques amiloide A (SAA) són una família de proteïnes homòlogues que inclou SAA1 i SAA2, les quals són proteïnes de fase aguda i SAA4, que s'expressa de forma constitutiva en humans, però no en ratolins. Tant en humans com en ratolins, les concentracions plasmàtiques de SAA1 i SAA2 poden augmentar fins a 100 vegades com a resposta a un estímul inflamatori. En els ratolins

deficients en apo E i en els deficientes per al LDLR, s'ha detectat SAA en les lesions ateroscleròtiques tant en lesions inicials com en les més avançades. A més, s'ha trobat una correlació directa entre concentracions plasmàtiques de SAA i la mida de les lesions ateroscleròtiques.

Un estudi recent en el que s'utilitzen ratolins apo E^{-/-} i LDLR^{-/-} demostra que

(1) SAA s'acumula en les lesions ateroscleròtiques d'ambdós models murítics, (2) que existeix una forta correlació entre l'àrea ocupada per SAA i l'àrea de la placa, (3) que l'àrea ocupada per SAA està significativament correlaciona amb l'àrea ocupada per apoB, suggerint que SAA podria augmentar la retenció de les partícules VLDL en la lesió ateroscleròtica (544).

1.4. Objectius

Estudi 1. Estudiar l'efecte que l'administració d'aspirina, durant un temps prolongat, pot tenir sobre el desenvolupament de l'aterosclerosi en el ratolí deficient en apo E alimentat amb una dieta aterogènica.

Estudi 2. Investigar l'efecte que un increment en la ingesta de colesterol pot tenir sobre el desenvolupament de la esteatohepatitis en el ratolí deficient en apo E. Estudiar, si existeixen, les relacions cronològiques entre les alteracions hepàtiques, la hipercolesterolèmia i la lesió arteroscleròtica.

Estudi 3. Avaluar l'efecte d'una inflamació crònica, estèril i localitzada en el desenvolupament d'aterosclerosi en el ratolí deficient en apo E. Determinar si l'efecte anterior és modificat per l'administració simultània d'un agent antiinflamatori no esteroide, com és l'aspirina.

Annex 1

Taula 1. Funcions dels components cel·lulars d'una artèria sana i d'una artèria amb aterosclerosi.

Tipus cel·lular	Funció en artèria sana	Funció en artèria amb lesió ateroscleròtica
Cèl·lula endotelial	Antiadhesió Vasoreactivitat Producció NO Producció citoquines	Adhesió leucòcits Vasoconstricció Disminució producció NO Increment producció citoquines Migració a l'íntima
Cèl·lula muscular llisa	Estructural Vasoreactivitat Remodelació	Proliferació Augment producció MMPs Secreció de citoquines
Macròfag	Captació de lípids	Secreció MMPs Ruptura de placa ?
Limfòcit T	Senyalització inflamatòria	Estimulació de macròfags Producció de citoquines

Taula 2. Nous factors de risc per l'aterosclerosi.

Marcadors d'inflamació Proteïna C reactiva Interleuquines (IL-6...) Proteïna sèrica amiloide A Molècules d'adhesió, lligand CD40 soluble Comptatge de leucòcits
Marcadors hemostasi/trombosi Fibrinògen i Factor <i>von Willebrand</i> Inhibidor dels activadors del plasminògen tipus 1 Activador tissular del plasminògen Factors V, VII, VIII, D-dímer Fibrinopèptid A Fragments de protrombina 1+2
Factors relacionats amb la funció plaquetària Agregació i activitat plaquetària La mida i volum de les plaquetes
Factors relacionats amb el metabolisme lipídic [LDL]/ LDL oxidada Lipoproteïna (a) Lipoproteïnes remanents Apolipoproteïnes A1 i B Subtipus d'HDL
D'altres factors Homocisteïna Fosfolipasa A(2) associada a lipoproteïnes Microalbuminúria Resistència a la insulina Genotip enzim convertidor de la angiotensina I Genotip activadors del plasminògen tipus 1 Genotip apo E Agents infecciosos Factors psicosocials

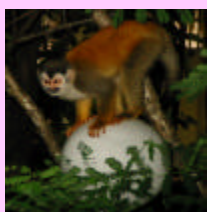
Taula 3. Possibles mecanismes d'acció dels leucòcits en la malaltia cardiovascular.

Lesió de les cèl·lules endotelials causada per enzims proteolítics
Perfusió disminuïda
Agregació leucocitària anormal
Efectes en el flux sanguini
Expressió incrementada dels factors tissulars
Activació del sistema de coagulació
Associació amb factors de risc ateroscлерòtics
Inestabilitat elèctrica
Increment en la formació del tromb en pacients amb malaltia cardiovascular
Adhesió leucocitària incrementada

Taula 4. Principals models animals que s'han utilitzat i es continuen utilitzant per a l'estudi de l'aterosclerosi.



Oryctolagus cuniculus



Saguinus oedipus,
Saimiri oerstedii,
Macaca mulatta



Sus scrofa



Mus musculus

Avantatges

- Responen a dietes enriquides amb colesterol: desenvolupen lesions ateroscleròtiques.
- Les lesions ateroscleròtiques que desenvolupen tenen una gran similitud a les de l'humà.
- Quan són alimentats amb dietes que contenen colesterol, presenten lesions ateroscleròtiques molt similars a les de l'humà.
- Fàcil manipulació
- Cost relativament baix
- Gran coneixement sobre el seu genoma
- Alta taxa de reproducció

Inconvenients

- No desenvolupen aterosclerosi de forma espontània
- Desenvolupen lesions ateroscleròtiques que tenen un alt contingut en greix i macròfags (en comparació amb les lesions que es troben en l'humà)
- Presenten concentracions plasmàtiques de colesterol que són extraordinàriament
- Risc d'extinció
- Elevat cost
- Dificultat en la manipulació
- Elevat cost
- Dificultat en el manteniment de les colònies
- Dificultat en la manipulació
- Els ratolins sense modificar genèticament són molt resistent a desenvolupar aterosclerosi

Taula 5. Concentracions plasmàtiques de colesterol i triglicèrids (mitjana $\pm$ desviació estàndard) en els ratolins que expressen l'apo E i en ratolins heterozigots i homozigots pel gen de l'apo E de 20 setmanes d'edat i alimentats amb una dieta normal de ratolí.

Animals	Colesterol total (mg/dL)	HDL-colesterol (mg/dL)	Triglicèrids (mg/dL)
Apo E ^{+/+}	86 $\pm$ 20	73 $\pm$ 28	73 $\pm$ 36
Apo E ^{+/-}	88 $\pm$ 22	75 $\pm$ 18	102 $\pm$ 40
Apo E ^{-/-}	434 $\pm$ 129	33 $\pm$ 15	123 $\pm$ 51

(Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. Science. 1992;258:468-471).

Taula 6. Comparació de l'extensió de les lesions ateroscleròtiques, les concentracions plasmàtiques de colesterol i els pesos en ratolins deficientes en apo E i en el receptor de les LDL.

Variable	Apo E ^{-/-}		LDLR ^{-/-}	
	Mascles (n=7)	Femelles (n=8)	Mascles (n=8)	Femelles (n=8)
Aterosclerosi (%)				
Aorta (superfície total)	27.4 $\pm$ 6.3	17.1 $\pm$ 1.6	29.2 $\pm$ 3.1	14.8 $\pm$ 3.2 ^a
Arc aòrtic	46.9 $\pm$ 3.0	51.6 $\pm$ 2.0	62.2 $\pm$ 3.3	47.7 $\pm$ 3.5 ^b
Aorta toràcica + abdominal	23.8 $\pm$ 7.4	9.2 $\pm$ 1.8 ^c	22.5 $\pm$ 3.1	8.1 $\pm$ 3.9 ^b
Concentració plasmàtica de colesterol (mg/dL)	1916 $\pm$ 187	2489 $\pm$ 275	895 $\pm$ 116	992 $\pm$ 80
Pes total (g) ^d	43.5 $\pm$ 4.8	39.2 $\pm$ 1.7	28.9 $\pm$ 1.1	22.8 $\pm$ 0.9 ^b

(Tangirala RK, Rubin EM, Palinski W. Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor -deficient and apolipoprotein E-deficient mice. J Lipid Res. 1995 Nov;36(11):2320-8).

^a P < 0.005 respecte a ratolins LDLR ^{-/-} mascles.

^b P < 0.01 respecte a ratolins LDLR ^{-/-} mascles.

^c P < 0.06 respecte a ratolins apoE ^{-/-} mascles.

^d Després de 6 mesos d'intervenció dietètica

Taula 7. Estudis realitzats en models animals en relació amb el paper que ACAT-1 i ACAT-2 poden jugar en el desenvolupament de l'aterosclerosi.

Model animal	Tractament	Resultats	Ref.
ACAT 1 ^{-/-}	----	↓ colesterol esterificat en macròfags	395
LDLR ^{-/-}	Reconstitució amb macròfags derivats d'ACAT ^{-/-}	↑ lesions ateroscleròtiques ↑ colesterol lliure	396
Apo E ^{-/-}	Inhibidors d'ACAT (ACAT 1)	No hi cap canvi en el la mida/ composició placa arterioscleròtica	398
Apo E ^{-/-}	F-1394 (Inhibidor d'ACAT-1 i ACAT-2)	↓ concentració plasmàtica de colesterol (30 %) ↓ la mida placa arterioscleròtica	399
Apo E ^{-/-} , LDLR ^{-/-}	F-1394	↓ la mida placa arterioscleròtica (32 %)	400
Conill	NTE-122	↓ la mida placa arterioscleròtica	401
Conill	F-12511	↓ incidència lesions ateroscleròtiques (50 %)	402
Apo E* 3 Leiden	Avasimibe	↓ la mida placa arterioscleròtica (73 %)	403
Conill	Dieta aterogènica, Avasimibe, simvastatin	↓ la mida placa arterioscleròtica (11%) ↓ contingut de macròfags en la placa (73 %)	404
Apo E ^{-/-}	Dieta aterogènica Beauveriolide III	↓ la mida placa arterioscleròtica (62 %)	405
LDLR ^{-/-}	Beauveriolide III	↓ la mida placa arterioscleròtica (40-60 %)	405
Apo E ^{-/-} , ACAT-2 ^{-/-}	----	↓ concentració plasmàtica de colesterol ↑ HDL-colesterol (61 %) ↑ Triglicèrids (90 %) Absència d'aterosclerosi	406
Apo E ^{-/-}	Dieta normal Tamoxifen	↓ Colesterol total ↑ HDL-colesterol ↓ Formació placa arterioscleròtica	407
Apo E ^{-/-}	Dieta aterogènica Tamoxifen	↓ Colesterol total ↑ LDL-colesterol (50 %) ↓ Formació placa arterioscleròtica	407
Mono	Tamoxifen	Cap canvi en les concentracions HDL-, LDL-colesterol ↓ Aterosclerosi en artèries coronàries.	408

Taula 8. Models experimentals d'aterosclerosi en què s'investiguen gens involucrats en la inflamació: molècules d'adhesió.

Model animal	Tractament	Resultats	Ref.
Apo E ^{-/-} , M-CSF ^{-/-}	Dieta normal	↓ Disminució de la placa d'ateroma	464
Apo E ^{-/-}	Administració d'Ab anti M-CSF	? Disminució de la placa d'ateroma	465
Apo E ^{-/-} , P-selectina ^{-/-}	Dieta normal	? Disminució de la placa d'ateroma	468
LDLR ^{-/-} , P-selectina ^{-/-}	Dieta rica en greix	? Disminució de la placa d'ateroma	469
Apo E ^{-/-} , E-selectina ^{-/-}	Dieta normal	? Disminució de la placa d'ateroma	468
LDLR ^{-/-} , P, E-selectina ^{-/-}	Dieta rica en greix	? Disminució de la placa d'ateroma	470
LDLR ^{-/-} , VCAM ^{-/-}	Dieta enriquida amb colesterol	Disminució de la placa d'ateroma	472
Apo E ^{-/-} , ICAM ^{-/-}	Dieta normal	? Disminució de la placa d'ateroma	468

Taula 9. Models experimentals d'aterosclerosi en què s'investiguen gens involucrats en la inflamació: citoquines i els seus receptors.

Model animal	Tractament	Resultats	Ref.
LDLR ^{-/-} , MCP-1 ^{-/-}	Dieta suplementada amb greix	? 5 vegades la mida lesions ateroscleròtiques	476
Apo E ^{-/-} , CCR2 ^{-/-}	Dieta normal	? 3 vegades vegades la mida lesions ateroscleròtiques	478
Apo E ^{-/-} , CCR2 ^{+/-}	Dieta normal	? 1,4 vegades vegades la mida lesions ateroscleròtiques	478
Apo E ^{-/-} , CCR2 ^{-/-}	Dieta suplementada amb greix	? 1,4 vegades vegades la mida lesions ateroscleròtiques	479
Apo E ^{-/-} , CCR2 ^{+/-}	Dieta suplementada amb greix	? 1,4 vegades vegades la mida lesions ateroscleròtiques	479
Apo E ^{-/-}	Trasplantament amb cel·ls de medul·la òssia del ratolí transgènic MCP-1	? 1,6 vegades vegades la mida lesions ateroscleròtiques	480
Apo E ^{-/-}	Bloqueig del gen MCP-1 (Transfecció amb 7ND)	? progressió lesions ja establertes	481
Apo E ^{-/-} , CD154 ^{-/-}	Dieta normal	? contingut lipídic en la placa d'ateroma, més rica en col·lagen, placa estable amb un contingut reduït de limfòcits T i macròfags	483
Apo E ^{-/-} , IFN- γ R ^{-/-}	Dieta suplementada amb greix	? 1,6 vegades	484
LDLR ^{-/-}	Trasplantament amb cel·ls de medul·la òssia de CXCR-2 ^{-/-}	? 2,5 vegades	485
Apo E ^{-/-} , IL-1 β ^{-/-}	Dieta normal	? lesió arterioscleròtica (30 %) ? nivells de mRNA de VCAM-1 i MCP-1	488
Apo E ^{-/-}	Tractament amb IL-1Ra	? lesió arterioscleròtica	492
apo E ^{-/-} , IL-1Ra ^{+/-}	Dieta normal	? lesió arterioscleròtica (30 %)	493
Apo E ^{-/-} , IL-6 ^{-/-}	Dieta normal	? lesions ateroscleròtiques	497,498
Apo E ^{-/-}	Administració de rIL-6	? lesions ateroscleròtiques	496
Apo E ^{-/-}	Dieta normal		
Apo E ^{-/-}	Administració de rIL-6	? lesions ateroscleròtiques	496
Apo E ^{-/-}	Dieta rica en greix		
Apo E ^{-/-} , IL-10 ^{-/-}	Dieta normal	? lesions ateroscleròtiques	499
Apo E ^{-/-}	Transferència d'IL-10 cDNA	? lesió arterioscleròtica ? àrea ocupada per macròfags	500
Apo E ^{-/-} , IL-18 ^{-/-}	Dieta normal	? lesió arterioscleròtica	501
Apo E ^{-/-}	Tractament amb rTNF- α	= lesió ateroscleròtica	502
Apo E ^{-/-} , TNF- α ^{-/-}	Dieta normal	? lesió arterioscleròtica ? nivells de mRNA d' <i>icam-1</i> , <i>vcam-1</i> i <i>mcp-1</i>	503
Apo E ^{-/-} , CX3CR1 ^{-/-}	Dieta normal	? lesió arterioscleròtica (59 %) ? cúmul macròfags (50%)	507
Apo E ^{-/-} , CX3CL1 ^{-/-}	Dieta pobre en colesterol	? lesió arterioscleròtica	508
RANTES	Dieta normal	Assaig funció limf T; s'observa una reducció en el reclutament de monòcits i limfòcits T en els teixits inflamats	517
LDLR ^{-/-}	Met- RANTES		
	Dieta enriquida amb colesterol	limita la progressió de l'aterosclerosi 'in vivo'	519
Apo E ^{-/-} , TLR4 ; Apo E ^{-/-} , MyD88	Dieta enriquida amb colesterol	? lesió arterioscleròtica ? nivells de mRNA de <i>cox-2</i> ? cúmul lípids i macròfags	527

Taula 10. Models experimentals d'aterosclerosi en què s'investiguen gens involucrats en la inflamació: mediadors de la inflamació.

Model animal	Tractament	Resultats	Ref.
Apo E ^{-/-} , iNOS ^{-/-}	Dieta normal	? aterogènesi	528
Apo E ^{-/-} , eNOS ^{+/-}	Dieta normal	? lesions ateroscleròtiques	529
Apo E ^{-/-} , 12/15-Lipoxygenasa ^{-/-}	Dieta normal	? lesions ateroscleròtiques	530
Apo E ^{-/-} , 12/15-Lipoxygenasa ^{+/-}	Dieta normal	? la mida de les lesions ateroscleròtiques	530
Apo E ^{-/-} , 12/15-Lipoxygenasa ^{+/-}	Trasplantament amb cel·ls medul·la òssia procedents de ratolí Apo E ^{-/-} , 12/15-Lipoxygenasa ^{+/-} Dieta western	? la mida de les lesions ateroscleròtiques	531
Apo E ^{-/-}	Trasplantament amb cel·ls medul·la òssia procedents de ratolí Apo E ^{-/-} , 12/15-Lipoxygenasa ^{+/-} Dieta western	? la mida de les lesions ateroscleròtiques	532

Taula 11. Models experimentals d'aterosclerosi en què s'investiguen gens involucrats en la inflamació: proteïnes de fase aguda.

Model animal	Tractament	Resultats	Ref.
Apo E ^{-/-} , CRP ^{+/-0}	Dieta normal	? lesions ateroscleròtiques a les 29 setmanes d'edat	541
Apo E ^{-/-} , CRP ^{+/-0}	Dieta normal Administració d'oli de turpentina (inducció inflamació)	? lesions ateroscleròtiques a les 29 setmanes d'edat	541
Apo E *3-Leiden , CRP ^{+/-0}	Dieta normal	= lesió ateroscleròtica	542
Apo E ^{-/-} , CRP ^{+/-0}	Dieta normal	= lesió ateroscleròtica	543

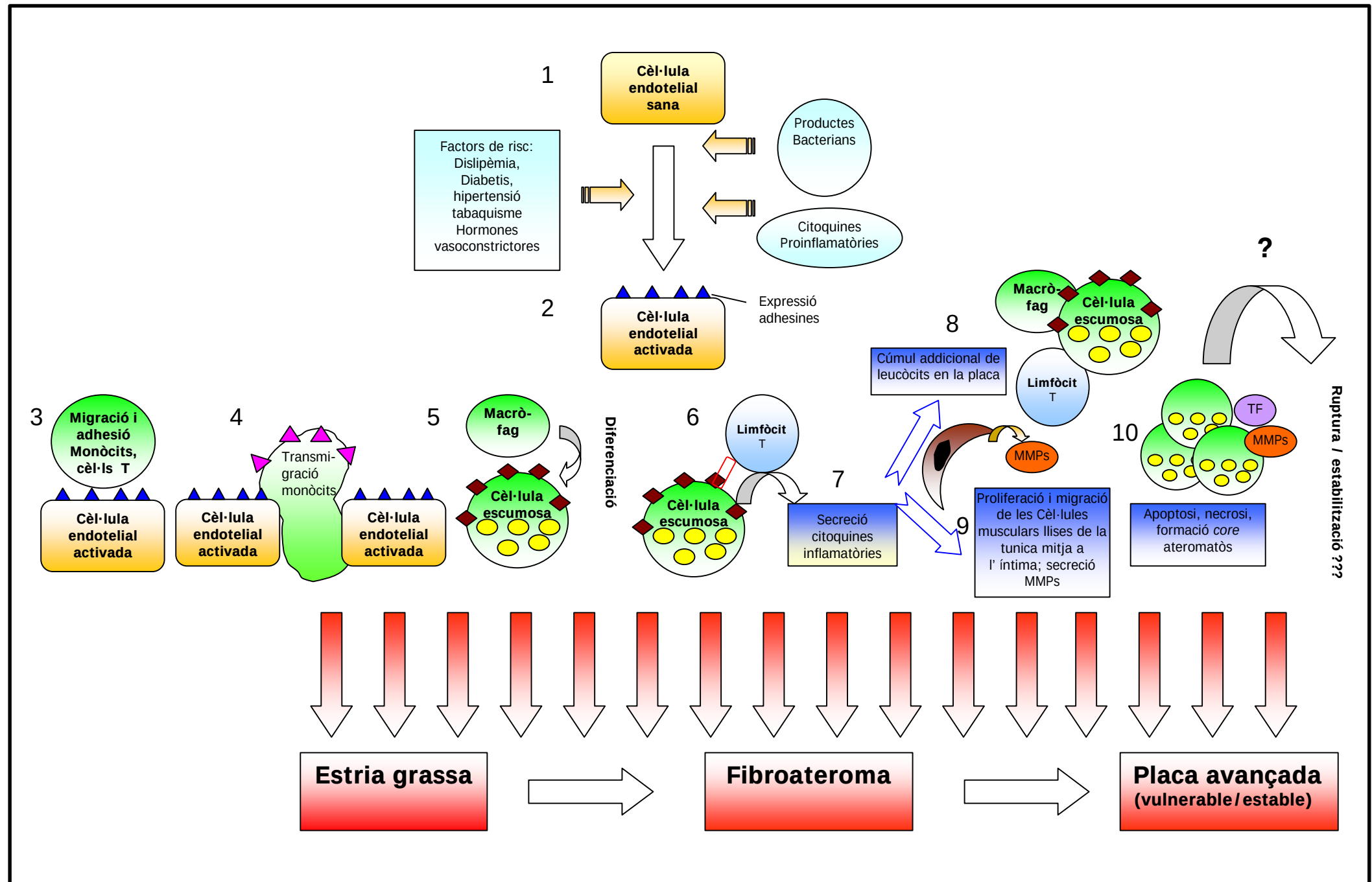


Figura 3. Desenvolupament de la placa ateroscleròtica. La inflamació té un paper fonamental en tots els estadis de la lesió ateroscleròtica, desde la formació de l'estria grassa fins a la ruptura/estabilització de plaques més avançades.

Annex 2

Procediments normalitzats de treball

1. Sacrifici dels ratolins

Objectiu de la instrucció

Realitzar el sacrifici dels ratolins de forma que les mostres s'obtinguin en les condicions òptimes per al posterior processament i realització de les determinacions histològiques, bioquímiques i genètiques.

Ratolins que s'han de sacrificar

Els sacrificis estan programats segons una planificació preestablerta a l'inici del projecte. Pot ser que hi hagin algunes excepcions, doncs poden haver-hi morts prèvies al sacrifici. Per aquesta raó, el dia abans del sacrifici la persona encarregada del sacrifici comprovarà que no hi ha hagut cap defunció.

Un cop confirmada la data de sacrifici així com els números corresponents als animals que es sacrificaran, es prepararan les etiquetes dels eppendorfs, criotubs i tubs d'orina per la recollida i emmagatzematge del plasma, teixits i òrgans diversos amb les dades de cada ratolí a més dels reactius i material quirúrgic necessari.

NOTA: Les mostres de sang es processaran i es guardaran al BIOBANC. Les etiquetes dels criotubs que contindran plasma i sèrum seran preparades pel personal del BIOBANC. Per tal d'informar amb previsió a les persones encarregades de processar aquestes mostres, s'enviarà al/s tècnic/s de l'àrea amb antelació l'arxiu : Estat actual dels grups NOM DE L'ESTUDI.

Mostres a obtenir i sistema d'etiquetatge

Als subjectes de l'estudi NOM DE L'ESTUDI se'ls extraurà sang i es realitzarà una necròpsia completa. Per cada ratolí seran necessaris els següents recipients els quals seran etiquetats el dia abans del sacrifici:

- 1 eppendorf de 1,5 mL amb 27 µL d' EDTA- Na_2 (La dosi d' EDTA- Na_2 es calcula, perquè en el tub amb sang hi hagi una concentració final del 0.05 g en 100mL (0.05%)) que es a on es dipositarà la sang que s'extreu de l'animal.
- 6 criotubs de 0,5 mL per alíquotar el plasma.
- 3 criotubs de 1,5 mL per guardar-hi el **fetge i l'arc aòrtic i aorta toràctica, i intestí (duodè) per a RT-PCR.**
- 4 criotubs de 1,5 mL per guardar-hi una alíquota de teixit hepàtic en cadascú.
- 1 tub estèril de 10 mL que contindrà una solució al 4 % de para-formaldehid i servirà per guardar dos trossos de teixit hepàtic (un d'ells per la tècnica TUNEL en fresc i l'altre per la IHQ de macròfags en fresc)
- 1 tub estèril de 10 mL que contindrà una solució al 4% de para-formaldehid i servirà per guardar el **cor.**
- 2 pots d'orina que contindran una solució al 4 % de para-formaldehid (millor dipositar aquesta solució en el recipient just abans de fer-lo servir) i seran necessaris per dipositar els teixits i òrgans diversos.

Material necessari per al sacrifici:

El dia abans del sacrifici s'ha de preparar el següent material quirúrgic i els reactius següents:

- Xeringues amb agulla de 1 mL (25G - 0,5mm X 16 mm) (1100 601010, Monoject)
- Fulles de bisturí estèrils (1/ ratolí)
- Pincas (com a mínim dues, doncs destinarem unes pincas exclusivament per a RT-PCR)¹
- Tisores (com a mínim dues, doncs destinarem unes tisores per escindir l'artèria aorta)¹
- Material necessari per a perfondre: és un catèter que s'adapta a una ampolla de sèrum fisiològic, que s'ha perforat per la part superior per permetre buidar l'ampolla i omplir-la amb la solució de PBS 1x. S'ha connectat un catèter de diàmetre petit. NOTA: rentar amb PBS 1x fent passar aquesta solució a través del catèter i repetir la operació 2 cops com a mínim abans de fer-la servir per perfondre l'animal.
- Ketamina (Ketalar, PARKE-DAVIS)
- Xilacina (Rompún 2%, BAYER)
- Heparina 1 % (ROVI)
- Phosphate-buffered formaldehyde 4 % (pH 7.4) (Aprox. 500 mL per a 6 ratolins)
- Phosphate-buffered saline 1x autoclavat (pH 7.4) (Aprox. cal 1 L per a perfondre a 6 ratolins)
- Etanol (70 %)
- Dues Plaques de Petri (reutilitzables)
- Una gradeta per dipositar tubs estèrils.
- Dues gradetes per dipositar eppendorfs.
- Una caixa de poliespan que conté una placa de gel i és on conservarem els eppendorfs un cop s'hagi extret la sang.
- Un recipient que conté N₂ (l) per tal de congelar immediatament les mostres destinades a RT-PCR, determinacions lipídiques i enzimàtiques en teixit hepàtic i quantificació de fibrosi.
- Pot resultar útil consultar webs sobre Anatomia i necropsia de ratolins per tal d'optimitzar el procés. Per exemple, a continuació es mostren algunes adreces interessants:
<http://www.geocities.com/virtualbiology/necropsy.html>
http://www.eulep.org/Necropsy_of_the_Mouse/index.php
<http://www.iacuc.uconn.edu/additional.html>

¹ El material quirúrgic per a manipular mostres que s'han de fer servir per a RT-PCR, s'ha d'autoclavar/estufar prèviament abans de la seva utilització.

Aquell material necessari per a manipular la resta de mostres no cal que estigui autoclavat, es netejarà amb un antisèptic i a continuació es guardarà preservat de la resta de material.

Instruccions per al sacrifici

1. Abans de procedir al sacrifici dels animals, pesar cada ratolí i anotar-ho en el full corresponent al sacrifici estudi NOM DE L'ESTUDI. La persona encarregada del sacrifici tindrà un full de sacrifici en el qual s'haurà d'apuntar la data de sacrifici, el número del ratolí, el pes del ratolí abans del sacrifici i d'altres observacions que es facin durant el sacrifici.
2. Assegurar-se que la persona que s'encarrega de l'estabulari ha deixat als animals en dejú (6 h. aproximadament) i en cas de què no ho hagi fet anotar-ho en el full de sacrifici en la columna d'observacions, o bé si s'escau, anul·lar el sacrifici.
3. Comprovar que els números de les etiquetes corresponen al número de ratolí que s'ha de sacrificar. El número del ratolí correspon al número de caixa (de 2 a 3 dígits) seguit d'un número que pot anar de l'1 al 5. Aquest, vindrà donat pel nombre de ratlles que tingui pintades el ratolí en la seva cua (per exemple un ratolí que es troba en la caixa 523 i té pintades 2 ratlles en la seva cua s'identificarà com 523.2).

4. A continuació, dipositar sobre el taulell de treball prèviament netejat amb una solució d'etanol al 70 % el que s'indica a continuació:
 - dos pots d'orina del ratolí que s'ha de sacrificar (reservar la resta en una altra zona) que els omplirem amb la solució de para- formaldehid al 4 %.
 - una gradeta on posarem dos tubs estèrils de 10 mL (un per fixar el fetge i l'altre per a fixar el cor) i els omplirem amb la solució de para- formaldehid al 4 %.
 - una gradeta on posarem un eppendorf que conté 27 µL d' EDTA-Na₂ i servirà per passar la sang que s'extreu del ratolí)
 - una gradeta on posarem 2 criotubs de 1,5 mL per guardar-hi el fetge, un fragment d'artèria aorta per a RT-PCR.
 - una gradeta on posarem 4 criotubs de 1,5 mL per guardar-hi una alíquota de teixit hepàtic en cadascú.
 - dues plaques de Petri (la base i la tapa) i afegir-li una solució de PBS 1x en cadascuna.
 - el material quirúrgic destinat a RT-PCR, prèviament rentat i autoclavat.
 - la resta del material quirúrgic net i prèviament rentat amb una solució d'etanol al 70 %.
5. Preparar el material necessari per a perfondre: connectar l'ampolla al catèter. Aquest ha d'estar tancat de manera que no flueixi el líquid cap a l'exterior. Omplir l'ampolla amb la solució de PBS 1x i a continuació, dipositar l'ampolla a una alçada tal que a l'obrir el catèter, permeti que la solució de PBS flueixi cap a l'exterior. Un cop s'ha provat que el sistema de perfusió funciona, tancar el catèter.
6. Preparar la dissolució d'anestèsic.
NOTA: Considerant que un ratolí té un pes mitjà de 25 g. , per a cada ratolí s'ha de preparar una dissolució que conté : 50 µL de Ketolar + 12.5 µL de Rompún.
7. Administrar al ratolí l'anestèsic (amb l'agulla de 25G) per via intraperitoneal. Esperar 5-10 min. aproximadament per a que l'anestèsic fagi el seu efecte.
NOTA: Es recomana traspasar el ratolí anestesiàt a una altra caixa, doncs s'ha observat que la resta de ratolins poden adoptar actituds agressives vers al ratolí anestesiàt.
8. Mentrestant, preparar una agulla heparinitzada: agafant i deixant anar heparina, de forma que tant l'agulla com la xeringa quedi ben embeguda amb l'anticoagulant.
9. Dessagnar el ratolí per punció cardíaca ventricular amb l'agulla heparinitzada què haviem preparat.
10. A continuació la sang es recull en :
 - un eppendorf de 1,5 mL convenientment retolat que conté la solució d' EDTA-Na₂. Immediatament, agitar suaument el tub per tal de permetre que la sang es barregi bé amb l'anticoagulant i mantindre a 4°C (en la caixa de poliespan que hem preparat) evitant que el tub estigui en contacte amb la placa freda, doncs la sang es podria hemolitzar.
 - un eppendorf de 250 µL convenientment retolat per a recollir sèrum. Immediatament, agitar suaument el tub i mantindre a 4°C (en la caixa de poliespan que hem preparat) evitant que el tub estigui en contacte amb la placa freda, doncs la sang es podria hemolitzar.
11. Amb l'ajut de les pinces i tisores, fer una incisió (1) i amb l'ajut de les pinces retirar la pell i tallar seguint la línia alba (2). (Veure Figura 1)
12. Procedir a obrir el peritoneu procurant no tallar cap vas.
13. Perfondre a aprox. 100 mm Hg amb la solució de PBS 1x (pH 7.4) a través d'un catèter localitzat en el ventricle esquerre. (Veure figura 2)
14. Punxar en l'aurícula dreta (Veure figura 2) amb una agulla de diàmetre aproximadament igual al de l'agulla que hem punxat, de forma que permetem que el PBS surti després d'haver

circulat per tot l'arbre arterial. Així podrem valorar si la perfusió s'està realitzant adequadament.

15. Després d'haver perfos durant 10 min, (és convenient cronometrar) aturar el flux i recollir els òrgans i teixits següents: (Veure figura 3)

- Utilitzar les pinces i tisores que hem destinat per a RT-PCR.
- Extreure el fetge i pesar-lo. Anotar-ho en el full de sacrifici NOM DE L'ESTUDI
- A continuació, extreure un fragment del fetge, i dividir-lo en 6 trossos petits (com a mínim, una de les seves dimensions ha de mesurar 0.5 cm) i reservar-ne la resta.
- Dipositar-los sobre una placa de Petri que conté una solució de PBS (1x) i netejar bé.
- Introduir 1 fragment en un criotub (etiquetat com Fetge RT-PCR) i congelar en N₂ (l) immediatament.
- Introduir 1 fragment per criotub (en total 4) etiquetats com:
 - Fetge per det.lipídiques
 - Fetge per det. Enzimàtiques
 - Fetge per OH-Prolina
 - RESTES deTeixit hepàtic
 i congelar en N₂ (l) immediatament.
- Introduir 1 fragment en una placa de Petri que conté una solució de PBS 1x i tenir cura que el líquid cobreixi el fragment de teixit hepàtic.
- Introduir 1 fragment en el tub de 10 mL que conté una solució de para-formaldehid al 4 % i que està etiquetat com fetge en formol.
- Guardar la resta de teixit hepàtic en el pot d'orina que conté una solució de para-formaldehid al 4 % etiquetat com ÒRGANS DIVERSOS.
- Amb les pinces i tisores destinades a RT-PCR prèviament rentades amb etanol, extreure l'artèria aorta des de l'arc aòrtic aproximadament a una distància d'1mm per sobre del cor fins a l'alçada del diafragma (arc aòrtic i artèria toràctica). Dipositar-la sobre una placa de Petri que conté una solució de PBS (1x). Eliminar restes de greix que poden quedar en la superfície arterial. Guardar ambdós fragments en un mateix criotub (retolat com Arc aòrtic RT-PCR) i immediatament congelar en N₂ (l).
- Disseccionar el cor .
- Utilitzar les pinces i tisores que hem destinat per a RT-PCR i que les hem submergit en etanol a 70 %.
- Dipositar-lo sobre una placa de Petri que conté una solució de PBS (1x) i seccionar el cor amb una fulla de bisturí 2 mm per sota de les aurícules de forma que obtenim una base ben plana.
- Submergir la regió superior del cor en un tub estèril (etiquetat com Cor en formol) i es deixarà durant 4 h i a Temperatura ambient. La base del cor es rebutjarà.
- Disseccionar l'intestí i un cop s'ha rentat en PBS (1x) fer obtenir de 2 a 3 fragments, guardar-los en un criotub (retolat com Intestí RT-PC) i immediatament congelar en N₂(l).
- Amb les pinces i tisores no destinades a RT-PCR, fer un tall al clatell i guardar el cap en el pot d'orina corresponent (etiquetat com Cervell) que conté una solució de para-formaldehid (4%) durant 4 h. com a màxim a 4°C.
- Disseccionar el cervell, el tim, les glàndules salivals, els pulmons, esòfag, estómac, melsa, ronyons, intestí, teixit muscular, teixit subcutani i dipositar immediatament cada òrgan en el pot d'orina corresponent (etiquetat com Òrgans DIVERSOS) per a la recollida de mostres estèrils que conté una solució de para-formaldehid (4%). Conservar a Temperatura ambient durant un mínim de 24 h.
- Amb el tros de fetge que hem dispensat en la Placa de Petri:

Amb un bisturí estèril i tenint cura de no fer pressió sobre el teixit, fer com a mínim 2 blocs que tingui cadascú una superfície total aproximadament d'1mm³.

Transferir els blocs a un recipient que conté una solució de glutaraldehid i que es troba etiquetat com Fetge per ME (Microscopia Electrònica).

- A continuació:
guardar les mostres que contenen fetge congelat (tant per RT-PCR, com per la resta de determinacions) en N₂(l).
Precintat tots els tubs i recipients que contenen paraformaldehid amb paper adhesiu.

16. Quan s'arribi al CRB, immediatament s'emmagatzemaran les mostres que hem preservat en N₂(l) a -80 °C i es centrifugarà la sang tal com s'indica en la IT de processament de mostres NOM DE L'ESTUDI.

17. La resta de mostres es processaran tal i com s'indica en la IT del processament de les mostres NOM DE L'ESTUDI.

Figura 1

Diagram of Subcutaneous Incision

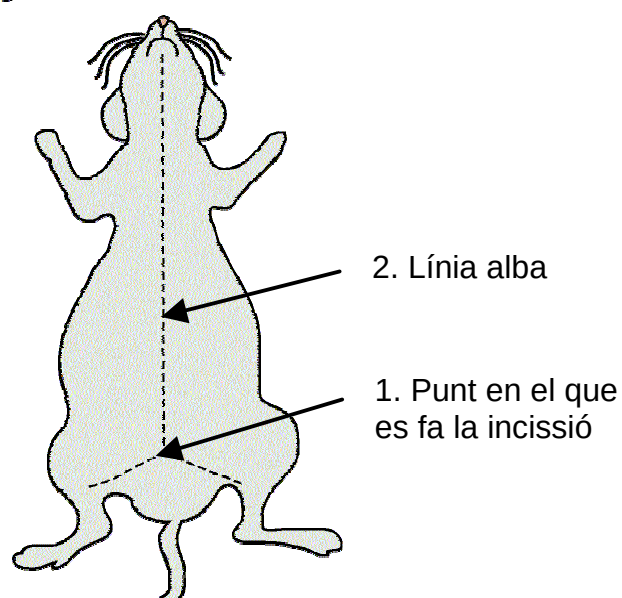


Figura 2

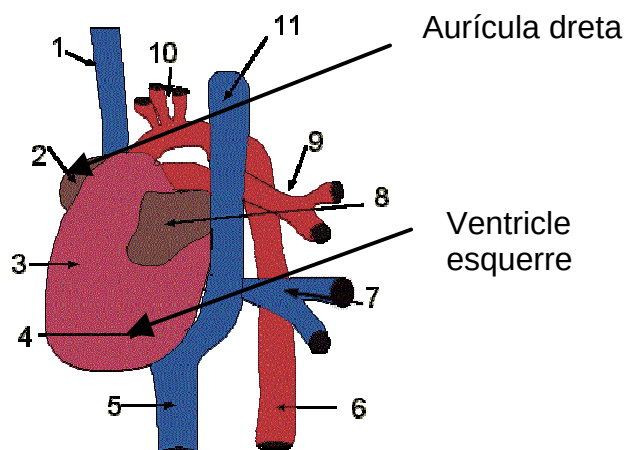
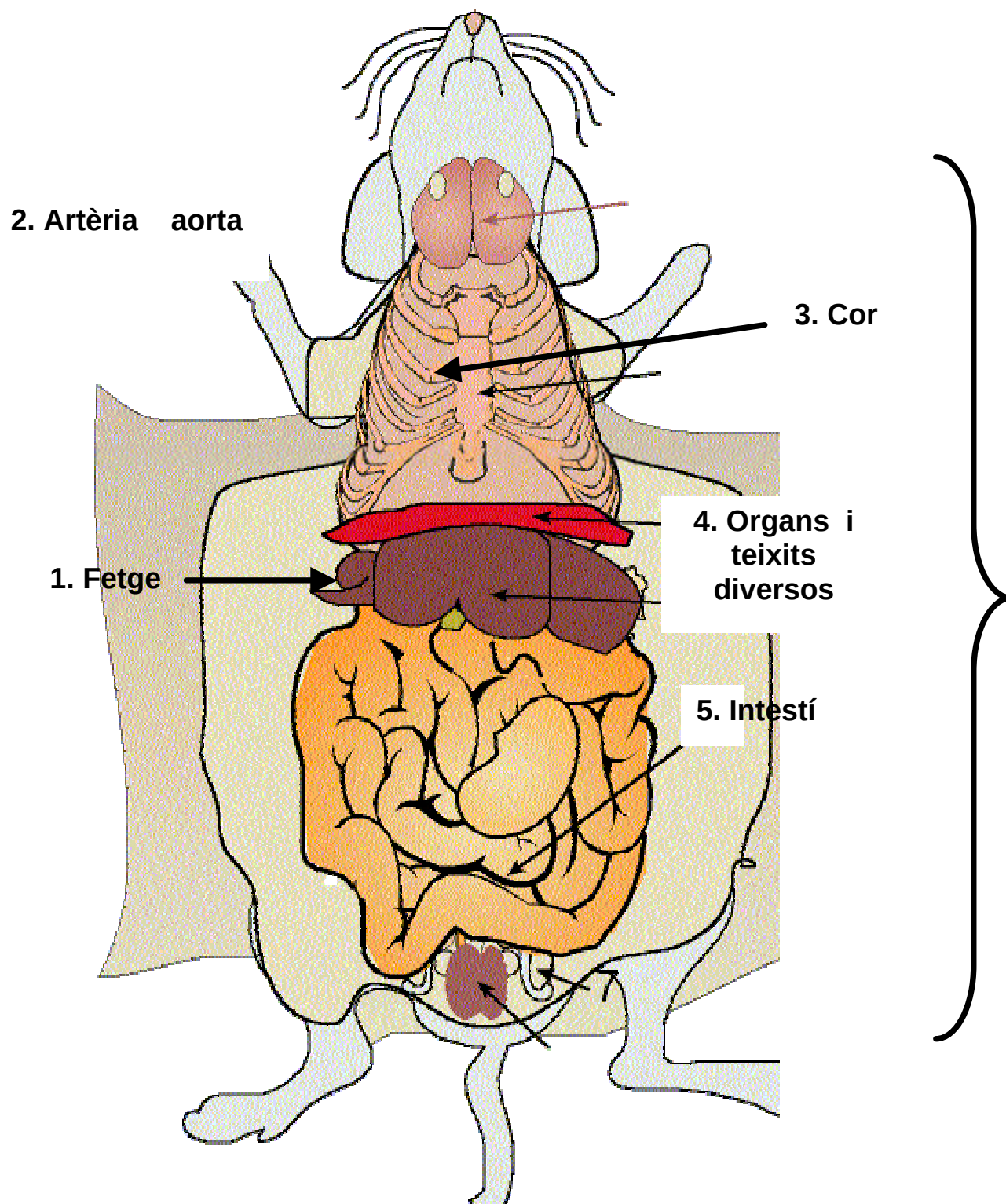
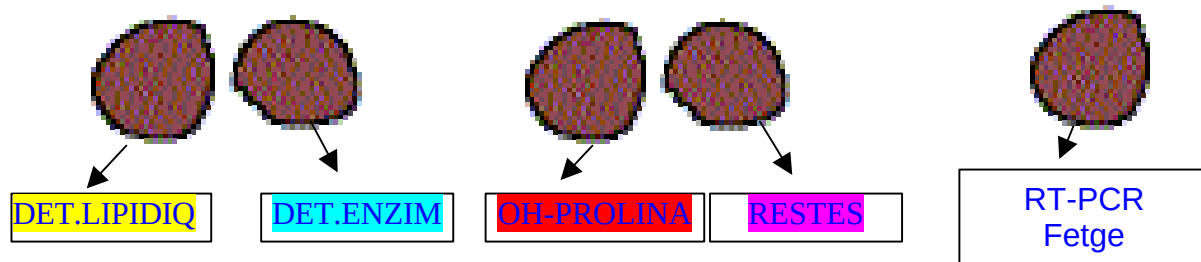


Figura 3. Teixits que s'han de extreure immediatament:

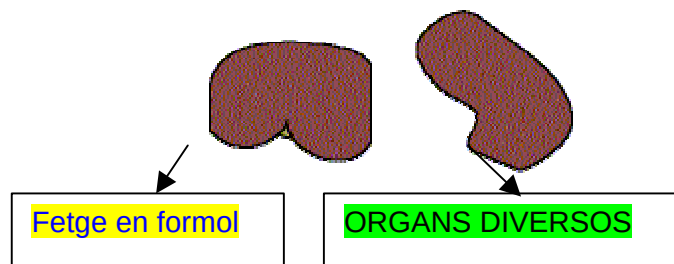


1. Fetge

1.1. Extreure 6 trossos petits i aliquotar-los segons el següent esquema:

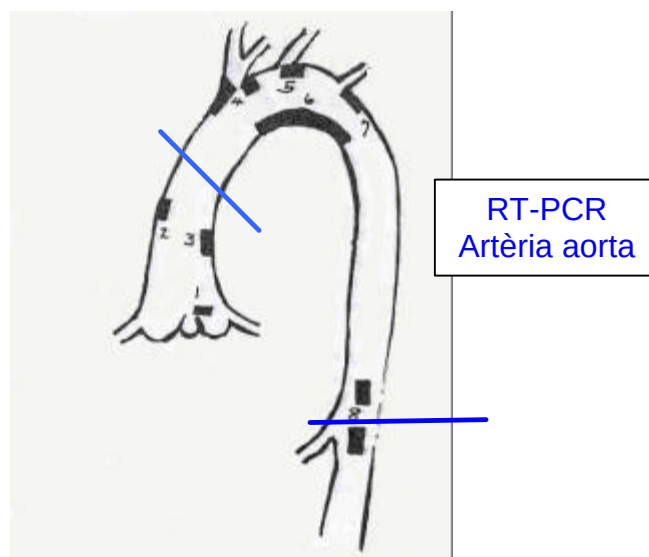


1.2. Guardar la resta en el tub etiquetat com Fetge en Formol.

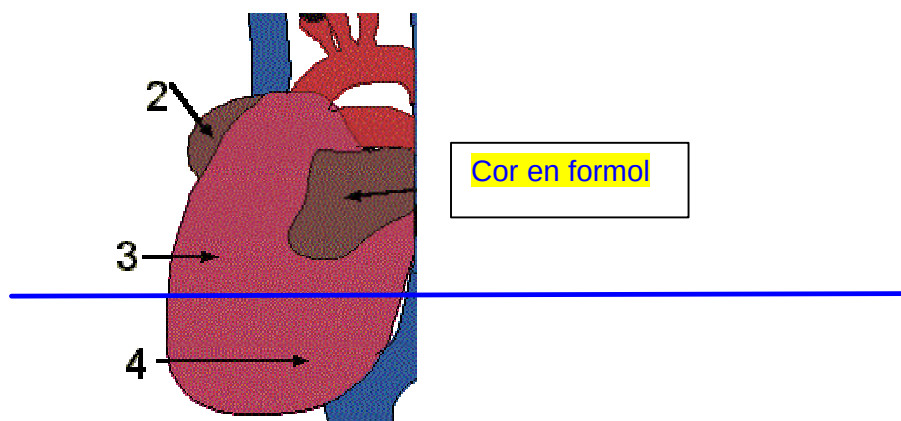


2. Artèria aorta

- 2.1. Escindir l'artèria aorta desde l'arc aortic fins a l'a. toràcica (fragment delimitat per /) i transferir-ho a una placa de Petri que conté PBS 1x.
- 2.2 Extreure les restes de greix que poden quedar en la superfície del vas.
- 2.3. Transferir la porció de l'arc aortic i de l'a. toràcica a un criotub etiquetat com RT-PCR Arc aortic¹



3. Cor. Escindir el cor i separar en dos fragments¹:



4. Organs diversos. Guardar en una solució al 4 % de paraformaldehid els diversos, separats en 2 alíquotes:

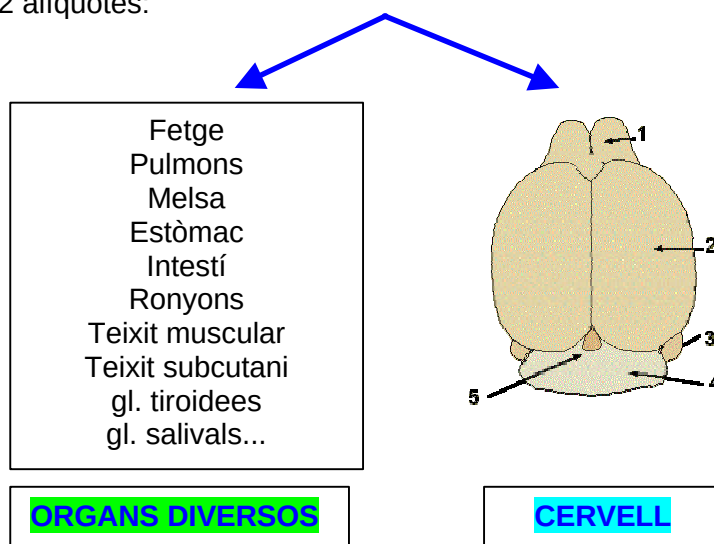
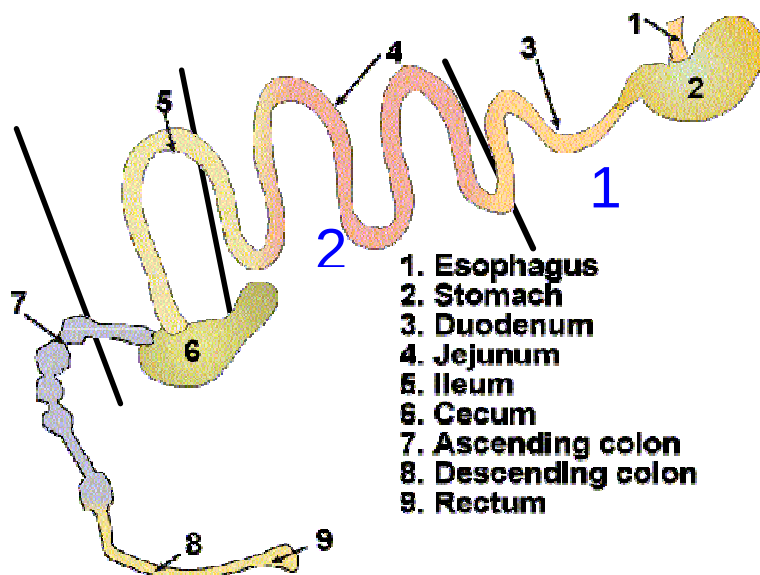


Figura 4.

Per tal de recollir sempre la mateixa zona de l'intestí per a la mateixa tècnica; per a fixar en paraformaldehid agafar una porció de la zona 1 i per congelar agafar una porció de la zona 2.



2. Processament de les mostres

Objectiu de la instrucció

Realitzar el processament de les mostres en les condicions òptimes per al seu emmagatzematge i per a la realització de les determinacions bioquímiques i genètiques.

Recollida de les mostres

Els sacrificis estan programats segons una planificació preestablerta a l'inici del projecte. Pot ser que hi hagin algunes excepcions, doncs poden haver-hi morts prèvies al sacrifici. Per aquesta raó, el dia abans del sacrifici la persona encarregada s'encarregarà de revisar si ha hagut alguna defunció.

El dia programat, la persona/persones que s'encarreguin de dur-lo a terme es desplaçaran l'estabulari de la FMCS de la URV i després de que s'hagin realitzat els sacrificis, portaran totes les mostres al CRB on seran recollides per la persona que hagi de realitzar el processament. Qualsevol incidència en les mostres: número de tubs incorrectes, aspecte de la mostra anòmal (òrgans que no estan ben perfosos, criotubs amb poca quantitat de sang, arribada dels criotubs descongelats,...) cal comunicar-ho al responsable de l'estudi (Jorge Joven) oen qui aquest delegui, que s'ocuparan de detectar el problema que ha hagut i evitar que torni a passar.

NOTA: Les mostres de sang es processaran i es guardaran al BIOBANC. Les etiquetes dels criotubs que contindran plasma i sèrum seran preparades pel personal del BIOBANC. Per tal d'informar amb previsió a les persones encarregades de processar aquestes mostres, s'enviarà al/s tècnic/s de l'àrea amb antelació l'arxiu : Estat actual dels grups NOM DE L'ESTUDI.

Instrucció de treball

1. Comprovar que per cada animal hi ha les mostres que s'enumeren a continuació i que juntament amb els tubs, hi ha les etiquetes amb la identificació i número corresponent de cada mostra.
 - 2 pots d'orina que contenen una solució de para-formaldehid al 4 % i que s'hi troben els següents òrgans:
 - ORGANS DIVERSOS**: Fetge, pulmons, estómac, melsa, intestí, ronyons, teixit muscular i teixit subcutani.
 - CERVELL**: Cervell.
 - 1 eppendorf que conté sang total i que està etiquetat amb el Núm de ratolí.
 - 2 criotubs de 1,5 mL que contenen teixit congelat per RT-PCR i estan etiquetats com: RT-PCR Fetge, RT-PCR Arc aòrtic.
 - 1 tub estèril de 10 mL. que conté el cor en solució de para-formaldehid al 4 % etiquetat com Cor en formol.
 - 1 tub estèril de 10 mL. que conté un fragment de teixit hepàtic en solució de para-formaldehid al 4 % etiquetat com Fetge en formol.
2. Enganxar una etiqueta a la llibreta de registre (NOM DE L'ESTUDI) de mostres. En aquesta llibreta s'hi anotarà si manca alguna mostra i qualsevol anomalia que es percebi en rebre-les (estat de la mostra, volum de sang,...).
3. Centrifugar la sang a 15000 rpm durant 10 min. segons PNT d'obtenció de plasma, 6.3.5.1. Dispensar tot el plasma obtingut en el criotub etiquetat com PLASMA Restes¹ i a continuació transferir:
 - 20 µL en el criotub etiquetat com FPLC.
 - 50 µL en el criotub etiquetat com BIOQ.
 - 50 µL en el criotub etiquetat com TBARS.
 - 200 µL en el criotub etiquetat com ELISA.

¹ NOTA: Si queden més de 200 µL de plasma en el tub RESTES, dividir-ho en 2 alíquotes: Plasma RESTES 1 i Plasma RESTES 2.

4. Guardar els criotubs que contenen mostres per a RT-PCR així com els fragments hepàtics etiquetats com. **DET LIPIDIQ**, **DET ENZIM**, **OH-PROLINA** i **RESTES** al congelador de – 80 °C.
5. Si no s'ha fet, preparar les etiquetes per la crioprotecció del cor.
6. Preparar una solució de sacarosa al 20 % (amb PBS 1x) i transferir aquesta solució a el tub de 10 mL estèril etiquetat com Cor en sacarosa. Traspasar els cors ja fixats¹ a aquest tub i a un tub de 10 mL estèril etiquetat com Fetge en sacarosa. Traspasar els dos fragments de teixit hepàtic ja fixats¹ (que es troben en el tub de 10 mL etiquetat com Fetge en formol) a aquest nou tub.
7. Mantindrem els tubs a 4°C amb aquesta solució durant un mínim de 24 h. (veure PNT Crioprotecció de teixits)
8. Passat aquest temps, congelar els cors i fetges en isopentà refrigerat en gel sec o N₂(l)
9. Embolicar el teixit congelat en paper d'alumini que està degudament etiquetat i guardar immediatament a –80 ° C fins al moment de que s'hagin de tallar.
10. Els òrgans que es troben en els dos pots d'orina etiquetats com: Òrgans diversos i Cervell s'han de fixar un mínim de 24 hores i a temperatura ambient. Es poden deixar en el mateix pot d'orina que conté la solució de para-formaldehid fins l'endemà, moment en el que incorporarem el teixit en les cassettes. Tanmateix, si es disposa de temps suficient, incorporarem els teixits diversos en les cassettes d'inclusió el mateix dia del sacrifici.
11. Passos que hem de seguir per incloure:

Fetge, melsa , intestí i teixit subcutani:

- Amb un bisturí estèril, obtenir seccions de fetge/melsa/intestí/txt.subcutani de 2-3 mm, i incorporar-les en una cassette. Retolar la cassette amb un marcador especial per a inclusió (es troba a la sala d'inclusió d'Anatomia)
- Submergir la cassette en un recipient que conté una solució de para-formaldehid (4%) fins l'endemà a les 17 :00 h. (moment en que s'incorporarà en el Processador de teixits automàtic)

Pulmons i ronyons:

- Amb un bisturí estèril, seccionar de forma longitudinal el ronyó/pulmó, de forma que obtinguem dos lòbuls i incorporar els lòbuls resultants en una cassette. (1 cassette/òrgan). Retolar la cassette amb un marcador especial per a inclusió (es troba a la sala d'inclusió d'Anatomia)
- Submergir la cassette en un recipient que conté una solució de para-formaldehid (4%) fins l'endemà a les 17 :00 h. (moment en que s'incorporarà en el Processador de teixits automàtic)

Cervell:

- Amb un bisturí estèril, seccionar verticalment el bulb olfactiv i el cervell, obtenint seccions de 2 mm. aproximadament. Quan s'arribi a l'alçada del bulb raquidi, fer talls en diagonal. Incorporar totes les seccions en una cassette, retolar la cassette amb un marcador especial per a inclusió (es troba a la sala d'inclusió d'Anatomia)²

Estómac:

- Amb un bisturí estèril, seccionar en diagonal l'estómac, obtenint seccions de 2 –3 mm aproximadament. Netejar l'interior de l'estómac posant cada secció sota l'aixeta d'aigua corrent (poden haver-hi pèls). Incorporar totes les seccions en una cassette, retolar la cassette amb un marcador especial per a inclusió (es troba a la sala d'inclusió d'Anatomia)

¹ es considera que després de 4 h. del sacrifici ja estan fixats

² Si volem que els talls del cervell quedin consecutius, dividir el cervell en 3 parts, resultant la regió del bulb olfactiv, la central i la del cerebel. Col·locar aquestes en la cassette i quan s'hagi de fer el bloc de parafina, fer seccions de cadascuna d'aquestes i disposar de forma ordenada en la cassette, de forma que s'identifiqui fàcilment cada regió

L'endemà (després d'un mínim de 24 h. d'estar fixant-se el teixit en formol) abans de les 17 :00, donar al personal tècnic d'Anatomia les cassettes per tal que siguin incorporades en el

processador de teixits TP 1050. Segons les necessitats de cada usuari, es poden seguir tres programes diferents: Rutina 1,2 i 3.

Les mostres, un cop deshidratades i processades han de ser incloses en parafina per a realitzar els blocs corresponents. El pas d'inclusió es farà l'endemà pel matí emprant la Placa freda Leica EG 1160 i seguint els següents passos:

- Incorporar parafina en el fons d'una cubeta metàl·lica de la mida adequada segons el teixit que es vagi a incloure.
- Obrir la cubeta i despendre's de la coberta de la cassette. Orientar el teixit de forma correcta (la part que volem tallar es col·loca orientada cap al fons de la cubeta)
- A continuació, posar la base de la cassette a sobre de la cubeta metàl·lica i pressionar amb l'ajut d'unes pinces. Simultàniament, afegir parafina fins que ompli la cubeta.
- Deixar refredar la cubeta en la placa freda.
- Un cop s'han refredat, pressionant la base de la cassette, retirar la cubeta metàl·lica.
- Netejar l'excés de parafina que ha quedat pels costats de la base de la cassette i guardar en l'arxivador del CRB de blocs de parafina fins al moment de tallar-ho.

3. Perfusió amb PBS

1. Fonament i objectiu de la prova

1.1. Fonament:

Netejar restes de cèl·lules sanguínies presents en qualsevol teixit d'un animal.

1.2. Objectiu:

Disposar de teixit apte per poder fer tècniques histoquímiques, immunològiques o d'hibridació *in situ*.

1.3. Utilitat:

Mirar l'expressió cel·lular, gènica o proteica en les diferents àrees sotmeses a estudi de l'animal perfòs.

2. Espècimen

Es parteix d'un animal que prèviament s'ha anestesià i en la major part dels casos s'ha extret la sang.

3. Reactius, controls i altres materials

- Phosphate-buffered saline 1x autoclavat (pH 7.4) (Aprox. cal 1 L per a perfondre a 6 ratolins).

4. Instrumentació

- Material quirúrgic: pinces i tisores corbades.
- Suport de suro o de poliespan.
- Agulles per a subjectar a l'animal.
- Agulla de 25G de 0,9 * 25 mm per a perfondre l'animal (4657852, Braun).
- Agulla de 25G de 0,50 * 16 mm per a clavar en l'aurícula dreta (4657853, Braun).
- 1 catèter que s'adapti a l'agulla de perfusió.
- Ampolla de solució salina fisiològica de 500 mL de capacitat (de vidre preferentment) buida.

5. Control de qualitat

Mentre s'està realitzant la perfusió és aconsellable punxar una agulla a nivell de l'aurícula dreta, doncs permet que la solució que s'ha introduït pel ventricle esquerre surti un cop que ha fet tot el recorregut per l'arbre arterial. El color de la solució que surt de l'aurícula constitueix un bon

control de qualitat, doncs a mida que es va perforant l'animal la solució cada cop és més transparent.

A més, el color dels teixits també és un bon control de qualitat, ja que, com més blanc queda, més ben perfós està.

6. Procediment

6.1. Anestesià l'animal (Veure PNT Anestèsia d'un rosegador)

6.2. Mentrestant, transferir la solució de PBS a l'ampolla buida que havíem reservat. Connectar l'ampolla amb el catèter al qual s'ha adaptat una agulla de 25 g. Subjectar l'ampolla en un suport, de forma que l'ampolla estigui en posició vertical a aprox. 60 cm. per sobre del suport on es col·locarà l'animal. D'aquesta forma s'afavoreix que la solució flueixi amb facilitat des de l'ampolla a través del catèter fins arribar al cor de l'animal.

6.3. Un cop adormit, estirar l'animal sobre el suport de suro, panxa amunt amb posició de creu. L'animal es subjecta fixant les extremitats amb agulles.

6.4. Amb l'ajut de les pinces i tisores, fer una incisió (1) i amb l'ajut de les pinces retirar la pell i tallar seguint la línia alba (2).

- Procedir a obrir el peritoneu procurant no tallar cap vas.
- Un cop tenim el cor en descobert, s'introdueix la cànula o agulla de perfusió al ventricle esquerra. S'obre el flux i es clava una agulla de 0,50 mm de diàmetre a nivell de l'aurícula dreta.

6.5. Després d'haver perfós durant 10-15 min, (o el temps que es consideri convenient) aturar el flux i recollir els òrgans i teixits d'interès.

6.6. Els teixits que s'inclouran en un bloc de parafina, per tal de fer una anàlisi histològica, es transferiran a una solució de paraformaldehid al 4% i es mantindran un mínim de 24 h.

6.7. Els teixits que s'han de congelar per tal de fer determinacions lipídiques, enzimàtiques, d'hidroxiprolina, d'expressió gènica... es congelaran immediatament submergint el criotub que conté el teixit en qüestió, en N₂ (l).

6.8. Aquells teixits que serviran per tal de fer tècniques immunohistoquímiques, es transferiran a un recipient que contingui una solució de paraformaldehid al 4% durant un mínim de 4 h. i a continuació, es transferiran a una solució crioprotectora (veure PNT Crioprotecció d'un teixit que s'ha de preservar)

7. Informe dels resultats

8. Anotacions i limitacions del procediment

9. Bibliografia

4. Crioprotecció d'un teixit

1. Fonament i objectiu de la prova

1.1. Fonament: Es basa en la incubació del teixit en una solució concentrada de sacarosa.

1.2. Objectiu: Deshidratar el teixit per l'efecte d'òsmosi.

1.3. Utilitat: És un mètode ràpid i molt bo per a evitar la formació de cristalls de gel durant la congelació, que ens afectarien al nostre teixit, ja que, un cop que el descongelem quedarien artefactes en el teixit.

2. Espècimen

Qualsevol teixit que s'hagi de congelar.

3. Reactius, controls i altres materials

Sacarosa (Panreac, 131621)
PBS (100mM)
H₂O Milli Q per enrasar.
Tubs d'orina / universals

4. Instrumentació

En principi, no es necessita

5. Control de qualitat

Considerarem que el teixit està llest per a congelar-lo quan aquest s'hagi dipositat en el fons del recipient.

6. Procediment

- 6.1. Preparar una solució de sacarosa al 20 %
- 6.2. Transferir els teixits de fins a 4 cm de diàmetre que desitgem congelar, a tubs que contenen la solució de sacarosa que acabem de preparar. NOTA: Per tal d'evitar problemes de contaminació, és millor preparar la solució en el moment de fer-la servir.
- 6.3. Un cop que el teixit s'hagi saturat de la solució de sacarosa, observarem que el aquest es diposita en el fons del recipient. A partir d'aquest moment ja es pot congelar el teixit.
- 6.4. El temps d'incubació serà un mínim de 24 h. i un màxim de 72 h.

7. Informe dels resultats

8. Anotacions i limitacions del procediment

La mida de la peça a congelar és crític, doncs en el cas en que sigui una peça molt gran s'haurà d'augmentar el temps d'incubació per tal de permetre que la sacarosa pugui penetrar en el teixit.

9. Bibliografia

10. Distribució de resultats

5. Extracció de sang

1. Fonament i objectiu de la prova

- 1.1. Fonament: La obtenció de sang que estava continguda en el cos d'un rosegador.
- 1.2. Objectiu: Obtenir alíquotes de plasma i o sèrum d'un rosegador.
- 1.3. Utilitat: Poder determinar posteriorment qualsevol element o característica del plasma / sèrum que ens pugui interessar.

2. Espècimen

Qualsevol rosegador del que es desitgi obtenir sang ja sigui durant el procediment experimental, o bé en el moment de sacrifici necessària per fer qualsevol determinació.

3. Reactius, controls i altres materials

- Ketamina (Ketolar, Parke Davis) (s'adquireix en la Farmàcia de l'Hospital)
- Xilacina (Rompún 2 %, Bayer) (s'adquireix en Productes veterinaris Solà Domingo)
- Xeringa de 1 mL 0,5 mm x 16 mm (Monoject, 1100601010)
- Heparina Sòdica (Heparina Rovi 1 %)

- EDTA- Na_2 0,1 M (Panreac, 181070)
- Povidona iodada al 10 % (Betadine)
- Tubs d'extracció de sang Microvette (Sarstedt, D-51588)
- Tub de 50 mL per a immobilitzar a l'animal
- Agulla de 23 Gauges (Microlance)

4. Instrumentació

5. Control de qualitat

Durant l'extracció de sang no existeix cap mètode per tal de comprovar que el procediment s'està portant a terme de forma correcta. Tanmateix, un bon control de qualitat consisteix en provar que la sang un cop centrifugada no està hemolitzada. El tractament mecànic de la sang, el sistema d'addició d'anticoagulant, el volum i concentració de la solució anticoagulant afegida i el període d'emmagatzematge són els principals factors responsables de l'hemòlisi.

6. Procediment

La quantitat de sang que es necessita així com d'altres factors determinarà el mètode i lloc d'extracció. La inserció correcta de l'agulla en la vena o d'altres parts del sistema vascular normalment la part més difícil del procediment. És molt probable que les venes es col·lapsin fent la seva entrada difícil. S'aconsella la introducció precisa i amb molt de compte de l'agulla.

6.1. Extracció parcial de sang de la cua

6.1.1. Preparació de l'animal:

Anestèsia a l'animal seguint el PNT Anestèsia d'un rosegador C2 2.1.
comprovar que l'animal està adormit, prement fort en la regió inter digital podal
apropar a l'animal a una làmpada (aprox. a 30 cm de distància), de forma que
s'afavoreixi la dilatació dels vasos sanguinis de la cua (de 5 a 15 min)

- 6.1.2. Netejar la superfície de la cua amb una solució antisèptica (etanol al 70%)
- 6.1.3. Emprant un bisturí estèril, fer una petita incisió en la cua del ratolí, de 0,5 a 2 cm des de la base de la cua.
- 6.1.4. Inclinar i prémer la cua de forma que s'afavoreixi la sortida de sang.
- 6.1.5. Recollir la sang amb un capil·lar Unopette/ eppendorf segons convingui.
- 6.1.6. Un cop que s'ha acabat de recollir el volum de sang desitjat tapar el tub i centrifugar la sang el més aviat possible a 10000 rpm durant 15 min i a 4°C (mantenir la sang a 4°C fins al moment de ser centrifugada).
- 6.1.7. Aturar el flux de sang prement amb força amb unes pinxes prèviament escalfades.
- 6.1.8. Abans de tornar a l'animal a la seva gàbia, comprovar que s'ha restaurat l'hemostàsia, es a dir, que no hi ha més pèrdua de sang.

6.2. Extracció parcial de sang de la vena safena

- 6.2.1. Conduir a l'animal a dintre d'un tub de 50 mL, (en el que prèviament hem fet dos forats en la seva base) de forma que el cap quedi en la zona on s'han fet els orificis, permetent així que respiri durant el procediment. (Veure Figura 1.1)
- 6.2.2. Amb la mà que tenim lliure, estendre el membre posterior i amb l'altra mà, agafar un plec de pell entre la cua i el membre posterior, de forma que aquest quedi immobilitzat. (veure Figura 1.2. A i B)
- 6.2.3. Amb un bisturí, afaitar la regió en la que s'ha d'extreure la sang (Veure Figura 1.3.)
- 6.2.4. Un cop que es visualitzi la vena safena (Veure Figura 1.4.A) introduir l'agulla de 23 g. (Veure Figura 1.4.B)

- 6.2.5. Apareixerà una gota de sang, a continuació recollirem la sang que va drenant amb un tub Microvette. (Veure Figura 1.4. C i D)
- 6.2.6. Aturar el flux de sang, comprovar que s'ha restaurat l'hemostàsia, i centrifugar la mostra de sang tal com s'indica en els passos 6.1.6. , 6.1.7. i 6.1.8. respectivament.

6.3. Extracció de sang total per punció cardíaca (només abans de sacrificar a l'animal)

- 6.3.1. Preparació de l'animal: seguir els passos 6.1.1. – 6.1.2.
- 6.3.2. Introduir l'agulla (xeringa de 1 mL 0,5 mm x 16 mm) sota el cartílag xifoide lleugerament desviada cap a l'esquerra (respecte al centre) i inclinada uns 20-30 graus respecte a la línia horitzontal de l'estèrnum.
- 6.3.3. Aspirar poc a poc , de manera que la sang vagi drenant poc a poc i no col·lapsem el vas.
- 6.3.4. Repetir els passos 6.1.5. – 6.1.8.

7. Informe dels resultats

8. Anotacions i limitacions del procediment

Aquest protocol pot ser seguit tant sols en el cas en que l'animal no presenti cap anormalitat, estigui sa i sigui adult.

S'assumeix que són necessaris un cicle de 14 a 21 dies per a la renovació de les cèl·lules vermelles. S'ha de tenir en compte que a cada espècie li correspon un volum de sang determinat, així com també el volum que es pot extreure dependrà del pes corporal d'aquell animal. Els animals d'edat avançada, estressats, que tenen alguna disfunció cardíaca o respiratòria , no toleren aquesta quantitat de pèrdua sanguínia.

9. Bibliografia

10. Distribució de resultats

Figura 1.1.

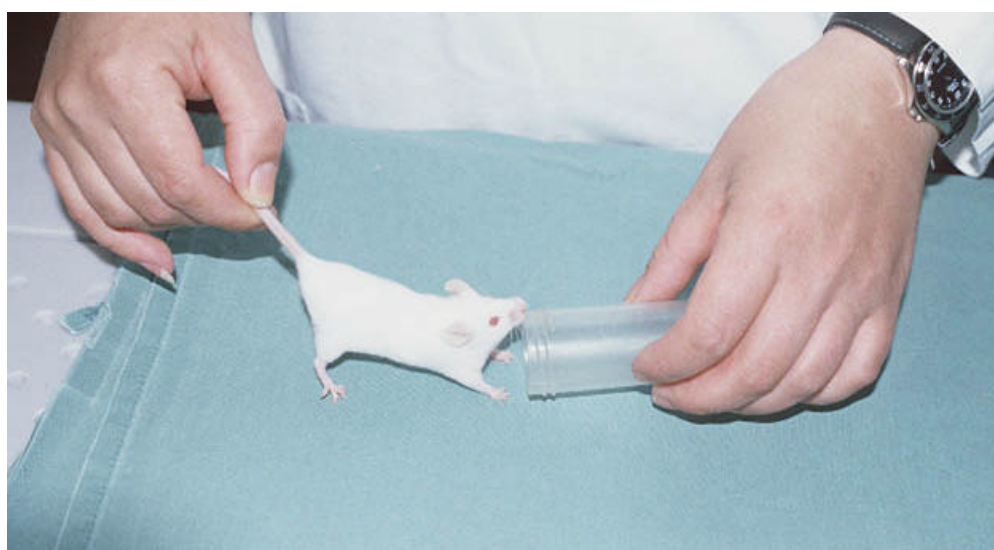


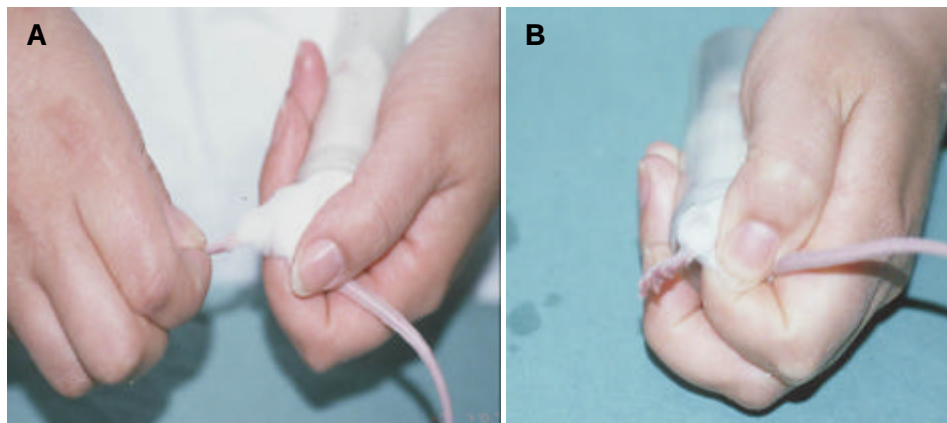
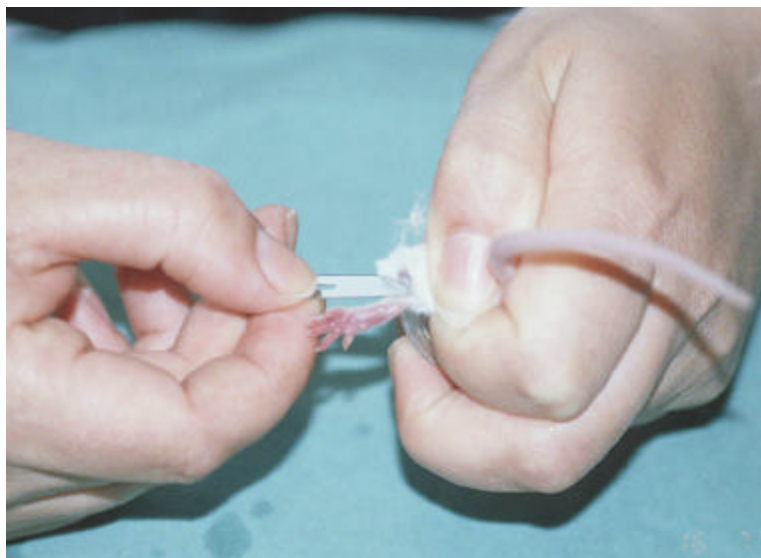
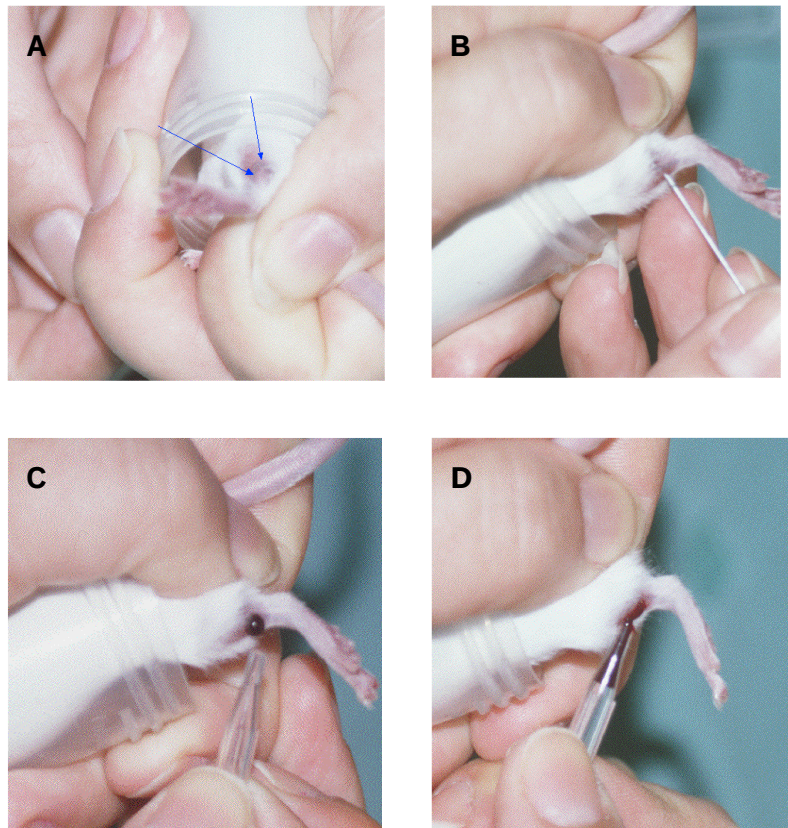
Figura 1.2.**Figura 1.3.**

Figura 1.4.

6. Histomorfometria de les lesions aòrtiques

1. Fonament i objectiu de la prova

1.1. Fonament:

La tècnica està basada en el tallat transversal de la base aòrtica, en la posterior tinció per lípids amb Sudan IV, i en la quantificació de l'àrea tenyida.

1.2. Objectiu:

Quantificar la lesió ateromatosa en la base de l'aorta.

1.3. Utilitat:

En el ratolí deficient en apolipoproteïna E la quantitat de lesió a la base de l'aorta és proporcional a la de tota l'aorta, per tant aquesta mesura ens indica el grau de desenvolupament de l'arteriosclerosi d'aquests animals.

2. Espècimen

Ratolins deficientes en apolipoproteïna E

3. Reactius, controls i altres materials

- portaobjectes coberts amb pol-L-lisina (Sigma)

- Tissue-Tek (O.C.T.) (Sakura Finetechnical) (Shandom, Life Sciences International)
- aigua milli-Q
- etanol
- sacarosa (131621, Panreac)
- isopropanol al 60%
- carbonat de liti (Sigma) al 1.35% p/v
- Sudan IV (Sigma) al 1% p/v
- solució d'hematoxil·lina de Harris (Merck)
- cobreobjectes de 24x60mm
- medi de muntatge aquós Crystal/Mount, Biomedica
- nitrogen líquid
- fulles de bisturí
- espinses
- tubs Eppendorf de 1 mL
- flascons de Coplin
- paper de filtre
- acetona al 100 % (QCA)

4. Instrumentació

- criostat amb pedestals de tall
- Microscopi òptic (Nikon, Eclipse E600)
- Software Analysys (Analysys, Soft Imaging System)

5. Control de qualitat

En principi, no es contempla.

6. Procediment

6.1. Realització dels talls histològics

- 6.1.1. Perfundre bé el cor i l'arbre arterial amb PBS sota pressió fisiològica (Veure PNT perfusió amb PBS) durant 10 min.
- 6.1.2. Disseccionar el cor i l'aorta, i a continuació rentar amb PBS. Posteriorment seccionar el cor amb una fulla de bisturí 2 mm per sota de les aurícules i tallar l'aorta per fora del cor paral·lelament al tall anterior.
- 6.1.3. Submergir en una solució de paraformaldehid al 4 %. Incubar durant 4 h. a T^a ambient per tal de permetre que el teixit quedi fixat. La fixació consisteix en matar les cèl·lules, fet que permet així preservar les característiques estructurals i bioquímiques del teixit.
- 6.1.4. Incubar en una solució de sacarosa al 20 % o/n a 4°C.
- 6.1.5. Traspasar els cors a una solució de sacarosa al 20% preparada just abans de fer-la servir i incubar durant 8 h aprox. a 4 °C. Aquest pas és necessari per tal de crioprotegir, doncs així s'evita la formació de cristalls de gel en el teixit.
- 6.1.6. Congelar els cors :
 - 6.1.6.1. Preparar una caixa de poliespan amb gel sec.
 - 6.1.6.2. Dipositar en aquesta un recipient que contingui isopentà.
 - 6.1.6.3. Esperar a que el isopentà assoleixi una temperatura al voltant de - 50°C.
 - 6.1.6.4. Dipositar el cor sobre un pedestal metàl·lic que conté O.C.T., de manera que la base del cor quedi assentada en la superfície metàl·lica.
 - 6.1.6.5. Afegir O.C.T. en les aurícules obertes, doncs així evitarem que quedin bombolles en el seu interior.
 - 6.1.6.6. Submergir la base en isopentà (I).

- 6.1.6.7. Un cop que s'hagi congelat, embolicar el cor en paper d'alumini convenientment identificat i conservar la mostra en gel sec.
- 6.1.7. A continuació guardar la mostra, ja congelada, a -80°C .
- 6.1.8. Abans de procedir a tallar la mostra, aquesta s'haurà d'equilibrar a -25°C durant 30 min. NOTA: És recomanable traslladar la mostra des del congelador de -80°C fins al criostat en un recipient que contingui neu carbònica en pols. Un cop s'arriba al criostat (que està a aprox. -25°C) deixar-lo atemperar i mentrestant es poden anar identificant els portaobjectes en els que es recolliran les seccions que es vagin tallant.
- 6.1.9. Cobrir la superfície d'un pedestal de tall del criostat amb una capa d'aproximadament d'1 mm d'O.C.T. i, abans que es solidifiqui, posar-hi a sobre la secció del cor amb la base de les aurícules descansant sobre el pedestal.
- 6.1.10. Situar el pedestal en el suport del criostat i procedir a tallar a intervals de 30 μm . Quan s'observi l'aparició de material a dins de l'O.C.T., situar el selector de tall del criostat a 10 μm . A partir d'aquest moment recollir una secció a sobre dels portaobjectes coberts amb poli-L-lisina i rebutjar-ne 2. En el cas en que s'hagin de fer tècniques d'immunohistoquímica, enlloc de rebutjar-les, es recolliran 4 seccions de 5 μm (3 talls per portaobjectes) i a continuació es tornarà a fixar el selector de tall de criostat a 10 μm i així consecutivament fins sobrepassar la vàlvula aòrtica i arribar a la cambra ventricular. D'aquesta manera es recullen seccions que inclouran l'aorta sola, l'aorta i la sortida de les coronàries, l'aorta i l'inici de la vàlvula aòrtica i la vàlvula aòrtica, que són les 4 zones que posteriorment es promitjaran en la morfometria. Durant el procés de tallat es pot verificar que els talls són correctes amb l'ajut d'un microscopi.
- 6.2. Processament de les mostres, segons s'escaigui (determinacions d'immunohistoquímica, o bé quantificació de la lesió)
- 6.2.1. Determinacions d'immunohistoquímica
- 6.2.1.1. Un cop obtinguts els talls, aquests es deixen assecar a temperatura ambient durant 1 h. aprox.
- 6.2.1.2. A continuació, submergir en acetona al 100% durant 5 min a T^{a} ambient.
- 6.2.1.3. Deixar assecar els portaobjectes durant 15 min a T^{a} ambient.
- 6.2.1.4. Guardar a -20°C fins al moment de la determinació.
- 6.2.2. Quantificació de la lesió ateromatosa. Tinció per a greixos.
- 6.2.2.1. Un cop s'ha acabat de tallar el cor, disposar els portaobjectes en una cistellet de tinció.
- 6.2.2.2. Submergir i ràpidament treure la cistellet en isopropanol al 60%.
- 6.2.2.3. Escórrer sobre paper de filtre.
- 6.2.2.4. Submergir en Sudan IV al 1% durant 3 min.
- 6.2.2.5. Submergir i ràpidament treure en un recipient amb aigua milli-Q; repetir en un altre recipient amb aigua milli-Q neta.
- 6.2.2.6. Submergir en Hematoxil·lina de Harris durant 40s.
- 6.2.2.7. Submergir i ràpidament treure en un recipient amb aigua milli-Q; repetir dos vegades en dos recipients amb aigua milli-Q neta.
- 6.2.2.8. Submergir en una solució de carbonat de liti al 1.35% durant 30 s.
- 6.2.2.9. Submergir i ràpidament treure en un recipient amb aigua milli-Q; repetir en un altre recipient amb aigua milli-Q neta.
- 6.2.2.10. Deixar assecar els portaobjectes a T^{a} ambient (durant aprox. 1 –2 dies)
- 6.2.2.11. Un cop secs, humitejar per immersió en un recipient amb aigua milli-Q, afegir 2 gotes de medi de muntatge, col·locar el cubreobjectes evitant la formació de bombolles d'aire i deixar que els portaobjectes s'assequin durant 24 h a T^{a} ambient. Netejar els portaobjectes amb etanol absolut.

6.2.2.12. Observació al microscopi. Veure Figura 1.

Nuclis blaus
Greixos vermell

6.3. Morfometria.

6.3.1. Amb l'ajut d'un microscopi, seleccionar els talls transversals de l'aorta en els que s'efectuarà la medició, de manera que n'hi hagi 3 que corresponguin a cada una de les 4 àrees abans esmentades.

6.3.2. La morfometria es durà a terme mitjançant el morfòmetre digital informatitzat AnalySIS

6.3.2.1.1. Accedir al programa clicant sobre la icona  ò bé des del menú INICIO/Programas/ AnalySIS/ AnalySIS.

6.3.2.1.2. Escollir el objectiu amb el que volem treballar. Per fer aixó, accedir al menú IMAGE i escollir la opció SET MAGNIFICATION. (Figura 1A)
Seleccionar l'objectiu de 4x, 10x, 20x, 40x o 100x. (Figura 1B)
NOTA: Normalment treballarem amb el de 4x, doncs, d'aquesta manera tota l'artèria queda inclosa en una sola imatge, afavorint així la quantificació.

6.3.2.1.3. Adquirir la imatge prement la icona  (Figura 2). Aquesta opció ens permet veure en viu la imatge captada pel microscopi.

6.3.2.1.4. Accedint al menú MEASURE, escollim la opció AREA/PERIMETER. (Figura 2)

6.3.2.1.5. Amb el ratolí (botó esquerra), encerclar l'àrea que ens interessa mesurar. Un cop s'ha acabat de mesurar totes les àrees desitjades clicar el botó dret del ratolí i escollir la opció YES.

6.3.2.1.6. El quadre de resultats ens assenyala cada àrea individual encerclada, així com també es pot obtenir la suma de totes les àrees seleccionades seleccionant la opció Statistics.

6.3.2.1.7. Per esborrar els resultats, tancar tots els quadres de diàleg que s'han anat obrint i si es vol fer una altra mesura en la mateixa imatge, esborrar les àrees encerclades prement la icona  (Figura 2)

6.3.2.1.8. Accedir al programa Microsoft Excel i anotar l'àrea corresponent a cadascun dels talls seleccionats i a cadascuna de les fases (I, II, III i IV). Calcular el promig (entre els 3 talls) d'àrea de la lesió per a cada fase. Sumar els promitjos obtinguts per a cada fase. Els resultats obtinguts representen l'àrea total de la lesió arterioscleròtica present en les 4 fases de la lesió.

7. Informe dels resultats

8. Anotacions i limitacions del procediment

9. Bibliografia

B Paigen et al. 1987. Quantitative assesment of atherosclerotic lesions in mice. Atherosclerosis; 68: 231-40.

10. Distribució de resultats

Solucions

Sudan IV a l'1 %.

10 g de Sudan IV

500 mL d'etanol al 70%

500 mL d'acetona

Disoldre deixant-ho en agitació al menys durant 2 h.

Filtrar-ho sempre abans de fer-ho servir.

És estable durant 1 mes en ampolla fosca, tanmateix la solució es reemplaçarà per a una de nova sempre que s'observi qualsevol anomalia en la tinció.

Carbonat de liti al 1.35 % p/v.

9,4 gr de carbonat de liti

700 mL d'aigua milli-Q

Disoldre deixant-ho en agitació al menys durant 12 h.

Emmagatzemar a T^a ambient en ampolla de plàstic.

Solució de sacarosa al 20 %.

120 g. de sacarosa

600 mL. de solució de PBS 1x.

Dissoldre-ho bé.

Emmagatzemar a 4°C.

Figura 1. Definició de l'objectiu amb el que es desitja treballar emprant el programa AnalySIS.

Figura 1 A. Accedir al Menú IMAGE/Set Magnification

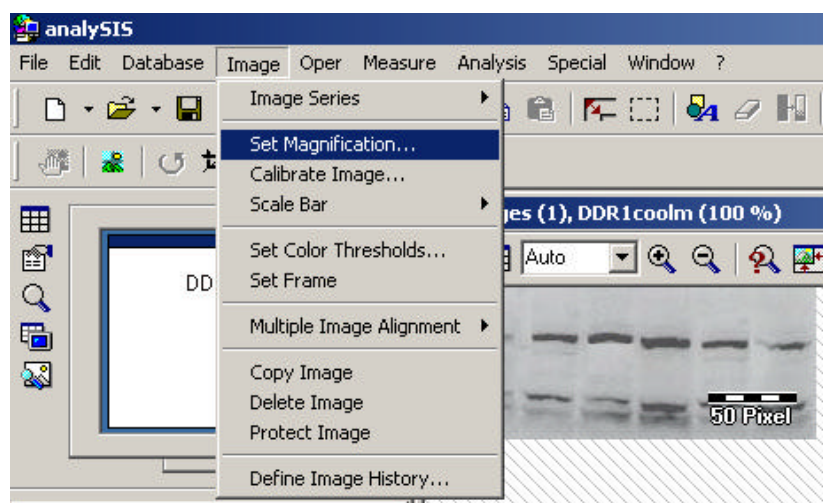
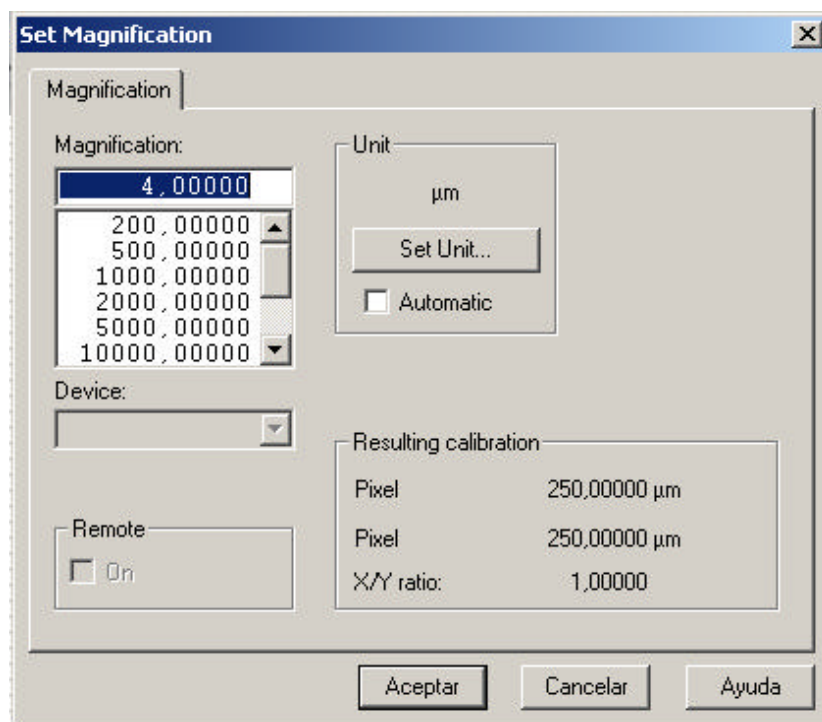
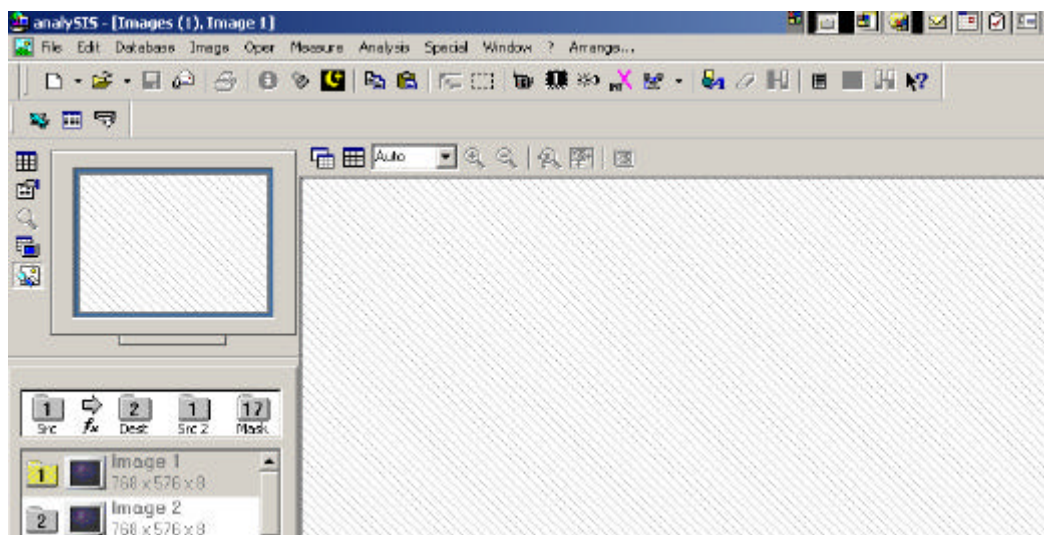
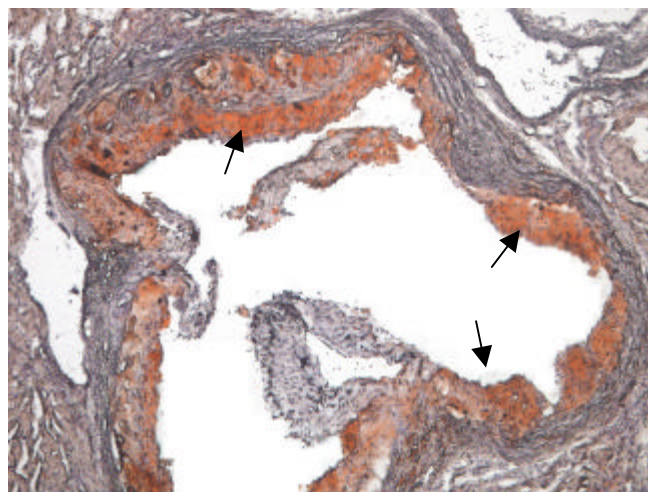


Figura 1 B. Seleccionar l'objectiu segons s'escaigui**Figura 2.** Seqüència d'accions a seguir per tal quantificar una àrea determinada emprant el programa AnalySIS.

1. Adquirir la imatge que estem veient en el microscopi. 
2. Congelar la imatge que estem veient (si s'escau) 
3. Seleccionar la opció Measure del menú.
4. Seleccionar la opció Area / perimeter
5. Encerclar les àrees que volem quantificar
6. Copiar la suma de les àrees que s'obté en el full excel.
7. Esborrar l'àrea encerclada per a quantificar una altra preparació. 

Figura 3.

Tinció dels lípids presents en artèria aorta de ratolins apo E^{-/-} amb el colorant Sudan IV.

L'àrea tenyida amb el colorant correspon a aquelles cèl·lules (→) que contenen greix en el seu interior i a aquells dipòsits de greix extracel·lular.

7. Immunohistoquímica de MOMA-2

1. Fonament i objectiu de la prova

1.1. Fonament:

La tècnica està basada en la unió específica de l'anticòs monoclonal MOMA-2 a un antígen intracel·lular expressat en monòcits i en macròfags; i en la posterior visualització d'aquest a través de la utilització d'una antimmunoglobulina biotinilada, un enzim conjugat amb estreptavidina i el substrat D.A.B.

1.2. Objectiu:

Identificació i quantificació d'un antígen intracel·lular expressat en monòcits i en macròfags de teixit de ratolí fixat i congelat.

1.3. Utilitat:

En el ratolí deficient en apolipoproteïna E es formen, al llarg del temps, gran quantitat de plaques arterioscleròtiques. La composició de les plaques, com és la quantitat de monòcits / macròfags, i la seva distribució és fonamental per tal de conèixer l'extensió de la resposta inflamatòria que està tenint lloc en aquest model d'arteriosclerosi.

2. Espècimen

Talls de l'artèria aorta de 5µm de gruix, des del seu inici fins que es sobrepassa la vàlvula aòrtica conservats a -80°C (veure PNT corresponent a Histomorfometria de les lesions aòrtiques, passos 6.1 fins 6.2.1.).

3. Reactius, controls i altres materials

- Cambra humida.

- Paper d'alumini.
- Paper de filtre.
- Glicina (Fluka, 50046)
- Solució PBS 100 mM – Glicina 20 mM.
- Solució PBS 100 mM.
- Aigua oxigenada (Peròxid d'hidrògen al 3%) (Cuve, 702373).
- BSA : Albúmina Bovina (Sigma, A-3803).
- Tritó X 100 (Merck,11869.1000).
- Anticòs primari Rat anti mouse macrophages/ monocytes (Serotec, MCA519G).
- Anticòs secundari Biotinylated goat anti-rat IgG (H + L) **Afinity Purified** (Vector, BA-9400).
- Sèrum de ratolí.
- ABC Complex, Vectastain ABC Kit Standard (Vector, PK-4000)
- Substrat - Cromogen 3,3' diaminobenzidine (D.A.B.) (Dako, K3466).
- Tubs Eppendorf de 1000 i 250 µL.
- Cubreobjectes de 24 x 60 mm.
- Flascons de Coplin.
- Xilol.
- Alcohol absolut.
- Alcohol de 96°.
- Aigua corrent.
- Aigua desionitzada.
- Cubeta sense fons: bressols.
- Cubetes de tinció amb tapa.
- Medi de muntatge D.P.X.

4. Instrumentació

- Microscopi òptic (Nikon, Eclipse E600)
- Software Analisis (Analysis, Soft Imaging System)

5. Control de qualitat

És totalment recomanable, cada cop que es vol fer aquesta determinació, reservar un tall per a realitzar un control negatiu de l'anticòs primari.

Procediment: En aquest cas, s'han de seguir tots els passos que s'indiquen en aquest protocol, tenint en compte que en el pas d'incubació de l'anticòs primari (6.6.) en els controls negatius NO S'AFEGEIX L'ANTICÒS PRIMARI, sinó que s'afegeix una solució de BSA 1% sense l'anticòs.

Resultats: El tall ha de quedar completament blau i no ha de presentar senyal positiva (cèl·lules tenyides de color marró fosc), doncs ens assegurem que la unió de l'anticòs secundari al primari és totalment específica.

6. Procediment

- 6.1. Descongelar els portaobjectes durant 5 min aproximadament a T^a ambient.
- 6.2. Hidratació. Submergir els portaobjectes en un flascó de Coplin que conté una solució de PBS (100 mM) - Glicina (20 mM) durant 10 min a T^a ambient i en agitació.
- 6.3. Permeabilització de les membranes. Submergir els portaobjectes en un flascó de Coplin que conté una solució de PBS (100 mM) - Glicina (20 mM) – Tritó (0.5%) durant 10 min a T^a ambient i en agitació. Aquest pas és necessari en el cas en què l'antígen a detectar es trobi en l'interior cel·lular.
- 6.4. Bloqueig de la peroxidasa endògena.
 - 6.4.1. Preparar una cambra humida protegida de la llum, per tal de poder portar a terme les successives incubacions.
 - 6.4.2. S'afegeixen 30 µL d'H₂O₂ (al 3%) a cada tall.
 - 6.4.3. Incubar en cambra humida a temperatura ambient durant 25 min.

- 6.4.4. Acabat el temps d'incubació, amb l'ajut de paper de filtre, retirar el líquid que cobreix la mostra.
- 6.4.5. Rentar 2 cops durant 4 min a T^a ambient amb PBS (100 mM) - Glicina (20 mM).
- 6.5. Bloqueig de llocs inespecífics.
 - 6.5.1. Retirar la solució que cobreix la superfície de cada tall amb paper de filtre.
 - 6.5.2. Ràpidament s'afegeixen 30 µL de solució BSA (2%) a cada tall.
 - 6.5.3. Incubar a temperatura ambient durant 20 min.
 - 6.5.4. Acabat el temps d'incubació, amb l'ajut de paper de filtre, retirar el líquid que cobreix la mostra.
- 6.6. Incubació amb l'anticòs primari. És convenient que immediatament s'afegeixi l'anticòs primari, doncs així evitem que els talls s'assequin.
 - 6.6.1. S'afegeixen 30 µL de la dissolució de MOMA-2 (1/1000) en BSA 1% a cada tall a excepció dels controls negatius en els que s'afegeixen 30 µL de BSA 1% sense l'anticòs.
 - 6.6.2. Incubar en cambra humida a 4°C o/n ò bé a temperatura ambient durant 2h.
- 6.7. Rentar. Repetir el pas 6.4.5.
- 6.8. Incubació amb l'anticòs secundari:
 - 6.8.1. Afegir 30 µL de la dissolució d'anticòs secundari (1/2000) amb sèrum de ratolí (10%) a cada tall (mostres i controls). Afegim sèrum de ratolí, és a dir, de la mateixa espècie, per tal d'evitar problemes de reaccions creuades amb immunoglobulines endògenes.
 - 6.8.2. Incubar a temperatura ambient durant 90 min.
- 6.9. Rentar. Repetir el pas 6.4.5.
- 6.10. Afegir a cada tall (mostres i controls) 30 µL de la solució ABC Complex (1/200) que s'ha preparat prèviament (veure Annex 1)
- 6.11. Repetir el pas 6.4.5.
- 6.12. Revelat.
 - 6.12.1. Preparar la solució de treball del cromògen: mesclar 20 µL de cromogen DAB amb 1 mL de Buffer solution.
 - 6.12.2. Afegir a cada tall 30 µL de la solució de treball del cromògen.
 - 6.12.3. Incubar a temperatura ambient aproximadament 30" i durant un màxim de 8 min.
NOTA: Controlar visualment amb l'ajut del microscopi òptic i quan veiem que algunes estructures del teixit viren a color marró, immediatament submergir el portaobjectes en el flascó que conté aigua MQ.
- 6.13. Rentar amb aigua MQ procedint tal com s'indica en el pas 6.4.5.
- 6.14. Contratació.
 - 6.14.1. Cobrir cada tall amb Hematoxilina de Mayer.
 - 6.14.2. Incubar a temperatura ambient durant 1min.
- 6.15. Rentar amb aigua corrent fins que el portaobjectes estigui net.
- 6.16. Muntatge.
 - 6.16.1. Submergir els portaobjectes (col·locats en un bressol) en una cubeta de tinció que contingui aigua destil·lada. Deixar actuar aprox. 1 min.
 - 6.16.2. Passar el bressol a la següent cubeta de tinció que conté alcohol 96%, i incubar durant 30 s.
 - 6.16.3. Passar a la següent cubeta que conté alcohol absolut, i incubar durant 30 s.
 - 6.16.4. Transferir el bressol a la següent cubeta que conté una mescla d'alcohol absolut-xilol (50%) i incubar durant 3 min.
 - 6.16.5. Passar a la següent cubeta que conté xilol absolut, i incubar durant 3 min.
 - 6.16.6. Repetir el pas anterior.
 - 6.16.7. Submergir en una solució que conté xilol-eucaliptol durant un mínim de 5".
NOTA: Aquest pas és opcional, doncs tant sols té per finalitat augmentar la lluentor de la preparació.
 - 6.16.8. Afegir D.P.X. sobre la preparació, cobrir amb un cubreobjectes i retirar l'excés de medi de muntatge.

6.17. Observació al microscopi. Veure Figura 1

- 6.17.1. Nuclis blaus
 6.17.2. Monòcits i macròfags marró fosc

6.18. Quantificació.

Utilitzant el programa informàtic Anisys es mesuraran l'àrea positiva per a monòcits / macròfags i es representaran en forma de % d'àrea ocupada per macròfags respecte a l'àrea de la placa arterioscleròtica. (veure PNT Histomorfometria de les lesions aòrtiques)

7. Informe dels resultats

8. Anotacions i limitacions del procediment

Malgrat que les concentracions d'anticòs primari i secundari són les òptimes per a determinar de forma específica els monòcits/macròfags que s'expressen a nivell de la placa arterioscleròtica procedent de ratolins deficientes en apo E de mostres que s'han fixat i congelat, podria ser que sigui necessari adaptar les concentracions d'anticòs primari i secundari depenent del tipus de fixació de la mostra, així com del temps que el teixit ha estat conservat a -80°C .

9. Bibliografia

H-R Jiang. Macrophages and Dendritic Cells in IRBP-Induced Experimental Autoimmune Uveoretinitis in B10RIII Mice. 1999. Investigative Ophthalmology and Visual Science.

Solució de stock PBS (10x)

80 g NaCl
 2 g KCl
 14,4 g Na_2HPO_4
 2,4 g KH_2PO_4
 Enrasar fins a 1 L amb H_2O MQ

PBS 100 mM.

100 mL solució de stock PBS (10x)
 900 mL H_2O MQ

PBS 100 mM – Glicina 20mM.

1.5 g. Glicina
 1000 mL PBS 100 mM

PBS 100 mM – Glicina 20 mM- Tritó (0.5%)

100 mL PBS 100 mM – Glicina 20 mM
 500 μL Tritó

BSA 2%

10 mL. PBS 100 mM
 0.2 g. BSA
 Fer alíquotes de 1 mL. i emmagatzemar a -20°C .

BSA 1%

500 mL PBS 100 mM
 500 mL BSA 2%
 Emmagatzemar a -20°C .

Sèrum 10%

40 mL de sèrum de ratolí
 360 mL de PBS 100 mM – Glicina 20 mM.

ABC Complex (1/200)

2,5 μL de reactiu A (Avidin DH, ampolla amb l'etiqueta taronja Vectastain ABC kit, PK-4000)

2,5 µL de reactiu B (Biotinylated horseradish peroxidase H, ampolla amb l'etiqueta marró Vectastain ABC kit, PK-4000)
 995 µL de solució PBS 100 mM .
 Homogeneitzar bé i protegir de la llum; agitar durant un mínim de 30 min abans de la seva utilització.

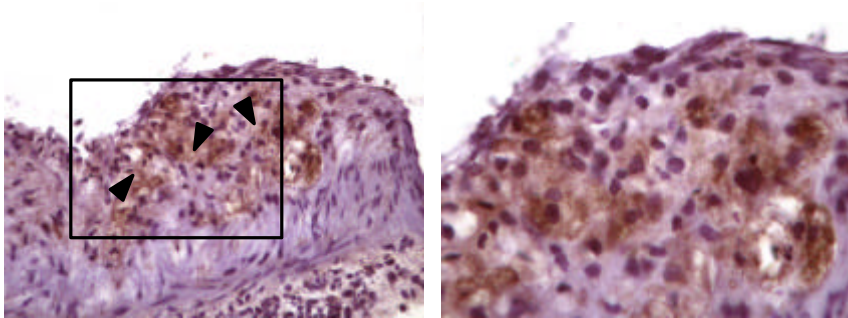


Figura 1. **Immunohistoquímica de monòcits/macròfags en artèria aorta de ratolins apo E^{-/-}.**

- A.** Els monòcits/ macròfags corresponen a les cèl·lules en què el seu citoplasma està tenyit de color marró (fletxes)
B. Es mostra amb més detall la regió seleccionada de la figura 1. A.

8. Immunohistoquímica d'α-actina

1. Fonament i objectiu de la prova

1.1. Fonament:

La tècnica està basada en la unió específica de l'anticòs monoclonal a un antígen intracel·lular expressat en les cèl·lules musculars llises; i en la posterior visualització d'aquest a través de la utilització d'una antimmunoglobulina conjugada amb peroxidasa i el substrat D.A.B.

1.2. Objectiu:

Identificació i quantificació d'un antígen intracel·lular expressat en les cèl·lules musculars llises i mioepitelials.

1.3. Utilitat:

En el ratolí deficient en apolipoproteïna E es formen, al llarg del temps, gran quantitat de plaques arterioscleròtiques. La composició de la placa, com és la quantitat de cèl·lules musculars llises, i la seva distribució és fonamental per tal de conèixer l'extensió de la resposta inflamatòria que està tenint lloc en aquest model d'arteriosclerosi.

2. Espècimen

Talls de l'artèria aorta de 5µm de gruix, des del seu inici fins que es sobrepassa la vàlvula aòrtica conservats a -80°C (veure PNT corresponent a Histomorfometria de les lesions aòrtiques, passos 6.1 fins 6.2.1.).

3. Reactius, controls i altres materials

- Cambra humida.
- Paper d'alumini.
- Paper de filtre.
- Glicina (Fluka, 50046)
- Solució PBS 100 mM – Glicina 20 mM.
- Solució PBS 100 mM.
- Aigua oxigenada (Peròxid d'hidrògen al 3%) (Cuve, 702373).

- BSA : Albúmina Bovina (Sigma, A-3803).
- Tritó X 100 (Merck, 11869.1000).
- Anticòs primari Mouse anti human to actin, smooth muscle (BioGenex, 128M)
- Anticòs secundari Biotinylated horse anti-mouse IgG (H + L) **Afinity Purified** (Vector, BA-2000).
- Sèrum de ratolí.
- ABC Complex, Vectastain ABC Kit Standard (Vector, PK-4000)
- Substrat - Cromogen 3,3' diaminobenzidine (D.A.B.) (Dako, K3466).
- Tubs Eppendorf de 1000 i 250 µL.
- Cubreobjectes de 24 x 60 mm.
- Flascons de Coplin.
- Xilol.
- Alcohol absolut.
- Alcohol de 96°.
- Aigua corrent.
- Aigua desionitzada.
- Cubeta sense fons: bressols.
- Cubetes de tinció amb tapa.
- Medi de muntatge D.P.X.

4. Instrumentació

- Microscopi òptic (Nikon, Eclipse E600)
- Software Analisisys (Analysis, Soft Imaging System)

5. Control de qualitat

És totalment recomanable, cada cop que es vol fer aquesta determinació, reservar un tall per a realitzar un control negatiu de l'anticòs primari.

Procediment: En aquest cas, s'han de seguir tots els passos que s'indiquen en aquest protocol, tenint en compte que en el pas d'incubació de l'anticòs primari (6.6.1.) en els controls negatius NO S'AFEGEIX L'ANTICÒS PRIMARI, sinó que s'afegeix una solució de BSA 1% sense l'anticòs.

Resultats: El tall ha de quedar completament blau i no ha de presentar senyal positiva (cèl·lules tenyides de color marró fosc), doncs ens assegurem que la unió de l'anticòs secundari al primari és totalment específica.

6. Procediment

- 6.1. Descongelar els portaobjectes durant 5 min aproximadament a T^a ambient.
- 6.2. Hidratació. Submergir els portaobjectes en un flascó de Coplin que conté una solució de PBS (100 mM) - Glicina (20 mM) durant 10 min a T^a ambient i en agitació.
- 6.3. Permeabilització de les membranes. Submergir els portaobjectes en un flascó de Coplin que conté una solució de PBS (100 mM) - Glicina (20 mM) – Tritó (0.5%) durant 10 min a T^a ambient i en agitació. Aquest pas és necessari en el cas en què l'antígen a detectar es trobi en l'interior cel·lular.
- 6.4. Bloqueig de la peroxidasa endògena.
 - 6.4.1. Preparar una cambra humida protegida de la llum, per tal de poder portar a terme les successives incubacions.
 - 6.4.2. S'afegeixen 30 µL d'H₂O₂ (al 3%) a cada tall.
 - 6.4.3. Incubar en cambra humida a temperatura ambient durant 25 min.
 - 6.4.4. Acabat el temps d'incubació, amb l'ajut de paper de filtre, retirar el líquid que cobreix la mostra.
 - 6.4.5. Rentar 2 cops durant 4 min a T^a ambient amb PBS (100 mM) – Glicina (20 mM)
- 6.5. Bloqueig de llocs inespecífics.
 - 6.5.1. Retirar la solució que cobreix la superfície de cada tall amb paper de filtre.
 - 6.5.2. Ràpidament s'afegeixen 30 µL de solució BSA (2%) a cada tall.
 - 6.5.3. Incubar a temperatura ambient durant 20 min.

- 6.5.4. Acabat el temps d'incubació, amb l'ajut de paper de filtre, retirar el líquid què cobreix la mostra.
- 6.6. Incubació amb l'anticòs primari. És convenient que immediatament s'afegeixi l'anticòs primari, doncs així evitarem que els talls s'assequin.
- 6.6.1. S'afegeixen DIRECTAMENT 30 µL de la dissolució de anti α -actin (ja preparada per la casa comercial) a cada tall a excepció dels controls negatius en els que s'afegeixen 30 µL de BSA 1% sense l'anticòs.
- NOTA: l'anticòs ja està diluït (aprox 1/50-1/100) en BSA 1% per la casa comercial i no és aconsellable tornar a diluir-lo, doncs es podria perdre marcatge; a més, la casa comercial indica que aquesta és la dissolució de treball òptima.
- 6.6.2. Incubar en cambra humida a temperatura ambient durant 90 min.
- 6.7. Rentar. Repetir el pas 6.4.5.
- 6.8. Incubació amb l'anticòs secundari:
- 6.8.1. Afegir 30 µL de la dissolució d'anticòs secundari (1/200) amb sèrum de ratolí (10%) a cada tall (mostres i controls) . Afegim sèrum de ratolí, és a dir, de la mateixa espècie, per tal d'evitar problemes de reaccions creuades amb immunoglobulines endògenes.
- 6.8.2. Incubar a temperatura ambient durant 90 min.
- 6.9. Rentar. Repetir el pas 6.4.5.
- 6.10. Afegir a cada tall (mostres i controls) 30µL del complex ABC Complex que s'ha preparat prèviament. Incubar durant 45 min a temperatura ambient.
- 6.11. Rentar : Repetir el pas 6.4.5.
- 6.12. Revelat.
- 6.12.1. Preparar la solució de treball del cromògen tal com indica en el kit: mesclar 20 µL de cromògen DAB amb 1 mL de Buffer solution.
- 6.12.2. Afegir a cada tall 30 µL de la solució de treball del cromògen.
- 6.12.3. Incubar a temperatura ambient aproximadament 30" i durant un màxim de 8 min.
- NOTA: Controlar visualment i si veiem que vira a color marró, immediatament submergir el portaobjectes en el flascó que conté aigua MQ.
- 6.13. Rentar amb aigua MQ procedint tal com s'indica en el pas 6.4.5.
- 6.14. Contratació.
- 6.14.1. Cobrir cada tall amb Hematoxilina de Mayer.
- 6.14.2. Incubar a temperatura ambient durant 1min.
- 6.15. Rentar amb aigua corrent fins que el portaobjecte estigui net.
- 6.16. Muntatge.
- 6.16.1. Submergir els portaobjectes (col·locats en un bressol) en una cubeta de tinció que contingui aigua destil·lada. Deixar actuar aprox. 1 min.
- 6.16.2. Passar el bressol a la següent cubeta de tinció que conté alcohol 96%, i incubar durant 30 s.
- 6.16.3. Passar a la següent cubeta que conté alcohol absolut, i incubar durant 30 s.
- 6.16.4. Transferir el bressol a la següent cubeta que conté una mescla d'alcohol absolut-xilol (50%) i incubar durant 3 min.
- 6.16.5. Passar a la següent cubeta que conté xilol absolut, i incubar durant 3 min.
- 6.16.6. Repetir el pas anterior.
- 6.16.7. Submergir en una solució que conté xilol-eucaliptol durant un mínim de 5".
- NOTA: Aquest pas és opcional, doncs tant sols té per finalitat augmentar la lluentor de la preparació.
- 6.16.8. Afegir D.P.X. sobre la preparació, cobrir amb un cubreobjectes i retirar l'excés de medi de muntatge.
- 6.17. Observació al microscopi. Veure Figura 1
- 6.17.1. Nuclis blaus
- 6.17.2. Cèl·lules musculars llises marró fosc

6.18. Quantificació.

Utilitzant el programa informàtic Anisys es mesurarà l'àrea positiva per a les cèl·lules musculars llises i es representaran en forma de % d'àrea ocupada per cèl·lules musculars llises respecte a l'àrea de la placa arterioscleròtica. (veure PNT Histomorfometria de les lesions aòrtiques)

7. Informe dels resultats

8. Anotacions i limitacions del procediment

Malgrat que les concentracions d'anticòs primari i secundari són les òptimes per a determinar de forma específica les cèl·lules musculars llises que s'expressen en la lesió arterioscleròtica procedent de ratolins deficientes en apo E de mostres que s'han fixat i congelat, podria ser que sigui necessari adaptar les concentracions d'anticòs primari i secundari depenent del tipus de fixació de la mostra, així com del temps que el teixit ha estat conservat a -80°C .

9. Bibliografia

10. Distribució de resultats

Solució de stock PBS (10x)

80 g NaCl

2 g KCl

14,4 g Na_2HPO_4

2,4 g KH_2PO_4

Enrasar fins a 1 L amb H_2O MQ

Es pot comprovar el pH, però si s'ha fet bé ha de donar 7,4

PBS 100 mM.

100 mL solució de stock PBS (10x)

900 mL H_2O MQ

PBS 100 mM – Glicina 20mM.

1.5 g. Glicina

1000 mL PBS 100 mM

PBS 100 mM – Glicina 20 mM- Tritó (0.5 %)

100 mL PBS 100 mM – Glicina 20 mM

500 μL Tritó

BSA 1%

500 mL PBS 100 mM

500 mL BSA 2%

Emmagatzemar a -20°C .

Sèrum 10 %

40 mL de sèrum de ratolí

360 mL de PBS 100 mM – Glicina 20 mM.

ABC Complex (1/200)

2,5 μL de reactiu A (Avidin DH, ampolla amb l'etiqueta taronja Vectastain ABC kit, PK-4000)

2,5 μL de reactiu B (Biotinylated horseradish peroxidase H, ampolla amb l'etiqueta marró Vectastain ABC kit, PK-4000)

995 μL de solució PBS 100 mM .

Homogeneitzar bé i protegir de la llum; agitar durant un mínim de 30 min abans de la seva utilització.

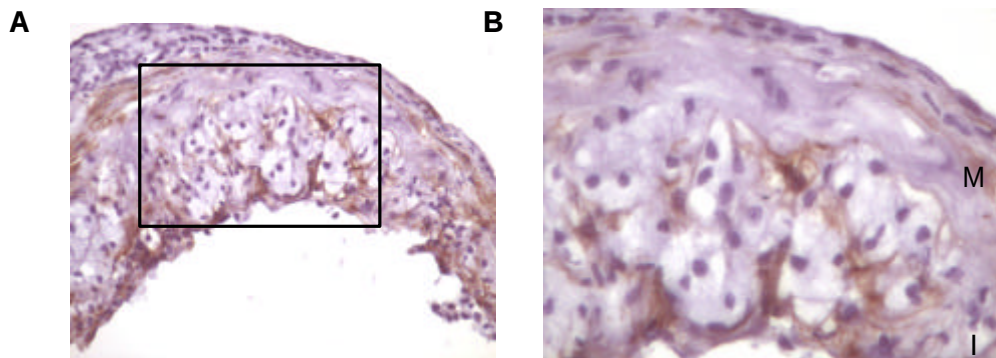


Figura 1. Immunohistoquímica de α - Smooth muscle actin . A. Les cèl·lules musculars llises presents en el teixit estan tenyides de color marró. B. Es mostra amb més detall la regió seleccionada de la figura 1. A. en la que es veuen les cèl·lules musculars llises presents en la placa arterioscleròtica (I) així com també aquelles que es troben en la capa mitja (M) de l'artèria aorta.

9. Doble immunohistoquímica de MOMA-2 i α -actina

1. Fonament i objectiu de la prova

1.1. Fonament:

La tècnica està basada en la unió específica de dos anticossos monoclonals, cadascun d'ells a un antígen intracel·lular determinat. El primer d'ells expressat en les cèl·lules musculars llises i el segon en monòcits i macròfags; i en la posterior visualització d'aquests a través de la utilització d'una antimmunoglobulina biotinilada i de dos substrats : 1) el substrat D.A.B. que ens permetrà detectar cèl·lules musculars llises i 2) el substrat AEC que ens permetrà detectar monòcits i macròfags presents en la placa arterioscleròtica.

1.2. Objectiu:

Identificació i quantificació de dos antígens intracel·lulars el primer d'ells expressat en les cèl·lules musculars llises i mioepitelials i el segon d'ells expressat en monòcits/macròfags.

1.3. Utilitat:

En el ratolí deficient en apolipoproteïna E es formen, al llarg del temps, gran quantitat de plaques arterioscleròtiques. La composició de la placa, com és la quantitat de cèl·lules musculars llises, la quantitat de monòcits i macròfags, i la seva distribució és fonamental per tal de conèixer l'extensió de la resposta inflamatòria que està tenint lloc en aquest model d'arteriosclerosi.

2. Espècimen

Talls de l'artèria aorta de 5 μ m de gruix, des del seu inici fins que es sobrepassa la vàlvula aòrtica conservats a -80°C (veure PNT corresponent a Histomorfometria de les lesions aòrtiques, passos 6.1 fins 6.2.1.).

3. Reactius, controls i altres materials

- Cambra humida.
- Paper d'alumini.
- Paper de filtre.
- Glicina (Fluka, 50046)

- Solució PBS 100 mM – Glicina 20 mM.
- Solució PBS 100 mM.
- Aigua oxigenada (Peròxid d'hidrògen al 3%) (Cuve, 702373).
- BSA : Albúmina Bovina (Sigma, A-3803).
- Tritó X 100 (Merck,11869.1000).
- Anticòs primari Mouse anti human to actin, smooth muscle (BioGenex, 128M)
- Anticòs secundari Biotinylated horse anti-mouse IgG (H + L) **Afinity Purified** (Vector, BA-2000).
- Anticòs primari Rat anti mouse macrophages/ monocytes (Serotec, MCA519G).
- Anticòs secundari Biotinylated goat anti-rat IgG (H + L) **Afinity Purified** (Vector, BA-9400).
- Sèrum de ratolí.
- ABC Complex, Vectastain ABC Kit Standard (Vector, PK-4000)
- Substrat - Cromogen 3,3' diaminobenzidine (D.A.B.) (Dako, K3466).
- Substrat – AEC substrate cromogen ready to use (Dako, K3464).
- Tubs Eppendorf de 1000 i 250 µL.
- Cubreobjectes de 24 x 60 mm.
- Flascons de Coplin.
- Aigua corrent.
- Aigua desionitzada.
- Cubeta sense fons: bressols.
- Hematoxilina de Harris
- Medi de muntatge Mowiol.

4. Instrumentació

- Microscopi òptic (Nikon, Eclipse E600)
- Software Analisis (Analysis, Soft Imaging System)

5. Control de qualitat

És totalment recomanable, cada cop que es vol fer aquesta determinació, reservar dos talls per a realitzar un control negatiu de cadascun dels anticossos primaris que s'utilitzen. NOTA: És convenient que no es fagin en el mateix portaobjectes els dos controls negatius, sinó que es reservin dos talls, cadascun d'ells en un portaobjecte diferent.

Procediment: En aquest cas, s'han de seguir tots els passos que s'indiquen en aquest protocol, tenint en compte que en el pas d'incubació de l'anticòs primari (6.9.1.,) en els controls negatius NO S'AFEGEIX L'ANTICÒS PRIMARI, sinó que s'afegeix una solució de BSA 1% sense l'anticòs.

Resultats: Els talls que s'han reservat per als controls negatius han de quedar completament blaus i no ha de presentar senyal positiva (cèl·lules tenyides de color marró fosc o bé vermell), doncs ens assegurem que la unió de l'anticòs secundari al primari és totalment específica.

6. Procediment

Immunohistoquímica de alpha smooth muscle actin

- 6.1. Descongelar els portaobjectes durant 5 min aproximadament a T^a ambient.
- 6.2. Hidratació. Submergir els portaobjectes en un flascó de Coplin / en una cubeta de tinció (dependent del nombre de mostres que tenim) que conté una solució de PBS (100 mM) - Glicina (20 mM) durant 10 min a T^a ambient i en agitació.
- 6.3. Permeabilització de les membranes. Submergir els portaobjectes en un flascó de Coplin / en una cubeta de tinció que conté una solució de PBS (100 mM) - Glicina (20 mM) – Tritó (0.5%) durant 10 min a T^a ambient i en agitació. Aquest pas és necessari en el cas en què l'antígen a detectar es trobi en l'interior cel·lular.
- 6.4. Bloqueig de la peroxidasa endògena.
 - 6.4.1. Preparar una cambra humida protegida de la llum, per tal de poder portar a terme les successives incubacions.
 - 6.4.2. S'afegeixen 30 µL d'H₂O₂ (al 3%) a cada tall.

- 6.4.3. Incubar en cambra humida a temperatura ambient durant 20-25 min.
- 6.4.4. Acabat el temps d'incubació, amb l'ajut de paper de filtre, retirar el líquid què cobreix la mostra.
- 6.4.5. Rentar 2 cops durant 4 min a T^a ambient amb PBS (100 mM) - Glicina (20 mM).
- 6.5. Bloqueig de llocs inespecífics.
 - 6.5.1. Retirar la solució que cobreix la superfície de cada tall amb paper de filtre.
 - 6.5.2. Ràpidament s'afegeixen 30 µL de solució BSA (2%) a cada tall.
 - 6.5.3. Incubar a temperatura ambient durant 30 min.
 - 6.5.4. Acabat el temps d'incubació, amb l'ajut de paper de filtre, retirar el líquid què cobreix la mostra.
- 6.6. Incubació amb l'anticòs primari (alpha-smooth muscle actin). És convenient que immediatament s'afegeixi l'anticòs primari, doncs així evitarem que els talls s'assequin.
 - 6.6.1. S'afegeixen DIRECTAMENT 30 µL de la dissolució de anti α-actin (ja preparada per la casa comercial) a cada tall a excepció dels controls negatius en els que s'afegeixen 30 µL de BSA 1% sense l'anticòs.
 NOTA: l'anticòs ja està diluït (aprox 1/50-1/100) en BSA 1% per la casa comercial i no és aconsellable tornar a diluir-lo, doncs es podria perdre marcatge; a més, la casa comercial indica que aquesta és la dissolució de treball òptima.
 - 6.6.2. Incubar en cambra humida a temperatura ambient durant 90 min.
- 6.7. Rentar. Repetir el pas 6.4.5.
- 6.8. Incubació amb l'anticòs secundari:
 - 6.8.1. Afegir 30 µL de la dissolució de l'anticòs secundari corresponent (horse anti mouse (1/200) amb sèrum de ratolí (10%) a cada tall (mostres i controls) . Afegim sèrum de ratolí, és a dir, de la mateixa espècie, per tal d'evitar problemes de reaccions creuades amb immunoglobulines endògenes.
 - 6.8.2. Incubar a temperatura ambient durant 90 min.
- 6.9. Rentar. Repetir el pas 6.4.5.
- 6.10. Afegir a cada tall (mostres i controls) 30 µL de la solució ABC Complex (1/200) que s'ha preparat prèviament (veure Annex 1)
- 6.11. Rentar. Repetir el pas 6.4.5.
- 6.12. Revelat.
 - 6.12.1. Preparar la solució de treball del cromògen tal com indica en el kit: mesclar 20 µL de cromògen DAB amb 1 mL de Buffer solution.
 - 6.12.2. Afegir a cada tall 30 µL de la solució de treball del cromògen.
 Incubar a temperatura ambient aproximadament 30" i durant un màxim de 8 min.
 - 6.12.3. Controlar visualment i si veiem que vira a color marró, immediatament submergir el portaobjectes en el flascó que conté aigua MQ.
 - 6.12.4. Rentar amb aigua MQ procedint tal com s'indica en el pas 6.4.5.

Immunohistoquímica de MOMA-2

- 6.13. Permeabilització de les membranes. Submergir els portaobjectes en un flascó de Coplin / en una cubeta de tinció que conté una solució de PBS (100 mM) - Glicina (20 mM) – Tritó (0.5%) durant 10 min a T^a ambient i en agitació.
- 6.14. Rentar. Repetir el pas 6.4.5.
- 6.15. Incubació amb l'anticòs primari (MOMA-2, 1/1000). És convenient que immediatament s'afegeixi l'anticòs primari, doncs així evitarem que els talls s'assequin.
 - 6.15.1. S'afegeixen 30 µL de la dissolució de MOMA-2 (1/1000) en BSA 1% a cada tall a excepció dels controls negatius en els que s'afegeixen 30 µL de BSA 1% sense l'anticòs.
 - 6.15.2. Incubar en cambra humida a 4°C o/n.
- 6.16. Rentar. Repetir el pas 6.4.5.
- 6.17. Incubació amb l'anticòs secundari:

- 6.17.1. Afegir 30 µl de la dissolució de l'anticòs secundari corresponent goat anti rat (1/2000) diluït amb sèrum de ratolí (10%) a cada tall (mostres i controls) .Afegim sèrum de ratolí, és a dir, de la mateixa espècie, per tal d'evitar problemes de reaccions creuades amb immunoglobulines endògenes.
- 6.17.2. Incubar a temperatura ambient durant 90 min.
- 6.18. Rentar. Repetir el pas 6.4.5.
- 6.19. Afegir a cada tall (mostres i controls) 30 µL del complex ABC Complex que s'ha preparat prèviament (veure Annex 1). Incubar durant 45 min i a temperatura ambient.
- 6.20. Rentar : Repetir el pas 6.4.5.
- 6.21. Revelat.
 - 6.21.1. Afegir a cada tall una gota de la solució ready to use-AEC Substrate chromogen, de manera que cobreixi cada tall.
 - 6.21.2. Incubar a temperatura ambient aproximadament 30" i durant un màxim de 30 min.
 NOTA: Controlar visualment amb l'ajut del microscopi òptic i quan veiem que algunes estructures del teixit viren a color vermell, immediatament submergir el portaobjectes en el flascó que conté aigua MQ.
- 6.22. Rentar amb aigua MQ procedint tal com s'indica en el pas 6.4.5.
- 6.23. Contratació.
 - 6.23.1. Cobrir cada tall amb Hematoxilina de Harris.
 - 6.23.2. Incubar a temperatura ambient durant 1min.
- 6.24. Rentar amb aigua corrent fins que el portaobjectes estigui net.
- 6.25. Muntatge.
 - 6.25.1. Afegir a cada tall 30 µL de la solució de Mowiol (previament preparada)
 - 6.25.2. Cobrir els talls amb el cubre que s'adequi a la mida del portaobjectes amb el que estem treballant
 - 6.25.3. Incubar durant 30 min a 4°C en una cambra humida i protegida de la llum.
 - 6.25.4. Transcorregut aquest temps d'incubació ja es poden observar al microscopi les preparacions obtingudes (Veure Figura 1)

Nuclis	blaus
Cèl·lules musculars	marró fosc
Monòcits/macròfags	vermell
- 6.26. Quantificació.
 Utilitzant el programa informàtic Anisys es mesuraran les àrees positives per a cèl·lules musculars llises i macròfags i es representaran en forma de % d'àrea ocupada per cèl·lules musculars llises respecte a l'àrea de la placa arterioscleròtica. (veure PNT Histomorfometria de les lesions aòrtiques)

7. Informe dels resultats

8. Anotacions i limitacions del procediment

Malgrat que aquesta tècnica permet visualitzar dos antígens que s'expressen en cèl·lules diferents mitjançant la utilització de dos cromògens que tenen un color diferent, en alguns casos, es fa difícil la distinció entre ambdós colors. Tanmateix, casacun d'aquests antígens es localitza en una zona diferent de la placa, el que permetria deduir quina és la senyal que correspon a cada antígen.

9. Bibliografia

10.- Distribució de resultats

Solució de stock PBS (10x)

80 g NaCl
 2 g KCl
 14,4 g Na₂HPO₄

2,4 g KH_2PO_4
 Enrasar fins a 1 L amb H_2O MQ
 Es pot comprovar el pH, però si s'ha fet bé ha de donar 7,4

PBS 100 mM.

100 mL solució de stock PBS (10x)
 900 mL H_2O MQ

PBS 100 mM – Glicina 20mM.

1.5 g. Glicina
 1000 mL PBS 100 mM

PBS 100 mM – Glicina 20 mM- Tritó (0.5 %)

100 mL PBS 100 mM – Glicina 20 mM
 500 μL Tritó

BSA 1 %

500 mL PBS 100 mM
 500 mL BSA 2%
 Emmagatzemar a -20°C .

Sèrum 10 %

40 mL de sèrum de ratolí
 360 mL de PBS 100 mM – Glicina 20 mM.

ABC Complex (1/200)

2,5 μL de reactiu A (Avidin DH, ampolla amb l'etiqueta taronja Vectastain ABC kit, PK-4000)
 2,5 μL de reactiu B (Biotinylated horseradish peroxidase H, ampolla amb l'etiqueta marró Vectastain ABC kit, PK-4000)
 995 μL de solució PBS 100 mM .
 Homogeneitzar bé i protegir de la llum; agitar durant un mínim de 30 min abans de la seva utilització.

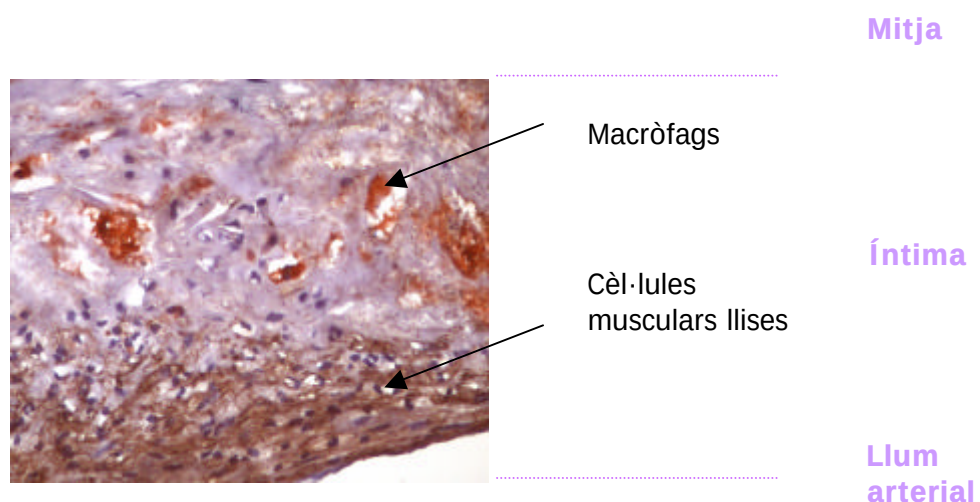


Figura 1. Doble immunohistoquímica d'a-actina i MOMA-2 en artèria aorta de ratolins deficients en apo E.

Les cèl·lules musculars llises presents en el teixit estan tenyides de color marró.
 Els monòcits/macròfags presents en el teixit estan tenyides de color vermell.

Discussió i Conclusions

L'aterosclerosi és una malaltia caracteritzada per la presència d'una inflamació crònica a l'artèria. Actualment s'accepta que la presència d'una inflamació crònica, tal com la periodontitis, el lupus eritomatós o l'artritis reumatoide, contribueixen a una major mortalitat i morbiditat per la malaltia cardiovascular (298-303). El principal objectiu d'aquesta tesi va ser determinar els efectes a llarg termini de la presència d'una inflamació crònica en el desenvolupament i progressió de l'aterosclerosi i determinar l'efecte que el tractament amb agents antiinflamatoris té sobre l'aterogènesi en el ratolí deficient en apolipoproteïna E.

Fins a la data actual s'han realitzat un gran nombre d'estudis amb models animals d'aterosclerosi amb l'objectiu de determinar l'efecte que certs agents antiinflamatoris tenen en l'aterogènesi i els resultats que s'han obtingut són controvertits. Alguns d'ells mostren un efecte positiu de l'aspirina sobre l'aterogènesi (343, 344), mentre que existeixen estudis que mostren resultats contraris (346,347).

En l'**estudi 1** es va avaluar l'efecte del tractament amb altes dosis d'aspirina sobre l'inici i el desenvolupament de l'aterosclerosi en el ratolí deficient en apolipoproteïna E, alimentat amb una dieta aterogènica. Després de 5 setmanes de tractament, l'aspirina va disminuir la mida de les lesions ateroscleròtiques que els ratolins presentaven en el sinus aòrtic, tal com ja s'havia trobat en un estudi anterior (343). Tanmateix, després de 12 setmanes de tractament, no es va observar cap efecte i a més, el tractament durant 8 setmanes més porta a un increment significatiu en la mida de les lesions ateroscleròtiques d'aquests animals comparat amb els ratolins control. Per tant, els resultats obtinguts suggereixen que l'efecte de l'aspirina és transitori, així en estadis inicials l'administració d'aspirina inhibiria l'aterogènesi i a llarg termini podria accelerar el procés ateroscleròtic. Una causa possible que podria aclarir l'efecte transitori de l'aspirina sobre l'aterogènesi, és que com a conseqüència de la inhibició de l'enzim ciclooxigenasa, l'àcid araquidònic pot ser alternativament processat per la via de la 5-lipooxigenasa, resultant en un increment en la producció de leucotriens que tenen capacitat inflamatori. La 5-lipooxigenasa està altament expressada en les plaques ateroscleròtiques d'humans. Aiello et al. (545) han demostrat que

els antagonistes del receptor del leucotriè B₄, redueixen la formació de cèl·lules escumoses en el ratolí. Tots els resultats que mostren un efecte beneficiós de l'aspirina sobre l'aterogènesi han estat realitzats en models d'aterosclerosi els quals han estat alimentats amb una dieta aterogènica, contràriament els realitzats amb models animals alimentats amb dietes suplementades amb greix i/o colesterol, mostren resultats negatius. Per aquesta raó en l'estudi 3 ens vam plantejar avaluar l'efecte de l'administració de l'aspirina sobre l'aterogènesi en el ratolí deficient en apo E alimentat amb una dieta estàndard de ratolí, que és pobre en greixos i colesterol.

Prèviament havíem vist que els ratolins deficientes en apo E quan són alimentats amb una dieta aterogènica (és a dir, amb un alt contingut en greixos i colesterol) desenvolupen alteracions hepàtiques greus que són compatibles amb l'esteatohepatitis. En l'**estudi 2** ens vam proposar investigar l'efecte que una dieta amb un alt contingut en greix i colesterol té sobre l'aterogènesi i sobre el desenvolupament de l'esteatohepatitis, en el ratolí deficient en apo E, així com determinar si ambdós processos es poden agreujar mútuament. Els resultats de l'estudi 2 mostren que una dieta suplementada amb greix i colesterol, no tant sols induïx el desenvolupament de l'aterosclerosi, sinó que també porta a esteatosi hepàtica en el ratolí deficient en apo E. Els efectes observats podien ser modulats dependent del tipus de dieta amb el que van ser alimentats; la dieta enriquida amb oli de palma i colesterol va produir majors lesions tant hepàtiques com en l'artèria aorta dels ratolins apo E^{-/-}. Vam observar una estreta relació cronològica i quantitativa entre l'esteatohepatitis i l'aterosclerosi. Aquests resultats indiquen que existeix una forta associació entre el desenvolupament de l'aterosclerosi i l'esteatosi hepàtica, en el ratolí deficient en apo E. Altres autors també han suggerit que en humans, l'esteatosi hepàtica està associada amb un major risc per desenvolupar aterosclerosi (337,338). Tanmateix, no queda clar si l'esteatosi hepàtica juga un paper fonamental en el desenvolupament de factors de risc metabòlics que alhora podrien afectar el desenvolupament de lesions ateroscleròtiques o per sí mateix pot induir l'aterosclerosi. Aquests resultats ens han portat a dissenyar un altre projecte (dades no publicades) en el que ens proposavem determinar l'efecte que

té afegir més o menys colesterol a la dieta estàndard de ratolí al llarg del temps sobre l'aterogènesi i l'esteatohepatitis. Hem trobat que els ratolins apo E^{-/-} alimentats amb una dieta amb un alt contingut en greix i colesterol presenten una marcada hipercolesterolèmia, un increment en l'expressió hepàtica i aòrtica de *mcp-1*, un major grau d'inflamació hepàtica i lesions ateroscleròtiques que són significativament superiors als ratolins que han estat alimentats amb una dieta estàndard de ratolí amb o sense greix afegit. A més, els ratolins que van mostrar lesions hepàtiques i ateroscleròtiques més greus, presenten concentracions hepàtiques i plasmàtiques de colesterol significativament augmentades respecte a aquells ratolins amb lesions més moderades. La hipercolesterolèmia que presenten aquests animals induïda per la dieta, portaria a un cúmul de colesterol tant en el fetge com en l'artèria aorta i probablement, el colesterol acumulat en ambdós teixits seria l'agent causant de l'esteatosi hepàtica i l'aterosclerosi. Liao et al. (339) troben que el consum d'una dieta aterogènica durant un període de 5-15 setmanes provoca en una soca de ratolí susceptible a l'aterosclerosi (C57BL/6J) la inducció de l'expressió hepàtica de *saa*, un increment en la mida de les lesions ateroscleròtiques i un major cúmul de diens conjugats en el fetge d'aquests animals (339). El colesterol podria actuar com una molècula prooxidant portant al cúmul de lípids oxidats en l'artèria i en el fetge, i desencadenant en una resposta inflamatòria en ambdós teixits.

Si aquests resultats es confirmessin, seria interessant dilucidar si el colesterol de la dieta podria actuar de forma indirecta (a través de la oxidació de lípids acumulats en ambdós teixits) o bé de forma directa (a través de la interacció amb factors de transcripció que activessin l'expressió de gens inflamatoris) en el desenvolupament de l'esteatosi hepàtica i l'aterosclerosi.

Per tal d'esbrinar l'efecte que d'altres processos inflamatoris no vasculars podrien tenir sobre l'aterogènesi, en l'**estudi 3** es va induir una inflamació localitzada, crònica i asèptica, en el ratolí deficient en apo E, mitjançant l'administració d'una injecció subcutània d'oli de turpentina durant 12 setmanes. El tipus de lesió inflamatòria produïda va desencadenar en una resposta sistèmica caracteritzada per un increment en les concentracions plasmàtiques de SAA i TNF- α , característic d'altres malalties inflamatòries, tal

com l'artritis reumatoide. Contràriament al que esperavem, la nostra principal troballa va ser que la mida de les lesions ateroscleròtiques dels ratolins tractats amb oli de turpentina, va resultar ser significativament inferior que les que presentaven els ratolins controls. Aquest efecte és contrari a l'observat en els ratolins apo E als quals s'ha induït una inflamació crònica per l'administració de LPS (546). Alguns factors poden explicar les nostres observacions. En primer lloc, sembla ser que la inflamació induïda per infecció i per oli de turpentina desencadenen en una resposta sistèmica diferent i per tant, ambdós processos no són comparables. En segon lloc, interpretem l'atenuació de l'aterosclerosi com una conseqüència directa d'una disminució significativa en les concentracions plasmàtiques de colesterol, el que disminuiria el nombre de cèl·lules inflamatòries que són reclutades en la paret arterial. En tercer lloc, es va trobar que l'expressió hepàtica de *mdr1b* dels ratolins tractats amb oli de turpentina era significativament inferior als ratolins control. Durant la resposta inflamatòria, s'ha demostrat en rates i ratolins que hi ha una disminució en l'expressió de *mdr1* (448,449). Estudis previs suggereixen que *mdr1* està involucrat directament en l'aterogènesi. Així doncs, en artèries d'humans s'ha demostrat que existeix una correlació directa entre l'expressió de *mdr1* i la mida de les lesions ateroscleròtiques (450-452). A més, els ratolins deficients en *mdr1a* i *mdr1b* presenten concentracions plasmàtiques de colesterol disminuïdes, suggerint que aquest gen pot tenir un paper important en l'homeostasi del colesterol. Els ratolins tractats amb oli de turpentina presentaven un augment en la quantitat de sals biliars presents en la femta, indicant que la disminució en les concentracions plasmàtiques de colesterol podria ser degut a una reducció en l'absorció de colesterol i una disminució en la reabsorció intestinal de les sals biliars. La disminució relativa de l'expressió de *mdr1b* podria portar a una disminució en la reabsorció intestinal d'àcids biliars. Tanmateix, són necessaris futurs estudis que estableixin el paper de *mdr1* en la regulació de les concentracions plasmàtiques de colesterol i en la progressió de l'aterosclerosi.

Tot i les conegudes accions antiinflamatòries de l'aspirina, el tractament simultani amb altes dosis d'aspirina no va tenir cap efecte sobre la mida de

les lesions ateroscleròtiques que van presentar els ratolins tractats amb oli de turpentina.

S'ha de tenir en compte que la inducció d'una inflamació, o bé la inhibició d'aquesta mitjançant l'ús d'agents antiinflamatoris, estan associats amb canvis en l'expressió d'un gran nombre de gens que podrien portar a canvis no desitjables i que s'han de tenir en compte abans de recomanar la seva aplicació en la pràctica clínica.

Bibliografia

1. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995;92:1355-1374.
2. Plutzky J. Atherosclerotic plaque rupture: emerging insights and opportunities. *Am J Cardiol*. 1999;84:15J-20J.
3. Strong JP, Malcom GT, McMahan CA, Tracy RE, Newman WP 3rd, Herderick EE, Cornhill JF. Prevalence and extent of atherosclerosis in adolescents and young adults: implications for prevention from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth Study. *JAMA*. 1999;281:727-735.
4. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med*. 1992;326:242-250.
5. Fuster V. Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation*. 1994;90:2126-2146.
6. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation*. 1995; 92:657-671.
7. Fuster V, Badimon JJ, Badimon L. Clinical-pathological correlations of coronary disease progression and regression. *Circulation*. 1992 ;86:III1-III11.
8. Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L. Coronary atherosclerosis. A multifactorial disease. *Circulation*. 1993;87:II3-II16.
9. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126.
10. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*. 2005;111:3481-3488.
11. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med*. 2000;247:349-358.
12. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685-1695.
13. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:1135-1143.
14. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868-874.
15. Luscher TF, Barton M. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol*. 1997;20:II-3-II10.
16. Gimbrone MA Jr, Resnick N, Nagel T, Khachigian LM, Collins T, Topper JN. Hemodynamics, endothelial gene expression, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 1997 ;811:1-10.
17. Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*. 1991;251:788-791.
18. Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol*. 2000;190:244-254.
19. Tedgui A, Mallat Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Circ Res*. 2001;88:877-887.
20. Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, Hahn AW, Werner A, Luscher TF. Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res*. 1992;70:1191-1197.
21. Lamas S, Michel T, Collins T, Brenner BM, Marsden PA. Effects of interferon-gamma on nitric oxide synthase activity and endothelin-1 production by vascular endothelial cells. *J Clin Invest*. 1992;90:879-887.
22. Emori T, Hirata Y, Imai T, Ohta K, Kanno K, Eguchi S, Marumo F. Cellular mechanism of thrombin on endothelin-1 biosynthesis and release in bovine endothelial cell. *Biochem Pharmacol*. 1992;44:2409-2411.
23. Drexler H. Factors involved in the maintenance of endothelial function. *Am J Cardiol*. 1998; 82:3S-4S.
24. Hamilton JA, Chan J, Byrne RJ, Bischof RJ, Jaworowski A, Kanagasundaram V. MRL/lpr and MRL+/+ macrophage DNA synthesis in the absence and the presence of colony-stimulating factor-1 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol*. 1998;161:6802-6811.
25. Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2002;14:123-128.
26. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216.
27. Bobryshev YV, Lord RS. Ultrastructural recognition of cells with dendritic cell morphology in human aortic intima. Contacting interactions of Vascular Dendritic Cells in athero-resistant and athero-prone areas of the normal aorta. *Arch Histol Cytol*. 1995;58:307-322.
28. Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1876-1890.
29. Kocher O, Gabbiani F, Gabbiani G, Reidy MA, Cokay MS, Peters H, Huttner I. Phenotypic features of smooth muscle cells during the evolution of experimental carotid artery intimal thickening. Biochemical and morphologic studies. *Lab Invest*. 1991;65:459-470.
30. Kocher O, Skalli O, Bloom WS, Gabbiani G. Cytoskeleton of rat aortic smooth muscle cells. Normal conditions and experimental intimal thickening. *Lab Invest*. 1984;50:645-652.
31. Kocher O, Gabbiani G. Cytoskeletal features of normal and atheromatous human arterial smooth muscle cells. *Hum Pathol*. 1986;17:875-880.
32. Libby P, Lee RT. Matrix matters. *Circulation*. 2000;102:1874-1876.
33. Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr Opin Lipidol*. 1998;9:471-474.

34. Tabas I. Nonoxidative modifications of lipoproteins in atherogenesis. *Annu Rev Nutr.* 1999;19:123-139.
35. Berliner JA, Subbanagounder G, Leitinger N, Watson AD, Vora D. Evidence for a role of phospholipid oxidation products in atherogenesis. *Trends Cardiovasc Med.* 2001;11:142-147.
36. Geng YJ, Libby P. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1370-1380.
37. Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med.* 2003;9:458-462.
38. Demer LL. Vascular calcification and osteoporosis: inflammatory responses to oxidized lipids. *Int J Epidemiol.* 2002; 31:737-741.
39. Small DM. George Lyman Duff memorial lecture. Progression and regression of atherosclerotic lesions. Insights from lipid physical biochemistry. *Arteriosclerosis.* 1988;8:103-129.
40. Galis ZS, Khatir JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res.* 2002;90:251-262.
41. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation.* 1998;97:1837-1847.
42. Keys A, Menotti A, Aravanis C, Blackburn H, Djordevic BS, Buzina R, Dontas AS, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N. The seven countries study: 2,289 deaths in 15 years. *Prev Med.* 1984;13:141-154.
43. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) *Lancet.* 1994;344:1383-1389.
44. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med.* 1995;333:1301-1307.
45. Sacks FM, Pfeffer MA, Moya LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. 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.* 1996;335:1001-1009.
46. Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, Langendorfer A, Stein EA, Krayer W, Gotto AM Jr. 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.* 1998;279:1615-1622.
47. 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 (LIPID) Study Group. *N Engl J Med.* 1998;339:1349-1357.
48. Rhoads GG, Gulbrandsen CL, Kagan A. Serum lipoproteins and coronary heart disease in a population study of Hawaii Japanese men. *N Engl J Med.* 1976;294:293-298.
49. Assmann G, Schulte H. The Prospective Cardiovascular Munster Study: prevalence and prognostic significance of hyperlipidemia in men with systemic hypertension. *Am J Cardiol.* 1987;59:9G-17G.
50. Assmann G, Schulte H. Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). Prospective Cardiovascular Munster study. *Am J Cardiol.* 1992;70:733-737.
51. Gordon T, Kannel WB, Castelli WP, Dawber TR. Lipoproteins, cardiovascular disease, and death. The Framingham study. *Arch Intern Med.* 1981;141: 1128-1131.
52. Assmann G, Gotto AM Jr. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109:III8-14.
53. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients: the Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 2000;342:145-153.
54. Fox KM. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomised, doubleblind, placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPA study). *Lancet.* 2003;362:782-788.
55. Craig WY, Palomaki GE, Haddow JE. Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations: an analysis of published data. *BMJ.* 1989;298:784-788.
56. Heitzer T, Yla-Herttuala S, Luoma J, Kurz S, Munzel T, Just H, Olschewski M, Drexler H. Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia. Role of oxidized LDL. *Circulation.* 1996;93:1346-1353.
57. Tracy RP, Psaty BM, Macy E, Bovill EG, Cushman M, Cornell ES, Kuller LH. Lifetime smoking exposure affects the association of C-reactive protein with cardiovascular disease risk factors and subclinical disease in healthy elderly subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2167-2176.
58. Bermudez EA, Rifai N, Buring JE, Manson JE, Ridker PM. Relation between markers of systemic vascular inflammation and smoking in women. *Am J Cardiol.* 2002;89:1117-1119.
59. Kutti J. Smoking, platelet reactivity and fibrinogen. *Adv Exp Med Biol.* 1990;273:129-134.

60. Renaud S. Cigarette smoking and platelet function: relation to nicotine, carbon monoxide and saturated fat. *Adv Exp Med Biol.* 1990;273:161-171.
61. Herrington DM, Reboussin DM, Klein KP, Sharp PC, Shumaker SA, Snyder TE, Geisinger KR. The estrogen replacement and atherosclerosis (ERA) study: study design and baseline characteristics of the cohort. *Control Clin Trials.* 2000;21:257-285.
62. Michnovicz JJ, Hershcopf RJ, Haley NJ, Bradlow HL, Fishman J. Cigarette smoking alters hepatic estrogen metabolism in men: implications for atherosclerosis. *Metabolism.* 1989 ;38:537-541.
63. Zevin S, Saunders S, Gourlay SG, Jacob P, Benowitz NL. Cardiovascular effects of carbon monoxide and cigarette smoking. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38:1633-1638.
64. Van Hinsbergh VW. Arteriosclerosis. Impairment of cellular interactions in the arterial wall. *Ann N Y Acad Sci.* 1992;673:321-330.
65. Lassila R, Laustiola KE. Cigarette smoking and platelet-vessel wall interactions. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1992;46:81-86.
66. Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:1731-1737.
67. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;87:840-844.
68. Steenland K. Passive smoking and the risk of heart disease. *JAMA.* 1992;267:94-9.
69. Kawachi I, Colditz GA, Speizer FE, Manson JE, Stampfer MJ, Willett WC, Hennekens CH. A prospective study of passive smoking and coronary heart disease. *Circulation.* 1997;95:2374-2379.
70. Bernhard D, Csordas A, Henderson B, Rossmann A, Kind M, Wick G. Cigarette smoke metal-catalyzed protein oxidation leads to vascular endothelial cell contraction by depolymerization of microtubules. *FASEB J.* 2005 ;19:1096-1107.
71. Otter W, Kleybrink S, Doering W, Standl E, Schnell O. Hospital outcome of acute myocardial infarction in patients with and without diabetes mellitus. *Diabet Med* 2004;21:183-187.
72. Norhammar A, Malmberg K, Diderholm E, et al. Diabetes mellitus: the major risk factor in unstable coronary artery disease even after consideration of the extent of coronary artery disease and benefits of revascularization. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:585-591.
73. Park, L., et al. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat. Med.* 1998;4:1025-1031.
74. Kako, Y., Masse, M., Huang, L.S., Tall, A.R., and Goldberg, I.J. Lipoprotein lipase deficiency and CETP in streptozotocin-treated apoB- expressing mice. *J. Lipid Res.* 2002;43:872-877.
75. Keren P, George J, Shaish A, Levkovitz H, Janakovic Z, Afek A, Goldberg I, Kopolovic J, Keren G, Harats D. Effect of hyperglycemia and hyperlipidemia on atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice: establishment of a combined model and association with heat shock protein 65 immunity. *Diabetes.* 2000;49:1064-1069.
76. Hasty AH, Shimano H, Osuga J, Namatame I, Takahashi A, Yahagi N, Perrey S, Iizuka Y, Tamura Y, Amemiya-Kudo M, Yoshikawa T, Okazaki H, Ohashi K, Harada K, Matsuzaka T, Sone H, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N. Severe hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, and atherosclerosis in mice lacking both leptin and the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 2001;276:37402-37408.
77. Renard CB, Kramer F, Johansson F, Lamharzi N, Tannock LR, von Herrath MG, Chait A, Bornfeldt KE. Diabetes and diabetes-associated lipid abnormalities have distinct effects on initiation and progression of atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* 2004;114:659-668.
78. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:816-823.
79. Death AK, Fisher EJ, McGrath KC, Yue DK. High glucose alters matrix metalloproteinase expression in two key vascular cells: potential impact on atherosclerosis in diabetes. *Atherosclerosis* 2003;168:263-269.
80. Moreno PR, Murcia AM, Palacios IF, et al. Coronary composition and macrophage infiltration in atherectomy specimens from patients with diabetes mellitus. *Circulation* 2000;102:2180-2184.
81. Burke AP, Kolodgie FD, Zieske A, et al. Morphologic findings of coronary atherosclerotic plaques in diabetes: a postmortem study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1266 -1271.
82. Zumbach M, Hofmann M, Borcea V, et al. Tissue factor antigen is elevated in patients with microvascular complications of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1997;105:206 -212.
83. Sambola A, Fuster V, Badimon JJ. [Role of coronary risk factors in blood thrombogenicity and acute coronary syndromes]. *Rev Esp Cardiol* 2003;56:1001-1009.
84. Blair SN, Kohl HW 3rd, Barlow CE, Paffenbarger RS Jr, Gibbons LW, Macera CA. Changes in physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy and unhealthy men. *JAMA.* 1995;273:1093-1098.
85. Mangoni AA, Jackson SH. Homocysteine and cardiovascular disease: current evidence and future prospects. *Am J Med.* 2002;112:556-565.
86. Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE, Andria G, Boers GH, Bromberg IL, Cerone R, et al. The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet.* 1985;37:1-31.
87. McCully KS. Homocystinuria, arteriosclerosis, methylmalonic aciduria, and methyltransferase

deficiency: a key case revisited. *Nutr Rev.* 1992;50:7-12.

88. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I.

Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med.* 1991;324:1149-1155.

89. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA.* 1995;274:1049-1057.

90. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995;10:111-113.

91. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ.* 2002;325:1202.

92. Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG; MTHFR Studies Collaboration Group. MTHFR 677C-->T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA.* 2002;288:2023-2031.

93. De Bree A, Verschuren WM, Kromhout D, Kluijtmans LA, Blom HJ. Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. *Pharmacol Rev.* 54:599-618.

94. Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, Zhou J, Maeda

N, Krisans SK, Malinow MR, Austin RC. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest.* 2001;107:1263-1273.

95. Ungvari Z, Pacher P, Rischak K, Szollar L, Koller A. Dysfunction of nitric oxide mediation in isolated rat arterioles with methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 ;19:1899-1904.

96. Eberhardt RT, Forgione MA, Cap A, Leopold JA, Rudd MA, Trolliet M, Heydrick S, Stark R, Klings ES, Moldovan NI, Yaghoubi M, Goldschmidt-Clermont PJ, Farber HW, Cohen R, Loscalzo J. Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest.* 2000;106:483-491.

97. Ungvari Z, Csiszar A, Edwards JG, Kaminski PM, Wolin MS, Kaley G, Koller A. Increased superoxide production in coronary arteries in hyperhomocysteinemia: role of tumor necrosis factor- α , NAD(P)H oxidase, and inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:418-424.

98. Dayal S, Arning E, Bottiglieri T, Boger RH, Sigmund CD, Faraci FM, Lentz SR. Cerebral vascular dysfunction

mediated by superoxide in hyperhomocysteinemic mice. *Stroke.* 2004;35:1957-1962.

99. Cleeter MW, Cooper JM, Darley-USmar VM, Moncada S, Schapira AH. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 1994;345:50-54.

100. Loke KE, McConnell PI, Tuzman JM, Shesely EG, Smith CJ, Stackpole CJ, Thompson CI, Kaley G, Wolin MS, Hintze TH. Endogenous endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide is a physiological regulator of myocardial oxygen consumption. *Circ Res.* 1999;84:840-845.

101. Trochu JN, Bouhour JB, Kaley G, Hintze TH. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of cardiac oxygen metabolism: implications in health and disease. *Circ Res.* 2000;87:1108-1117.

102. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;87:840-844.

103. Arimura K, Egashira K, Nakamura R, Ide T, Tsutsui H, Shimokawa H, Takeshita A.. Increased inactivation of nitric oxide is involved in coronary endothelial dysfunction in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:H68-H75.

104. Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D, Dominiczak AF. Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension.* 2001;37:529-534.

105. McCarthy PA, Grieve DJ, Li JM, Dunster C, Kelly FJ, Shah AM. Impaired endothelial regulation of ventricular relaxation in cardiac hypertrophy: role of reactive oxygen species and NADPH oxidase. *Circulation.* 2001;104:2967-2974.

106. Milionis HJ, Winder AF, Mikhailidis DP. Lipoprotein (a) and stroke. *J Clin Pathol.* 2000;53:487-496.

107. Gaw A, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH. Comparative analysis of the apo(a) gene, apo(a) glycoprotein, and plasma concentrations of Lp(a) in three ethnic groups. Evidence for no common "null" allele at the apo(a) locus. *J Clin Invest.* 1994;93:2526-2534.

108. Kraft HG, Lingenhel A, Kochl S, Hoppichler F, Kronenberg F, Abe A, Muhlberger V, Schonitzer D, Utermann G. Apolipoprotein(a) kringle IV repeat number predicts risk for coronary Herat disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:713-719.

109. Lippi G, Guidi G. Lipoprotein(a): from ancestral benefit to modern pathogen? *QJM.* 2000;93:75-84.

110. Pillarisetti S, Paka L, Obunike JC, Berglund L, Goldberg IJ. Subendothelial retention of lipoprotein (a). Evidence that reduced heparan sulfate promotes lipoprotein binding to subendothelial matrix. *J Clin Invest.* 1997;100:867-874.

111. Grainger DJ, Kemp PR, Liu AC, Lawn RM, Metcalfe JC. Activation of transforming growth factor-beta is

- inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice. *Nature*. 1994;370:460-462.
112. Poon M, Zhang X, Dunskey KG, Taubman MB, Harpel PC. Apolipoprotein(a) induces monocyte chemotactic activity in human vascular endothelial cells. *Circulation*. 1997;96:2514.
113. Loscalzo J. Lipoprotein(a). A unique risk factor for atherothrombotic disease. *Arteriosclerosis*. 1990;10:672-679.
114. Danesh J, Collins R, Peto R. Lipoprotein(a) and coronary heart disease. Meta-analysis of prospective studies. *Circulation*. 2000;102:1082-1085.
115. Carlson LA, Hamsten A, Asplund A. Pronounced lowering of serum levels of lipoprotein Lp(a) in hyperlipidaemic subjects treated with nicotinic acid. *J Intern Med*. 1989;226:271-276.
116. Herrick S, Blanc-Brude O, Gray A, Laurent G. Fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31:741-746.
117. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med*. 1992;326:242-250.
118. Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *JAMA*. 1998;279:1477-1482.
119. Di Minno G, Mancini M. Measuring plasma fibrinogen to predict stroke and myocardial infarction. *Arteriosclerosis*. 1990;10:1-7.
120. Fey GH, Fuller GM. Regulation of acute phase gene expression by inflammatory mediators. *Mol Biol Med*. 1987;4:323-338.
121. Maresca G, Di Blasio A, Marchioli R, Di Minno G. Measuring plasma fibrinogen to predict stroke and myocardial infarction: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1368-1377.
122. Tanne D, Benderly M, Goldbourt U, Boyko V, Brunner D, Graff E, Reicher-Reiss H, Shotan A, Mandelzweig L, Behar S; Bezafibrate Infarction Prevention Study Group. A prospective study of plasma fibrinogen levels and the risk of stroke among participants in the bezafibrate infarction prevention study. *Am J Med*. 2001;111:457-463.
123. Folsom AR, Rosamond WD, Shahar E, Cooper LS, Aleksic N, Nieto FJ, Rasmussen ML, Wu KK. Prospective study of markers of hemostatic function with risk of ischemic stroke. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Circulation*. 1999;100:736-742.
124. Wattanakit K, Folsom AR, Selvin E, Weatherley BD, Pankow JS, Brancati FL, Hirsch AT. Risk factors for peripheral arterial disease incidence in persons with diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Atherosclerosis*. 2005;180:389-397.
125. Lee AJ, Fowkes FG, Lowe GD, Connor JM, Rumley A. Fibrinogen, factor VII and PAI-1 genotypes and the risk of coronary and peripheral atherosclerosis: Edinburgh Artery Study. *Thromb Haemost*. 1999;81:553-560.
126. Wilkes HC, Kelleher C, Meade TW. Smoking and plasma fibrinogen. *Lancet*. 1988;1:307-308.
127. Ernst E, Resch KL. Therapeutic interventions to lower plasma fibrinogen concentration. *Eur Heart J*. 1995;16 Suppl A:47-52.
128. Meade T, Zuhrie R, Cook C, Cooper J. Bezafibrate in men with lower extremity arterial disease: randomised controlled trial. *BMJ*. 2002;325:1139.
129. Phillips NR, Waters D, Havel RJ. Plasma lipoproteins and progression of coronary artery disease evaluated by angiography and clinical events. *Circulation*. 1993;88:2762-2770.
130. Tkac I, Kimball BP, Lewis G, Uffelman K, Steiner G. The severity of coronary atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus is related to the number of circulating triglyceride-rich lipoprotein particles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:3633-3638.
131. Schaefer EJ, McNamara JR, Shah PK, Nakajima K, Cupples LA, Ordovas JM, Wilson PW; Framingham Offspring Study. Elevated remnant-like particle cholesterol and triglyceride levels in diabetic men and women in the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care*. 2002;25:989-994.
132. Hodis HN, Mack WJ, Azen SP, Alaupovic P, Pogoda JM, LaBree L, Hemphill LC, Kramsch DM, Blankenhorn DH. Triglyceride- and cholesterol-rich lipoproteins have a differential effect on mild/moderate and severe lesion progression as assessed by quantitative coronary angiography in a controlled trial of lovastatin. *Circulation*. 1994;90:42-49.
133. Imke C, Rodriguez BL, Grove JS, McNamara JR, Waslien C, Katz AR, Willcox B, Yano K, Curb JD. Are remnant-like particles independent predictors of coronary heart disease incidence? The Honolulu Heart study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1718-1722.
134. Pepys MB, Baltz ML. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol*. 1983;34:141-212.
135. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med*. 1997;336:973-979.
136. Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation*. 1998;98:731-733.
137. Du Clos TW. Function of C-reactive protein. *Ann Med*. 2000;32:274-278.
138. Reifenberg K, Lehr HA, Baskal D, Wiese E, Schaefer SC, Black S, Samols D, Torzewski M, Lackner KJ, Husmann M, Blettner M, Bhakdi S. Role of C-reactive protein in atherogenesis: can the

- apolipoprotein E knockout mouse provide the answer? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1641-1646.
139. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet.* 1998;351:88-92.
140. Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM Jr, Boerwinkle E. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation.* 1997;96:4219-4225.
141. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor- α and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation.* 2000;101: 2149-2153.
142. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation.* 2000;101:1767-1772.
143. Meek RL, Eriksen N, Benditt EP. Serum amyloid A in the mouse. Sites of uptake and mRNA expression. *Am J Pathol.* 1989;135:411-419.
144. Meek RL, Eriksen N, Benditt EP. Murine serum amyloid A3 is a high density apolipoprotein and is secreted by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:7949-7952.
145. Uhlir CM, Whitehead AS. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem.* 1999 ;265:501-523.
146. Meek RL, Urieli-Shoval S, Benditt EP. Expression of apolipoprotein serum amyloid A mRNA in human atherosclerotic lesions and cultured vascular cells: implications for serum amyloid A function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:3186-3190.
147. Steel DM, Whitehead AS. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today.* 1994;15:81-88.
148. Malle E, De Beer FC. Human serum amyloid A (SAA) protein: a prominent acute-phase reactant for clinical practice. *Eur J Clin Invest.* 1996;26:427-435.
149. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks FM, Moye LA, Goldman S, Flaker GC, Braunwald E. Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation.* 1998;98:839-844.
150. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 2000;342:836-843.
151. Jousilahti P, Salomaa V, Rasi V, Vahtera E, Palosuo T. The association of c-reactive protein, serum amyloid a and fibrinogen with prevalent coronary heart disease--baseline findings of the PAIS project. *Atherosclerosis.* 2001;156:451-456.
152. Johnson BD, Kip KE, Marroquin OC, Ridker PM, Kelsey SF, Shaw LJ, Pepine CJ, Sharaf B, Bairey Merz CN, Sopko G, Olson MB, Reis SE; National Heart, Lung, and Blood Institute. Serum amyloid A as a predictor of coronary artery disease and cardiovascular outcome in women: the National Heart, Lung, and Blood Institute-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE). *Circulation.* 2004;109:726-732.
153. Leinonen, E., E. Hurt-Camejo, O. Wiklund, L. M. Hulten, A. Hiukka, and M. R. Taskinen. Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2003;166:387-394.
154. Wong, M., L. Toh, A. Wilson, K. Rowley, C. Karschimkus, D. Prior, E. Romas, L. Clemens, G. Dragicevic, H. Harianto, I. Wicks, G. McColl, J. Best, and A. Jenkins.. Reduced arterial elasticity in rheumatoid arthritis and the relationship to vascular disease risk factors and inflammation. *Arthritis Rheum.* 2003; 48:81-89.
155. Jousilahti, P., V. Salomaa, V. Rasi, E. Vahtera, and T. Palosuo. The association of C-reactive protein, serum amyloid A and fibrinogen with prevalent coronary heart disease—baseline findings of the PAIS project. *Atherosclerosis* 2001;156: 451-456.
156. Ebeling, P., A. M. Teppo, H. A. Koistinen, J. Viikari, T. Ronnemaa, M. Nissen, S. Bergkulla, P. Salmela, J. Saltevo, and V. A. Koivisto. Troglitazone reduces hyperglycaemia and selectively acute phase serum proteins in patients with type II diabetes. *Diabetologia* 1999;42: 1433-1438.
157. Leinonen, E. S., A. Hiukka, E. Hurt-Camejo, O. Wiklund, S. S. Sarna, L. Mattson Hulten, J. Westerbacka, R. M. Salonen, J. T. Salonen, and M. R. Taskinen. Low-grade inflammation, endothelial activation and carotid intima-media thickness in type 2 diabetes. *J. Intern. Med.* 2004; 256: 119-127.
158. Haffner, S., R. D'Agostino, M. Saad, D. O'Leary, P. Savage, M. Rewers, J. Selby, R. Bergman, and L. Mykkanen.. Carotid artery atherosclerosis in type 2 diabetic and non-diabetic subjects with and without clinical coronary artery disease. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Am. J. Cardiol.* 2000; 85: 1395-1400.
159. Lewis, K. E., E. A. Kirk, T. O. McDonald, S. Wang, T. N. Wight, K. D. O'Brien, and A. Chait. Increase in serum amyloid A evoked by dietary cholesterol is associated with increased atherosclerosis in mice. *Circulation* 2004; 110: 540-545.
160. Ancsin JB, Kisilevsky R. The heparin/heparan sulfate-binding site on apo-serum amyloid A. Implications for the therapeutic intervention of amyloidosis. *J Biol Chem.* 1999;274:7172-7181.
161. O'Brien KD, McDonald TO, Kunjathoor V, Eng K, Knopp EA, Lewis K, Lopez R, Kirk EA, Chait A, Wight

- TN, deBeer FC, LeBoeuf RC. Serum amyloid A and lipoprotein retention in murine models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:785-790.
162. Migita, K., Y. Kawabe, M. Tominaga, T. Origuchi, T. Aoyagi, and K. Eguchi. 1998. Serum amyloid A protein induces production of matrix metalloproteinases by human synovial fibroblasts. *Lab. Invest.* 78: 535-539.
163. Strissel, K. J., M. T. Girard, J. A. West-Mays, W. B. Rinehart, J. R. Cook, C. E. Brinckerhoff, and M. E. Fini. 1997. Role of serum amyloid A as an intermediate in the IL-1 and PMA-stimulated signaling pathways regulating expression of rabbit fibroblast collagenase. *Exp. Cell Res.* 237: 275-287.
164. Hayat S, Raynes JG. Acute phase serum amyloid A protein increases high density lipoprotein binding to human peripheral blood mononuclear cells and an endothelial cell line. *Scand J Immunol.* 2000;51:141-146.
165. Artl A, Marsche G, Lestavel S, Sattler W, Malle E. Role of serum amyloid A during metabolism of acute-phase HDL by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:763-72.
166. Badolato R, Wang JM, Murphy WJ, Lloyd AR, Michiel DF, Bausserman LL, Kelvin DJ, Oppenheim JJ. Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med.* 1994;180:203-209.
167. Badolato, R., J. M. Wang, W. J. Murphy, A. R. Lloyd, D. F. Michiel, L. L. Bausserman, D. J. Kelvin, and J. J. Oppenheim. Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* 1994;180: 203-209.
168. Xu, L., R. Badolato, W. J. Murphy, D. L. Longo, M. Anver, S. Hale, J. J. Oppenheim, and J. M. Wang. A novel biologic function of serum amyloid A. Induction of T lymphocyte migration and adhesion. *J. Immunol.* 1995;155: 1184-1190.
169. Artl, A., G. Marsche, S. Lestavel, W. Sattler, and E. Malle. Role of serum amyloid A during metabolism of acute-phase HDL by macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000;20: 763-772.
170. Liang, J., B. Schreiber, M. Salmona, G. Phillip, W. Gonnerman, F. de Beer, and J. Sipe. Amino terminal region of acute phase, but not constitutive, serum amyloid A (apoSAA) specifically binds and transports cholesterol into aortic smooth muscle and HepG2 cells. *J. Lipid Res.* 1996;37: 2109-2116.
171. Tam SP, Flexman A, Hulme J, Kisilevsky R. Promoting export of macrophage cholesterol: the physiological role of a major acute-phase protein, serum amyloid A 2.1. *J Lipid Res.* 2002;43(9):1410-1420.
172. Husebekk, A., B. Skogen, and G. Husby. Characterization of amyloid proteins AA and SAA as apolipoproteins of high density lipoprotein (HDL). Displacement of SAA from the HDL-SAA complex by apo AI and apo AII. *Scand. J. Immunol.* 1987;25: 375-381.
173. Cabana, V. G., J. R. Lukens, K. S. Rice, T. J. Hawkins, and G. S. Getz. HDL content and composition in acute phase response in three species: triglyceride enrichment of HDL a factor in its decrease. *J. Lipid Res.* 1996;37: 2662-2674.
174. Costa, L. G., B. E. McDonald, S. D. Murphy, G. S. Omenn, R. J. Richter, A. G. Motulsky, and C. E. Furlong. Serum paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpyrifos-oxon toxicity in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1990;103: 66-76.
175. La Du, B. N. Human serum paraoxonase/arylesterase. In *Pharmacogenetics of Drug Metabolism*. W. Kalow, editor. Pergamon Press, Inc., 1992: 51-91.
176. Bergmeier, C., R. Siekmeier, and W. Gross. Distribution spectrum of paraoxonase activity in HDL fractions. *Clin. Chem.* 2004;50: 2309-2315.
177. Cabana, V. G., C. A. Reardon, N. Feng, S. Neath, J. Lukens, and G. S. Getz. Serum paraoxonase: effect of the apolipoprotein composition of HDL and the acute phase response. *J. Lipid Res.* 2003;44: 780-792.
178. Feingold, K. R., R. A. Memon, A. H. Moser, and C. Grunfeld. Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. *Atherosclerosis.* 1998;139: 307-315.
179. Kumon, Y., Y. Nakauchi, K. Kidawara, M. Fukushima, S. Kobayashi, Y. Ikeda, T. Suehiro, K. Hashimoto, and J. D. Sipe. A longitudinal analysis of alteration in lecithin-cholesterol acyltransferase and paraoxonase activities following laparoscopic cholecystectomy relative to other parameters of HDL function and the acute phase response. *Scand. J. Immunol.* 1998;48: 419-424.
180. Navab, M., S. Hama-Levy, B. J. Van Lenten, G. C. Fonarow, C. J. Cardinez, L. W. Castellani, M. L. Brennan, A. J. Lusis, A. M. Fogelman, and B. N. La Du. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *J. Clin. Invest.* 1997;99: 2005-2019.
181. Shih, D. M., L. Gu, S. Hama, Y. R. Xia, M. Navab, A. M. Fogelman, and A. J. Lusis. Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *J. Clin. Invest.* 1996;97: 1630-1639.
182. Shih, D. M., Y. R. Xia, X. P. Wang, E. Miller, L. W. Castellani, G. Subbanagounder, H. Cheroutre, K. F. Faull, J. A. Berliner, J. L. Witztum, and A. J. Lusis. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* 2000;275: 17527-17535.
183. Rozenberg, O., M. Rosenblat, R. Coleman, D. M. Shih, and M. Aviram. Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress:

studies in PON1-knockout mice. *Free Radic. Biol. Med.* 2003;34: 774–784.

184. Tward, A., Y. R. Xia, X. P. Wang, Y. S. Shi, C. Park, L. W. Castellani, A. J. Lusis, and D. M. Shih..

Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation.* 2002;106: 484–490.

185. Van Lenten, B. J., S. Y. Hama, F. C. de Beer, D. M. Stafforini, T. M. McIntyre, S. M. Prescott, B. N. La Du, A. M. Fogelman, and M. Navab. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J. Clin. Invest.* 1995;96: 2758–2767.

186. Barter, P. J., S. Nicholls, K. A. Rye, G. M. Anantharamaiah, M. Navab, and A. M. Fogelman. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ. Res.* 2004;95: 764–772.

187. Mackness, M. I., S. Arrol, C. Abbott, and P. N. Durrington. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Arteriosclerosis.* 1993;104: 129–135.

188. Mackness, M. I., S. Arrol, and P. N. Durrington. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoproteins. *FEBS Lett.* 1991;286: 152–154.

189. Navab, M., S. Y. Hama, G. P. Hough, C. C. Hedrick, R. Sorenson, B. N. La Du, J. A. Kobashigawa, G. C. Fonarow, J. A. Berliner, H. Laks, and A. M. Fogelman. High density associated enzymes: their role in vascular biology. *Curr. Opin. Lipidol.* 1998;9: 449–456.

190. Navab M, Ananthramaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fonarow GC, Vahabzadeh K, Hama S, Hough G, Kamranpour N, Berliner JA, Lusis AJ, Fogelman AM. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res.* 2004;45:993-1007.

191. Navab M, Ananthramaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Hama S, Hough G, Bachini E, Grijalva VR, Wagner AC, Shaposhnik Z, Fogelman AM. The double jeopardy of HDL. *Ann Med.* 2005;37:173-178.

192. Navab, M., J. A. Berliner, A. D. Watson, S. Y. Hama, M. C. Territo, A. J. Lusis, D. M. Shih, B. J. Van Lenten, J. S. Frank, L. L. Demer, P. A. Edwards, and A. M. Fogelman. The yin and yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler. Thromb.Vasc. Biol.* 1994;16: 831–842.

193. La Du, B. N. Invited editorial. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 1988;43: 227–229.

194. Mackness, M., P. Durrington, and B. Mackness. Paraoxonase 1 activity, concentration and genotype in cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 2004;15: 399–404.

195. Li, H. L., D. P. Liu, and C. C. Liang. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *J. Mol. Med.* 2003;81: 766–779.

195. Olivares R, Ducimetiere P, Claude JR. Monocyte count: a risk factor for coronary heart disease? *Am J Epidemiol.* 1993;137:49-53.

197. Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *JAMA.* 1998;279:1477-1482.

198. Sabatine MS, Morrow DA, Cannon CP, Murphy SA, Demopoulos LA, DiBattiste PM, McCabe CH, Braunwald E, Gibson CM. Relationship between baseline white blood cell count and degree of coronary artery disease and mortality in patients with acute coronary syndromes: a TACTICS-TIMI 18 (Treat Angina with Aggrastat and determine Cost of Therapy with an Invasive or Conservative Strategy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 18 trial)substudy. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40:1761-1768.

199. Zalokar JB, Richard JL, Claude JR. Leukocyte count, smoking, and myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1981;304:465-468.

200. Grimm RH Jr, Neaton JD, Ludwig W. Prognostic importance of the white blood cell count for coronary, cancer, and all-cause mortality. *JAMA.* 1985;254:1932-1937.

201. Phillips AN, Neaton JD, Cook DG, Grimm RH, Shaper AG. Leukocyte count and risk of major coronary heart disease events. *Am J Epidemiol.* 1992;136:59-70.

202. Kannel WB, Anderson K, Wilson PW. White blood cell count and cardiovascular disease. Insights from the Framingham Study. *JAMA.* 1992;267:1253-1256.

203. Gillum RF, Ingram DD, Makuc DM. White blood cell count, coronary heart disease, and death: the NHANES I Epidemiologic Follow-up Study. *Am Heart J.* 1993;125:855-863.

204. Folsom AR, Wu KK, Rosamond WD, Sharrett AR, Chambless LE. Prospective study of hemostatic factors and incidence of coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation.* 1997;96:1102-1108.

205. Lee CD, Folsom AR, Nieto FJ, Chambless LE, Shahar E, Wolfe DA. White blood cell count and incidence of coronary heart disease and ischemic stroke and mortality from cardiovascular disease in African-American and White men and women: atherosclerosis risk in communities study. *Am J Epidemiol.* 2001;154:758-764.

206. Brown DW, Giles WH, Croft JB. White blood cell count: an independent predictor of coronary heart disease mortality among a national cohort. *J Clin Epidemiol.* 2001;54:316-322.

207. Takeda Y, Suzuki S, Fukutomi T, Kondo H, Sugiura M, Suzumura H, Murasaki G, Okutani H, Itoh M. Elevated white blood cell count as a risk factor of coronary artery disease:

inconsistency between forms of the disease. *Jpn Heart J.* 2003;44:201-211.

208. Schlant RC, Forman S, Stamler J, Canner PL. The natural history of coronary heart disease: prognostic factors after recovery from myocardial infarction in 2789 men. The 5-year findings of the coronary drug project. *Circulation.* 1982;66:401-414.

209. Lowe GD, Machado SG, Krol WF, Barton BA, Forbes CD. White blood cell count and haematocrit as predictors of coronary recurrence after myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 1985;54:700-703.

210. Amaro A, Gonzalez-Juanatey JR, Iglesias C, Martinez-Sande L, Trillo R, Garcia-Acuna J, Gil de la Pena M. Leukocyte count as a predictor of the severity of ischaemic heart disease as evaluated by coronary angiography. *Rev Port Cardiol.* 1993;12:913-917.

211. Kostis JB, Turkevich D, Sharp J. Association between leukocyte count and the presence and extent of coronary atherosclerosis as determined by coronary arteriography. *Am J Cardiol.* 1984;53:997-999.

212. Hajj-Ali R, Zareba W, Ezzeddine R, Moss AJ. Relation of the leukocyte count to recurrent cardiac events in stable patients after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2001 ;88:1221-1224.

213. Haines AP, Howarth D, North WR, Goldenberg E, Stirling Y, Meade TW, Raftery EB, Millar Craig MW. Haemostatic variables and the outcome of myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 1983;50:800-803.

214. Furman MI, Becker RC, Yarzebski J, Savegeau J, Gore JM, Goldberg RJ. Effect of elevated leukocyte count on in-hospital mortality following acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1996;78:945-948.

215. Cannon CP, McCabe CH, Wilcox RG, Bentley JH, Braunwald E. Association of white blood cell count with increased mortality in acute myocardial infarction and unstable angina pectoris. OPUS-TIMI 16 Investigators. *Am J Cardiol.* 2001;87:636-639.

216. Barron HV, Harr SD, Radford MJ, Wang Y, Krumholz HM. The association between white blood cell count and acute myocardial infarction mortality in patients > or =65 years of age: findings from the cooperative cardiovascular project. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38:1654-1661.

217. Sabatine MS, Morrow DA, Cannon CP, Murphy SA, Demopoulos LA, DiBattiste PM, McCabe CH, Braunwald E, Gibson CM. Relationship between baseline white blood cell count and degree of coronary artery disease and mortality in patients with acute coronary syndromes: a TACTICS-TIMI 18 (Treat Angina with Aggrastat and determine Cost of Therapy with an Invasive or Conservative Strategy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 18 trial)substudy. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40:1761-1768.

218. Barron HV, Cannon CP, Murphy SA, Braunwald E, Gibson CM. Association between white blood cell count, epicardial blood flow, myocardial perfusion, and clinical outcomes in the setting of acute myocardial

infarction: a thrombolysis in myocardial infarction 10 substudy. *Circulation.* 2000;102:2329-2334.

219. Wanten G, van Emst-De Vries S, Naber T, Willems P. Nutritional lipid emulsions modulate cellular signaling and activation of human neutrophils. *J Lipid Res.* 2001 ;42:428-436.

220. Wanten GJ, Geijtenbeek TB, Raymakers RA, van Kooyk Y, Roos D, Jansen JB, Naber AH. Medium-chain, triglyceride-containing lipid emulsions increase human neutrophil beta2 integrin expression, adhesion, and degranulation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2000;24:228-233.

221. Hiramatsu K, Arimori S. Increased superoxide production by mononuclear cells of patients with hypertriglyceridemia and diabetes. *Diabetes.* 1988;37:832-837.

222. Van Oostrom AJ, Sijmonsma TP, Rabelink TJ, Van Asbeck BS, Cabezas MC. Postprandial leukocyte increase in healthy subjects. *Metabolism.* 2003;52:199-202.

223. van Oostrom AJ, Sijmonsma TP, Verseyden C, Jansen EH, de Koning EJ, Rabelink TJ, Castro Cabezas M. Postprandial recruitment of neutrophils may contribute to endothelial dysfunction. *J Lipid Res.* 2003;44:576-583.

224. Schmidt MI, Duncan BB, Sharrett AR, Lindberg G, Savage PJ, Offenbacher S, Azambuja MI, Tracy RP, Heiss G. Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet.* 1999;353:1649-1652.

225. Eriksson EE, Xie X, Werr J, Thoren P, Lindbom L. Direct viewing of atherosclerosis in vivo: plaque invasion by leukocytes is initiated by the endothelial selectins. *FASEB J.* 2001;15:1149-1157.

226. Mazzone A, De Servi S, Ricevuti G, Mazzucchelli I, Fossati G, Pasotti D, Bramucci E, Angoli L, Marsico F, Specchia G. Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules in instable coronary artery disease. *Circulation.* 1993;88:358-363.

227. Berliner S, Rogowski O, Rotstein R, Fusman R, Shapira I, Bornstein NM, Prochorov V, Roth A, Keren G, Eldor A, Zeltser D. Activated polymorphonuclear leukocytes and monocytes in the peripheral blood of patients with ischemic heart and brain conditions correspond to the presence of multiple risk factors for atherothrombosis. *Cardiology.* 2000;94:19-25.

228. Ott I, Neumann FJ, Gawaz M, Schmitt M, Schomig A. Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation.* 1996;94:1239-1246.

229. Sarma J, Laan CA, Alam S, Jha A, Fox KA, Dransfield I. Increased platelet binding to circulating monocytes in acute coronary syndromes. *Circulation.* 2002;105:2166-2171.

230. Pellizzon GG, Dixon SR, Stone GW, Cox DA, Mattos L, Boura JA, Grines LL, Addala S, O'Neill WW, Grines CL; Stent PAMI Investigators. Relation of admission white blood cell count to long-term

outcomes after primary coronary angioplasty for acute myocardial infarction (The Stent PAMI Trial). *Am J Cardiol.* 2003;91:729-731.

231. Siminiak T, Flores NA, Sheridan DJ. Neutrophil interactions with endothelium and platelets: possible role in the development of cardiovascular injury. *Eur Heart J.* 1995;16:160-170.
232. Vlaicu R, Rus HG, Niculescu F, Cristea A. Protein distribution across the human atherosclerotic wall with reference to immunoglobulins and complement components. *Med Interne.* 1985;23:87-94.
233. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Complement components, but not complement inhibitors, are upregulated in atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1214-1219.
234. Vlaicu R, Niculescu F, Rus HG, Cristea A. Immunohistochemical localization of the terminal C5b-9 complement complex in human aortic fibrous plaque. *Atherosclerosis.* 1985;57:163-177.
235. Niculescu F, Hugo F, Rus HG, Vlaicu R, Bhakdi S. Quantitative evaluation of the terminal C5b-9 complement complex by ELISA in human atherosclerotic arteries. *Clin Exp Immunol.* 1987;69:477-483.
236. Rus HG, Niculescu F, Constantinescu E, Cristea A, Vlaicu R. Immunoelectron-microscopic localization of the terminal C5b-9 complement complex in human atherosclerotic fibrous plaque. *Atherosclerosis.* 1986;61:35-42.
237. Rus HG, Niculescu F, Porutiu D, Ghiurca V, Vlaicu R. Cells carrying C5b-9 complement complexes in human atherosclerotic wall. *Immunol Lett.* 1989;20:305-310.
238. Torzewski M, Klouche M, Hock J, Messner M, Dorweiler B, Torzewski J, Gabbert HE, Bhakdi S. Immunohistochemical demonstration of enzymatically modified human LDL and its colocalization with the terminal complement complex in the early atherosclerotic lesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:369-378.
239. Seifert PS, Roth I, Schmiedt W, Oelert H, Okada N, Okada H, Bhakdi S. CD59 (homologous restriction factor 20), a plasma membrane protein that protects against complement C5b-9 attack, in human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis.* 1992;96:135-145.
240. Torzewski J, Torzewski M, Bowyer DE, Frohlich M, Koenig W, Waltenberger J, Fitzsimmons C, Hombach V. C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1386-1392.
241. Bhakdi S, Torzewski M, Klouche M, Hemmes M. Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2348-2354.

242. Chang MK, Binder CJ, Torzewski M, Witztum JL. C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:13043-13048.
243. Wieland E, Dorweiler B, Bonitz U, Lieser S, Walev I, Bhakdi S. Complement activation by oxidatively modified low-density lipoproteins. *Eur J Clin Invest.* 1999;29:835-841.
244. Seifert PS, Hugo F, Trantum-Jensen J, Zahringer U, Muhly M, Bhakdi S. Isolation and characterization of a complement-activating lipid extracted from human atherosclerotic lesions. *J Exp Med.* 1990;172:547-557.
245. Bhakdi S, Dorweiler B, Kirchmann R, Torzewski J, Weise E, Trantum-Jensen J, Walev I, Wieland E. On the pathogenesis of atherosclerosis: enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety. *J Exp Med.* 1995;182:1959-1971.
246. Seifert PS, Kazatchkine MD. Generation of complement anaphylatoxins and C5b-9 by crystalline cholesterol oxidation derivatives depends on hydroxyl group number and position. *Mol Immunol.* 1987;24:1303-1308.
247. Pinckard RN, Olson MS, Giclas PC, Terry R, Boyer JT, O'Rourke RA. Consumption of classical complement components by heart subcellular membranes in vitro and in patients after acute myocardial infarction. *J Clin Invest.* 1975;56:740-750.
248. Megran DW, Stiver HG, Bowie WR. Complement activation and stimulation of chemotaxis by *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* 1985;49:670-673.
249. Campbell LA, Kuo CC. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *Semin Respir Infect.* 2003;18:48-54.
250. Geertinger P, Sorensen H. Complement as a factor in arteriosclerosis. *Acta Pathol Microbiol Scand [A].* 1970;78:284-288.
251. Schmiedt W, Kinscherf R, Deigner HP, Kamencic H, Nauen O, Kilo J, Oelert H, Metz J, Bhakdi S. Complement C6 deficiency protects against diet-induced atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1790-1795.
252. Patel S, Thelander EM, Hernandez M, Montenegro J, Hassing H, Burton C, Mundt S, Hermanowski-Vosatka A, Wright SD, Chao YS, Detmers PA. ApoE(-/-) mice develop atherosclerosis in the absence of complement component C5. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;286:164-170.
253. Buono C, Come CE, Witztum JL, Maguire GF, Connelly PW, Carroll M, Lichtman AH. Influence of C3 deficiency on atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105:3025-3031.
254. Persson L, Boren J, Robertson AK, Wallenius V, Hansson GK, Pekna M. Lack of complement factor C3, but not factor B, increases hyperlipidemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-/- low-density lipoprotein receptor-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 ;24:1062-1067.

255. Ghebrehewet B, Lim BL, Kumar R, Feng X, Peerschke EI. gC1q-R/p33, a member of a new class of multifunctional and multicompartmental cellular proteins, is involved in inflammation and infection. *Immunol Rev.* 2001;180:65-77.
256. Peerschke EI, Minta JO, Zhou SZ, Bini A, Gotlieb A, Colman RW, Ghebrehewet B. Expression of gC1q-R/p33 and its major ligands in human atherosclerotic lesions. *Mol Immunol.* 2004;41:759-766.
257. Libby, P., D. Egan, and S. Skarlatos. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation* 1997;96: 4095-4103.
258. Epstein, S. E., Y. F. Zhou, and J. Zhu. Infection and atherosclerosis: emerging mechanistic paradigms. *Circulation* 1999;100: e20-e28.
259. Becker, A. E., O. J. de Boer, and A. C. van Der Wal. The role of inflammation and infection in coronary artery disease. *Annu.Rev. Med* 2001;52: 289-297.
260. Leinonen, M., and P. Saikku. Evidence for infectious agents in cardiovascular disease and atherosclerosis. *Lancet Infect. Dis* 2002;2:11-17.
261. Mendall, M. A., P. M. Goggin, N. Molineaux, J. Levy, T. Toosy, D. Strachan, A. J. Camm, and T. C. Northfield. Relation of *Helicobacter pylori* infection and coronary heart disease. *Br.Heart J* 1994;71: 437-439.
262. DeStefano, F., R. F. Anda, H. S. Kahn, D. F. Williamson, and C. M. Russell. Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality. *BMJ* 1993;306:688-691.
263. Jousilahti, P., E. Vartiainen, J. Tuomilehto, and P. Puska. Symptoms of chronic bronchitis and the risk of coronary disease. *Lancet* 1996;348: 567-572.
264. Kiechl, S., G. Egger, M. Mayr, C. J. Wiedermann, E. Bonora, F. Oberhollenzer, M. Muggeo, Q. Xu, G. Wick, W. Poewe, and J. Willeit. Chronic interactions and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from a large population study. *Circulation* 2001;103: 1064-1070.
265. Monson, R. R., and A. P. Hall. Mortality among arthritics. *J. Chronic Dis* 1976;29: 459-467.
266. McDonald, C. J., and P. Calabresi. Psoriasis and occlusive vascular disease. *Br. J. Dermatol.* 1978;99:469-475.
267. Asanuma, Y., A. Oeser, A. K. Shintani, E. Turner, N. Olsen, S. Fazio, M. F. Linton, P. Raggi, and C. M. Stein. Premature coronary-artery atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 2003;349: 2407-2415.
268. Roman, M. J., B. A. Shanker, A. Davis, M. D. Lockshin, L. Sammaritano, R. Simantov, M. K. Crow, J. E. Schwartz, S. A. Paget, R. B. Devereux, and J. E. Salmon. Prevalence and correlates of accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349: 2399-2406.
269. Pickup, J. C., and M. A. Crook. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia.* 1998;41:1241-1248.
270. Pradhan, A. D., and P. M. Ridker. Do atherosclerosis and type 2 diabetes share a common inflammatory basis? *Eur. Heart J.* 2002;23: 831-834.
271. Huerta, M. G., and J. L. Nadler. Role of inflammatory pathways in the development and cardiovascular complications of type 2 diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 2002; 2: 396-402.
272. Grimble, R. F. Inflammatory status and insulin resistance. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2002;5: 551-559.
273. Yudkin, J. S., M. Kumari, S. E. Humphries, and V. Mohamed-Ali. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis.* 2000;148: 209-247.
274. Khovidhunkit, W., R. A. Memon, K. R. Feingold, and C. Grunfeld. Infection and inflammation-induced proatherogenic changes of lipoproteins. *J. Infect. Dis.* 2000;181 (Suppl. 3): 462-472.
275. Gianturco, S. H., M. P. Ramprasad, R. Song, R. Li, M. L. Brown, and W. A. Bradley. Apolipoprotein B-48 or its apolipoprotein B-100 equivalent mediates the binding of triglyceride-rich lipoproteins to their unique human monocyte-macrophage receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998;18: 968-976.
276. Feingold, K. R., R. M. Krauss, M. Pang, W. Doerrler, P. Jensen, and C. Grunfeld. The hypertriglyceridemia of acquired immunodeficiency syndrome is associated with an increased prevalence of low density lipoprotein subclass pattern B. *J. Clin. Endocrinol.Metab.* 1993; 76: 1423-1427.
277. Nigon, F., P. Lesnik, M. Rouis, and M. J. Chapman. Discrete subspecies of human low density lipoproteins are heterogeneous in their interaction with the cellular LDL receptor. *J. Lipid Res.* 1991;32: 1741-1753.
278. Hurt-Camejo, E., G. Camejo, B. Rosengren, F. Lopez, O. Wiklund, and G. Bondjers. Differential uptake of proteoglycan-selected subfractions of low density lipoprotein by human macrophages. *J. Lipid Res.* 1990;31: 1387-1398.
279. Chait, A., R. L. Brazg, D. L. Tribble, and R. M. Krauss. Susceptibility of small, dense, low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B. *Am. J. Med.* 1993;94: 350-356.
280. Memon, R. A., I. Staprans, M. Noor, W. M. Holleran, Y. Uchida, A. H. Moser, K. R. Feingold, and C. Grunfeld. Infection and inflammation induce LDL oxidation in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000;20: 1536-1542.
281. Chang, M. K., C. J. Binder, M. Torzewski, and J. L. Witztum. C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002;99:13043-13048.
282. Pruzanski, W., P. Vadas, and J. Browning. Secretory nonpancreatic group II phospholipase A2:

role in physiologic and inflammatory processes. *J. Lipid Mediat.* 1993;8: 161–167.

283. Ivandic, B., L. W. Castellani, X. P. Wang, J. H. Qiao, M. Mehrabian, M. Navab, A. M. Fogelman, D. S. Grass, M. E. Swanson, M. C. de Beer, F. de Beer, and A. J. Lusis. Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis: 1. Increased atherogenesis and altered lipoproteins in transgenic mice expressing group IIa phospholipase A2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999;19: 1284–1290.
284. Feingold, K. R., I. Hardardottir, R. Memon, E. J. Krul, A. H. Moser, J. M. Taylor, and C. Grunfeld. Effect of endotoxin on cholesterol biosynthesis and distribution in serum lipoproteins in Syrian hamsters. *J. Lipid Res.* 1993;34: 2147–2158.
285. Memon, R. A., W. M. Holleran, A. H. Moser, T. Seki, Y. Uchida, J. Fuller, J. K. Shigenaga, C. Grunfeld, and K. R. Feingold. Endotoxin and cytokines increase hepatic sphingolipid biosynthesis and produce lipoproteins enriched in ceramides and sphingomyelin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998;18: 1257–1265.
286. Jeong, T., S. L. Schissel, I. Tabas, H. J. Pownall, A. R. Tall, and X. Jiang. Increased sphingomyelin content of plasma lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice reflects combined production and catabolic defects and enhances reactivity with mammalian sphingomyelinase. *J. Clin. Invest.* 1998;101: 905–912.
287. Jiang, X. C., F. Paultre, T. A. Pearson, R. G. Reed, C. K. Francis, M. Lin, L. Berglund, and A. R. Tall. Plasma sphingomyelin level as a risk factor for coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000;20: 2614–2618.
288. Artl, A., G. Marsche, S. Lestavel, W. Sattler, and E. Malle. Role of serum amyloid A during metabolism of acute-phase HDL by macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000;20: 763–772.
289. Pussinen, P. J., M. Jauhiainen, T. Vilkkunen-Rautiainen, J. Sundvall, M. Vesanen, K. Mattila, T. Palosuo, G. Alfthan, and S. Asikainen. Periodontitis decreases the antiatherogenic potency of high density lipoprotein. *J. Lipid Res.* 2004;45: 139–147.
290. Artl, A., G. Marsche, P. Pussinen, G. Knipping, W. Sattler, and E. Malle. Impaired capacity of acute-phase high density lipoprotein particles to deliver cholesteryl ester to the human HUH-7 hepatoma cell line. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2002;34: 370–381.
291. Hakala, J. K., K. Oorni, M. O. Pentikainen, E. Hurt-Camejo, and P. T. Kovanen. Lipolysis of LDL by human secretory phospholipase A(2) induces particle fusion and enhances the retention of LDL to human aortic proteoglycans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 21: 1053–1058.
292. Ivandic, B., L. W. Castellani, X. P. Wang, J. H. Qiao, M. Mehrabian, M. Navab, A. M. Fogelman, D. S. Grass, M. E. Swanson, M. C. de Beer, F. de Beer, and A. J. Lusis. Role of group II secretory phospholipase A2

in atherosclerosis: 1. Increased atherogenesis and altered lipoproteins in transgenic mice expressing group IIa phospholipase A2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999; 19: 1284–1290.

293. Oiknine, J., and M. Aviram. Increased susceptibility to activation and increased uptake of low density lipoprotein by cholesterol-loaded macrophages. *Arterioscler. Thromb.* 1992;12: 745–753.
294. Funk, J. L., K. R. Feingold, A. H. Moser, and C. Grunfeld. Lipopolysaccharide stimulation of RAW 264.7 macrophages induces lipid accumulation and foam cell formation. *Atherosclerosis.* 1993;98: 67–82.
295. Ruan, X. Z., Z. Varghese, S. H. Powis, and J. F. Moorhead. Dysregulation of LDL receptor under the influence of inflammatory cytokines: a new pathway for foam cell formation. *Kidney Int.* 2001;60: 1716–1725.
296. Kalayoglu, M. V., and G. I. Byrne. A Chlamydia pneumoniae component that induces macrophage foam cell formation is chlamydial lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 1998;66: 5067–5072.
297. Bannerman DD, Goldblum SE. Direct effects of endotoxin on the endothelium: barrier function and injury. *Lab Invest.* 1999;79:1181-1199.
298. Manzi S, Meilahn EN, Rairie JE, Conte CG, Medsger TA Jr, Jansen-McWilliams L, D'Agostino RB, Kuller LH. Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham Study. *Am J Epidemiol.* 1997;145:408-15.
299. Manzi S, Selzer F, Sutton-Tyrrell K, Fitzgerald SG, Rairie JE, Tracy RP, Kuller LH. Prevalence and risk factors of carotid plaque in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1999;42:51-60.
300. Petri M, Perez-Gutthann S, Spence D, Hochberg MC. Risk factors for coronary artery disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Med.* 1992;93:513-519.
301. Sturfelt G, Eskilsson J, Nived O, Truedsson L, Valind S. Cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. A study of 75 patients from a defined population. *Medicine* 1992;71:216-223.
302. Van Doornum S, McColl G, Wicks IP. Accelerated atherosclerosis: an extraarticular feature of rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum.* 2002;46:862-873.
303. del Rincon ID, Williams K, Stern MP, Freeman GL, Escalante A. High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis Rheum.* 2001;44:2737-2745.
304. Pasceri V, Yeh ET. A tale of two diseases: atherosclerosis and rheumatoid arthritis. *Circulation.* 1999;100:2124-2126.
305. Del Rincon I, Williams K, Stern MP, Freeman GL, O'Leary DH, Escalante A. Association between carotid atherosclerosis and markers of inflammation in rheumatoid arthritis patients and healthy subjects. *Arthritis Rheum.* 2003;48:1833-1840.

306. Nagata-Sakurai M, Inaba M, Goto H, Kumeda Y, Furumitsu Y, Inui K, Koyama H, Emoto M, Ishimura E, Shoji T, Nishizawa Y. Inflammation and bone resorption as independent factors of accelerated arterial wall thickening in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48:3061-3067.
307. Koshiyama H, Nakamura Y, Tanaka S, Minamikawa J. Decrease in carotid intima-media thickness after 1-year therapy with etidronate for osteopenia associated with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:2793-2796.
308. Gonzalez-Escribano MF, Torres B, Aguilar F, Rodriguez R, Garcia A, Valenzuela A, Nunez-Roldan A. MCP-1 promoter polymorphism in Spanish patients with rheumatoid arthritis. *Hum Immunol.* 2003 Jul;64(7):741-4.
309. Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, Johnson B, Evanoff HL, Haines GK, Burdick MD, Pope RM, Strieter RM. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 1992;90:772-779.
310. Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, Mazarakis DD, Haines GK, Burdick MD, Pope RM, Strieter RM. Macrophage inflammatory protein-1 alpha. A novel chemotactic cytokine for macrophages in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 1994;93:921-928.
311. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Pineiro A, Garcia-Porrúa C, Testa A, Llorca J. High-grade C-reactive protein elevation correlates with accelerated atherogenesis in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2005;32:1219-1223.
312. Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet.* 1997;350:430-436.
313. Zhou YF, Leon MB, Waclawiw MA, Popma JJ, Yu ZX, Finkel T, Epstein SE. Association between prior cytomegalovirus infection and the risk of restenosis after coronary atherectomy. *N Engl J Med.* 1996;335:624-630.
314. Speir E, Modali R, Huang ES, Leon MB, Shawl F, Finkel T, Epstein SE. Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science.* 1994;265:391-394.
315. Nieto FJ, Adam E, Sorlie P, Farzadegan H, Melnick JL, Comstock GW, Szklo M. Cohort study of cytomegalovirus infection as a risk factor for carotid intimal-medial thickening, a measure of subclinical atherosclerosis. *Circulation.* 1996;94: 922-927.
316. Zhu J, Quyyumi AA, Norman JE, Costello R, Csako G, Epstein SE. The possible role of hepatitis A virus in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Infect Dis.* 2000;182:1583-1587.
317. Muhlestein JB, Hammond EH, Carlquist JF, Radicke E, Thomson MJ, Karagounis LA, Woods ML, Anderson JL. Increased incidence of Chlamydia species within the coronary arteries of patients with symptomatic atherosclerotic versus other forms of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 1996;27:1555-1561.
318. Pasceri V, Cammarota G, Patti G, Cuoco L, Gasbarrini A, Grillo RL, Fedeli G, Gasbarrini G, Maseri A. Association of virulent *Helicobacter pylori* strains with ischemic heart disease. *Circulation.* 1998;97:1675-1679.
319. Seinost G, Wimmer G, Skerget M, Thaller E, Brodmann M, Gasser R, Bratschko RO, Pilger E. Periodontal treatment improves endothelial dysfunction in patients with severe periodontitis. *Am Heart J.* 2005;149:1050-1054.
320. Maggi P, Serio G, Epifani G, Fiorentino G, Saracino A, Fico C, Perilli F, Lillo A, Ferraro S, Gargiulo M, Chirianni A, Angarano G, Regina G, Pastore G. Premature lesions of the carotid vessels in HIV-1-infected patients treated with protease inhibitors. *AIDS.* 2000;14:F123-F128.
321. Depairon M, Chessex S, Sudre P, et al. Premature atherosclerosis in HIV-infected individuals: focus on protease inhibitor therapy. *AIDS.* 2001; 15: 329-334.
322. Friis-Møller N, Weber R, Reiss P, et al. Cardiovascular disease risk factors in HIV patients — association with antiretroviral therapy: results from the DAD study. *AIDS.* 2003; 17: 1179-1193.
323. Hadigan C, Meigs JB, Corcoran C, et al. Metabolic abnormalities and cardiovascular disease risk factors in adults with human immunodeficiency virus infection and lipodystrophy. *Clin Infect Dis.* 2001; 32: 130-139.
324. Nolan D, Watts GF, Herrmann SE, French MA, John M, Mallat S. Endothelial function in HIV-infected patients receiving protease inhibitor therapy: does immune competence affect cardiovascular risk? *QJM.* 2003;96:825-832.
325. Carrillo-Jimenez R, Lamas GA, Hennekens CH. Thiazolidinediones could improve endothelial dysfunction and risk of premature coronary heart disease in HIV-infected patients. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2002;7:207-210.
326. 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.* 2001;104:257-262.
327. Bonnet D, Aggoun Y, Szezepanski I, Bellal N, Blanche S. Arterial stiffness and endothelial dysfunction in HIV-infected children. *AIDS.* 2004;18:1037-1041.
328. Matzen K, Dirx AE, oude Egbrink MG, Speth C, Gotte M, Ascherl G, Grimm T, Griffioen AW, Sturzl M. HIV-1 Tat increases the adhesion of monocytes and T-cells to the endothelium in vitro and in vivo: implications for AIDS-associated vasculopathy. *Virus Res.* 2004;104:145-155.
329. Meroni L, Riva A, Morelli P, Galazzi M, Mologni D, Adorni F, Galli M. Increased CD36 expression on circulating monocytes during HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005;38:310-313.

330. Alonso-Villaverde C, Coll B, Parra S, Montero M, Calvo N, Tous M, Joven J, Masana L. Atherosclerosis in patients infected with HIV is influenced by a mutant monocyte chemoattractant protein-1 allele. *Circulation*. 2004;110:2204-2209.
331. Pendino GM, Mariano A, Surace P, Caserta CA, Fiorillo MT, Amante A, Bruno S, Mangano C, Polito I, Amato F, Cotichini R, Stroffolini T, Mele A; ACE Collaborating Group. Prevalence and etiology of altered liver tests: a population-based survey in a Mediterranean town. *Hepatology*. 2005;41:1151-9.
332. Friis-Liby I, Aldenborg F, Jerlstad P, Rundstrom K, Bjornsson E. High prevalence of metabolic complications in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Scand J Gastroenterol*. 2004;39:864-9.
333. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in children. *Front Biosci*. 2005;10:2306-18.
- Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*. 1999;116:1413-1419.
334. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology*. 1994;107:1103-1109.
- Roberts EA. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in children. *Front Biosci*. 2005 ;10:2306-2318.
335. Day, C P, James, O F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114,842-884
336. Tous M, Ferre N, Camps J, Riu F, Joven J. Feeding apolipoprotein E-knockout mice with cholesterol and fat enriched diets may be a model of non-alcoholic steatohepatitis. *Mol Cell Biochem*. 2005;268:53-58.
337. Volzke H, Robinson DM, Kleine V, Deutscher R, Hoffmann W, Ludemann J, Schminke U, Kessler C, John U. Hepatic steatosis is associated with an increased risk of carotid atherosclerosis. *World J Gastroenterol*. 2005;11:1848-1853.
338. Brea A, Mosquera D, Martin E, Arizti A, Cordero JL, Ros E. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with carotid atherosclerosis: a case-control study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1045-1050.
339. Liao F, Andalibi A, Qiao JH, Allayee H, Fogelman AM, Lusis AJ. Genetic evidence for a common pathway mediating oxidative stress, inflammatory gene induction, and aortic fatty streak formation in mice. *J Clin Invest*. 1994;94:877-884.
340. Weber C, Erl W, Pietsch A, Weber PC. Aspirin inhibits nuclear factor-kappa B mobilization and monocyte adhesion in stimulated human endothelial cells. *Circulation*. 1995;91:1914-1917.
341. Brooks G, Yu XM, Wang Y, Crabbe MJ, Shattock MJ, Harper JV. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) inhibit vascular smooth muscle cell proliferation via differential effects on the cell cycle. *J Pharm Pharmacol*. 2003 ;55:519-526.
342. Steer KA, Wallace TM, Bolton CH, Hartog M. Aspirin protects low density lipoprotein from oxidative modification. *Heart*. 1997;77:333-337.
343. Paul A, Calleja L, Camps J, Osada J, Vilella E, Ferre N, Mayayo E, Joven J. The continuous administration of aspirin attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Life Sci*. 2000;68:457-465.
344. Cyrus T, Sung S, Zhao L, Funk CD, Tang S, Pratico D. Effect of low-dose aspirin on vascular inflammation, plaque stability, and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 2002;106:1282-1287.
345. Pratico D, Tillmann C, Zhang ZB, Li H, FitzGerald GA. Acceleration of atherogenesis by COX-1-dependent prostanoid formation in low density lipoprotein receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:3358-3363.
346. Reis ED, Roque M, Dansky H, Fallon JT, Badimon JJ, Cordon-Cardo C, Shiff SJ, Fisher EA. Sulindac inhibits neointimal formation after arterial injury in wild-type and apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:12764-12769.
347. Cayatte AJ, Du Y, Oliver-Krasinski J, Lavielle G, Verbeuren TJ, Cohen RA. The thromboxane receptor antagonist S18886 but not aspirin inhibits atherogenesis in apo E-deficient mice: evidence that eicosanoids other than thromboxane contribute to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 ;20:1724-1728.
348. Makheja AN, Bloom S, Muesing R, Simon T, Bailey JM. Anti-inflammatory drugs in experimental atherosclerosis. 7. Spontaneous atherosclerosis in WHHL rabbits and inhibition by cortisone acetate. *Atherosclerosis*. 1989;76:155-161.
349. Asai K, Funaki C, Hayashi T, Yamada K, Naito M, Kuzuya M, Yoshida F, Yoshimine N, Kuzuya F. Dexamethasone-induced suppression of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. Possible mechanisms. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:892-899.
350. Faggitotto A, Ross R, Harker L. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis*. 1984;4:323-340.
351. Faggitotto A, Ross R. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis*. 1984;4:341-356.
352. Rosenfeld ME, Tsukada T, Chait A, Bierman EL, Gown AM, Ross R. Fatty streak expansion and maturation in Watanabe Heritable Hyperlipemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis*. 1987;7:24-34.
353. Rosenfeld ME, Tsukada T, Gown AM, Ross R. Fatty streak initiation in Watanabe Heritable Hyperlipemic and comparable hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis*. 1987;7:9-23.

354. Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis*. 1987;68:231-240.
355. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:133-140.
356. Plump AS, Breslow JL. Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse. *Annu Rev Nutr*. 1995;15:495-518.
357. Smith JD, Breslow JL. The emergence of mouse models of atherosclerosis and their relevance to clinical research. *J Intern Med*. 1997;242:99-109.
358. Smith JD. Mouse models of atherosclerosis. *Lab Anim Sci*. 1998;48:573-579.
359. Roberts A, Thompson JS. Inbred mice and their hybrids as an animal model for atherosclerosis research. *Adv Exp Med Biol*. 1976;67:313-327.
360. Paigen B, Morrow A, Brandon C, Mitchell D, Holmes P. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis*. 1985;57:65-73.
361. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*. 1988;240: 622-630.
362. Zannis VI, Breslow JL, Utermann G, Mahley RW, Weisgraber KH, Havel RJ, Goldstein JL, Brown MS, Schonfeld G, Hazzard WR, Blum C. Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. *J Lipid Res*. 1982;23:911-914.
363. Rall SC Jr, Mahley RW. The role of apolipoprotein E genetic variants in lipoprotein disorders. *J Intern Med*. 1992;231:653-659.
364. van den Maagdenberg AM, de Knijff P, Stalenhoef AF, Gevers Leuven JA, Havekes LM, Frants RR. Apolipoprotein E*3-Leiden allele results from a partial gene duplication in exon 4. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;165:851-857.
365. Wardell MR, Weisgraber KH, Havekes LM, Rall SC Jr. Apolipoprotein E3-Leiden contains a seven-amino acid insertion that is a tandem repeat of residues 121-127. *J Biol Chem*. 1989;264:21205-21210.
366. de Knijff P, van den Maagdenberg AM, Stalenhoef AF, Leuven JA, Demacker PN, Kuyt LP, Frants RR, Havekes LM. Familial dysbetalipoproteinemia associated with apolipoprotein E3-Leiden in an extended multigeneration pedigree. *J Clin Invest*. 1991; 2:643-655.
367. van Vlijmen BJ, van den Maagdenberg AM, Gijbels MJ, van der Boom H, HogenEsch H, Frants RR, Hofker MH, Havekes LM. Diet-induced hyperlipoproteinemia and atherosclerosis in apolipoprotein E3-Leiden transgenic mice. *J Clin Invest*. 1994 ;93:1403-1410.
368. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*. 1992;258:468-471.
369. Zhang SH, Reddick RL, Burkey B, Maeda N. Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption. *J Clin Invest*. 1994 ;94:937-945.
370. Reddick RL, Zhang SH, Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesion development and progression. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:141-147.
371. Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *PNAS* 1994;91:4431-4435.
372. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. 1992;71:343-353.
373. Tamminen M, Mottino G, Qiao JH, Breslow JL, Frank JS. Ultrastructure of early lipid accumulation in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:847-853.
374. Ishibashi S, Goldstein JL, Brown MS, Herz J, Burns DK. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest*. 1994;93:1885-1893.
375. Palinski W, Tangirala RK, Miller E, Young SG, Witztum JL. Increased autoantibody titers against epitopes of oxidized LDL in LDL receptor-deficient mice with increased atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:1569-1576.
376. Tangirala RK, Rubin EM, Palinski W. Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res*. 1995;36:2320-2328.
377. Walsh A, Ito Y, Breslow JL. High levels of human apolipoprotein A-I in transgenic mice result in increased plasma levels of small high density lipoprotein (HDL) particles comparable to human HDL3. *J Biol Chem*. 1989;264:6488-6494.
378. Walsh A, Azrolan N, Wang K, Marcigliano A, O'Connell A, Breslow JL. Intestinal expression of the human apoA-I gene in transgenic mice is controlled by a DNA region 3' to the gene in the promoter of the adjacent convergently transcribed apoC-III gene. *J Lipid Res*. 1993;34:617-623.
379. Rubin EM, Ishida BY, Clift SM, Krauss RM. Expression of human apolipoprotein A-I in transgenic mice results in reduced plasma levels of murine apolipoprotein A-I and the appearance of two new high density lipoprotein size subclasses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:434-438.
380. Rinninger F, Kaiser T, Windler E, Greten H, Fruchart JC, Castro G. Selective uptake of cholesteryl esters from high-density lipoprotein-derived LpA-I and

- LpA-I:A-II particles by hepatic cells in culture. *Biochim Biophys Acta*. 1998 ;1393:277-291.
381. Vadiveloo PK, Fidge NH. The role of apoproteins AI and AII in binding of high-density lipoprotein3 to membranes derived from bovine aortic endothelial cells. *Biochem J*. 1992;284:145-151.
382. Boden WE. High-density lipoprotein cholesterol as an independent risk factor in cardiovascular disease: assessing the data from Framingham to the Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial. *Am J Cardiol*. 2000;86:19L-22L.
383. Duverger N, Kruth H, Emmanuel F, Caillaud JM, Viglietta C, Castro G, Tailleux A, Fievet C, Fruchart JC, Houdebine LM, Deneffe P. Inhibition of atherosclerosis development in cholesterol-fed human apolipoprotein A-I-transgenic rabbits. *Circulation*. 1996;94:713-717.
384. Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, Verstuyft JG, Clift SM. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature*. 1991;353:265-267.
385. Plump AS, Scott CJ, Breslow JL. Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *PNAS*. 1994;91:9607-9611.
386. Paszty C, Maeda N, Verstuyft J, Rubin EM. Apolipoprotein AI transgene corrects apolipoprotein E deficiency-induced atherosclerosis in mice. *J Clin Invest*. 1994;94:899-903.
387. Linton MF, Farese RV Jr, Chiesa G, Grass DS, Chin P, Hammer RE, Hobbs HH, Young SG. Transgenic mice expressing high plasma concentrations of human apolipoprotein B100 and lipoprotein(a). *J Clin Invest*. 1993;92:3029-3037.
388. Callow MJ, Stoltzfus LJ, Lawn RM, Rubin EM. Expression of human apolipoprotein B and assembly of lipoprotein(a) in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 15;9::2130-2134.
389. Purcell-Huynh DA, Farese RV Jr, Johnson DF, Flynn LM, Pierotti V, Newland DL, Linton MF, Sanan DA, Young SG. Transgenic mice expressing high levels of human apolipoprotein B develop severe atherosclerotic lesions in response to a high-fat diet. *J Clin Invest*. 1995 ;95:2246-2257.
390. Voyiakiakis E, Goldberg IJ, Plump AS, Rubin EM, Breslow JL, Huang LS. ApoA-I deficiency causes both hypertriglyceridemia and increased atherosclerosis in human apoB transgenic mice. *J Lipid Res*. 1998;39:313-321.
391. Chen Z, Fitzgerald RL, Aversa MR, Schonfeld G. A targeted apolipoprotein B-38.9-producing mutation causes fatty livers in mice due to the reduced ability of apolipoprotein B-38.9 to transport triglycerides. *J Biol Chem*. 2000;275:32807-32815.
392. Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4431-4435.
393. Bonthu S, Heistad DD, Chappell DA, Lamping KG, Faraci FM. Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium - dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2333-2340
394. Witting PK, Pettersson K, Ostlund-Lindqvist AM, Westerlund C, Eriksson AW, Stocker R. 88. Inhibition by a coantioxidant of aortic lipoprotein lipid peroxydation and atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor gene double knockout mice. *FASEB J* 1999; 13: 667-675.
395. Meiner VL, Cases S, Myers HM, Sande ER, Bellosta S, Schambelan M, Pitas RE, McGuire J, Herz J, Farese RV Jr. Disruption of the acyl-CoA:cholesterol acyltransferase gene in mice: evidence suggesting multiple cholesterol esterification enzymes in mammals. *PNAS* 1996;93:14041-14046.
396. Fazio S, Major AS, Swift LL, Gleaves LA, Accad M, Linton MF, Farese RV Jr. Increased atherosclerosis in LDL receptor-null mice lacking ACAT1 in macrophages. *J Clin Invest*. 2001;107:163-171.
397. Buhman KK, Accad M, Novak S, Choi RS, Wong JS, Hamilton RL, Turley S, Farese RV Jr. Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice. *Nat Med*. 2000;6:1341-1347.
398. Perrey S, Legendre C, Matsuura A, Guffroy C, Binet J, Ohbayashi S, Tanaka T, Ortuno JC, Matsukura T, Laugel T, Padovani P, Bellamy F, Edgar AD. Preferential pharmacological inhibition of macrophage ACAT increases plaque formation in mouse and rabbit models of atherogenesis. *Atherosclerosis*. 2001;155:359-370.
399. Kusunoki J, Hansoty DK, Aragane K, Fallon JT, Badimon JJ, Fisher EA. Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibition reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2001;103:2604-2609.
400. Chiwata T, Aragane K, Fujinami K, Kojima K, Ishibashi S, Yamada N, Kusunoki J. Direct effect of an acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitor, F-1394, on atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor double knockout mice. *Br J Pharmacol*. 2001;133:1005-1012.
401. Azuma Y, Date K, Ohno K, Matsushiro S, Nobuhara Y, Yamada T. NTE-122, an acyl-coa:cholesterol acyltransferase inhibitor, prevents the progression of atherogenesis in cholesterol-fed rabbits. *Jpn J Pharmacol*. 2001;86:120-123.
402. Rival Y, Junquero D, Bruniquel F, N'Guyen X, Faure P, Pomies JP, Degryse AD, Delhon A. Anti-atherosclerotic properties of the acyl-coenzyme A:colesterol acyltransferase inhibitor F 12511 in casein-fed New Zealand rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002;39:181-191.

403. Delsing DJ, Offerman EH, van Duyvenvoorde W, van Der Boom H, de Wit EC, Gijbels MJ, van Der Laarse A, Jukema JW, Havekes LM, Princen HM. Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitor avasimibe reduces atherosclerosis in addition to its cholesterol-lowering effect in ApoE*3-Leiden mice. *Circulation*. 2001;103:1778-1786.
404. Temel RE, Gebre AK, Parks JS, Rudel LL. Compared with acyl-CoA:cholesterol O-acyltransferase (ACAT) 1 and lecithin:cholesterol acyltransferase, ACAT2 displays the greatest capacity to differentiate cholesterol from sitosterol. *J Biol Chem* 2003;278(48):47594-601.
405. Namatame I, Tomoda H, Ishibashi S, Omura S. Antiatherogenic activity of fungal beauveriolides, inhibitors of lipid droplet accumulation in macrophages. *PNAS* 2004;101:737-742.
406. Willner EL, Tow B, Buhman KK, Wilson M, Sanan DA, Rudel LL, Farese RV Jr. Deficiency of acyl CoA:cholesterol acyltransferase 2 prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *PNAS* 2003;100:1262-1267.
407. Reckless J, Metcalfe JC, Grainger DJ. Tamoxifen decreases cholesterol sevenfold and abolishes lipid lesion development in apolipoprotein E knockout mice. *Circulation*. 1997;95:1542-1548.
408. Williams JK, Wagner JD, Li Z, Golden DL, Adams MR. Tamoxifen inhibits arterial accumulation of LDL degradation products and progression of coronary artery atherosclerosis in monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:403-408.
409. Glomset JA. The mechanism of the plasma cholesterol esterification reaction: plasma fatty acid transferase. *Biochim Biophys Acta* 1962;65:128-135.
410. Glomset JA. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res* 1968;9:155-167.
411. Furbee Jr JW, Sawyer JK, Parks JS. Lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency increases atherosclerosis in the low density lipoprotein receptor and apolipoprotein E knockout mice. *J Biol Chem* 2002;277:3511-3519.
412. Ng DS, Maguire GF, Wylie J, Ravandi A, Xuan W, Ahmed Z, Eskandarian M, Kuksis A, Connelly PW. Oxidative stress is markedly elevated in lecithin:cholesterol acyltransferase-deficient mice and is paradoxically reversed in the apolipoprotein E knockout background in association with a reduction in atherosclerosis. *J Biol Chem*. 2002;277:11715-11720.
413. Hovingh GK, Hutten BA, Holleboom AG, Petersen W, Rol P, Stalenhoef A, Zwinderman AH, de Groot E, Kastelein JJ, Kuivenhoven JA. Compromised LCAT function is associated with increased atherosclerosis. *Circulation*. 2005;112:879-884.
414. Pattnaik NM, Montes A, Hughes LB, Zilversmit DB. Cholesteryl ester exchange protein in human plasma isolation and characterization. *Biochim Biophys Acta*. 1978;530:428-438.
415. Carlquist JF, Muhlestein JB, Horne BD, Hart NI, Bair TL, Molhuizen HO, Anderson JL. The cholesteryl ester transfer protein Taq1B gene polymorphism predicts clinical benefit of statin therapy in patients with significant coronary artery disease. *Am Heart J*. 2003;146:1007-1014.
416. Freeman DJ, Samani NJ, Wilson V, McMahon AD, Braund PS, Cheng S, Caslake MJ, Packard CJ, Gaffney D. A polymorphism of the cholesteryl ester transfer protein gene predicts cardiovascular events in non-smokers in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Eur Heart J*. 2003;24:1833-1842.
417. Brousseau ME, O'Connor JJ Jr, Ordovas JM, Collins D, Otvos JD, Massov T, McNamara JR, Rubins HB, Robins SJ, Schaefer EJ. Cholesteryl ester transfer protein TaqI B2B2 genotype is associated with higher HDL cholesterol levels and lower risk of coronary heart disease end points in men with HDL deficiency: Veterans Affairs HDL Cholesterol Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1148-1154.
418. Ordovas JM, Cupples LA, Corella D, Otvos JD, Osgood D, Martinez A, Lahoz C, Coltell O, Wilson PW, Schaefer EJ. Association of cholesteryl ester transfer protein-TaqIB polymorphism with variations in lipoprotein subclasses and coronary heart disease risk: the Framingham study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1323-1339.
419. Parini P, Rudel LL. Is there a need for cholesteryl ester transfer protein inhibition? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(3):374-375.
420. Barter PJ, Brewer HB Jr, Chapman MJ, Hennekens CH, Rader DJ, Tall AR. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:160-167.
421. Wolfbauer G, Albers JJ, Oram JF. Phospholipid transfer protein enhances removal of cellular cholesterol and phospholipids by high-density lipoprotein apolipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1999;1439:65-76.
422. Lie J, de Crom R, van Gent T, van Haperen R, Scheek L, Sadeghi-Niaraki F, van Tol A. Elevation of plasma phospholipid transfer protein increases the risk of atherosclerosis despite lower apolipoprotein B-containing lipoproteins. *J Lipid Res*. 2004;45:805-811.
423. Post SM, de Crom R, van Haperen R, van Tol A, Princen HM. Increased fecal bile acid excretion in transgenic mice with elevated expression of human phospholipid transfer protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:892-897.
424. Russell DW, Setchell KD. Bile acid biosynthesis. *Biochemistry*. 1992;31:4737-4749.
425. Beil U, Crouse JR, Einarsson K, Grundy SM. Effects of interruption of the enterohepatic circulation of bile acids on the transport of very low density-lipoprotein triglycerides. *Metabolism*. 1982;31:438-444.

426. Angelin B, Einarsson K, Hellstrom K, Leijdt B. Bile acid kinetics in relation to endogenous triglyceride metabolism in various types of hyperlipoproteinemia. *J Lipid Res.* 1978;19:1004-1016.
427. Einarsson K, Ericsson S, Ewerth S, Reihner E, Rudling M, Stahlberg D, Angelin B. Bile acid sequestrants: mechanisms of action on bile acid and cholesterol metabolism. *Eur J Clin Pharmacol.* 1991;40:S53-S58.
428. Miyake JH, Doung XD, Strauss W, Moore GL, Castellani LW, Curtiss LK, Taylor JM, Davis RA. Increased production of apolipoprotein B-containing lipoproteins in the absence of hyperlipidemia in transgenic mice expressing cholesterol 7 α -hydroxylase. *J Biol Chem.* 2001;276:23304-23311.
429. Post SM, Groenendijk M, Solaas K, Rensen PC, Princen HM. Cholesterol 7 α -hydroxylase deficiency in mice on an APOE*3-Leiden background impairs very-low-density lipoprotein production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:768-774.
430. Miyake JH, Duong-Polk XT, Taylor JM, Du EZ, Castellani LW, Lusis AJ, Davis RA. Transgenic expression of cholesterol-7- α -hydroxylase prevents atherosclerosis in C57BL/6J mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:121-126.
431. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouellette BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJ, Genest J, Hayden MR. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 1999;22:336-345.
432. Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Deneffe P, Assmann G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet* 1999; 22:352-355.
433. Haghighpassand M, Bourassa PA, Francone OL, Aiello RJ. Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels. *J Clin Invest* 2001;108:1315-1320.
434. Fung-Leung WP, Van Berkel TJ, Schmitz G. Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:6298-6303.
435. Joyce CW, Amar MJ, Lambert G, Vaisman BL, Paigen B, Najib-Fruchart J, Hoyt Jr RF, Neufeld ED, Remaley AT, Fredrickson DS, Brewer Jr HB, Santamarina-Fojo S. The ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) modulates the development of aortic atherosclerosis in C57BL/6 and apoE-knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:407-412.
436. Singaraja RR, Fievet C, Castro G, James ER, Hennuyer N, Clee SM, Bissada N, Choy JC, Fruchart JC, McManus BM, Staels B, Hayden MR. Increased ABCA1 activity protects against atherosclerosis. *J Clin Invest* 2002;110:35-42.
437. Lee MH, Lu K, Patel SB. 2001 Genetic basis of sitosterolemia. *Curr Opin Lipidol* 12:141-149.
438. Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 2000; 290:1771-1775.
439. Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:16237-16242.
440. Yu L, von Bergmann K, Lutjohann D, Hobbs HH, Cohen JC. Selective sterol accumulation in ABCG5/ABCG8-deficient mice. *J Lipid Res.* 2004;45:301-307.
441. Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest.* 2002;110:671-680.
442. Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science.* 2000;;290:1771-1775.
443. Lee MH, Lu K, Hazard S, Yu H, Shulenin S, Hidaka H, Kojima H, Allikmets R, Sakuma N, Pegoraro R, Srivastava AK, Salen G, Dean M, Patel SB. Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet.* 2000;27:79-83.
444. Buhman KK, Accad M, Novak S, Choi RS, Wong JS, Hamilton RL, Turley S, Farese RV Jr. Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice. *Nat Med.* 2000;6:1341-1347.
445. Davies JP, Levy B, Ioannou YA. Evidence for a Niemann-pick C (NPC) gene family: identification and characterization of NPC1L1. *Genomics.* 2000;65:137-145.
446. Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, Loftus SK, Zhang D, Cummings C, Gu J, Rosenfeld MA, Pavan WJ, Krizman DB, Nagle J, Polymeropoulos MH, Sturley SL, Ioannou YA, Higgins ME, Comly M, Cooney A, Brown A, Kaneski CR, Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, Neufeld EB, Chang TY, Liscum L, Strauss JF 3rd, Ohno K, Zeigler M, Carmi R, Sokol J, Markie D, O'Neill RR, van Diggelen OP, Elleder M, Patterson MC, Brady RO, Vanier MT, Pentchev PG, Tagle DA. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science.* 1997;277:2282-2291.
447. Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. Niemann-Pick C1

- Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*. 2004;303:1201-1204.
448. Piquette-Miller M, Pak A, Kim H, Anari R, Shahzamani A. Decreased expression and activity of P-glycoprotein in rat liver during acute inflammation. *Pharm Res*. 1998 ;15:706-711.
449. Hartmann G, Kim H, Piquette-Miller M. Regulation of the hepatic multidrug resistance gene expression by endotoxin and inflammatory cytokines in mice. *Int Immunopharmacol*. 2001 ;1:189-199.
450. Petruzzio P, Cappai A, Brotzu G, Batetta B, Putzolu M, Mulas MF, Bonatesta RR, Sanna F, Dessi S. Lipid metabolism and molecular changes in normal and atherosclerotic vessels. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2000;22:31-36.
451. Batetta B, Dessi S, Putzolu M, Sanna F, Spano O, Mulas MF, Petruzzio P, Cappai A, Brotzu G. MDR1 gene expression in normal and atherosclerotic human arteries(1). *J Vasc Res*. 1999;36:261-271.
452. Metherrall JE, Li H, Waugh K. Role of multidrug resistance P-glycoproteins in cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem*. 1996;271: 2634-2640.
453. Voshol PJ, Havinga R, Wolters H, Ottenhoff R, Princen HM, Oude Elferink RP, Groen AK, Kuipers F. Reduced plasma cholesterol and increased fecal sterol loss in multidrug resistance gene 2 P-glycoprotein-deficient mice. *Gastroenterology*. 1998;114:1024-1034.
454. Luker GD, Dahlheimer JL, Ostlund RE Jr, Piwnicka-Worms D. Decreased hepatic accumulation and enhanced esterification of cholesterol in mice deficient in *mdr1a* and *mdr1b* P-glycoproteins. *J Lipid Res*. 2001;42:1389-1394.
455. Tous M, Ribas V, Ferre N, Escola-Gil JC, Blanco-Vaca F, Alonso-Villaverde C, Coll B, Camps J, Joven J. Turpentine-induced inflammation reduces the hepatic expression of the multiple drug resistance gene, the plasma cholesterol concentration and the development of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1733:192-198.
456. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, Shih DM, Van Lenten BJ, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Fogelman AM. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:831-842.
457. Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr Opin Lipidol*. 1998;9:471-474.
458. Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hulten LM, Wiklund O, Innerarity TL, Boren J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*. 2002 ;417:750-754.
459. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*. 1995;91::2488-2496.
460. Palinski W, Witztum JL. Immune responses to oxidative neopeptides on LDL and phospholipids modulate the development of atherosclerosis. *J Intern Med*. 2000 ;247:371-380.
461. Horkko S, Binder CJ, Shaw PX, Chang MK, Silverman G, Palinski W, Witztum JL. Immunological responses to oxidized LDL. *Free Radic Biol Med*. 2000;28(12):1771-1779.
462. Calara F, Dimayuga P, Niemann A, Thyberg J, Diczfalussy U, Witztum JL, Palinski W, Shah PK, Cercek B, Nilsson J, Regnstrom J. An animal model to study local oxidation of LDL and its biological effects in the arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:884-893.
463. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 2001;104:503-516.
464. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:8264-8268.
465. Murayama T, Yokode M, Kataoka H, Imabayashi T, Yoshida H, Sano H, Nishikawa S, Kita T. Intraperitoneal administration of anti-c-fms monoclonal antibody prevents initial events of atherogenesis but does not reduce the size of advanced lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 1999;99:1740 -1746.
466. O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO, Chait A, Harlan JM, Fishbein D, McCarty J, Ferguson M, Hudkins K, Benjamin CD. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1993;92:945-951.
467. Johnson-Tidey RR, McGregor JL, Taylor PR, Poston RN. Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *Am J Pathol*. 1994;144:952-961.
468. Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med*. 2000;191:189-194.
469. Johnson RC, Chapman SM, Dong ZM, Ordovas JM, Mayadas TN, Herz J, Hynes RO, Schaefer EJ, Wagner DD. Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice. *J Clin Invest*. 1997;99:1037-1043.
470. Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1998;102:145-152.
471. Dong ZM, Brown AA, Wagner DD. Prominent role of P-selectin in the development of advanced atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Circulation*. 2000;101:2290-2295.

472. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2001;107:1255-1262.
473. Tian J, Pei H, James JC, Li Y, Matsumoto AH, Helm GA, Shi W. Circulating adhesion molecules in apoE-deficient mouse strains with different atherosclerosis susceptibility. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;329:1102-1107.
474. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:5134-5138.
475. Klouche M, Gottschling S, Gerl V, Hell W, Husmann M, Dorweiler B, Messner M, Bhakdi S. Atherogenic properties of enzymatically degraded LDL: selective induction of MCP-1 and cytotoxic effects on human macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1376-1385.
476. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell.* 1998; 2:275-281.
477. Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot CH, Young SG, Rollins BJ, Charo IF. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apo B. *J Clin Invest* 1999;103:773-778.
478. Dawson TC, Kuziel WA, Osahar TA, Maeda N. Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis.* 1999;143:205-211.
479. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 1998;394:894-897.
480. Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Natoli E, Rollins BJ, Milos PM. Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1518-1525.
481. Inoue S, Egashira K, Ni W, Kitamoto S, Usui M, Otani K, Ishibashi M, Hiasa K, Nishida K, Takeshita A. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation.* 2002;106:2700-2706.
482. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature.* 1998; 394:200-203.
483. Lutgens E, Gorelik L, Daemen MJ, de Muinck ED, Grewal IS, Kotliansky VE, Flavell RA. Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis. *Nat Med.* 1999;5:1313-1316.
484. Gupta S, Pablo AM, Jiang X, Wang N, Tall AR, Schindler C. IFN- γ potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest.* 1997; 99:2752-2761.
485. Boisvert WA, Santiago R, Curtiss LK, Terkeltaub RA. A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest.* 1998;101:353-363.
486. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim Y-C, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, Jr., Luster AD, Luscinskas FW, Rosenzweig A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature.* 1999;398:718-723.
487. Gerszten RE, Lim Y-C, Ding HT, Snapp K, Kansas G, Dichek DA, Cabañas C, Sanchez-Madrid F, Gimbrone MA, Jr, Rosenzweig A, Luscinskas FW. Adhesion of monocytes to vascular cell adhesion molecule-1-transduced human endothelial cells. Implications for atherogenesis. *Circ Res.* 1998;82:871-878.
488. Kirii H, Niwa T, Yamada Y, Wada H, Saito K, Iwakura Y, Asano M, Moriwaki H, Seishima M. Lack of interleukin-1 β decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:656-660.
489. Shanley TP, Schmal H, Warner RL, Schmid E, Friedl HP, Ward PA. Requirement for C-X-C chemokines (macrophage inflammatory protein-2 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant) in IgG immune complex-induced lung injury. *J Immunol.* 1997;158:3439-3448.
490. Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, Ju G. Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem.* 1995;270:13757-13765.
491. Korherr C, Hofmeister R, Wesche H, Falk W. A critical role for interleukin-1 receptor accessory protein in interleukin-1 signaling. *Eur J Immunol.* 1997;27:262-267.
492. Elhage R, Maret A, Pieraggi MT, Thiers JC, Arnal JF, Bayard F. Differential effects of interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein on fatty-streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 1998;97:242-244.
493. Isoda K, Sawada S, Ishigami N, Matsuki T, Miyazaki K, Kusuhara M, Iwakura Y, Ohsuzu F. Lack of interleukin-1 receptor antagonist modulates plaque composition in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1068-1073.
494. Devlin CM, Kuriakose G, Hirsch E, Tabas I. Genetic alterations of IL-1 receptor antagonist in mice affect plasma cholesterol level and foam cell lesion size. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:6280-6285.
495. Kopf M, Ramsay A, Brombacher F, Baumann H, Freer G, Galanos C, Gutierrez-Ramos JC, Kohler G.

- Pleiotropic defects of IL-6-deficient mice including early hematopoiesis, T and B cell function, and acute phase responses. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;762:308-318.
496. Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 ;19:2364-2367.
497. Elhage R, Clamens S, Besnard S, Mallat Z, Tedgui A, Arnal J, Maret A, Bayard F. Involvement of interleukin-6 in atherosclerosis but not in the prevention of fatty streak formation by 17 β -estradiol in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis.* 2001;156:315-320.
498. Schieffer B, Selle T, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Grote K, Tietge UJ, Trautwein C, Luchtefeld M, Schmittkamp C, Heeneman S, Daemen MJ, Drexler H. Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis. *Circulation.* 2004 ;110:3493-3500.
499. Caligiuri G, Rudling M, Ollivier V, Jacob MP, Michel JB, Hansson GK, Nicoletti A. Interleukin-10 deficiency increases atherosclerosis, thrombosis, and low-density lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice. *Mol Med.* 2003;9:10-17.
500. Namiki M, Kawashima S, Yamashita T, Ozaki M, Sakoda T, Inoue N, Hirata K, Morishita R, Kaneda Y, Yokoyama M. Intramuscular gene transfer of interleukin-10 cDNA reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Atherosclerosis.* 2004;172:21-29.
501. Elhage R, Jawien J, Rudling M, Ljunggren HG, Takeda K, Akira S, Bayard F, Hansson GK. Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc Res.* 2003 ;59:234-240.
502. Hansen PR, Chew M, Zhou J, Daugherty A, Heegaard N, Jensen P, Mouritsen S, Falk E. Freund's adjuvant alone is antiatherogenic in apoE-deficient mice and specific immunization against TNF α confers no additional benefit. *Atherosclerosis.* 2001;158:87-94.
503. Ohta H, Wada H, Niwa T, Kirii H, Iwamoto N, Fujii H, Saito K, Sekikawa K, Seishima M. Disruption of tumor necrosis factor- α gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis.* 2005;180:11-17.
504. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature.* 1997 13;385:640-644.
505. Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, Tedder TF, Yoshie O, Imai T, Patel DD. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med.* 1998;188:1413-1419.
506. Lucas AD, Bursill C, Guzik TJ, Sadowski J, Channon KM, Greaves DR. Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques express the fractalkine receptor CX3CR1 and undergo chemotaxis to the CX3C chemokine fractalkine (CX3CL1). *Circulation.* 2003;108:2498-2504.
507. Combadiere C, Potteaux S, Gao JL, Esposito B, Casanova S, Lee EJ, Debre P, Tedgui A, Murphy PM, Mallat Z. Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation.* 2003;107:1009-1016.
508. Teupser D, Pavlides S, Tan M, Gutierrez-Ramos JC, Kolbeck R, Breslow JL. Major reduction of atherosclerosis in fractalkine (CX3CL1)-deficient mice is at the brachiocephalic artery, not the aortic root. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:17795-17800.
509. Hayes IM, Jordan NJ, Towers S, Smith G, Paterson JR, Earnshaw JJ, Roach AG, Westwick J, Williams RJ. Human vascular smooth muscle cells express receptors for CC chemokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:397-403.
510. Pattison JM, Nelson PJ, Huie P, Sibley RK, Krensky AM. RANTES chemokine expression in transplant-associated accelerated atherosclerosis. *J Heart Lung Transplant.* 1996 ;15:1194-1199.
511. von Hundelshausen P, Weber KS, Huo Y, Proudfoot AE, Nelson PJ, Ley K, Weber C. RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation.* 2001;103:1772-1777.
512. Yun JJ, Fischbein MP, Laks H, Irie Y, Espejo ML, Fischbein MC, Berliner JA, Ardehali A. Rantes production during development of cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation.* 2001;71:1649-1656.
513. Parissis JT, Adamopoulos S, Venetsanou KF, Mentzifok DG, Karas SM, Kremastinos DT. Serum profiles of C-C chemokines in acute myocardial infarction: possible implication in postinfarction left ventricular remodeling. *J Interferon Cytokine Res.* 2002;22:223-229.
514. Wilcox JN, Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Schall TJ. Local expression of inflammatory cytokines in human atherosclerotic plaques. *J Atheroscler Thromb.* 1994; 1:S10-S13.
515. Simeoni E, Winkelmann BR, Hoffmann MM, Fleury S, Ruiz J, Kappenberger L, Marz W, Vassalli G. Association of RANTES G-403A gene polymorphism with increased risk of coronary arteriosclerosis. *Eur Heart J.* 2004;25:1438-1446.
516. Boger CA, Fischereder M, Deinzer M, Aslanidis C, Schmitz G, Stubanus M, Banas B, Kruger B, Riegger GA, Kramer BK. RANTES gene polymorphisms predict all-cause and cardiac mortality in type 2 diabetes mellitus hemodialysis patients. *Atherosclerosis.* 2005;
517. Makino Y, Cook DN, Smithies O, Hwang OY, Neilson EG, Turka LA, Sato H, Wells AD, Danoff TM.

- Impaired T cell function in RANTES-deficient mice. *Clin Immunol.* 2002 ;102:302-309.
518. Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL, Morrissey JH, Prescott SM, Zimmerman GA. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest.* 1996;97:1525-1534.
519. Veillard NR, Kwak B, Pelli G, Mulhaupt F, James RW, Proudfoot AE, Mach F. Antagonism of RANTES receptors reduces atherosclerotic plaque formation in mice. *Circ Res.* 2004 ;94:253-261.
520. Kuziel WA, Dawson TC, Quinones M, Garavito E, Chenaux G, Ahuja SS, Reddick RL, Maeda N. CCR5 deficiency is not protective in the early stages of atherogenesis in apoE knockout mice. *Atherosclerosis.* 2003;167:25-32.
521. Ferreira AM, Rollins BJ, Faunce DE, Burns AL, Zhu X, Di Pietro LA. The effect of MCP-1 depletion on chemokine and chemokine-related gene expression: evidence for a complex network in acute inflammation. *Cytokine.* 2005;30:64-71.
522. Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol.* 2002;14:103-110.
523. Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation.* 2002 ;105:1158-1161.
524. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* 1999;11:443-451.
525. Iwaki D, Mitsuzawa H, Murakami S, Sano H, Konishi M, Akino T, Kuroki Y. The extracellular toll-like receptor 2 domain directly binds peptidoglycan derived from taphylococcus aureus. *J Biol Chem.* 2002;277:24315-24320.
526. Kanwar RK, Kanwar JR, Wang D, Ormrod DJ, Krissansen GW. Temporal expression of heat shock proteins 60 and 70 at lesion-prone sites during atherogenesis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1991-1997.
527. Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, Zhang W, Yano J, Doherty TM, Akira S, Rajavashisth TB, Ardit M. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:10679-10684.
528. Kuhlencordt PJ, Chen J, Han F, Astern J, Huang PL. Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation.* 2001;103:3099-3104.
529. Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, Hajjar R, Picard MH, Huang PL. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic Herat disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation.* 2001 ;104:448-454.
530. Cyrus T, Witztum JL, Rader DJ, Tangirala R, Fazio S, Linton MF, Funk CD. Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest.* 1999;103: 1597-1604.
531. Cyrus T, Pratico D, Zhao L, Witztum JL, Rader DJ, Rokach J, FitzGerald GA, Funk CD. Absence of 12/15-lipoxygenase expression decreases lipid peroxidation and atherogenesis in apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation.* 2001;103:2277-2282.
532. Huo Y, Zhao L, Hyman MC, Shashkin P, Harry BL, Burcin T, Forlow SB, Stara MA, Smith DF, Clarke S, Srinivasan S, Hedrick CC, Pratico D, Witztum JL, Nadler JL, Funk CD, Ley K. Critical role of macrophage 12/15-lipoxygenase for atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 2004;110:2024-2031.
533. Torzewski M, Rist C, Mortensen RF, Zwaka TP, Bienek M, Waltenberger J, Koenig W, Schmitz G, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2094-2099.
534. Bhakdi S, Torzewski M, Klouche M, Hemmes M. Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2348-2354.
535. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation.* 2000;102:2165-2168.
536. Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation.* 2001;103:1194-1197.
537. Pasceri V, Cheng JS, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation.* 2001;103:2531-2534.
538. Szalai AJ, McCrory MA. Varied biologic functions of C-reactive protein: lessons learned from transgenic mice. *Immunol Res.* 2002;26:279-287.
539. Szalai AJ, Briles DE, Volanakis JE. Human C-reactive protein is protective against fatal *Streptococcus pneumoniae* infection in transgenic mice. *J Immunol.* 1995;155:2557-2563.
540. Danenberg HD, Szalai AJ, Swaminathan RV, Peng L, Chen Z, Seifert P, Fay WP, Simon DI, Edelman ER. Increased thrombosis after arterial injury in human C-reactive protein-transgenic mice. *Circulation.* 2003 ;108:512-515.
541. Paul A, Ko KW, Li L, Yechool V, McCrory MA, Szalai AJ, Chan L. C-reactive protein accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 2004;109:647-655.
542. Trion A, de Maat MP, Jukema JW, van der Laarse A, Maas MC, Offerman EH, Havekes LM, Szalai AJ,

- Princen HM, Emeis JJ. No effect of C-reactive protein on early atherosclerosis development in apolipoprotein E*3-leiden/human C-reactive protein transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1635-1640.
543. Reifenberg K, Lehr HA, Baskal D, Wiese E, Schaefer SC, Black S, Samols D, Torzewski M, Lackner KJ, Husmann M, Blettner M, Bhakdi S. Role of C-reactive protein in atherogenesis: can the apolipoprotein E knockout mouse provide the answer? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1641-1646.
544. O'Brien KD, McDonald TO, Kunjathoor V, Eng K, Knopp EA, Lewis K, Lopez R, Kirk EA, Chait A, Wight TN, deBeer FC, LeBoeuf RC. Serum amyloid A and lipoprotein retention in murine models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:785-790.
545. Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Freeman A, Showell HJ. Leukotriene B4 receptor antagonism reduces monocytic foam cells in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:443-449.
546. Ostos MA, Recalde D, Zakin MM, Scott-Algara D. Implication of natural killer T cells in atherosclerosis development during a LPS-induced chronic inflammation. *FEBS Lett.* 2002;519:23-29.

Estudi 1

Tous M, Ferre N, Vilella E, Riu F, Camps J, Joven J.
Aspirin attenuates the initiation but not the
progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-
deficient mice fed a high-fat, high-cholesterol diet.
Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2004;95:15-19.

Aspirin Attenuates the Initiation but Not the Progression of Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice Fed a High-Fat, High-Cholesterol Diet

Mònica Tous, Natàlia Ferré, Elisabet Vilella, Francesc Riu, Jordi Camps and Jorge Joven

Center of Biomedical Research, Institute of Health Sciences Research (IRCIS), University Hospital of St. Joan, Reus, Spain

(Received November 6, 2003; Accepted March 4, 2004)

Abstract: Aspirin has potent antiinflammatory properties and attenuates atherosclerosis in apolipoprotein-E-deficient mice fed a high-fat, high-cholesterol diet. In an attempt to clarify the contradictory results obtained with normal chow, we studied the effect of aspirin for a prolonged period of time. The mice were fed a commercial chow until the experiment began at 8 weeks of age. Blood samples were then obtained and several mice ($n=8$) were sacrificed. The diet of the remaining 48 animals was supplemented with 200 g/kg palm fat and 1 g/kg cholesterol. They were then randomly divided into 2 groups, one of which received 0.5 mg/day of aspirin. The aspirin had a time-dependent effect. First, the extent of lesion decreased; then the effect was neutral; and, finally, after longer periods of being fed the atherogenic diet and receiving aspirin, the extent of the lesion increased. The transitory effect of aspirin should be elucidated in the absence of high dietary lipids.

Considerable experimental and clinical evidence exists to suggest that there is an association between inflammation and atherosclerosis (Ross 1999). The mechanisms are unknown but the induction of inflammation may trigger the production of leukocyte chemoattractants that induce the initiation and progression of atheroma, the formation of thrombi and the stabilization of plaques (Libby 2000). Therefore, for their potential to decrease vascular inflammation, the utility of antiinflammatory agents should be considered clinically. Aspirin has potent antiinflammatory properties and is widely used in the secondary prevention of coronary heart disease and stroke. Experimental data also show that cyclooxygenases are widely expressed in the plaques, and that aspirin inhibits monocyte adhesion (Weber *et al.* 1995) and smooth muscle cell proliferation (Brooks *et al.* 2003), and protects LDL from oxidation (Steer *et al.* 1997).

We have previously shown in apolipoprotein E-deficient mice that the continuous administration of high doses of aspirin (0.5 mg of acetylsalicylic acid per day) for 10 weeks reduces the lesion area by 30–40% (Paul *et al.* 2000). In LDL receptor-deficient mice fed a high-fat, high-cholesterol diet, and treated for 26 weeks, low-dose aspirin (0.1 mg per day) significantly reduced atherosclerotic lesions (Cyrus *et al.* 2002). The same effect was reported with an aspirin-like drug, indomethacin (Pratico *et al.* 2001). However, the effect of aspirin on the progression of atherosclerosis remains unclear and contrasting data have also been obtained. It

has been reported that, when a femoral injury is mechanically induced in apolipoprotein E-deficient mice, there is a marked reduction in neointimal formation in mice treated with the non-steroidal antiinflammatory drug SulindacTM but not in mice treated with aspirin (Reis *et al.* 2000). It has also been shown that, for 11 weeks of treatment, the thromboxane receptor antagonist S18886, but not high-dose aspirin, inhibits atherogenesis in Apolipoprotein E-deficient mice, despite the greater efficacy of aspirin at preventing the platelet production of thromboxane A₂ (Cayatte *et al.* 2000).

The studies that showed a positive effect of aspirin were all performed with animals on a high-fat, high-cholesterol diet. To further explore this effect, we have extended the duration of treatment and assessed the lesions at different evolution times.

Materials and Methods

Experimental animals and study design. The study group consisted of 56 homozygous male apolipoprotein E-knock-out mice, hybrids of C57BL/6J and 129 Ola strains, the progeny of those previously described (Piedrahita *et al.* 1992). The animals were fed a commercial mouse diet (BK Universal, Barcelona, Spain) until the experiment began at 8 weeks of age. At this point, blood samples were obtained and mice ($n=8$) were sacrificed. The diet of the remaining 48 animals was supplemented with refined palm oil (200 g/kg, Unilever, Bilbao, Spain) and cholesterol (1 g/kg, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) (Paul *et al.* 1999). They were then randomly divided into 2 groups; there was no further modification in the control group and 0.5 mg of acetylsalicylic acid (aspirin) per day was administered to each animal in the treatment group, as described (Paul *et al.* 2000). At 13, 20 and 24 weeks of age, animals were sequentially sacrificed ($n=8$ for each group and time point) and relevant variables analysed. The liver and stomach of all animals were also microscopically examined.

Author for correspondence: Jorge Joven, Center of Biomedical Research, Institute of Health Sciences Research, University Hospital of St. Joan, Calle Sant Joan s/n, E-43201 Reus, Spain (fax +34 977 312569, e-mail jjoven@grupsgassa.com).

Quantitation of atherosclerosis and immunohistochemistry. The size and number of lesions in the proximal aortic region were evaluated as described (Tangirala *et al.* 1995). Immediately after desanguination through cardiac puncture, the vascular tree was perfused with phosphate buffered saline. Once the hearts and 2 mm below the ascending aorta had been removed, they were sectioned transversely, embedded in OCT and immediately frozen. Sections were made at intervals of 20 µm, stained with Sudan IV and counterstained with haematoxylin and eosin. Morphometric evaluation was performed according to the features outlined previously (Paigen *et al.* 1987). The lesion area was quantified by using the AnalSYSTM (Soft Imaging System, Münster, Germany). The extent of atherosclerosis was also determined by using the *en face* method. The results were expressed as % of lesion area in the treatment group with respect to that obtained in controls at the aortic arch, the thoracic aorta and the abdominal aorta.

Cryosections (n=3–5 per mice) were stained with MOMA-2 (rat anti mouse macrophages/monocytes; Biospec, Oklahoma, OK, USA) and VCAM-1 (rat anti mouse CD106, Pharmingen, San Diego, CA, USA) followed by detection with a fluorescent secondary antibody (goat anti-rat IgG conjugate; Molecular Probes, Eugene, OR, USA). They were counterstained with SYTOX Green (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Images were acquired, and the area measured with an image-analysis system.

Plasma chemistry and cholesterol distribution among lipoproteins. Plasma samples were obtained from each animal. Plasma cholesterol, triacylglycerols, albumin and bilirubin concentrations, as well as aspartate and alanine aminotransferase activities were measured by standard procedures. To assess cholesterol distribution among lipoproteins, the plasma was pooled and gel-filtered through a Superose 6HR column in an FPLC System (Pharmacia, Uppsala, Sweden) as described (Vilella *et al.* 1993).

Statistical analyses. Statistical assessment was carried out using SPSS/PC + 10.0 (SPSS, Chicago, IL). Data were analysed by ANOVA and subsequently by Student's two-tailed t-test. The Wilcoxon test was used to compare baseline and final values within each

group. Bivariate correlations were examined by the Pearson correlation coefficient.

Results

At 8 weeks of age, mice were fed a high-fat, high cholesterol diet and one group was selected to receive aspirin. There were no differences between control and treated groups in terms of mobility, behaviour, and water and food intake throughout the study. As expected, there was a similar increase in body weight of approximately 30–40% in both groups. There was also an increase in plasma lipid levels. In the mice treated with aspirin, there was a trend towards higher plasma cholesterol concentration that reached statistical significance at 24 weeks of age. At this age there was also a consistent increase in plasma triacylglycerol concentration in both groups (table 1). This difference was even more evident in the cholesterol distribution among lipoproteins (fig. 1). There was a significant increase in VLDL and LDL cholesterol concentration at 24 weeks of age. In both groups there was a slight increase in HDL cholesterol at 13 weeks of age that remained relatively constant throughout the study.

At 13 weeks of age, the plasma bilirubin concentration increased significantly and continuously in both groups and by the end of the study was six times greater than the initial value. This was not accompanied by significant changes in plasma aminotransferases activities (table 1). However, at 20 weeks of age and throughout the study, we found gross hepatomegaly, liver steatosis and xanthomatous lesions in the submucosa of the esophagus and gastro-oesophageal junction.

Table 1.

Baseline, intermediate and final values of selected parameters according to the experimental groups.

Age (weeks)	8	13	20	24
Body weight (g)				
Control	16.7±2.6	24.0±3.1 [†]	26.7±1.9 [‡]	27.4±2.6 [‡]
Aspirin	18.2±1.1	24.6±2.2 [‡]	25.9±4.4 [†]	27.3±4.1 [‡]
Plasma albumin (g/l)				
Control	26.0±2.3	35.3±5.9 [†]	32.8±7.7	29.1±8.2
Aspirin	25.0±3.8	30.8±2.8 [†]	31.3±6.4	28.7±7.8
Plasma bilirubin (µM)				
Control	5.2±2.0	48.2±18.1 [‡]	54.7±23.1 [‡]	37.4±26.6 [†]
Aspirin	12.0±7.1	38.2±18.8 [‡]	50.0±14.7 [‡]	60.9±7.5 [‡]
Plasma alanine aminotransferase (µkat/l)				
Control	0.6±0.1	0.7±0.1	0.6±0.2	0.5±0.2
Aspirin	0.6±0.1	0.5±0.1	0.4±0.2	0.7±0.3
Plasma aspartate aminotransferase (µkat/l)				
Control	3.2±1.4	2.5±0.7	2.3±1.0	1.5±0.6 [†]
Aspirin	2.4±0.9	2.7±1.0	2.3±1.3	2.1±0.8
Plasma cholesterol (mM)				
Control	10.8±2.3	48.3±12.1 [‡]	73.7±17.5 [‡]	68.4±15.0 [‡]
Aspirin	14.0±2.3	41.3±12.4 [‡]	88.7±12.1 [‡]	86.9±16.3 ^{*‡}
Plasma triacylglycerols (mM)				
Control	1.1±0.2	2.7±0.7 [†]	2.5±0.6 [‡]	2.9±1.1 [‡]
Aspirin	2.2±0.7 [*]	1.5±0.5 ^{*‡}	2.0±0.7 [‡]	3.1±1.0 [‡]

*P<0.05 with respect to control values.

[†]P<0.05 with respect to baseline values.

[‡]P<0.001 with respect to baseline values.

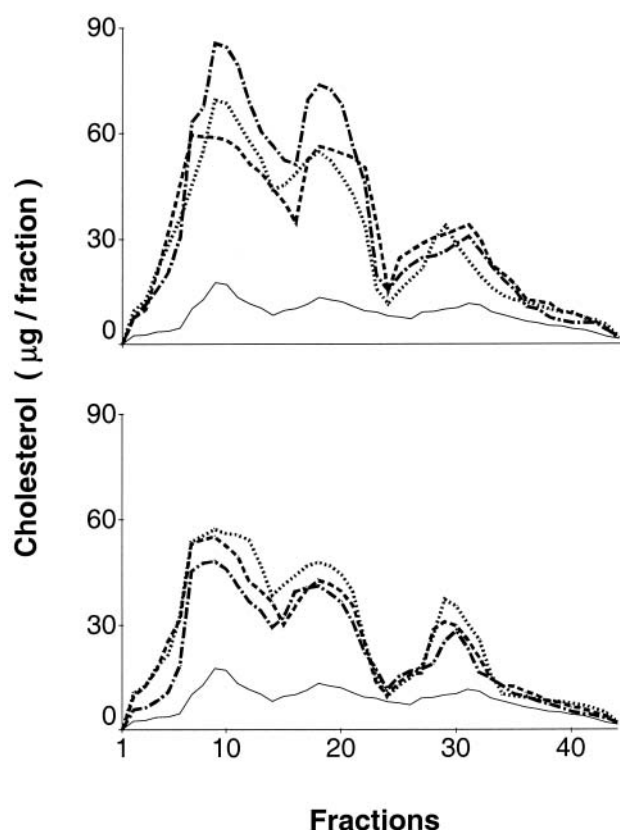


Fig. 1. Cholesterol concentrations in FPLC fractions from pooled plasma of aspirin-treated (upper panel) and control mice (lower panel) at 8 (—), 13 (---), 20 (···) and 24 (—·) weeks of age. Fractions 1 to 13 represent the VLDL lipoproteins, fractions 14 to 23 LDL, and fractions ≥ 24 HDL.

Analysis of aortic atherosclerosis.

The aortic atherosclerotic lesion area was quantified by two independent methods. As expected, at age 8 weeks no lesions were found in the aortic sinus. The expression of VCAM-1 was already apparent at this age and did not change throughout the study in any of the groups considered (data not shown). At 13 weeks of age, treatment with aspirin resulted in a 26% reduction in the cross section analysis of lesion size (fig. 2) compared with the control group ($20488 \pm 16738 \mu\text{m}^2$ versus $15721 \pm 7626 \mu\text{m}^2$). The difference did not reach statistical significance ($P=0.058$) but it is consistent with the 30–40% significant reduction observed at 18 weeks in our previous study (Paul *et al.* 2000). At 20 weeks of age, lesion sizes were similar in both groups. Unexpectedly, at 24 weeks of age the lesion area in aspirin-treated animals was significantly ($P<0.005$) higher (115%) than in controls (fig. 2). This finding could be explained by the differences observed in plasma cholesterol concentration and the lipoprotein cholesterol distribution.

Moreover, the extent of atherosclerosis was significantly correlated with plasma cholesterol concentrations in both control ($r=0.84$, $P<0.05$) and aspirin-treated mice ($r=0.77$, $P<0.05$). We did not observe any impact of aspirin on

plaque composition during the study. There were no significant changes in the percentage of positive area for macrophages in both groups, which remained relatively constant throughout the study ($28 \pm 13\%$ versus $30 \pm 14\%$, $32 \pm 15\%$ versus $31 \pm 18\%$ and $35 \pm 17\%$ versus $37 \pm 21\%$, at 13, 20 and 24 weeks, respectively). When we considered the average atherosclerotic lesion area of the entire aorta, our results were similar in the *en face* analysis (fig. 3).

However, we observed substantial differences in the different regions. The distribution of lesions in the aortic arch and the abdominal aorta were similar. However, in the thoracic aorta, the aspirin-treated mice showed consistent higher lesion areas than those observed in controls (fig. 3).

Discussion

After 5 weeks of treatment, aspirin apparently retarded atherosclerosis, which is consistent with our previous findings (Paul *et al.* 2000). This trend, however, was not observed at 12 weeks of treatment, and was even inverted after 4 more weeks of aspirin administration. Apparently, the continuous administration of aspirin was facilitating atherogenesis at a dosage that suppressed platelet activation, inhibited the activation of nuclear factor- κB and reduced plasma inflammatory cytokine levels (Cayatte *et al.* 2000; Cyrus *et al.* 2002). Plasma cholesterol concentration increased significantly in mice after 16 weeks of treatment with aspirin, something for which we cannot find any apparent reason. Moreover, all animals showed a marked increase in cholesterol associated with VLDL/LDL-sized fractions, which was more marked in aspirin-treated animals.

These data may explain the apparent atherogenic effect of aspirin but they also indicate that a high-fat, high chol-

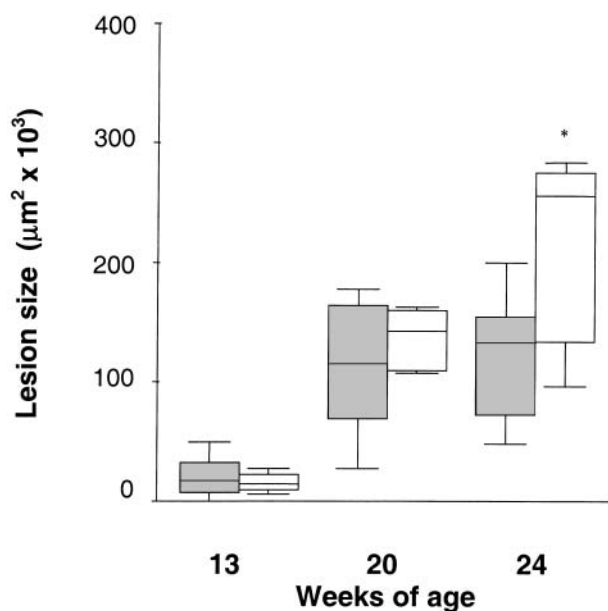


Fig. 2. Box-and-whiskers plots representing the lesion size at the aortic sinus in the control (grey) and aspirin-treated (white) mice.

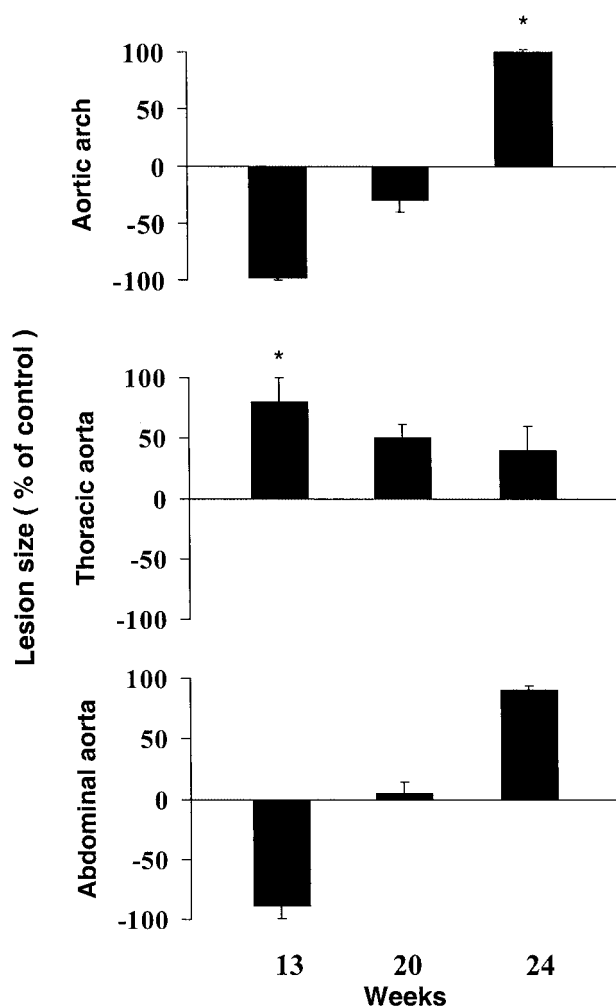


Fig. 3. Percentage of aortic surface area covered by lesions in aspirin-treated mice with respect to the corresponding controls.

esterol diet could be a complicating factor. Moreover, the data available suggest a direct inflammatory role of dietary cholesterol in atheroma (Libby 2001). In LDL receptor-deficient mice on normal chow, high-cholesterol diets increase the plasma cholesterol concentration from 6.5 mmol/l to more than 32 mmol/l (Tangirala *et al.* 1995) and they develop widespread xanthomatosis (Paigen *et al.* 1987; Ishibashi *et al.* 1994; Tangirala *et al.* 1995). In contrast, apolipoprotein E-deficient mice develop substantial (14–24 mmol/l) hypercholesterolaemia even on a normal chow diet. Nevertheless, many studies of apolipoprotein E-deficient mice use diets with an increased cholesterol content to further raise plasma cholesterol levels and accelerate lesion formation (Paigen *et al.* 1987; Ishibashi *et al.* 1994; Reddick *et al.* 1994; Tangirala *et al.* 1995).

There have been a number of observations indicating that the absence of Apolipoprotein E is a factor that predisposes to steatohepatitis (Hamilton *et al.* 1990; Kuipers *et al.* 1996; Sehayek *et al.* 2000) but it is also possible that we are inadvertently manipulating a critical factor related to the combined effect of palm fat and cholesterol. This is exemplified

by recent data (Lu *et al.* 2003) which suggest that a high-fat diet accelerates the progression of renal disease in Han:SPRD-cy rats and that this effect is modulated by the source of dietary lipids. In these murine models the presence of atypical xanthomatosis (van Ree *et al.* 1995), insulin resistance (Merat *et al.* 1999) and an increased incidence of gastritis (Laurila *et al.* 2001) may also suggest an unknown influence of dietary lipids.

Another explanation is suggested to explain the transitory effect of aspirin. It is well known that the inhibition of cyclooxygenases by non-steroidal antiinflammatory drugs reduces the levels of prostaglandins, thus reducing pain and inflammation. The need to detoxify a continuous daily load of aspirin and the observed hepatic lesions may interfere with the xenobiotic pathways and lead to inefficient action on prostaglandins when aspirin is administered for a prolonged period of time. It is also known that the action of aspirin may cause arachidonic acid to be alternatively processed via the 5-lipoxygenase, resulting in an increased production of pro-inflammatory leukotrienes, which could promote atherosclerosis. This is exemplified by recently obtained data (Aiello *et al.* 2002) indicating that antagonists of the leukotriene B₄ receptor reduce monocytic foam cells in mice. Conversely, the absence of these

receptors in mice promotes atherosclerosis by attracting monocytes and converting them to foam cells (Subbarao *et al.* 2004). Finally, it has been reported that the 5-lipoxygenase is abundantly expressed in the cells of human arteriosclerotic lesions (Spanbroek *et al.* 2002). Therefore, more studies are clearly needed to ascertain the possible contribution of antiinflammatory agents to the prevention of atherosclerosis.

Acknowledgements

This study was supported by grants 00/0291 and 01/1596 from the Fondo de Investigación Sanitaria and the Red de Centros de Metabolismo y Nutrición (C03/08). N.F. and M.T. were recipients of fellowships from the Generalitat de Catalunya (99-FI-790 and 02-FI-806, respectively).

References

- Aiello, R. J., P. A. Bourassa, S. Lindsey, W. Weng, A. Freeman & H. J. Showell: Leukotriene B₄ receptor antagonism reduces monocytic foam cells in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002, **22**, 443–449.
- Brooks, G., X. M. Yu, Y. Wang, M. J. Crabbe, M. J. Shattock & J. V. Harper: Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) inhibit vascular smooth muscle cell proliferation via differential effects on the cell cycle. *J. Pharm. Pharmacol.* 2003, **55**, 519–526.
- Brune, K.: Safety of anti-inflammatory treatment—new ways of thinking. *Rheumatology* 2004, **43**, i16–i20.
- Cayatte, A. J., Y. Du, J. Oliver-Krasinski, G. Lavielle, T. J. Verbeuren & R. A. Cohen: The thromboxane receptor antagonist S18886 but not aspirin inhibits atherogenesis in Apo E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000, **20**, 1724–1728.
- Cyrus, T., S. Sung, L. Zhao, C. D. Funk, S. Tang & D. Pratico: Effect of low-dose aspirin on vascular inflammation, plaque stability, and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 2002, **106**, 1282–1287.

- Hamilton, R. L., J. S. Wong, L. S. Guo, S. Krisans & R. J. Havel: Apolipoprotein E localization in rat hepatocytes by immunogold labelling of cryothin sections. *J. Lipid. Res.* 1990, **31**, 1589–1603.
- Ishibashi, S., J. L. Goldstein, M. S. Brown, J. Herz & D. K. Burns: Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J. Clin. Invest.* 1994, **93**, 1885–1893.
- Kuipers, F., J. M. van Ree, M. H. Hofker, H. Wolters, G. In't Veld, R. Havinga, R. J. Vonk, H. M. Princen & L. M. Havekes: Altered lipid metabolism in apolipoprotein E-deficient mice does not affect cholesterol balance across the liver. *Hepatology* 1996, **24**, 241–247.
- Laurila, A., S. P. Cole, S. Merat, M. Obonyo, W. Palinski, J. Fierer & J. L. Witztum: High-fat, high-cholesterol diet increases the incidence of gastritis in LDL receptor-negative mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001, **21**, 991–996.
- Libby, P.: Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis and stabilization. *Amer. J. Cardiol.* 2000, **86**, 3–8.
- Libby, P.: What have we learned about the biology of atherosclerosis? The role of inflammation. *Amer. J. Cardiol.* 2001, **88**, 3J–6J (review).
- Lu, J., N. Bankovic, M. Ogborn, M. H. Saboorian & H. M. Aukema: Detrimental effects of a high fat diet in early renal injury are ameliorated by fish oil in Han:SPRD-cy rats. *J. Nutr.* 2003, **133**, 180–186.
- Merat, S., F. Casanada, M. Sutphin, W. Palinski & P. D. Reaven: Western-type diets induce insulin resistance and hyperinsulinemia in LDL receptor-deficient mice but do not increase aortic atherosclerosis compared with normoinsulinemic mice in which similar plasma cholesterol levels are achieved by a fructose-rich diet. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999, **19**, 1223–1230.
- Paigen, B., A. Morrow, P. A. Holmes, D. Mitchell & R. A. Williams: Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 1987, **68**, 231–240.
- Paul, A., L. Calleja, E. Vilella, R. Martinez, J. Osada & J. Joven: Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice with phenylhydrazine-induced anemia. *Atherosclerosis* 1999, **147**, 61–68.
- Paul, A., L. Calleja, J. Camps, J. Osada, E. Vilella, N. Ferré, E. Mayayo & J. Joven: The continuous administration of aspirin attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Life. Sci.* 2000, **68**, 457–465.
- Piedrahita, J. A., S. H. Zhang, J. R. Hagaman, P. M. Oliver & N. Maeda: Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, **89**, 4471–4475.
- Pratico, D., C. Tillmann, Z. B. Zhang, H. Li & G. A. FitzGerald: Acceleration of atherogenesis by COX-1-dependent prostanoic acid formation in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, **98**, 3358–3363.
- Reddick, R. L., S. H. Zahng & N. Maeda: Atherosclerosis in mice lacking apo E: evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler. Thromb.* 1994, **14**, 141–147.
- Reis, E. D., M. Roque, H. Dansky, J. T. Fallon, J. J. Badimon, C. Cordon-Cardo, S. J. Shiff & E. A. Fisher: Sulindac inhibits neointimal formation after arterial injury in wild-type and Apo-lipoprotein E-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, **97**, 12764–12769.
- Ross, R.: Atherosclerosis – an inflammatory disease. *New England J. Med.* 1999, **340**, 115–126.
- Sehayek, E., S. Shefer, L. B. Nguyen, J. G. Ono, M. Merkel & J. L. Breslow: Apolipoprotein E regulates dietary cholesterol absorption and biliary cholesterol excretion: studies in C57BL/6 apolipoprotein E knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, **97**, 3433–3437.
- Spanbroek, R., R. Gräbner, K. Lötzer, M. Hildner, A. Urbach & K. Rühling: Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, **99**, 1238–1243.
- Steer, K. A., T. M. Wallace, C. H. Bolton & M. Hartog: Aspirin protects low density lipoprotein from oxidative modification. *Heart* 1997, **77**, 333–337.
- Subbarao, K., V. R. Jala, S. Mathis, J. Suttles, W. Zacharias, J. Ahamed, A. Hydar, M. T. Tseng & B. Haribabu: Role of leukotriene B₄ receptors in the development of atherosclerosis: potential mechanisms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004, **24**, 369–375.
- Tangirala, R. K., E. M. Rubin & W. Palinski: Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J. Lipid. Res.* 1995, **36**, 2320–2328.
- Vilella, E., J. Joven, M. Fernández, S. Vilaro, J. D. Brunzell, T. Olivecrona & G. Bengtsson-Olivecrona: Lipoprotein lipase in human plasma is mainly inactive and associated with cholesterol-rich lipoproteins. *J. Lipid. Res.* 1993, **34**, 1555–1564.
- van Ree, J. H., M. J. Gijbels, W. van den Broek, M. H. Hofker & L. M. Havekes: Atypical xanthomatosis in apolipoprotein E-deficient mice after cholesterol feeding. *Atherosclerosis* 1995, **112**, 237–243.
- Weber, C., W. Erl, A. Pietsch & P. C. Weber: Aspirin inhibits nuclear factor- κ B mobilization and monocyte adhesion in stimulated human endothelial cells. *Circulation* 1995, **91**, 1914–1917.

Estudi 2

Tous M, Ferre N, Camps J, Riu F, Joven J.
Feeding apolipoprotein E-knockout mice with
cholesterol and fat enriched diets may be a model of
non-alcoholic steatohepatitis.
Mol Cell Biochem. 2005;268:53-58.

Feeding apolipoprotein E-knockout mice with cholesterol and fat enriched diets may be a model of non-alcoholic steatohepatitis

Mònica Tous, Natàlia Ferré, Jordi Camps, Francesc Riu
and Jorge Joven

Centre de Recerca Biomèdica, Institut de Recerca en Ciències de la Salut, Hospital Universitari de Sant Joan, C/. Sant Joan s/n, 43201-Reus, Catalunya, Spain

Received 7 April 2004; accepted 24 June 2004

Abstract

The present study was aimed (1) to investigate the effect of cholesterol and fat enriched diets on the development of steatohepatitis in apolipoprotein E-knockout mice, and (2) to study the chronological relationships between the development of hepatic alterations, hypercholesterolemia and atherosclerotic lesions in this experimental model. The study consisted of two protocols. Protocol 1 was used in 90 mice subdivided in groups of 18. For 10 weeks, each group was given a diet with different fat and cholesterol contents. Protocol 2 was used in 42 mice, subdivided in four groups. Each group was given a diet enriched with cholesterol and palm oil and they were sacrificed at 8, 13, 18 and 24 weeks of age. Results were as following. (1) Mice given high fat/high cholesterol diets developed an impairment of liver histology consisting of fat accumulation, macrophage proliferation, and inflammation. (2) These effects were modulated by the type of fat: olive oil was mainly associated with macrovesicular steatosis and cholesterol plus palm oil with severe steatohepatitis. (3) There was a chronological and quantitative relationship between liver impairment and the formation of atheromatous lesions. We conclude that apolipoprotein E-knockout mice may be a useful model for investigating the mechanisms of diet-induced steatohepatitis. (*Mol Cell Biochem* **268**: 53–58, 2005)

Key words: animal models, inflammation, lipoproteins, oxidative stress, steatohepatitis

Introduction

Gene modification technology has provided a number of knockout (KO) and transgenic mice models suitable for studying atherosclerosis [1]. One of the most common models is the apolipoprotein (apo) E-KO mouse [2–4]. Apo E is a constituent of most lipoproteins. It functions as a ligand for receptors that clear chylomicrons and very low-density lipoprotein (VLDL) remnants. Homozygous animals for the altered *apo E* gene develop advanced atherosclerotic lesions even when fed regular mouse chow, but adding cholesterol alone or in combination with fat to the diet exacerbates the

lesion and reduces the induction period [5–7]. This animal model has been extensively investigated since alterations are very similar to those observed in human atherosclerosis. However, we have previously observed [8] that apo E-KO mice also develop severe hepatic alterations that are consistent with steatohepatitis (micro- and macrovesicular steatosis, macrophage proliferation and inflammatory nodules) when they are fed a Western-type diet (rich in fat and cholesterol), but not when they are fed standard mouse chow. These alterations may be a drawback of this model in the study of cardiovascular diseases and were observed in the absence of well-known dietary hepatotoxic inducers such as cholic acid.

Much is still unknown about the pathophysiology of steatohepatitis in humans. At the moment, it is unclear whether certain diets are more likely to cause fatty liver than others. Given the difficulty of studying all the factors involved in food intake in human populations, studies that manipulate dietary composition in animal models might provide crucial insights into the role of diet in the pathogenesis of steatohepatitis [9]. The present study was conceived to explore the possibilities of apo E-KO mice as a model for diet-induced steatohepatitis. It consists of two protocols. Protocol 1 was designed to study the effect of several cholesterol and fat enriched diets on the development of steatohepatitis in apo E-KO mice. Protocol 2 was designed to investigate the chronological relationships between the development of hepatic alterations, atherosclerotic lesions and the increase in plasma cholesterol concentrations in this experimental model.

Materials and methods

Experimental animals and study design

The study was performed in homozygous male apo E-KO mice produced by gene targeting to disrupt the gene in embryonic stem cells [2]. These animals were hybrids of the C57BL/6J and 129 Ola strains, and were the progeny of those initially described by Piedrahita *et al.* [10].

Protocol 1: Ninety mice were housed in sterile filter-top cages with a humidity level of 50–60% and a 12-h light–dark cycle. The animals were fed a commercial mouse diet (B&K Universal Ltd., Humberside, UK) until the experiment began at 8 weeks of age. At this point, the mice were divided in five groups ($n = 18$) and fed with five different experimental diets: group 1, standard diet; group 2, standard diet plus 0.1% (w/w) cholesterol supplementation (Sigma Chemical Co.); group 3, standard diet plus 20% (w/w) olive oil supplementation (Agra-Unilever, Bilbao, Spain); group 4, standard diet plus 0.1% (w/w) cholesterol and 20% olive oil supplementation; and group 5, standard diet plus 0.1% (w/w) cholesterol and 20% palm oil supplementation. The composition of the high-fat diets has been described elsewhere [11]. The content of total energy, carbohydrate, proteins and fat was similar but the olive oil supplemented diet was richer in mono- and poly-unsaturated fatty acids (PUFA) than the palm oil supplemented diet. These diets were not fortified with cholic acid. All the mice were sacrificed at 18 weeks of age. First they were anaesthetised with avertin (2,2,2-tribromoethanol) and then cardiac puncture was practised. Blood was removed and centrifuged to obtain plasma so that cholesterol could be determined. After perfusion with phosphate-buffered saline (PBS), the liver was removed, washed in PBS and fixed with 4% formaldehyde for 24 h, processed and embedded

in paraffin so that the histological examination could be performed.

Protocol 2: This study was performed in 42 mice of 8 weeks of age that were fed a diet supplemented with 0.1% (w/w) cholesterol and 20% (w/w) palm oil. Groups of eight mice each were sacrificed at 8 (control group), 13, and 24 weeks of age. An additional group of 18 mice sacrificed at 18 weeks of age coincided with group 5 from protocol 1. Plasma was obtained after cardiac puncture for lipoprotein fractionation and cholesterol analysis, and the livers were removed and processed as before. In addition, the hearts were removed after perfusion with PBS, sectioned transversely, embedded in OCT and immediately frozen with liquid nitrogen so that the atherosclerosis lesions could be quantified.

Histological analysis of the liver

The liver tissue was cut in sections 3- μ m thick and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Histological analysis was performed by a pathologist (F.R.) who was blinded to the treatment groups. Macrovesicular steatosis was evaluated by estimating the percentage of area covered by fat droplets. The amount of inflammation was estimated by a score graded from 0 to 3 [12]. (0: null; 1: when inflammatory cells or groups of inflammatory cells were observed in up to 30% of the microscope fields; 2: when they were observed in between 30 and 60% of the fields; 3: when they observed in more than 60% of the fields). The amount of macrophages was estimated by using an equivalent score.

Quantification of atherosclerosis lesion

The size and number of lesions in the proximal aortic region were evaluated in the frozen hearts as described elsewhere [13]. Ten-micrometer-thick sections were made at intervals of 20 μ m sequentially throughout the aortic sinus. To quantify the atherosclerotic lesion area, slides were stained with Sudan red IV B and counterstained with H&E. All slides were reviewed and four sections spanning the region from the very proximal aorta to the point of the aortic sinus that contains three complete valves were used for morphometric evaluation according to the features previously outlined by Paigen *et al.* [14]. The lesion area was quantified by using a digitising morphometry image-analysis system (AnaliSYS, Soft Imaging System, Münster, Germany).

Cholesterol measurements and distribution among lipoproteins

Plasma cholesterol was measured by the cholesterol oxidase method (ITC Diagnostics, Barcelona, Spain) in an ILab 1800 automatic analyser (Izasa, Barcelona). In protocol 2, the

plasma samples from the mice were pooled and gel-filtered through a Superose 6HR column mainly as described in [15] in a FPLC System (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Each fraction obtained from the column was assayed enzymatically for cholesterol concentration.

Statistical analysis

We used standard methods (Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wills) to check whether the variables were normally distributed. When the distributions were continuous and parametric, multiple comparisons among the groups were performed by ANOVA. When they were discontinuous (the histological scores) or non-parametric, the comparisons were performed by the Kruskal-Wallis test. Differences between two groups were analysed by Scheffé's *post hoc* test or the *U*-Mann-Whitney test. Correlations between variables were examined by Pearson's correlation coefficient (parametric) or Kendall's τ test (when at least one variable was discontinuous). A significant difference was defined as $p < 0.05$.

Statistical analysis was carried out by using SPSS 11.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

Protocol 1

The hepatic histology of the mice fed with a standard diet was normal, except that microsteatosis was observed in some cases. In contrast, we observed marked hepatic disturbances in all the animals given diets that were rich in fat and/or cholesterol (Fig. 1). These changes consisted of macrovesicular steatosis, an abnormally high amount of foamy macrophages, and the presence of clusters of polymorphonuclear and mononuclear leukocytes forming inflammatory nodules.

Variations in the histopathological scores and plasma cholesterol concentrations are shown in Table 1. The type of diet markedly influenced the hepatic morphological alterations. The percentages of macrovesicular steatosis were

Table 1. Values of selected parameters in mice belonging to protocol 1

Diet group	Group 1 (standard)	Group 2 (cholesterol)	Group 3 (olive oil)	Group 4 (cholesterol + olive oil)	Group 5 (cholesterol + palm oil)
Plasma cholesterol (mmol/l)	14.5 $\pm$ 4.9	33.5 $\pm$ 7.1 ^c	28.5 $\pm$ 9.4 ^b	39.4 $\pm$ 5.1 ^{c,f}	73.7 $\pm$ 17.5 ^{c,e,h,j}
Macrovesicular steatosis (%)	1.4 $\pm$ 3.6	13.1 $\pm$ 16.3 ^k	29.7 $\pm$ 16.8 ^b	48.3 $\pm$ 31.9 ^c	32.9 $\pm$ 15.3 ^a
Macrophages score	0	1.9 $\pm$ 0.7 ^{c,h}	0.8 $\pm$ 0.7 ^b	1.8 $\pm$ 0.9 ^{c,g}	2.6 $\pm$ 0.5 ^{c,d,h,i}
Inflammation score	0	1.6 $\pm$ 0.5 ^b	1.3 $\pm$ 0.6 ^{a,e}	1.8 $\pm$ 0.7 ^c	1.9 $\pm$ 0.4 ^{c,g}

^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.001$ vs. group 1; ^d $p < 0.05$, ^e $p < 0.001$ vs. group 2; ^f $p < 0.05$ ^g $p < 0.01$, ^h $p < 0.001$ vs. group 3; ⁱ $p < 0.05$, ^j $p < 0.001$ vs. group 4.

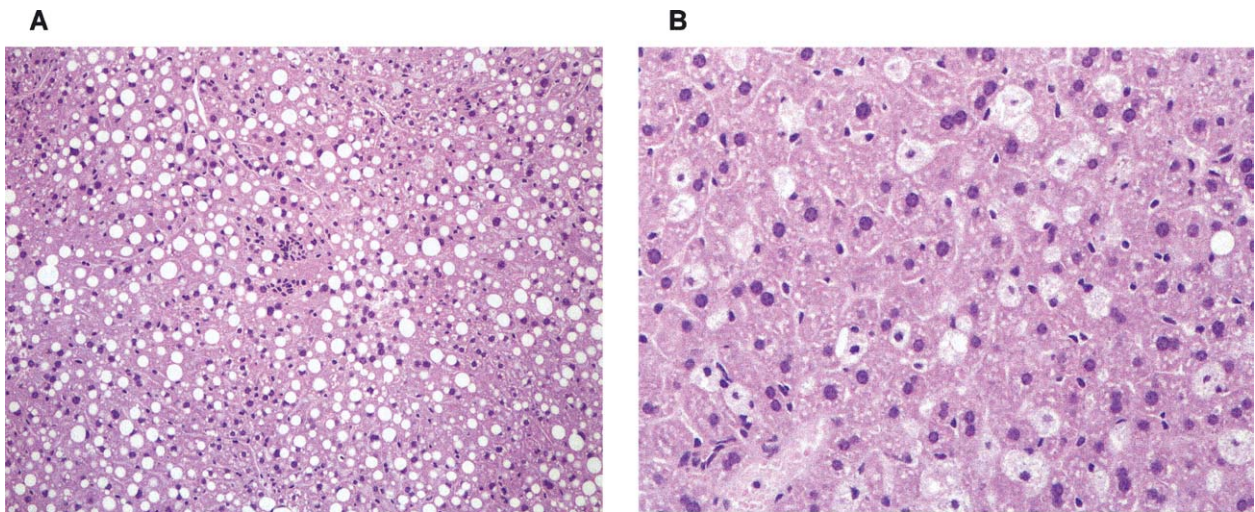


Fig. 1. Representative examples of liver-tissue sections from mice given high-cholesterol/high-fat diets. (A) Macrovesicular steatosis and inflammatory clusters (H&E, 200 $\times$). (B) Foamy macrophages and inflammation (H&E, 400 $\times$).

lower in the mice fed with a standard diet and a standard diet plus cholesterol, intermediate in those fed with olive oil alone or palm oil plus cholesterol, and higher in those fed with olive oil plus cholesterol. The macrophage score was zero in mice fed with a standard diet, intermediate in mice fed with olive oil alone, and highest in mice fed with a diet rich in cholesterol, alone or in combination with fat. The inflammation score followed a similar pattern, although the differences between the mice given olive oil alone and the mice given the other experimental diets were not so marked. There were significant correlations between plasma cholesterol concentrations and the macrophage score ($\tau = 0.62$; $p < 0.001$) and between plasma cholesterol concentrations and the inflammation score ($\tau = 0.35$; $p < 0.001$). There also were significant correlations between the percentage of macrovesicular steatosis and the inflammation score ($\tau = 0.32$; $p = 0.001$), and between the inflammation and the macrophage scores ($\tau = 0.39$; $p < 0.001$).

Protocol 2

Table 2 shows longitudinal changes in hepatic histopathological scores, atheromatous lesion sizes, and plasma cholesterol concentrations. All the parameters studied progressively increased between 8 and 18 weeks of age (10 weeks of treatment), but tended to decrease at 24 weeks, perhaps indicating that the mice had a certain ability to adapt to the experimental conditions. Figure 2 shows that temporary changes in plasma cholesterol concentrations were mainly related to a marked increase in the plasma levels of VLDL and low-density lipoproteins (LDL). Bivariate correlation analysis showed that the atheromatous lesion size was significantly related to plasma cholesterol concentrations ($r = 0.79$; $p < 0.001$), the macrophage score ($\tau = 0.50$; $p < 0.01$) and the inflammation score ($\tau = 0.42$; $p < 0.05$). When a multivariate analysis was used, however, lesion size showed a significant and independent association only with plasma cholesterol concentration ($p < 0.01$). There were also significant

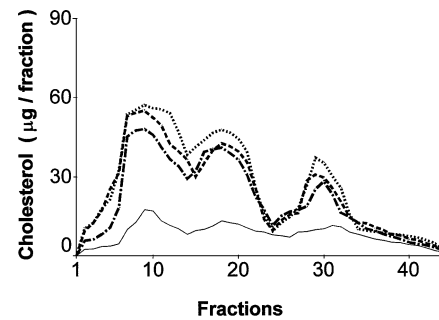


Fig. 2. Cholesterol concentrations in FPLC fractions from pooled plasma of mice belonging to protocol 2 at 8 (—), 13 (---), 20 (....) and 24 (— · —) weeks of age. Fractions 1–13 represent the very low-density lipoproteins, fractions 14–23 low-density lipoproteins, and fractions ≥ 24 high-density lipoproteins.

correlations between plasma cholesterol concentration and the number of macrophages ($\tau = 0.67$; $p < 0.001$), inflammation score ($\tau = 0.47$; $p < 0.01$), and macrovesicular steatosis ($\tau = 0.45$; $p < 0.01$).

Discussion

The present study shows that: (a) apo E-KO mice given Western diets rich in fat and/or cholesterol develop a profound impairment of liver histology (fat accumulation, macrophage proliferation, and inflammation); (b) the effects of cholesterol/fat-rich diets are modulated by the type of fat administered; and (c) there is a chronological and quantitative relationship between liver impairment and atheromatous lesion formation.

Ludwig *et al.* [16] introduced the term non-alcoholic steatohepatitis to describe a form of human liver disease that is histologically indistinguishable from alcoholic hepatitis but occurs in persons who do not consume excess alcohol. This disease has become a focus of increasing medical attention since obesity, hyperlipidemia, and disturbances related to excessive or unbalanced food ingestion have reached epidemic proportions in the developed world [17–19]. Human steatohepatitis includes a wide range of changes, from steatosis to cirrhosis [20]. Recently, it has been proposed as a premalignant condition that may ultimately lead to hepatoma [21].

Several animal models have been proposed for the study of hepatic steatosis and steatohepatitis (reviewed in [9] and [22]). Genetically modified mice with increased hepatic lipogenesis develop fatty livers, but not overt hepatic inflammation [23–25]. *Ob/ob* obese mice develop steatosis, and treatment with bacterial endotoxin or ethanol results in steatohepatitis [26–28]. Some diets, like high sucrose and fructose, can induce fatty livers in unmodified, lean, rats [29]. One of the things that most of these models have in common

Table 2. Values of selected parameters in mice belonging to protocol 2

Age (weeks)	8	13	18	24
Plasma cholesterol (mmol/l)	15.3 $\pm$ 5.6	45.0 $\pm$ 11.1 ^a	73.3 $\pm$ 17.5 ^{c,e}	66.7 $\pm$ 15.7 ^c
Atheroma lesion size (μm^2) $\times 10^3$	0	20.4 $\pm$ 17.3 ^a	112.4 $\pm$ 55.6 ^{b,d}	86.8 $\pm$ 62.6
Macrovesicular steatosis (%)	1.7 $\pm$ 4.1	17.5 $\pm$ 15.4	32.9 $\pm$ 15.3 ^b	13.8 $\pm$ 13.8
Macrophage score	0	2.3 $\pm$ 0.5 ^b	2.6 $\pm$ 0.5 ^b	2.3 $\pm$ 1.0 ^b
Inflammation score	0	2.3 $\pm$ 0.5 ^b	1.9 $\pm$ 0.4 ^b	1.8 $\pm$ 0.5 ^b

^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.001$ vs. 8 weeks of age; ^d $p < 0.05$, ^e $p < 0.01$ vs. 13 weeks of age.

is that, although steatosis develops spontaneously and quite easily, progression to steatohepatitis is more difficult. In contrast, results from the present investigation show that apo E-KO mice fed high cholesterol/high fat diets develop a severe and reproducible steatohepatitis in only 10 weeks of treatment, which is a reasonable experimental time.

However, the molecular mechanisms underlying these alterations are, at present, unknown. Some studies suggest that apo E may play a significant role in the intracellular metabolism of lipids. Kuipers *et al.* [30] showed that, in mice fed with standard chow, apo E deficiency leads to hepatic accumulation of free cholesterol and triacylglycerol, which could explain the microvesicular steatosis observed in some of our control animals. It has also been reported that apo E-KO mice cannot correctly down-regulate dietary cholesterol absorption or stimulate biliary excretion when fed with a high-cholesterol diet [31]. Therefore, it seems that apo E deficiency may be a factor that predisposes to steatohepatitis.

The present study shows that lesions are modulable—at least to a certain extent — by the type of fat administered. Thus, olive oil administration was mainly associated with macrovesicular steatosis, while cholesterol plus palm oil was associated with a more severe disturbance involving macrophage proliferation and inflammation. These differences may be explained by the chemical composition of the oils. Olive oil is richer in PUFA and Vitamin E than palm oil [11, 32] and this is, perhaps, related to the differences in the histological lesions. The finding of advanced lesions in animals given cholesterol plus palm oil agree with previous studies showing an increase of the hepatic production of lipid peroxidation products in apo E-KO mice given this type of diet [32]. In the present study, we have observed that the administration of cholesterol plus palm oil often produces an extremely high increase in macrophages (see Fig. 1B). We cannot ascertain, from the present data, whether this increase in macrophage number is the consequence of Kupffer cell proliferation or the result of an increased recruitment of circulating monocytes. However, these animals may provide a good experimental basis for investigating the role of macrophages in steatohepatitis. Macrophages are involved in phagocytosis, and secrete pro-inflammatory cytokines, nitric oxide and reactive oxygen intermediates [33]. All these factors intervene in the recruitment of inflammatory cells and in the increase of hepatocyte apoptosis, which in turn lead to the development of steatohepatitis [33–36].

Another suggestive characteristic of the present model is the close chronological and quantitative relationship between the severity of the hepatic and the atheromatous lesions in the mice fed with cholesterol and palm oil. This suggests that common circulating factors may induce inflammatory reactions in these distant tissues. Lipoproteins are an obvious link between the liver and the atheroma plaque. All animals showed a marked increase in plasma cholesterol

concentration associated to atherogenic lipoproteins (VLDL and LDL), and the degree of increase paralleled the severity of the tissular lesions in the liver and the aorta. In addition to hyperlipoproteinemia *per se*, another possible link is that mice with steatohepatitis had a higher plasma concentration of oxidised lipoproteins. VLDL rich in oxidised phospholipids are likely to be produced in livers with a high number of macrophages synthesizing reactive oxygen species. These altered lipoproteins have been reported to increase the expression of nuclear factor- κ B, a transcriptional regulatory element that stimulates the production of proinflammatory cytokines by tissues [12, 37].

Further studies are necessary if the molecular mechanisms of these alterations are to be ascertained but our findings suggest that apo E-KO mice may provide an experimental model for the effect of Western diet on the development of steatohepatitis.

Acknowledgements

The authors thank Alberto Ameijide for his advice on the statistical analysis. This study was supported by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria (00/0252 and 00/0291), the Red Nacional de Centros (C03/08) and the Red Nacional de Grupos de Investigación (G03/140). N.F. and M.T. were recipients of fellowships from the Generalitat de Catalunya (99-FI-790 and 02-FI-806, respectively).

References

1. Moghadasian MH: Experimental atherosclerosis. A historical overview. *Life Sci* 70: 855–865, 2002
2. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N: Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258: 468–471, 1992
3. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL: Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71: 343–353, 1992
4. van Ree JH, van der Broek WJ, Dahlmans VE, Groot PH, Vidgeon-Hart M, Frants RR, Wieringa B, Havekes LM, Hofker MH: Diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in heterozygous apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 111: 25–37, 1994
5. Hofker MH, van Vlijmen BJ, Havekes LM: Transgenic mouse models to study the role of ApoE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 137: 1–11, 1998
6. Moghadasian MH, Pritchard HP, McManus BM, Frohlich JJ: “Tall-oil” derived phytosterol mixture reduces atherosclerosis in apo E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 11, 1997
7. Osada J, Joven J, Maeda N: The value of apolipoprotein E knockout mice for studying the effects of dietary fat and cholesterol on atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* 11: 25–29, 2000
8. Tous M, Ferré N, Camps J, Joven J: Efectos de la dieta hipercolesterolemia en el animal de experimentación. *Clin Invest Arterioscler* 14: 107, 2002

9. Koteish A, Diehl AM: Animal models of steatosis. *Sem Liver Dis* 21: 89–104, 2001
10. Piedrahita JA, Zhang SH, Hagaman JR, Oliver PM, Maeda N: Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E-gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 4471–4475, 1992
11. Calleja L, París MA, Paul A, Vilella E, Joven J, Jiménez A, Beltrán G, Uceda M, Maeda N, Osada J: Low-cholesterol and high-fat diets reduce atherosclerotic lesion development in apoE-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 2368–2375, 1999
12. Laurila A, Cole SP, Merat S, Obonyo M, Palinski W, Fierer J, Witztum JL: High-fat, high-cholesterol diet increases the incidence of gastritis in LDL receptor-negative mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21: 991–996, 2001
13. Tangirala RK, Rubin EM, Palinski Q: Quantitation of atherosclerosis in murine models: Correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesion between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res* 36: 2320–2328, 1995
14. Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA: Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 68: 231–240, 1987
15. Vilella E, Joven J, Fernández M, Vilaró S, Brunzell JD, Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G: Lipoprotein lipase in human plasma is mainly inactive and associated with cholesterol-rich lipoproteins. *J Lipid Res* 34: 1555–1564, 1993
16. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Ott BJ: Non-alcoholic steatohepatitis. Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 55: 434–438, 1980
17. Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR: Nonalcoholic steatohepatitis. *Med Clin North Am* 80: 1147–1166, 1996
18. Ludwig J, McGill DB, Lindor KD: Review: Nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 12: 398–403, 1997
19. Baffy G, Zhang CY, Glickman JN, Lowell BB: Obesity-related fatty liver is unchanged in mice deficient for mitochondrial uncoupling protein 2. *Hepatology* 35: 753–761, 2002
20. Brunt EM, Janney CG, Di Besceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR: Nonalcoholic steatohepatitis: A proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 94: 2467–2474, 1999
21. Yang SQ, Lin HZ, Hwang J, Chacko VP, Diehl AM: Hepatic hyperplasia in noncirrhotic fatty livers: Is obesity-related hepatic steatosis a premalignant condition? *Cancer Res* 61: 5016–5023, 2001
22. Koteish A, Diehl AM: Animal models of steatohepatitis. *Best Practice Res Clin Gastroenterol* 16: 679–690, 2002
23. Shimano H, Horton JD, Hammer RE, Shimomura I, Brown MS, Goldstein JL: Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J Clin Invest* 98: 1575–1584, 1996
24. Shimomura I, Hammer RE, Richardson JA, Ikemoto S, Bashmakov Y, Goldstein JL, Brown MS: Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: Model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev* 12: 3182s–3194s, 1998
25. Moitra J, Mason MM, Olive M, Krylov D, Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Feigenbaum L, Lee E, Aoyama T, Eckhaus M, Reitman ML, Vinson C: Life without white fat: A transgenic mouse. *Genes Dev* 12: 3168–3181, 1998
26. Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM: Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: Implications for pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2557–2562, 1997
27. Chavin KD, Yang S, Lin HZ, Chatham J, Chacko VP, Hoek JB, Walajtys-Rode E, Rashid A, Chen CH, Huang CC, Wu TC, Lane MD, Diehl AM: Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *J Biol Chem* 274: 5692–5700, 1999
28. Faggioni R, Fantuzzi G, Gabay C, Moser A, Dinarello CA, Feingold KR, Grunfeld C: Leptin deficiency enhances sensitivity to endotoxin-induced lethality. *Am J Physiol* 276: R136–R142, 1999
29. Poulosom R: Morphological changes of organs after sucrose or fructose feeding. *Progr Biochem Pharmacol* 21: 104–134, 1986
30. Kuipers F, van Ree JM, Hofker MH, Wolters H, In't Veld G, Havinga R, Vonk RJ, Princen HM, Havekes LM: Altered lipid metabolism in apolipoprotein E-deficient mice does not affect cholesterol balance across the liver. *Hepatology* 24: 241–247, 1996
31. Sehayek E, Shefer S, Nguyen LB, Ono JG, Merkel M, Breslow JL: Apolipoprotein E regulates dietary cholesterol absorption and biliary cholesterol excretion: Studies in C57BL/6 apolipoprotein E knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3433–3437, 2000
32. Ferré N, Camps J, Paul A, Cabré M, Calleja L, Osada J, Joven J: Effects of high-fat, low-cholesterol diets on hepatic lipid peroxidation and antioxidants in apolipoprotein E-deficient mice. *Mol Cell Biochem* 218: 165–169, 2001
33. Diehl AM: Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis IV. Nonalcoholic fatty liver disease abnormalities in macrophage function and cytokines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G1–G5, 2002
34. Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B: Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G193–G199, 2002
35. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN: Nonalcoholic steatohepatitis: Association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 120: 1183–1192, 2001
36. Chitturi S, Farrell GC: Ethio-pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Sem Liver Dis* 21: 27–41, 2001
37. Liao F, Andalibi A, Qiao JH, Allayee H, Fogelman AM, Lusis AJ: Genetic evidence for a common pathway mediating oxidative stress, inflammatory gene induction, and aortic fatty streak formation in mice. *J Clin Invest* 94: 877–884, 1994

Estudi 3

Tous M, Ribas V, Ferre N, Escola-Gil JC, Blanco-Vaca F, Alonso-Villaverde C, Coll B, Camps J, Joven J.
Turpentine-induced inflammation reduces the hepatic expression of the multiple drug resistance gene, the plasma cholesterol concentration and the development of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice.
Biochim Biophys Acta. 2005;1733:192-198.

Regular paper

Turpentine-induced inflammation reduces the hepatic expression of the multiple drug resistance gene, the plasma cholesterol concentration and the development of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice

Mònica Tous^{a,1}, Vicent Ribas^{b,1}, Natàlia Ferré^a, Joan Carles Escolà-Gil^b, Francisco Blanco-Vaca^b, Carlos Alonso-Villaverde^a, Blai Coll^a, Jordi Camps^a, Jorge Joven^{a,*}

^aCentre de Recerca Biomèdica, Institut de Recerca en Ciències de la Salut (IRCS), Hospital Universitari de Sant Joan, C/ Sant Joan s/n, 43201-Reus, Spain

^bServei de Bioquímica, Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, C/ Antoni M Claret, 167, 08025 Barcelona, Spain

Received 9 August 2004; received in revised form 21 December 2004; accepted 4 January 2005

Available online 14 March 2005

Abstract

We aimed to investigate the effect of turpentine-induced inflammation in an atherosclerosis-prone murine model. We have induced a chronic aseptic inflammation in apolipoprotein E-deficient mice, with or without a dietary supplement of aspirin ($n=10$, each), by the injection of a mixture (1:1) of turpentine and olive oil in the hind limb twice weekly for a period of 12 weeks. Control animals were injected with olive oil alone ($n=10$). The control mice did show any alteration neither in plasma nor at the site of injection. Turpentine-treated mice showed a significant increase in plasma TNF- α and SAA concentrations which indicated a systemic inflammatory response that was not substantially affected by aspirin. Also, turpentine injections significantly reduced the plasma cholesterol concentration, probably decreasing intestinal cholesterol re-absorption, and attenuated the size of atherosclerotic lesion. Both effects were minimally influenced by aspirin. The burden of atherosclerosis correlated with plasma lipid levels but not with plasma inflammatory markers. Finally, there was a concomitant decrease in the expression of the hepatic *mdr1b* gene that correlated with the decrease in plasma cholesterol concentration. Therefore, we conclude that *mdr1* is an additional factor to consider in the complexity of alterations in cholesterol metabolism that occur in this model. © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Apo-E-deficient mice; Absorption; Arteriosclerosis; Cholesterol; Inflammation; *mdr1b*

Inflammation plays a major role in the pathogenesis of atherosclerosis [1,2]. It is commonly accepted that chronic inflammation, as observed in periodontal disease [3,4], lupus erythematosus [5], rheumatoid arthritis [6], or chronic bronchitis [7], contributes to higher mortality and morbidity from cardiovascular disease. As such, it is of considerable importance to ascertain the long-term effects of chronic inflammation and the effect of anti-inflammatory agents on the development and progression of atherosclerosis. We have explored this issue in apolipoprotein E (apo E)

deficient mice which, following the subcutaneous injection of turpentine for a protracted period of time, developed local, chronic and aseptic inflammation.

Tissue inflammation is associated with changes in cytokine secretion that regulate the expression of several genes. During the inflammatory response, as demonstrated in rats and mice [8,9], there is a down-regulation of the hepatic multiple-drug resistance (*mdr*) gene. The class I P-glycoproteins that are encoded by the *MDR1(ABCB1)* in humans and by the *mdr1a* and *mdr1b* genes in rodents have also been implicated directly in atherogenesis [10–12]. For instance, in human arteries [13], there is a positive correlation between *MDR1* gene expression and the atherosclerotic lesion size and P-glycoproteins have been implicated in the acceleration in the rate of cell growth in vessel

* Corresponding author. Tel.: 34 977 310300; fax: 34 977 312569.

E-mail address: jjoven@grupsagessa.com (J. Joven).

¹ These authors contributed equally.

sites prone to atherosclerosis [13,14]. Moreover, mice that are deficient in *mdr1a* and *mdr1b* P-glycoproteins have been shown to have a reduced plasma cholesterol concentration with increased faecal sterol loss, suggesting an important role of this gene in regulating the balance of cholesterol re-absorption versus excretion [15,16].

In the present report, we demonstrate that, as a response to a local, chronic inflammation there was a relative decrease in hepatic *mdr1b* gene expression and a lower plasma cholesterol concentration. Despite the increase in plasma inflammatory markers this combination of factors resulted in a significant decrease in the atherosclerotic lesion size.

1. Materials and methods

1.1. Experimental animals and study design

The apo E deficient mice were in a C57BL/6J background. Mice of 12 weeks of age were housed in sterile filter-top cages with a humidity level of 50–60% and a 12-h light–dark cycle and were fed a commercial mouse diet (B&K Universal, N. Humberside, UK). Subcutaneous injection under isofluorane anaesthesia was into the hind limb twice weekly for 12 weeks with either 100 μ L of a 1:1 mixture of turpentine oil (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and olive oil (treatment group; $n=20$) or the same amount of olive oil alone (control group; $n=10$). The treatment group was further divided into 2 subgroups ($n=10$, each): one without further modifications and the other in which aspirin was administered with the drinking water as previously described [17]. At 24 weeks of age, mice were sacrificed and the relevant variables analysed. We further studied 16 additional mice that were equally treated with either turpentine ($n=8$) or olive oil ($n=8$) for 4 weeks. They were subdivided into two control and two treatment groups (each $n=4$) for the measurement of intestinal cholesterol absorption or the *in vivo* triglyceride production rate. All the procedures described were in accordance with the ethical guidelines of the Hospital Universitari de Sant Joan and the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

1.2. Histological analyses

Microscopic examination was performed on the stomach, liver, kidneys, lungs and spleen of all animals. To assess the extent and characteristics of local inflammation, tissue from the hind limb was also evaluated. Tissues were removed, fixed for 24 h in 10% neutral-buffered formalin, processed and embedded in paraffin. Sections were stained with hematoxylin and eosin.

1.3. Inflammatory markers and other biochemical variables

In order to measure serum amyloid A (SAA) concentration with a commercially available ELISA kit (Biosource,

Camarillo, USA), blood was obtained from the tail veins of mice once every 2 weeks, immediately before the injection. To measure the other variables, blood was obtained from each animal at the moment of sacrifice and collected into tubes containing EDTA. Assays for plasma TNF- α were performed by ELISA (Prepotech, London, UK) according to the manufacturer's instructions. Plasma cholesterol, triglyceride, albumin and bilirubin concentrations, as well as the activities of the aminotransferases were determined by standard laboratory procedures. Liver tissue content of cholesterol and triglycerides was determined following lipid extraction with isopropyl alcohol-hexane as described previously [18]. Plasma was also filtered through a Superose 6HR gel FPLC column, as described [19]. Each fraction obtained from the column was assayed for total and free cholesterol.

1.4. Quantitation of atherosclerosis and immunohistochemistry

Immediately following the exsanguinations through cardiac puncture, the vascular tree was perfused with phosphate buffered saline. Once the hearts and 2 mm below the ascending aorta had been removed, they were cut transversely, embedded in OCT and immediately frozen. Sections were made at intervals of 20 μ m, stained with Sudan IV and counterstained with hematoxylin and eosin. Morphometric evaluation was performed as described [20,21]. The lesion area (percentage of surface area) was quantified by using AnalSYSTM (Soft Imaging System, Münster, Germany). Cryosections ($n=3$ –5 per mouse) were stained with MOMA-2 (rat anti-mouse macrophages/monocytes; Serotec, Oxford, UK). Images were acquired, and the area was measured with the image-analysis system.

1.5. Analysis of mRNA expression by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction

Total RNA was isolated from liver tissue using the ABI PRISM 6100 (Applied Biosystems, Foster City, USA). One microgram of total RNA was reverse transcribed to cDNA using random hexamers and MultiScribe Reverse Transcriptase following the manufacturer's instructions based upon the 5' nuclease assay with 18S ribosomal RNA as endogenous control. TaqMan primers and probes for *mdr1b* and *18S* were obtained from validated and pre-designed Assays-on-Demand products (Applied Biosystems) and were used in real time PCR amplifications. The *mdr1b* mRNA expression for each sample was calculated using the recommended $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The samples belonging to the control group were defined as the calibrator in this experiment, and therefore the amount of *mdr1b* transcripts in the other samples are dimensionless numbers relative to the calibrator levels.

1.6. Other laboratory measurements

To measure cholesterol absorption we used a faecal dual-isotope ratio method using a mixture of 2 μCi [5,6- ^3H]sitostanol (American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, MO, USA) and 1 μCi [4- ^{14}C]cholesterol (NEN Life Science Products, Boston, MA) and the measurement of relevant variables in plasma and stools [22]. Lipids were extracted from diet and stools with isopropyl alcohol–hexane (2:3 v/v), bile removed from the gallbladders and concentrations of cholesterol measured enzymatically. Stools from individually-housed mice collected over 3 days were dried, weighed, and bile acids of 0.5 g of faeces were extracted in ethanol and used to determine total bile acid content by the 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase method (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO).

Triglyceride production rates in plasma were measured as described [18] after the intravenous injection of 500 mg/kg Triton WR-1339 (Sigma) to block lipoprotein lipase-mediated lipolysis. Blood was sequentially collected after the injection and plasma triglycerides measured and compared with baseline results.

1.7. Statistical analyses

Data were analyzed using ANOVA or Student's unpaired *t* test, with the level of significance set at $P < 0.05$. The SPSS/PC+11.0 (SPSS, Chicago, IL) software was used throughout. When necessary, the association between variables was examined with the Spearman's rank correlation test.

2. Results

2.1. Body weight and nutritional status

There were no differences between the control and treatment groups in terms of mobility, behaviour, or water and food intake throughout the study. Most mice showed a comparable, steady weight gain over the course of the study (Table 1). Plasma albumin concentration in treated mice was similar to that obtained in controls.

2.2. Characteristics of the local inflammation and the plasma inflammatory response markers

Except for non-inflammatory lipid vesicles that were observed in a few cases, the control mice did not show any alteration at the point of injection. Conversely, all turpentine-injected mice developed a significant inflammatory response (Fig. 1). Lesions were characterized by a thickened dermal layer, infiltrated with inflammatory cells which, in many cases, were found in the muscular layer. Inflammatory nodules were also observed in most cases. Supplementation with aspirin did not produce significant effects. The

Table 1

Body weight, nutritional status and selected plasma variables in apolipoprotein E-deficient mice

	Control	Turpentine+ aspirin	Turpentine
Body weight (g)			
Baseline	25.8 $\pm$ 1.5	26.0 $\pm$ 1.8 ^a	23.6 $\pm$ 2.7*
Final	29.1 $\pm$ 1.6	29.2 $\pm$ 3.3	27.9 $\pm$ 3.4
Body weight increase (%)	13.1 $\pm$ 7.8	12.5 $\pm$ 10.0	18.2 $\pm$ 6.7
Plasma albumin (g/L)	26.2 $\pm$ 2.1	28.0 $\pm$ 2.7	25.8 $\pm$ 4.9
Plasma cholesterol (mmol/L)			
Baseline	4.8 $\pm$ 0.4	6.0 $\pm$ 2.0	5.2 $\pm$ 1.0
Final	9.1 $\pm$ 1.5	6.3 $\pm$ 0.9 ^{a,b}	5.1 $\pm$ 1.4 ^b
Plasma triglycerides (mmol/L)			
Baseline	0.4 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.2
Final	1.0 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.9
ALT activity ($\mu\text{kat/L}$)	0.5 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.2
Hepatic lipid content (nmol/mg)			
Cholesterol	6.0 $\pm$ 1.3	5.6 $\pm$ 1.8	7.2 $\pm$ 1.5
Triglycerides	10.5 $\pm$ 6.2	6.3 $\pm$ 2.4	8.2 $\pm$ 4.9

^a $P < 0.05$ with respect to turpentine-only treated mice.

^b $P < 0.01$ with respect to control group.

* $P < 0.05$ with respect to control group.

systemic response, as measured by plasma SAA concentrations, increased significantly following the inflammatory stimulus. Mice in the control group showed values lower than 100 mg/L throughout the study whereas turpentine-injected animals showed a steady increase over the 12 weeks of follow-up; the values reaching $>3\text{g/L}$ in most animals by the end of the study (Fig. 2A). At this point, there was a significantly increased plasma Tumor Necrosis Factor (TNF- α) concentration in turpentine-treated mice (Fig. 2B). Aspirin-supplemented animals showed lower plasma SAA concentration than did their counterparts, but had similar plasma TNF- α concentrations (Fig. 2).

2.3. Effects on plasma lipid levels and liver lipid content

At the end of the study, plasma cholesterol concentration was significantly lower ($P < 0.01$) in turpentine-treated mice than in controls. This hypocholesterolemic effect was also significant in the group supplemented with aspirin ($P < 0.01$) (Table 1). As shown in the lipoprotein size fractionation (Fig. 3) this was mainly due to a significant decrease in the cholesterol content of VLDL; the effect being maximal in the turpentine-only treated mice. The composition of HDL was similar in all groups. The injection of turpentine did not produce significant effects in the cholesterol and triglyceride content in the liver (Table 1). The relative proportion of free cholesterol between the control and treated groups was similar in all the measurements indicating normality in the cholesterol esterification process (data not shown).

2.4. Effect on aortic arteriosclerosis

The size of atherosclerotic lesions in mice treated with turpentine, with or without the aspirin supplement, was significantly lower than that observed in controls (Fig. 4).

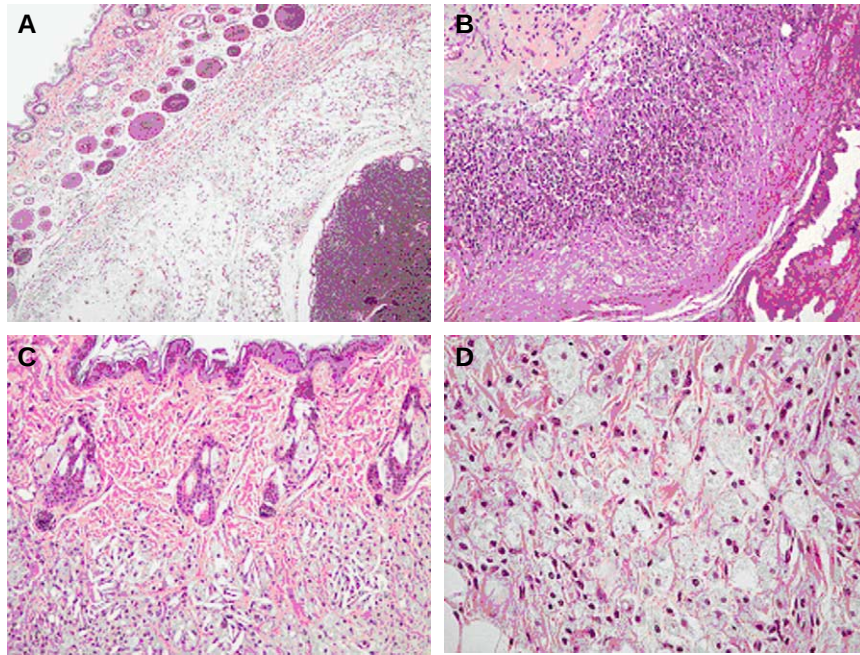


Fig. 1. Histology lesions (H&E-stained sections) at the site of the injection of turpentine, include thickening of the dermis (A, $\times 4$) and the presence of inflammatory nodules (B, $\times 20$), cholesterol clefts (C, $\times 4$) and fat-laden macrophages (D, $\times 4$). No alteration was found at the point of injection in control mice.

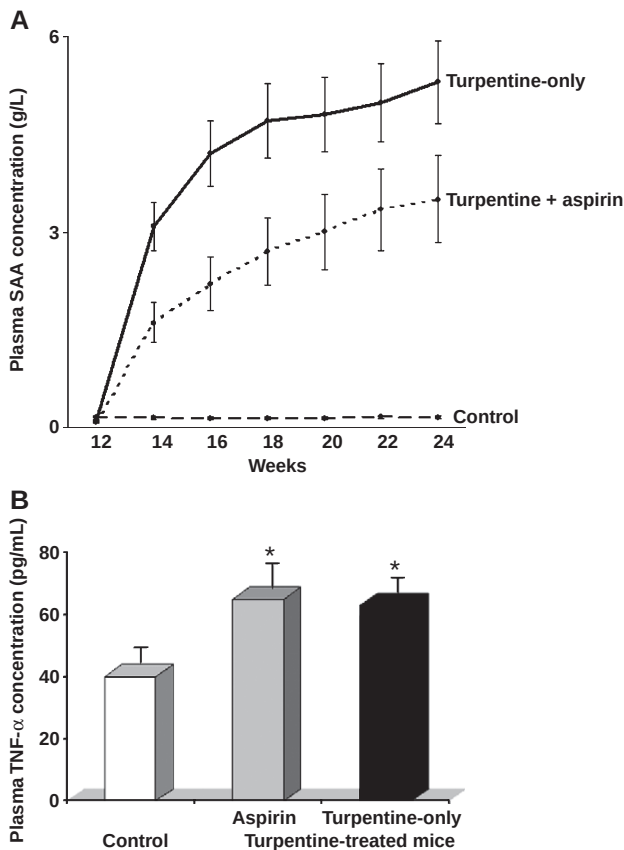


Fig. 2. Mean plasma serum amyloid A concentrations measured over the course of the study (A) and plasma TNF- α concentrations measured at the conclusion of the study (B). Aspirin supplemented animals showed lower plasma SAA but similar plasma TNF- α concentrations.

The amount of macrophages present in the atherosclerotic lesions was significantly lower, as well, in the turpentine-only treated mice. Although aspirin-treated animals showed a lower percentage of macrophages, the differences did not reach statistical significance. Plasma inflammatory markers were not correlated with the aortic arteriosclerosis but there were strong associations between plasma cholesterol concentration and both, the mean lesion size in the aortic arch ($\rho=0.521$; $P<0.05$) and the percentage of macrophages found in the lesion ($\rho=0.430$; $P<0.05$).

2.5. Expression of the *mdr1b* gene

Treatment with turpentine resulted in a relative decrease in the expression of the hepatic *mdr1b* gene which was

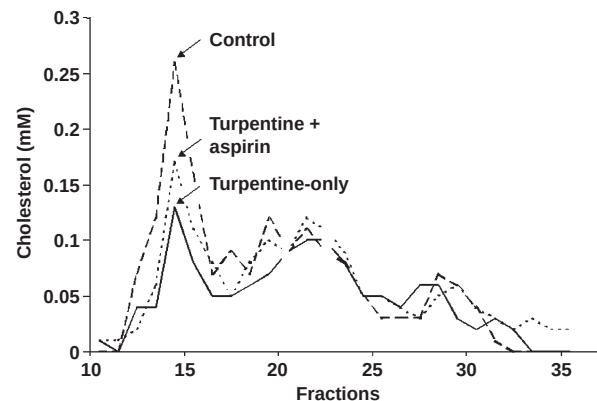


Fig. 3. Lipoprotein size fractionation by FPLC. Fractions 1 to 15 contain the triglyceride-rich lipoproteins, fractions 16 to 25 contain IDL and LDL, and fractions ≥ 26 contain HDL. A lower plasma cholesterol concentration is mainly due to a significant decrease in the cholesterol content of VLDL.

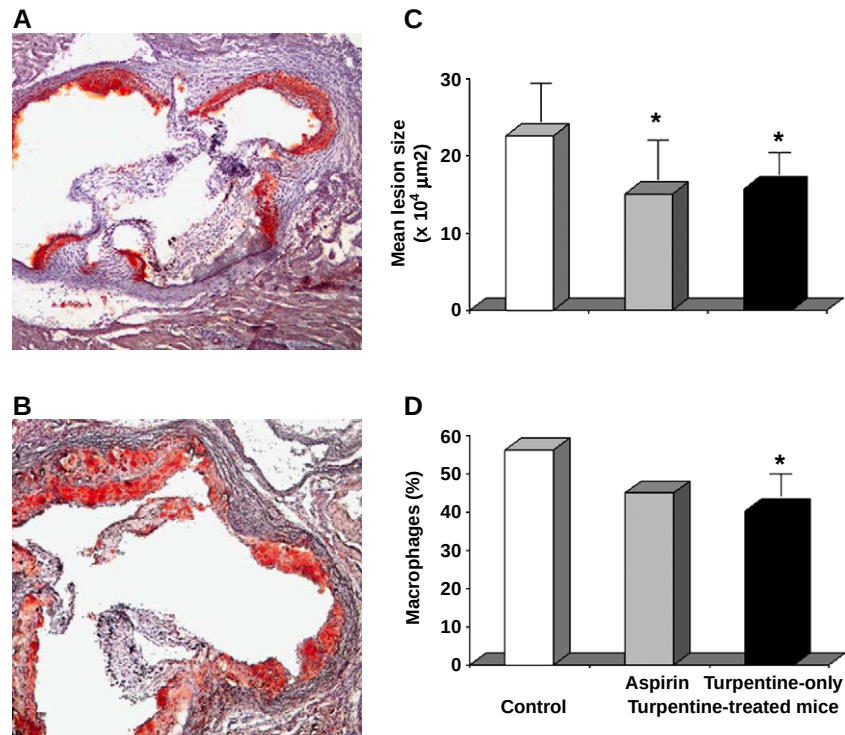


Fig. 4. Representative microphotographs of lesions observed in turpentine-treated mice (A) and control animals (B). Mean arterial lesions in the aortic sinus (C) and the macrophage content expressed in percentage of lesion area (D) are also represented. Turpentine-treated animals showed lower lesion size than controls and this correlated with plasma cholesterol concentration.

partially reversed by the aspirin supplementation (Fig. 5). The decrease in the *mdr1b* expression correlated positively with the decrease in plasma cholesterol concentration ($\rho=0.774$, $P=0.023$).

2.6. In vivo triglyceride production rate and intestinal cholesterol absorption

The hepatic production of VLDL-triglycerides was virtually the same in both control (3.74 ± 0.54 mmol/L h) and turpentine-treated mice (4.43 ± 0.26 mmol/L h). The intestinal cholesterol absorption was not significantly ($P=0.062$) decreased in turpentine-treated mice ($73.5 \pm$

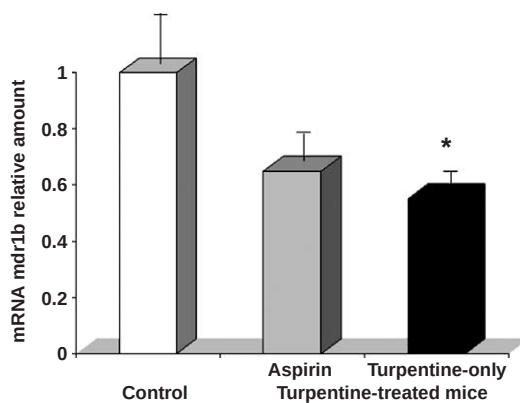


Fig. 5. Treatment with turpentine decreased the hepatic mRNA expression of *mdr1b*, an effect that was partially reversed by aspirin.

10.5%) as compared with controls ($90.4 \pm 0.52\%$), but the amount of labelled cholesterol (of dietary origin) in plasma at 72 h was significantly lower ($P<0.02$) in turpentine-treated mice ($17,410 \pm 913$ cpm/mL as compared with $33,440 \pm 3436$ cpm/mL in the controls). There were also a trend towards higher values in turpentine-treated mice as compared with controls in both biliary cholesterol (2.5 ± 0.9 mmol/L vs. 1.6 ± 0.5 mmol/L) and biliary bile acids (31.5 ± 22.5 mmol/L vs. 26.3 ± 7.5 mmol/L). Finally, there was a significant ($P<0.05$) increase in the faecal bile acid output, measured as μmol per day and per 100 g of body weight, of turpentine-treated mice (0.84 ± 0.06) as compared with controls (0.53 ± 0.07). However, the faecal cholesterol excretion was similar in both groups (20.2 ± 1.0 vs. 19.7 ± 1.4 μmol per day and per 100 g of body weight).

3. Discussion

A repeated injection of turpentine over such a protracted period of time has not been previously investigated. The local, inflammatory lesion, which is not modified by the use of aspirin, closely resembled the characteristic pattern of inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis and inflammatory bowel disease, i.e. infiltration of immunoinflammatory cells into the target tissue producing a systemic response characterized by an increased concentration of plasma SAA and TNF- α [23,24].

Our main finding was that the size of atherosclerotic lesions in mice with turpentine-induced inflammation was significantly lower than in controls. This was unexpected because our data appear to rule out a direct role of either SAA or TNF- α in the atherogenesis process. In humans, plasma concentration of SAA and C-reactive protein (CRP) have been shown to be predictors of cardiovascular disease [25,26] and, in transgenic mice, an active and direct role of CRP in vascular injury and repair has been documented [27,28]. Moreover, the observed effect is contrary to that described in essentially the same model of apo E-deficient mice in which chronic inflammation was induced by repeated intraperitoneal injections of lipopolysaccharide (LPS) [29]. Under the LPS-induced inflammation, the size of the lesions in mice increased significantly, compared with controls. It seems, therefore, that inflammation caused by infection and that induced by chemical irritants elicit different responses and that the complex patterns of induction and inhibition of cytokines on the expression of genes caused by the inflammation are not all necessarily pro-atherogenic. It could be speculated that the nature of the stimuli produces different patterns of chemokine secretion that may promote Th2 migration and/or prevent Th1 infiltration, thus helping to prevent chronic inflammation at the cellular level. It can also be argued that both models are not comparable and the LPS-induced inflammation is more aggressive over such a protracted period of time, suggesting that other mechanisms may play a significant role. Clearly, further studies are needed to clarify this point.

We interpret the attenuation of atherosclerosis as a consequence of the reduction in plasma cholesterol because there is a close association between the plasma cholesterol concentration and the burden of atherosclerosis while there is no relationship with plasma inflammatory markers. Moreover, aspirin did not have significant effects despite its known anti-inflammatory action. We observed, as well, a decrease in the macrophage density at the artery wall that was associated with the reduction in plasma cholesterol concentration. This would confirm the recent findings describing a molecular link between serum lipid levels and macrophage recruitment into the artery wall [30]. Interestingly, this effect was less evident in mice supplemented with aspirin.

It has been demonstrated previously [8,9] that the inflammatory response mediates a suppression of P-glycoprotein in rodents through a diminished *mdr1* gene transcription but the mechanism is currently unknown [31,32]. The complexity of alterations in lipid metabolism that occur in association with inflammation has been recently reviewed [33]. Most of these changes are attributable to changes in gene transcription probably regulated through changes in nuclear hormone receptors.

We propose that the lower expression of *mdr1b* gene may contribute to explain the lower plasma cholesterol concentration in our treated mice, probably mediated by a

decrease in the intestinal re-absorption of cholesterol. There are some indirect evidences supporting this point: firstly, we found a direct correlation between the decrease in the *mdr1b* gene expression and the decrease in plasma cholesterol. Secondly, the reduction in the plasma cholesterol concentration, confined to a reduction in circulating VLDL particles, is similar to the lipoprotein distribution observed in mice that are deficient in *mdr1* genes [15,16,34]. Finally, P-glycoprotein-deficient mice present a significant reduction in cholesterol absorption, with similar cholesterol synthesis, compared to control mice [15]. However, this hypothesis cannot be fully confirmed on the basis of our results. A lower production of VLDL can be discarded but we only found a modest (17%) non-significant decrease in intestinal cholesterol absorption. However, the fecal bile acid output was significantly higher in turpentine-treated animals, indicating that the combination of reduction in the absorption of dietary cholesterol and decrease of biliary acids for re-absorption from the intestine contributes to our findings in plasma. Hence, the relative decrease of *mdr1b* expression could produce a decrease in the intestinal re-absorption of biliary acids which may be a site of control of considerable importance in cholesterol homeostasis. At least in humans, the secretion of cholesterol into bile is 2–3 times higher than that entering by the diet, and more than 60% is re-absorbed from the intestine [35]. A higher conversion of cholesterol into bile salts is also possible, but we did not observe differences in the hepatic lipid content as a consequence of turpentine treatment.

Therefore, the observed plasma lipid profile represents the consequence of a more complex interaction between secretory processes and removal of lipids from plasma. It is also obvious that inflammation may alter the expression of many genes in many other tissues. Moreover, not only the lower plasma cholesterol but also a direct effect of P-glycoprotein may play a substantial role in the development of atherosclerosis [13,36]. Further studies are warranted to establish unequivocally the role of *mdr1* in the regulation of plasma cholesterol and/or the progression of atherosclerosis. These studies would be conducted most effectively in *mdr1* and *apo E* double knockout mice, when they become available.

Acknowledgements

This study was supported by grants 00/0291 and 01/1596 from the Fondo de Investigación Sanitaria, the European Union and the Red de centros de Metabolismo y Nutrición del Instituto de Salud Carlos III (RCMN 03/08). Mònica Tous is the recipient of a fellowship from the Generalitat de Catalunya (2002FI806). Joan Carles Escolà is a Ramón y Cajal researcher, funded by the Ministerio de Educación y Ciencia.

References

- [1] P. Libby, P.M. Ridker, Inflammation and atherosclerosis: role of C-reactive protein in risk assessment, *Am. J. Med.* 116 (Suppl. 6A) (2004) 9S–16S.
- [2] R.S. Rosenson, Pluripotential mechanisms of cardioprotection with HMG-CoA reductase inhibitor therapy, *Am. J. Cardiovasc. Drugs* 1 (2001) 411–420.
- [3] W.G. Haynes, C. Stanford, Periodontal disease and atherosclerosis: from dental to arterial plaque, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 (2003) 1309–1311.
- [4] E. Lalla, I.B. Lamster, M.A. Hofmann, L. Bucciarelli, A.P. Jerud, S. Tucker, Y. Lu, P.N. Papapanou, A.M. Schmidt, Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 (2003) 1405–1411.
- [5] S. Manzi, E.N. Meilahn, J.E. Rairie, C.G. Conte, T.A. Medsger Jr., L. Jansen-McWilliams, R.B. D'Agostino, L.H. Kuller, Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham Study, *Am. J. Epidemiol.* 145 (1997) 408–415.
- [6] I. del Rincon, A. Escalante, Atherosclerotic cardiovascular disease in rheumatoid arthritis, *Curr. Rheumatol. Rep.* 4 (2003) 278–286.
- [7] P. Jousilahti, E. Vartiainen, J. Tuomilehto, P. Puska, Symptoms of chronic bronchitis and the risk of coronary disease, *Lancet* 348 (1996) 567–572.
- [8] M. Piquette-Miller, A. Pak, H. Kim, R. Anari, A. Shahzamani, Decreased expression and activity of P-glycoprotein in rat liver during acute inflammation, *Pharm. Res.* 15 (1998) 706–711.
- [9] G. Hartmann, H. Kim, M. Piquette-Miller, Regulation of the hepatic multidrug resistance gene expression by endotoxin and inflammatory cytokines in mice, *Int. Immunopharmacol.* 1 (2001) 189–199.
- [10] P. Borst, A.H. Schinkel, Genetic dissection of the function of mammalian P-glycoproteins, *Trends Genet.* 13 (1997) 217–222.
- [11] J.M. Croop, M. Raymond, D. Haber, A. Devault, R.J. Arceci, P. Gros, D.E. Housman, The three mouse multidrug resistance (*mdr*) genes are expressed in a tissue-specific manner in normal mouse tissues, *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989) 1346–1350.
- [12] G.D. Luker, K.R. Nilsson, D.F. Covey, D. Piwnicka-Worms, Multidrug resistance (*MDR1*) P-glycoprotein enhances esterification of plasma membrane cholesterol, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 6979–6991.
- [13] B. Batetta, S. Dessi, M. Putzolu, F. Sanna, O. Spano, M.F. Mulas, P. Petruzzo, A. Cappai, G. Brotzu, *MDR1* gene expression in normal and atherosclerotic human arteries, *J. Vasc. Res.* 36 (1999) 261–271.
- [14] J.E. Metherall, H. Li, K. Waugh, Role of multidrug resistance P-glycoproteins in cholesterol biosynthesis, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 2634–2640.
- [15] P.J. Voshol, R. Havinga, H. Wolters, R. Ottenhoff, H.M. Princen, R.P. Oude Elferink, A.K. Groen, F. Kuipers, Reduced plasma cholesterol and increased fecal sterol loss in multidrug resistance gene 2 P-glycoprotein-deficient mice, *Gastroenterology* 114 (1998) 1024–1034.
- [16] G.D. Luker, J.L. Dahlheimer, R.E. Ostlund Jr., D. Piwnicka-Worms, Decreased hepatic accumulation and enhanced esterification of cholesterol in mice deficient in *mdr1a* and *mdr1b* P-glycoproteins, *J. Lipid Res.* 42 (2001) 1389–1394.
- [17] A. Paul, L. Calleja, J. Camps, J. Osada, E. Vilella, N. Ferre, E. Mayayo, J. Joven, The continuous administration of aspirin attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice, *Life Sci.* 68 (2000) 457–465.
- [18] J.C. Escola-Gil, J. Julve, A. Marzal-Casacuberta, J. Ordóñez-Llanos, F. Gonzalez-Sastre, F. Blanco-Vaca, Expression of human apolipoprotein A-II in apolipoprotein E-deficient mice induces features of familial combined hyperlipidemia, *J. Lipid Res.* 41 (2000) 1328–1338.
- [19] E. Vilella, J. Joven, M. Fernandez, S. Vilario, J.D. Brunzell, T. Olivecrona, G. Bengtsson-Olivecrona, Lipoprotein lipase in human plasma is mainly inactive and associated with cholesterol-rich lipoproteins, *J. Lipid Res.* 34 (1993) 1555–1564.
- [20] S.H. Zhang, R.L. Reddick, J.A. Piedrahita, N. Maeda, Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E, *Science* 258 (1992) 468–471.
- [21] B. Paigen, A. Morrow, P.A. Holmes, D. Mitchell, R.A. Williams, Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice, *Atherosclerosis* 68 (1987) 231–240.
- [22] S.D. Turley, B.P. Daggy, J.M. Dietschy, Psyllium augments the cholesterol-lowering action of cholestyramine in hamsters by enhancing sterol loss from the liver, *Gastroenterology* 107 (1994) 444–452.
- [23] P. Ghezzi, A. Cerami, Tumor necrosis factor as a pharmacological target, *Methods Mol. Med.* 98 (2004) 1–8.
- [24] C.F. Thorn, Z.Y. Lu, A.S. Whitehead, Regulation of the human acute phase serum amyloid A genes by tumour necrosis factor- α , interleukin-6 and glucocorticoids in hepatic and epithelial cell lines, *Scand. J. Immunol.* 59 (2004) 152–158.
- [25] B.D. Johnson, K.E. Kip, O.C. Marroquin, P.M. Ridker, S.F. Kelsey, L.J. Shaw, C.J. Pepine, B. Sharaf, C.N.B. Merz, G. Sopko, M.B. Olson, S.E. Reis, Serum amyloid A as a predictor of coronary artery disease and cardiovascular outcome in women: The National Heart, Lung, and Blood Institute-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE), 109 (2004) 726–732.
- [26] A.R. Folsom, J.S. Pankow, R.P. Tracy, D.K. Arnett, J.M. Peacock, Y. Hong, L. Djousse, J.H. Eckfeldt, Association of C-reactive protein with markers of prevalent atherosclerotic disease, *Am. J. Cardiol.* 88 (2001) 112–117.
- [27] A. Paul, K.W. Ko, L. Li, V. Yechoor, M.A. McCrory, A.J. Szalai, L. Chan, C-reactive protein accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice, *Circulation* 109 (2004) 647–655.
- [28] H.D. Danenberg, A.J. Szalai, R.V. Swaminathan, L. Peng, Z. Chen, P. Seifert, W.P. Fay, D.I. Simon, E.R. Edelman, Increased thrombosis after arterial injury in human C-reactive protein-transgenic mice, *Circulation* 108 (2003) 512–515.
- [29] M.A. Ostos, D. Recalde, M.M. Zakin, D. Scott-Algara, Implication of natural killer T cells in atherosclerosis development during a LPS-induced chronic inflammation, *FEBS Lett.* 519 (2002) 23–29.
- [30] H. Bjorkbacka, V.V. Kunjathoor, K.J. Moore, S. Koehn, C.M. Ordija, M.A. Lee, T. Means, K. Halmen, A.D. Luster, D.T. Golenbock, M.W. Freeman, Reduced atherosclerosis in *MyD88*-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signalling pathways, *Nat. Med.* 10 (2004) 16–21.
- [31] M. Raymond, P. Gros, Cell-specific activity of cis-acting regulatory elements in the promoter of the mouse multidrug resistance gene *mdr1*, *Mol. Cell. Biol.* 10 (1990) 6036–6040.
- [32] N.J. Combates, R.W. Rzepka, Y.N. Chen, D. Cohen, NF- κ B, a member of the C/EBP family of transcription factors, binds and transactivates the human *MDR1* gene promoter, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 29715–29719.
- [33] W. Khovidhunkit, M.S. Kim, R.A. Memon, J.K. Shigenaga, A.H. Moser, K.R. Feingold, C. Grunfeld, Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host, *J. Lipid Res.* 45 (2004) 1169–1196.
- [34] T. Plösch, V. Bloks, J. Baller, R. Havinga, H. Verkade, P. Jansen, F. Kuipers, *Mdr* P-glycoproteins are not essential for biliary excretion of the hydrophobic heme precursor protoporphyrin in a griseofulvin-induced mouse model of erythropoietic protoporphyria, *Hepatology* 35 (2002) 299–306.
- [35] M.D. Wilson, L.L. Rudel, Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol, *J. Lipid Res.* 35 (1994) 943–955.
- [36] B. Batetta, M.F. Mulas, P. Petruzzo, M. Putzolu, R.R. Bonatesta, F. Sanna, A. Cappai, G. Brotzu, S. Dessi, Opposite pattern of *MDR1* and caveolin-1 gene expression in human atherosclerotic lesions and proliferating human smooth muscle cells, *Cell. Mol. Life Sci.* 58 (2001) 1113–1120.

Agraiments

Resulta difícil en un projecte d'aquest caire, pel gran nombre de persones que implica, donar les gràcies a tots els que han contribuït a ell. Voldria aprofitar aquesta ocasió per tal d'expressar el meu sincer agraïment a totes aquestes persones i especialment:

Al meu director de tesi, al Dr. Jorge Joven per haver-me donat la possibilitat de fer aquesta tesi doctoral al seu costat, pel seu esperit innovador i per les seves ganes de tirar endavant, per la seva destreça en treure profit dels resultats obtinguts; gràcies per tot el que he après al seu costat.

Al Dr. Jordi Camps, per la seva implicació en aquesta tesi i de forma especial per la seva contribució a l'estudi 2 d'aquesta tesi; gràcies pel seu interès, pels seus comentaris i per les seves suggerències.

A la Dra. Elisabet Vilella, perquè va ser qui em va oferir la possibilitat de treballar amb el Dr. Joven; gràcies per haver-me obert les portes al laboratori de Biologia Cel·lular de la UB encapçalat pel Dr. Senent-Vilaró i preocupar-se per la meua formació.

Al Xavi Sanjuan, al meu professor d'immunohistoquímica, per haver-me acollit, pel seu temps dedicat i per ensenyar-me tot allò que estava al seu abast.

Als clínics del grup ('internistes'), a la Sandra Parra, al Blai Coll i al Dr. Carlos Alonso-Villaverde, per la seva amistat, pel seu bon rotllo, pel suport en tots aquells projectes que han estat implicats.

Agraeixo molt al Dr. Villagreen les seves lectures intensament crítiques de les primeres versions dels articles diversos en que ha col·laborat, pel seu temps dedicat, per les seves suggerències que juntament amb les del Blai Coll, han influenciat positivament en el contingut d'aquesta tesi.

A tots els companys del Laboratori de Bioquímica de l'Hospital de Sant Pau i Santa Creu de Barcelona. Gràcies especialment al Dr. Francisco Blanco-Vaca per haver-me deixat anar-hi, al Dr. Joan Carles Escolà i al Dr. Vicent Ribas per haver-me acollit, per la seva professionalitat, per la seva implicació en tots els projectes que hem col·laborat, per oferir tots els seus coneixements i la seva experiència; gràcies per tot el que après al seu costat. Gràcies també a la Laura Calpe-Berdiel i a la Noemí Rotllan; és una sort poder treballar amb persones com elles.

A tots els companys del laboratori del CRB, Carme, Lourdes, Natàlia, Lúdia, Vicky, Iolanda, Neus (qui sap trobar el temps necessari per conservar una bona amistat, sap valorar tot el que aquesta li retorna), Bàrbara, Mònica (la roja) i als nouvinguts 'bollicaos', Judit, Gerard i Anna, pel seu temps dedicat, pel que m'han ensenyat, ajudat i pels bons moments que hem compartit.

A tot el personal dels laboratoris clínics i del laboratori d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari de Sant Joan de Reus, per la seva professionalitat i per estar sempre disposats a ajudar-me en qualsevol cosa.

A tots els companys que han format part de la URL durant tots aquests anys, Anna, Merche, Juliana, Katia, Montse, Adriana, Rosario, Natàlia, Iolanda, Josep, Jimmy, Josefa per la seva col·laboració desinteressada, el seu suport i les bones estones a dins i fora del laboratori.

Al grup d'Histologia de la Facultat de Medicina de la URV, especialment, a la Dra. Angels Lanuza i a la Dra. Neus Garcia perquè m'han ajudat a millorar les meves primeres immunohistoquímiques i perquè sé que sempre estàn disposats a col·laborar amb nosaltres.

A la Generalitat de Catalunya i a l'Institut de Recerca en Ciències de la Salut pel suport econòmic que m'han donat durant aquests anys i al Instituto de Salud Carlos III per haver finançat els projectes que han donat lloc a aquesta tesi.

Al Javi per haver-me fet costat en qualsevol situació, per la seva comprensió, pel seu interès sobre el que he estat fent i pel seu suport incondicional durant tots aquests anys.

A la meva família, especialment als meus pares perquè un cop més m'han donat fet costat en aquest projecte tant important per a mí, per compartir els bons moments i no tant bons, i per ser com són.

Publicacions

Marsillach J, Bertran N, Camps J, Ferre N, Riu F, **Tous M**, Coll B, Alonso-Villaverde C, Joven J. The role of circulating monocyte chemoattractant protein-1 as a marker of hepatic inflammation in patients with chronic liver disease. *Clin Biochem*. 2005.

Coll B, Alonso-Villaverde C, Parra S, Montero M, **Tous M**, Joven J, Masana L. The stromal derived factor-1 mutated allele (SDF1-3'A) is associated with a lower incidence of atherosclerosis in HIV-infected patients. *AIDS*. 2005;19:1877-1883.

Ferre N, Marsillach J, Camps J, Rull A, Coll B, **Tous M**, Joven J. Genetic association of paraoxonase-1 polymorphisms and chronic hepatitis C virus infection. *Clin Chim Acta*. 2005;361:206-210.

Tous M, Ribas V, Ferre N, Escola-Gil JC, Blanco-Vaca F, Alonso-Villaverde C, Coll B, Camps J, Joven J. Turpentine-induced inflammation reduces the hepatic expression of the multiple drug resistance gene, the plasma cholesterol concentration and the development of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1733:192-198.

Ferre N, Camps J, Marsillach J, Mackness B, Mackness M, Coll B, **Tous M**, Joven J. Comparison of paraoxonase 1 measurements in serum and in lithium-heparin-anticoagulated plasma samples. *Clin Chem*. 2005;51:922-923.

Bertran N, Camps J, Fernandez-Ballart J, Murphy MM, Arijia V, Ferre N, **Tous M**, Joven J. Evaluation of a high-sensitivity turbidimetric immunoassay for serum C-reactive protein: application to the study of longitudinal changes throughout normal pregnancy. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43:308-313.

Tous M, Ferre N, Camps J, Riu F, Joven J. Feeding apolipoprotein E-knockout mice with cholesterol and fat enriched diets may be a model of non-alcoholic steatohepatitis. *Mol Cell Biochem*. 2005;268:53-58.

Bertran N, Camps J, Fernandez-Ballart J, Arijia V, Ferre N, **Tous M**, Simo D, Murphy MM, Vilella E, Joven J. Diet and lifestyle are associated with serum C-reactive protein concentrations in a population-based study. *J Lab Clin Med*. 2005;145:41-46.

Alonso-Villaverde C, Coll B, Parra S, Montero M, Calvo N, **Tous M**, Joven J, Masana L. Atherosclerosis in patients infected with HIV is influenced by a mutant monocyte chemoattractant protein-1 allele. *Circulation*. 2004;110:2204-2209.

Tous M, Ferre N, Vilella E, Riu F, Camps J, Joven J. Aspirin attenuates the initiation but not the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice fed a high-fat, high-cholesterol diet. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2004;95:15-19.

Tous M, Ferre N, Vilella E, Riu F, Camps J, Joven J. Circulating blood cells modulate the atherosclerotic process in apolipoprotein E-deficient mice. *Metabolism*. 2004;53:95-100.

Ferre N, Camps J, Fernandez-Ballart J, Arijia V, Murphy MM, Ceruelo S, Biarnes E, Vilella E, **Tous M**, Joven J. Regulation of serum paraoxonase activity by genetic, nutritional, and lifestyle factors in the general population. *Clin Chem*. 2003;49:1491-1497.

Ferre N, **Tous M**, Paul A, Zamora A, Vendrell JJ, Bardaji A, Camps J, Richart C, Joven J. Paraoxonase Gln-Arg(192) and Leu-Met(55) gene polymorphisms and enzyme activity in a population with a low rate of coronary heart disease. *Clin Biochem*. 2002;35:197-203.