







UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
Departamento de Ciencias Médicas  
y Quirúrgicas

**D. ESTEBAN PÉREZ ALONSO,  
SECRETARIO DEL DEPARTAMENTO DE  
CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS DE LA  
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN  
CANARIA,**

**CERTIFICA,**

Que el Consejo de Doctores del Departamento en su sesión de fecha 27 de Enero de 2009, tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada "Losartán y Rosiglitazona en un modelo de hipercolesterolemia-aterosclerosis: Efectos antiinflamatorio y antioxidante." presentada por la doctoranda D<sup>a</sup>. Carlota Yaridé Hernández Trujillo y dirigida por los Doctores D. Francisco Javier Rodríguez Esparragón y D. José Carlos Rodríguez Pérez.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del Reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a veintisiete de Enero de dos mil nueve.





UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
Departamento de Ciencias Médicas  
y Quirúrgicas

PROGRAMA DE DOCTORADO: AVANCES EN MEDICINA INTERNA.

## **Título de la Tesis**

# **LOSARTÁN Y ROSIGLITAZONA EN UN MODELO DE HIPERCOLESTEROLEMIA-ATEROSCLEROSIS: EFECTOS ANTIINFLAMATORIO Y ANTIOXIDANTE.**

Tesis Doctoral presentada por:

D<sup>a</sup>. Carlota Yaridé Hernández Trujillo.

Dirigida por los doctores:

D. Francisco Javier Rodríguez Esparragón.

D. José Carlos Rodríguez Pérez.

**El Director,**

(firma)

**El Codirector,**

(firma)

**La Doctoranda,**

(firma)

Las Palmas de Gran Canaria, a 27 de Enero de 2009.



**D. FRANCISCO JAVIER RODRÍGUEZ ESPARRAGÓN,  
INVESTIGADOR CIENTÍFICO DE LA UNIDAD DE  
INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE  
GRAN CANARIA DOCTOR NEGRÍN,**

**CERTIFICA:**

Que el trabajo de investigación titulado **“Losartán y rosiglitazona en un modelo de hipercolesterolemia-aterosclerosis: Efectos antiinflamatorio antioxidante.”**, ha sido realizado por D<sup>a</sup> **Carlota Yaridé Hernández Trujillo**, en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, bajo mi dirección y asesoramiento técnico, y que una vez revisada la presente Memoria la encuentro apta para su defensa como Tesis Doctoral.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, extendo el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria a 27 de Enero de 2009.

Firmado:

D. Francisco Javier Rodríguez Esparragón.



**D. JOSÉ CARLOS RODRÍGUEZ PÉREZ, JEFE DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DOCTOR NEGRÍN Y PROFESOR TITULAR DE MEDICINA EN LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.**

**CERTIFICA:**

Que el trabajo de investigación titulado **“Losartán y rosiglitazona en un modelo de hipercolesterolemia-aterosclerosis: Efectos antiinflamatorio y antioxidante.”**, ha sido realizado por D<sup>a</sup> Carlota Yaridé Hernández Trujillo, en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, bajo mi dirección y asesoramiento técnico, y que una vez revisada la presente Memoria la encuentro apta para su defensa como Tesis Doctoral.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, extiendo el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria a 27 de Enero de 2009.

Firmado:

D José Carlos Rodríguez Pérez.



*A Fran.*



## AGRADECIMIENTOS:

*Cuando llegué a la Unidad de Investigación del Hospital Doctor Negrín con la ilusión de poder optar a un beca de investigación no podía imaginarme todo lo que viviría a partir de ese momento. Han sido buenos momentos pero también ha habido momentos malos...alguna “pájara” que me impedía ver con claridad mis objetivos. En fin, que mirando hacia atrás, todavía me cuesta creer donde me encuentro ahora...uff... ¡ya era hora!*

*Pero al margen del propio esfuerzo personal, no me cabe la menor duda de que este trabajo no hubiera podido realizarse sin la ayuda, el apoyo, la paciencia y el amor de muchas personas que me han acompañado a medida que este proyecto tomaba forma.*

*Me gustaría dar las gracias en primer lugar a las instituciones públicas (FUNCIS e Instituto de Salud Carlos III) y privadas (Fundación MAPFRE Guanarteme) que han financiado y han hecho posible la elaboración de este trabajo.*

*Agradezco a D. José Carlos Rodríguez Pérez, el haberme dado la oportunidad de empezar a trabajar en La Unidad de Investigación del Hospital Universitario Doctor Negrín y poner a mi alcance todos los medios a su disposición para que pudiera llevarse a cabo esta tesis. Gracias por su apoyo como director de la misma, sus consejos, su esfuerzo y tiempo invertidos en las revisiones del manuscrito y en la preparación de la exposición oral. Gracias también por sus enseñanzas en el campo de la cirugía animal.*

*Gracias a todos los compañeros de la Unidad de Investigación que me ofrecieron sus conocimientos, experiencia y ayuda en algún momento, María José, Octavio, Arancha, Macame, Nuria, Clara, Sandra...de todos he*

*aprendido algo.*

*Antonio Macías, gracias por enseñarme a hacer PCRs, por conseguirme un ordenador, por tu asistencia técnica informática, por tu apoyo moral...pero sobre todo porque siempre has estado disponible y decidido a regalar tu ayuda y tu amistad.*

*Gracias a Érika, constante y metódica en el trabajo, dispuesta a echar una mano siempre y a Araceli por ofrecerme su ayuda y sus conocimientos en el campo de la estadística. Por compartir conmigo los desayunos, los almuerzos y las dudas de inglés.*

*A Lidia Esther por ser más que una compañera en el laboratorio, por soportarme. Compartimos muchas risas y también algún cabreo pero al final siempre me abría su gran corazón.*

*También quiero dar las gracias a Heriberto que me enseñó a cuidar los animales, a respetarlos y a perderles el miedo y a Inmaculada por sus atenciones y cuidados.*

*Gracias a Juan Verona por la ayuda desinteresada que me ha brindado en el diseño artístico de la portada y la elaboración de la presentación oral de este trabajo. Y también a Ramón por su colaboración.*

*A mi familia y amigos, siempre preocupados por mí, por su apoyo, por el ánimo que me han dado siempre preguntando como me iba con el trabajo...y especialmente a mis padres por su comprensión y paciencia, y por ser un ejemplo de trabajo, esfuerzo y superación y un referente en mi vida.*

*Finalmente gracias a Fran. Esta ha sido tu idea y este es tu trabajo. Gracia sobre todo por creer en mí para defenderlo. Sin ti no hubiera sido capaz de hacerlo. Sencillamente, por tu amor.*

## Índice



---

## ÍNDICE.

I) ABREVIATURAS.....	1
II) FIGURAS Y TABLAS. ....	9
III) INTRODUCCIÓN. ....	15
<b>1. Enfoque actual de la aterosclerosis.....</b>	<b>15</b>
1.1 La Aterosclerosis en cifras.....	16
1.2 Hipótesis aterosclerótica. ....	17
<b>2. Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas. .</b>	<b>27</b>
2.1 Papel de los distintos tipos celulares de la pared vascular en la aterosclerosis.....	27
2.1.1 El endotelio. ....	27
2.1.2 Monocitos/macrófagos.....	30
a) Captación de las LDL modificadas: receptores basurero. ....	31
b) Degradación de la cubierta fibrosa. ....	35
2.1.3 Las células musculares lisas. ....	36
a) Activación de las células musculares lisas en la media; migración a la íntima.....	36
b) Proliferación de las células musculares lisas en la íntima; síntesis de matriz extracelular. ....	37
c) Formación de células espumosas. ....	37
<b>3. Expresión hepática de los receptores basurero SCARB1 y CD36.....</b>	<b>38</b>
<b>4. Los receptores nucleares PPAR-<math>\gamma</math> y Nrf-2. ....</b>	<b>41</b>
4.1 Mecanismo de acción de los PPARs.....	43
4.2 Papel de PPAR- $\gamma$ en el desarrollo de la aterosclerosis.....	44
4.3 Mecanismo de acción de Nrf-2.....	46
4.4 Papel de Nrf-2 en el desarrollo de la aterosclerosis.....	47

---

5. Sistema renina-angiotensina adipocitario. Acción del losartán.	47
6. Tiazolidinadionas: efectos antiaterogénicos. La rosiglitazona.	51
7. Modelos murinos de aterosclerosis.	53
IV) JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.	61
V) MATERIAL Y MÉTODOS.	67
1. Animales de experimentación.	67
2. Análisis de los lípidos plasmáticos y la peroxidación lipídica.	70
3. Actividades Paroxonasa y Arilesterasa.	74
4. Ensayo de diclorofluoresceína.	75
5. Medida de los metabolitos totales del óxido nítrico.	76
6. Determinación semicuantitativa de la expresión génica mediante PCR en tiempo real.	76
7. Ensayo de Inmunoprecipitación de la cromatina.	88
8. Análisis estadístico.	93
VI) RESULTADOS.	97
1. Pesos.	97
2. Lípidos plasmáticos.	99
2.1 Colesterol total.	99
2.2 Colesterol HDL.	101
2.2.1 Actividades Paroxonasa y Arilesterasa.	103
2.3 Triglicéridos.	105
2.4 Hidroperóxidos Lipídicos.	107
3. Niveles de Insulina.	109
4. Medida de la capacidad antioxidante del HDL.	109
5. Porcentaje de apolipoproteína A-1 recuperado tras inmunoprecipitación con anticuerpo frente a PPAR-γ.	111
6. Validación de los métodos $\Delta\Delta Ct$ y recta estándar de los diferentes genes objeto de estudio.	113

---

<b>7. Expresión relativa de PPAR-<math>\gamma</math>.....</b>	<b>116</b>
<b>8. Expresión relativa de SCARB1.....</b>	<b>117</b>
<b>9. Porcentaje de SCARB1 recuperado tras inmunoprecipitación con anticuerpo frente a PPAR-<math>\gamma</math>.....</b>	<b>119</b>
<b>10. Expresión relativa del gen CD36.....</b>	<b>121</b>
<b>11. Porcentaje de CD36 recuperado tras inmunoprecipitación con anticuerpo frente a Nrf-2.....</b>	<b>122</b>
<b>12. Expresión relativa de los genes iNOS y eNOS.....</b>	<b>124</b>
<b>13. Porcentaje de iNOS recuperado tras inmunoprecipitación con anticuerpo frente a PPAR-<math>\gamma</math>.....</b>	<b>126</b>
<b>14. Medidas de los metabolitos del óxido nítrico.....</b>	<b>127</b>
<b>15. Expresión relativa de los genes Alox-15, Alox-15b y Alox-5.....</b>	<b>128</b>
<b>16. Expresión relativa de los genes paroxonasa-1 (PON-1) y CYBA (p22phox).....</b>	<b>131</b>
<b>17. Expresión relativa del gen de la IL-6.....</b>	<b>134</b>
<b>VII) DISCUSIÓN.....</b>	<b>137</b>
<b>VIII) ENFOQUE TRASLACIONAL.....</b>	<b>147</b>
<b>IX) CONCLUSIONES.....</b>	<b>151</b>
<b>X) PUBLICACIONES.....</b>	<b>155</b>
<b>XI) BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>183</b>



## Abreviaturas



## I) Abreviaturas.

**4-AA:** 4-aminoantipirina.

**5HT:** 5-hidroxitriptamina (serotonina).

**A:** Absorbancia.

**AA:** Ácido araquidónico.

**ACV:** Accidente cerebro vascular.

**ADP:** Adenosindifosfato.

**Alox-5:** 5-lipoxigenasa araquidónica.

**Alox-15:** 15-lipoxigenasa araquidónica.

**Alox-15b:** 15b-lipoxigenasa araquidónica.

**ATP:** Adenosintrifosfato.

**apoA-I:** Apolipoproteína A-I.

**apoB:** Apoproteína B.

**apoE:** Apoproteína E.

**apoE<sup>-/-</sup>:** apoE *knockout*.

**ARAI:** Bloqueadores del receptor tipo 1 de la Angiotensina II.

**AT<sub>1</sub>R:** Receptor de la angiotensina tipo 1.

**ANGII:** Angiotensina II.

**BH<sub>4</sub>:** Tetrahidrobiopterina.

**BK:** Bradiquinina.

**b-ZIP:** Región básica de cremallera de leucinas.

**CAMs:** Molécula de adhesión celulares.

**CD36:** Receptor de LDL oxidadas. *Cluster of Differentiation 36*.

**cDNA:** DNA complementario.

**CHE:** Colesterol esterasa.

**CLA-1:** CD36 *and* LIMP II *analogous* 1.

- CML:** Células musculares lisas.
- CVML:** Células vasculares musculares lisas.
- CO:** Colesterol oxidasa.
- COX-2:** Cicloxigenasa 2.
- CVD:** Enfermedad cardiovascular. (*Cardiovascular disease*).
- DCFH-DA:** Diclorofluoresceíndiacetato.
- DEPC:** Dietilpirocarbonato.
- DNA:** Ácido desoxiribonucleico.
- EGF:** Factor de crecimiento endotelial.
- EHN:** *European Heart Network*.
- eNOS (NOS3) :** Óxido nítrico sintasa endotelial constitutiva.
- ET:** Endotelina.
- FAD:** Flavina-adenina dinucleotido.
- F-DAOS:** Sal sódica [N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxi-4-fluoroanilina].
- FGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento de fibroblastos- $\beta$ .
- FMN:** Flavina mononucleotido.
- GAPDH:** Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.
- GK:** Glicerol kinasa.
- GM-CSF:** Factor estimulador de colonias granulocitos-macrófagos.
- GPO:** Glicerol-3-fosfato oxidasa.
- GPX3:** Glutación selenoperoxidasa plasmática.
- HDL:** Lipoproteínas de alta densidad.
- HDL-C:** HDL colesterol.
- HFHC:** Dieta tipo *High Fat High Cholesterol*.
- HODE:** Ácido 13-hidroxi-octadecadienoico.
- HPODE:** Ácido 13-hidroperoxi-octadecadienoico.
- IAM:** Infarto agudo de miocardio.

- 
- ICAM-1:** Moléculas de adhesión intercelular-1.
- IGF-1:** Factor de crecimiento tipo insulina-1.
- INE:** Instituto Nacional de Estadística.
- iNOS ( NOS2):** Óxido nítrico sintasa inducible, calcio independiente.
- IL-1:** Interleucina-1.
- IL-6:** Interleucina-6.
- IL-8:** Interleucina-8.
- IL-2:** Interleucina-2.
- IL-1 $\beta$ :** Interleucina 1 $\beta$ .
- INF- $\gamma$ :** Interferón- $\gamma$ .
- Keap-1:** *Kelch-like ECH-associated-1 protein.*
- LDL:** Lipoproteínas de baja densidad.
- LDL<sup>-/-</sup>:** LDL *knockout*
- LDLox:** Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
- LDLmox:** LDL minimamente oxidada.
- LDLR:** Receptores para las LDL nativas.
- LIFE:** *Losartan Intervention For End Point reduction in Hypertension.*
- LIMP II:** *Lysosomal integral membrane protein II.*
- LRP:** *Low density lipoprotein receptor-related protein.*
- LST:** Losartán.
- Maf:** Familia de factores de transcripción con una región bZIP.
- MCP-1:** Proteína quimiotáctica de monocitos-1.
- MCSF-1:** Factor estimulador de colonias de macrófagos-1.
- NADPH:** *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidized.*
- NCBI:** *National Centre for Biotechnology Information.*
- NO:** Óxido nítrico.
- NO<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Anión nitrito.
- NOS:** Óxido nítrico sintasa.

- 
- Nrf-2:** *Nuclear factor-erythroid 2-related factor*.
- O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Anión superóxido.
- OH<sup>-</sup>:** Anión hidroxilo.
- ONOO<sup>-</sup>:** Anión peroxinitrito.
- p22phox:** Subunidad  $\alpha$  del citocromo b (558). Producto del gen CYBA.
- PAF:** Factor activador de plaquetas o plaquetario.
- PAF-like:** Factor similar al activador de plaquetas.
- PAF-AH:** Acetil hidrolasa del factor activador de plaquetas.
- PAI-1:** Inhibidor-1 del activador del plasminógeno tisular.
- PAPC:** L- $\alpha$ -1-palmitoil-2-araquidonil-sn-glicero-3-fosfocolina.
- PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- PDZK1 o CLAMP:** *PDZ domain-containing 1 protein* o *C-terminal linking and modulating protein*. Proteína soluble hepática asociada a SCARBI.
- PECAM-1:** Molécula de adhesión plaquetar-1.
- PGI<sub>2</sub>:** Prostaciclina 2.
- PMSF:** Inhibidor de serinproteasas, fenilmetilsulfonil fluoruro.
- POD:** Peroxidasa.
- PON1:** Paroxonasa 1.
- PON ar.asa:** actividad arilesterasa.
- PON p.asa:** actividad paroxonasa.
- PPAR- $\gamma$ :** *Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* .
- PPARs:** *Peroxisome proliferator-activated receptors*.
- PPRE:** Elemento de respuesta a PPAR.
- RG:** Rosiglitazona.
- RNA:** Ácido ribonucleico.
- RNasas:** Ribonucleasas.
- RNA<sub>m</sub>:** RNA mensajero.
- ROS:** Especies reactivas del oxígeno.

- RT:** Transcriptasa inversa.
- RXR:** Receptor de ácido retinóico.
- RXR $\alpha$ :** Receptor  $\alpha$  de ácido retinóico.
- SCARB1:** Receptor *scavenger* clase B tipo 1.
- SOD:** Superóxido dismutasa.
- SRA:** Sistema Renina Angiotensina.
- TC:** Colesterol total.
- TG:** Triglicéridos.
- TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante- $\beta$ .
- TNF $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ .
- TPP:** Trifenilfosfina.
- TRC:** Transporte reverso de colesterol.
- TXA $_2$ :** Tromboxano A $_2$ .
- TZDs:** Tiazolidinadionas.
- t-PA:** Activador del plasminógeno tisular.
- VCAM-1:** Moléculas de adhesión de células vasculares-1.
- VEGF:** Factor de crecimiento del endotelio vascular.
- VLDL:** Lipoproteínas de muy baja densidad.
- WHO:** *World Health Organization*.



Figuras y Tablas



## II) Figuras y Tablas.

### Figuras:

**Figura 1.** Disfunción endotelial.

**Figura 2.** Lesión temprana.

**Figura 3.** Formación de la estría grasa.

**Figura 4.** Lesión avanzada.

**Figura 5.** Placa fibrosa inestable.

**Figura 6.** Moléculas secretadas por el endotelio en respuesta a estímulos y funciones vasculares que regula.

**Figura 7.** Representación esquemática de las diferentes familias de receptores scavenger.

**Figura 8.** Esquema simplificado del transporte reverso de colesterol.

**Figura 9.** Representación esquemática de la estructura de los PPARs.

**Figura 10.** Unión de los PPARs a sus genes de respuesta.

**Figura 11.** Mecanismo de acción de Nrf-2.

**Figura 12.** Oxidación del losartán.

**Figura 13.** Acción del bloqueo del SRA sobre el metabolismo de lípidos.

**Figura 14.** Estructura química de la rosiglitazona.

**Figura 15.** Esquema del diseño experimental.

**Figura 16.** Reacciones químicas que tienen lugar durante la determinación de triglicéridos en plasma.

**Figura 17.** Esquema del proceso de determinación de colesterol en muestras de plasma.

**Figura 18.** Obtención de plasma e hígado, donde se midieron hidroperóxidos lipídicos por el método del Xilenol Orange.

**Figura 19.** Experimento de validación del método de cuantificación relativa  $\Delta\Delta Ct$ .

**Figura 20.** Cálculo de las concentraciones del gen problema y GAPDH a partir de una recta estándar.

**Figura 21.** Cálculo de los valores normalizados de concentración de un gen problema.

**Figura 22.** Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina.

**Figura 23.** Evolución de los pesos a lo largo del tiempo.

**Figura 24.** Evolución de los niveles de colesterol total a lo largo del tiempo.

**Figura 25.** Evolución de los niveles de HDL colesterol a lo largo del tiempo.

**Figura 26.** Evolución de la actividad paroxonasa a lo largo del tiempo.

**Figura 27.** Evolución de la actividad arilesterasa a lo largo del tiempo.

**Figura 28.** Evolución de los niveles de triglicéridos a lo largo del tiempo.

**Figura 29.** Evolución de los niveles de lípidos peroxidados a lo largo del tiempo.

**Figura 30.** Medida de la capacidad antioxidante del HDL mediante el ensayo de la diclorofluoresceína.

**Figura 31.** Porcentajes de recuperación de apolipoproteína A-I tras ChIP (Chromatin Immunoprecipitation Assay).

**Figura 32.** Rectas Ct para PON-1 y PPAR- $\gamma$ .

**Figura 33.** Rectas Ct para los genes iNOS, IL-6, p22phox y eNOS.

**Figura 34.** Rectas estándar para los genes SCARB1 y CD36.

**Figura 35.** Rectas estándar para los genes Alox-15, Alox-15b y Alox-5.

**Figura 36.** Expresión relativa del gen PPAR- $\gamma$ .

**Figura 37.** Expresión relativa del gen SCARB1.

**Figura 38.** Porcentajes de recuperación de SCARB1 tras ChIP.

**Figura 39.** Expresión relativa del gen CD-36.

**Figura 40.** Porcentaje de CD-36 recuperado tras ChIP.

**Figura 41.** Expresiones relativas de los genes iNOS y eNOS.

**Figura 42.** Porcentaje de iNOS recuperado tras ChIP.

**Figura 43.** Medida de los metabolitos del óxido nítrico.

**Figura 44.** Expresión relativa del gen Alox-15, Alox-15b y Alox-5

**Figura 45.** Expresión relativa del gen PON-1.

**Figura 46.** Expresión relativa del gen p22phox.

**Figura 47.** Expresión relativa del gen IL-6.

### **Tablas:**

**Tabla 1.** Fenotipo de modelos murinos de aterosclerosis.

**Tabla 2.** Media de los valores Ct para un gen objeto de estudio y GAPDH a diferentes concentraciones de cDNA.

**Tabla 3.** Ejemplo de cuantificación relativa de un gen usando el método Ct.

**Tabla 4.** Comparaciones inter e intra grupo. Pesos.

**Tabla 5.** Comparaciones inter e intra grupo. Colesterol total.

**Tabla 6.** Comparaciones inter e intra grupo. HDL colesterol.

**Tabla 7.** Comparaciones inter e intra grupo. Actividad paroxonasa.

**Tabla 8.** Comparaciones inter e intra grupo. Actividad arilesterasa.

**Tabla 9.** Comparaciones inter e intra grupo. Triglicéridos.

**Tabla 10.** Comparaciones inter e intra grupo. Lípidos peroxidados.



Introducción



### **III) Introducción.**

#### **1. Enfoque actual de la aterosclerosis.**

El poder sumar a las opciones técnicas, cada vez más avanzadas, los nuevos conocimientos en biología molecular, inmunología, genómica, metabolómica y proteómica, modifica nuestra forma de entender la aterosclerosis y, por tanto, nuestra actitud frente a ella. Ya no es suficiente con la aplicación de técnicas terapéuticas, por muy sofisticadas que sean; no queda más remedio que introducir en nuestro campo de conocimientos nuevas nociones sobre aterosclerosis, sus factores de riesgo y su evolución natural, y sobre la forma de modificarla y evitar, una vez que ya ha aparecido, su progresión o el inicio de complicaciones.

Durante décadas la aterosclerosis fue considerada como una enfermedad producida por el almacenamiento de lípidos en las arterias. Los avances recientes en ciencias básicas han establecido el papel fundamental que tiene la inflamación y los mecanismos celulares y moleculares, durante todas las etapas de esta enfermedad, desde el inicio, la progresión y, en última instancia, las complicaciones trombóticas. Estas nuevas ideas donde la inflamación juega un papel fundamental en la enfermedad aterosclerótica, no sólo aumentan nuestra comprensión sobre esta enfermedad, sino que también tienen aplicaciones clínicas prácticas tanto en la clasificación del riesgo, como en la orientación de estrategias terapéuticas innovadoras dirigidas a paliar esta pandemia de creciente importancia en todo el mundo. Así por ejemplo, los marcadores séricos de inflamación, se han convertido en indicadores de aterosclerosis de gran interés y los posibles efectos pleiotrópicos de cierta clase de drogas con inesperados efectos antiinflamatorios y por tanto antiaterogénicos, abren nuevas vías de investigación en este campo.

---

## 1.1 La Aterosclerosis en cifras.

La aterosclerosis es la principal causa de morbimortalidad en la sociedad actual, pudiendo ser la base de un evento isquémico, un accidente cerebro vascular (ACV) o vascular periférico y de insuficiencia renal (WHO 2008. Factsheet N°317. Febrero 2007).

Las enfermedades cardiovasculares son la causa número uno de muerte global y se estima que lo seguirán siendo en el futuro. En 2005, 17.5 millones de personas murieron de enfermedad cardiovascular, lo que supone un 30% del total de muertes a nivel mundial. De estas, 7,6 millones fueron debidas a ataques cardíacos y 5,7 millones a infarto, y aunque son los grupos socioeconómicos más desfavorecidos de los países de rentas per-cápita altas, los que generalmente tienen mayor prevalencia de factores de riesgo, enfermedad y mortalidad, alrededor del 80% de estas muertes ocurrieron en países de renta per-cápita medio-baja (WHO 2008. Factsheet N°317. Febrero 2007). Si no se toman medidas adecuadas, se estima que para el año 2015 unos 28 millones de personas morirán cada año debido a enfermedades cardiovasculares (CVD) (WHO 2008. Factsheet N°317. Febrero 2007).

En Europa, también es la enfermedad cardiovascular la causa principal y más común de muerte, con el 48% del total de las muertes que se producen. El costo para la economía de la Unión Europea debido a estas enfermedades, se ha estimado en 192 billones de € por año (EHN, Febrero 2008).

En el contexto mundial, nuestro país no es una excepción. A pesar de los cambios en el estilo de vida y del uso de nuevas alternativas farmacológicas principalmente enfocadas a disminuir las concentraciones plasmáticas de colesterol, la enfermedad cardiovascular es también la principal causa de muerte en España (INEbase [online]. <http://www.ine.es/inebase/>)<sup>1</sup>. Según los datos que maneja el INE (Instituto Nacional de

---

Estadística) en el año 2006, dentro de las enfermedades cardiovasculares, el síndrome coronario agudo fue la primera causa de muerte entre los hombres y por su parte, las enfermedades cerebrovasculares fueron la principal causa entre las mujeres.

En Canarias, el grupo de las patologías cardiovasculares se mantuvo en 2006 como primera causa de muerte (32,5% del total de defunciones) (INE, Abril 2008).

## **1.2 Hipótesis aterosclerótica.**

Debido a que la alta concentración de colesterol en plasma, en particular el transportado en las lipoproteínas de baja densidad (LDL), es uno de los principales factores de riesgo de aterosclerosis<sup>2-4</sup>, el proceso de aterogénesis ha sido considerado durante mucho tiempo como el acumulo de lípidos en las paredes arteriales; sin embargo, es mucho más que eso. Numerosas evidencias han echado por tierra esta visión tradicional<sup>5</sup>. Hoy por hoy, la aterosclerosis se considera una enfermedad inflamatoria crónica que afecta de forma selectiva a las arterias.

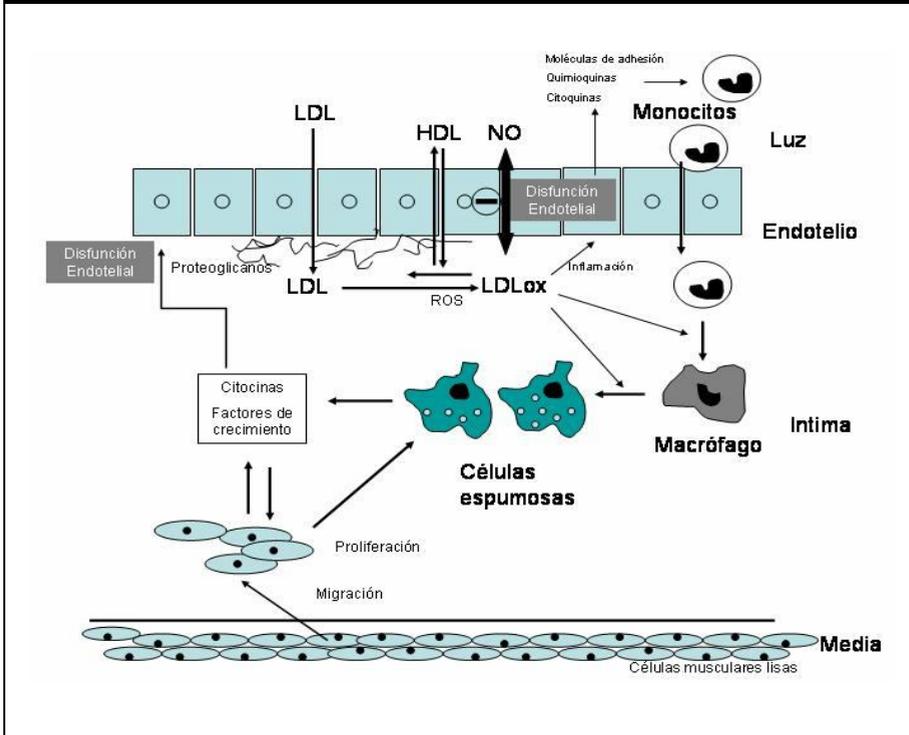
Las lesiones provocadas por la aterosclerosis representan una serie altamente específica de respuestas celulares y moleculares, descritas en su conjunto como una enfermedad inflamatoria<sup>6</sup>. Estas lesiones tienen lugar principalmente en las arterias de tamaño medio y grande y se producen a lo largo de la vida de una persona. De hecho, el tipo de lesión más temprana, llamada estría grasa, es una lesión inflamatoria en la capa más interna de la pared arterial, o íntima, con presencia de monocitos/macrófagos y linfocitos T<sup>7:8</sup> que puede aparecer en etapas muy tempranas de la vida.

Numerosas observaciones fisiopatológicas en humanos y animales, llevaron a formular la hipótesis aterosclerótica de “respuesta frente al daño”<sup>9:10</sup>, que inicialmente, proponía que la injuria endotelial constituía el

primer paso en el desarrollo de la aterosclerosis. Esta hipótesis ha sido constantemente modificada<sup>11-14</sup> hasta llegar a la versión más reciente de la misma, que enfatiza más en la disfunción endotelial y las modificaciones oxidativas, que en el propio daño al endotelio<sup>15;16</sup>, como desencadenantes del proceso aterosclerótico.

El endotelio es la monocapa de células que recubre de forma continua la pared interna de los vasos sanguíneos del organismo de los mamíferos. Las células endoteliales son células altamente especializadas capaces de adaptar su estado funcional a estímulos diversos, por lo que el endotelio ejerce diversas funciones ateroprotectoras: regula la coagulación, la trombosis y el sistema fibrinolítico; modula la actividad de las células musculares de la capa media y controla el tránsito de macromoléculas y células inflamatorias a la pared<sup>16;17</sup>. Cuando las funciones del endotelio son perturbadas se produce una disfunción endotelial, que favorece el desarrollo de lesiones ateroscleróticas desempeñando un importante papel en el inicio y desarrollo de la lesión<sup>15;18</sup>.

La disfunción del endotelio hace que aumente la capacidad del mismo para adherir leucocitos y plaquetas así como su permeabilidad a las LDLs que penetran al espacio subendotelial donde interactúan con proteínas de la matriz extracelular y sufren procesos de oxidación. Las LDL oxidadas alteran la producción de óxido nítrico<sup>19</sup> (NO), por lo que se perturban la homeostasis vascular y todas las funciones protectoras que el NO ejerce sobre la pared vascular<sup>20</sup>, potenciándose el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas (Figura 1).

**Figura 1. Disfunción endotelial.**

Diversos factores pueden modificar las funciones del endotelio y provocar lo que se conoce como disfunción endotelial. La disfunción endotelial puede definirse como un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas de origen endotelial que predispone a la inflamación, la vasoconstricción y el incremento de la permeabilidad vascular, y que puede facilitar el desarrollo de arteriosclerosis, agregación plaquetaria y trombosis.

Hay que destacar el papel protector de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) frente a los procesos oxidativos de las LDL. Las HDLs ejercen esta función participando en el transporte reverso de colesterol y además porque poseen propiedades antioxidantes (Figura 1), conferidas principalmente por la actividad hidrolítica de enzimas como la acetil hidrolasa del factor activador plaquetario (PAF-AH), la lecitin colesterol

---

acetil transferasa (LCAT)<sup>21</sup>, la paroxonasa 1 (PON1) y paroxonasa 3 (PON3)<sup>22</sup>, por su actividad antioxidante asociada a la glutatión selenoperoxidasa plasmática (GPX3)<sup>23</sup> y finalmente por la actividad antioxidante de su principal componente lipoprotéico: la apolipoproteína A-I (apo A-I)<sup>24;25</sup>.

PAF-AH es una enzima asociada en su gran mayoría al HDL en ratón<sup>26</sup>. Ésta, hidroliza los ácidos grasos peroxidados de los fosfolípidos de las LDLox<sup>21</sup>.

La enzima PON1 se encuentra también asociada en el plasma, a las HDLs<sup>27</sup>. El mecanismo de protección mediado por la PON1 contra la oxidación de lipoproteínas y la inflamación, reside en su capacidad de hidrolizar peróxidos lipídicos en las lipoproteínas oxidadas<sup>22</sup>, factores activadores de plaquetas (PAF) y otros fosfolípidos con estructura similar (*PAF-like*)<sup>28</sup>. Se ha visto que la PAF-AH no es suficientemente efectiva previniendo la oxidación de LDL, en un modelo de ratón deficiente en PON1, lo que sugiere que la PAF-AH y la PON1 actúan conjuntamente en la protección de la oxidación de las lipoproteínas<sup>29</sup>.

La GPX3 es capaz de reducir hidroperóxidos orgánicos como los de los fosfolípidos y se ha encontrado asociado a HDL en el plasma humano<sup>23</sup>. En base a esta capacidad, se le atribuye un papel en la protección del endotelio vascular, de los efectos tóxicos de los lípidos oxidados<sup>23</sup>.

Navab y colaboradores demostraron que las LDLs contienen pequeñas cantidades de hidroperóxidos, que pueden ser potencialmente iniciadores de la oxidación (*seeding molecules*). La apoA-1, es capaz de recoger estos hidroperóxidos de las LDLs *in vitro* y también *in vivo* después de la infusión de apoA-I a ratones y a humanos y por tanto inhibir la cascada de eventos inflamatorios que darían lugar a la formación de la estría grasa y a la lesión aterosclerótica<sup>24;25</sup>. El HDL es capaz de bloquear todos y cada uno

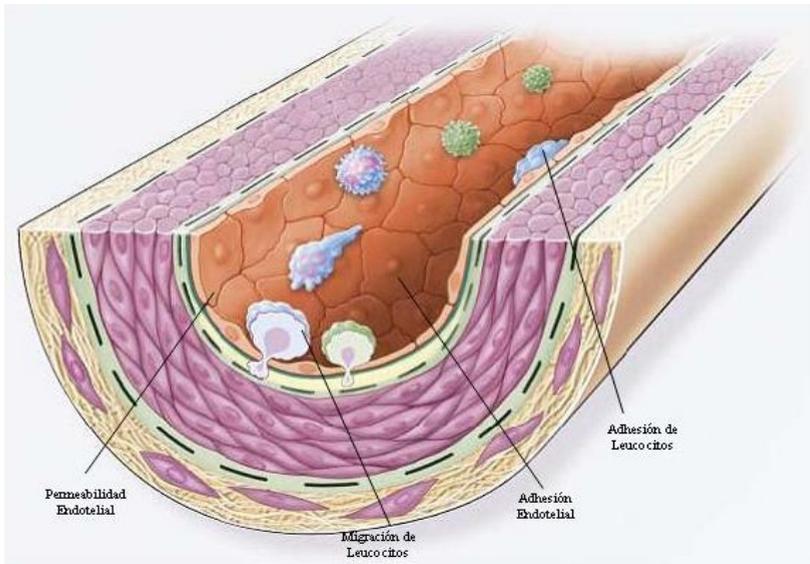
de los pasos que tienen lugar durante la formación de las LDLs minimamente oxidadas (LDLmox)<sup>24</sup>.

Además, se ha demostrado que las HDLs normales son capaces de inhibir la actividad de las LDLox, evitar que las células de la pared arterial transfieran más especies reactivas del oxígeno a las LDLs retenidas en la íntima e inactivar los fosfolípidos oxidados proinflamatorios que se hayan formado en las LDLox, bloqueando la oxidación de las LDLs a diferentes niveles<sup>30</sup>. También las HDLs tienen la capacidad de inhibir la producción de quimioquinas y moléculas de adhesión, por parte de las células endoteliales<sup>31</sup>.

Dada la composición proteica de las HDLs normales (carecen de apoB), estas pueden atravesar el endotelio de forma reversible a diferencia de las LDLs, que son retenidas en la matriz subendotelial de proteoglicano<sup>32</sup>. Las LDLs se caracterizan por la presencia de apoB lo que les confiere carga positiva, de forma que se ven atrapadas entre las cadenas de glucosaminglicanos con carga negativa que conforman la matriz de proteoglicano<sup>32</sup>. Según Navab, las LDLs también pueden escapar del espacio subendotelial, siempre y cuando no hayan alcanzado un nivel crítico de oxidación que las obliga a quedar atrapadas en la matriz<sup>24</sup>.

El endotelio disfuncional tiene propiedades pro-coagulantes en lugar de anticoagulantes y forma moléculas vasoactivas, citoquinas y factores de crecimiento. Si la respuesta inflamatoria no neutraliza eficazmente o no elimina los agentes ofensivos, ésta puede continuar indefinidamente (Figuras 1, 2 y 3).

**Figura 2. Lesión temprana.( Modificada de Ross y colaboradores<sup>7</sup>)**

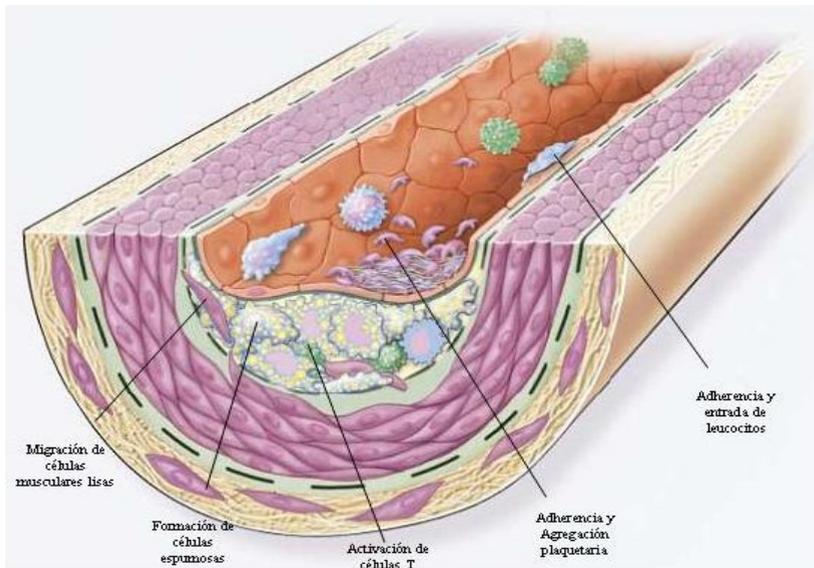


El endotelio incrementa su permeabilidad a lipoproteínas, prostaciclina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), angiotensina II y endotelina.

Sobreexpresión de moléculas de adhesión leucocitarias (L-serina, integrinas, molécula de adhesión plaquetas-células endoteliales 1) y endoteliales (E-selectina, P-selectina, moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), moléculas de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1)).

Migración de leucocitos hacia la pared arterial mediada por lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox), proteína quimiotáctica de monocitos 1(MCP-1), interleucina-8 (IL-8), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y el factor estimulador de colonias de macrófagos (MCSF-1).

**Figura 3. Formación de la estría grasa (Modificada de Ross y colaboradores<sup>7</sup>)**



Migración de células musculares lisas, estimuladas por el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos  $\beta$  (FGF- $\beta$ ) y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ).

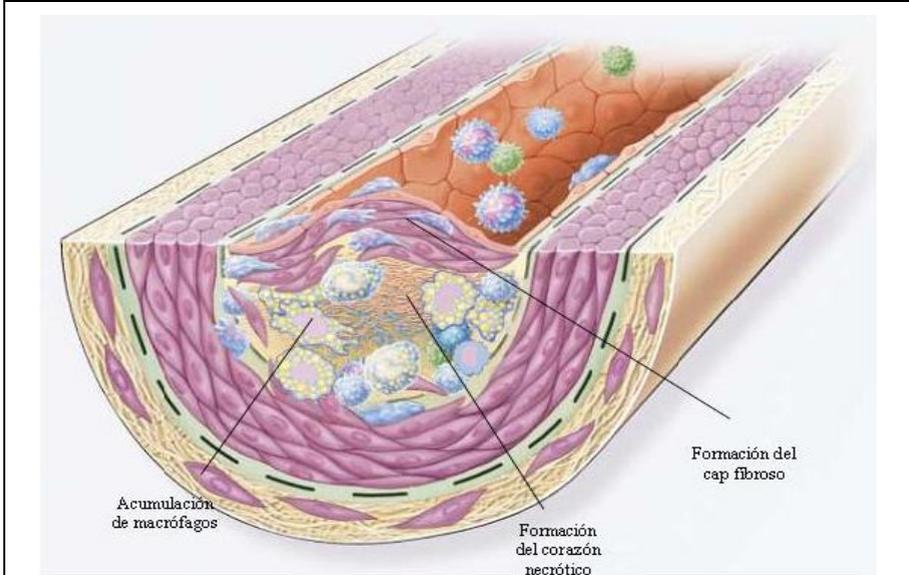
Activación de células T, mediada por el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), la interleucina 2 (IL-2), y el factor estimulador de colonias granulocitos-macrófagos (GM-CSF).

Formación de células espumosas mediada por las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox), el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), y la interleucina 1 (IL-1).

Adherencia y agregación plaquetaria y leucocitaria, estimuladas por integrinas, P-selectina, fibrina, tromboxano A<sub>2</sub>, LDLox, MCP 1 (proteína-1 quimiotáctica de monocitos), PDGF, etc.

La respuesta inflamatoria estimula la migración (desde la media a la íntima) y proliferación de células musculares lisas (CML) que se mezclan en el área de inflamación con capas de macrófagos y donde pueden transformarse en células espumosas<sup>33;34</sup>, contribuyendo a la progresión de las lesiones y formando lo que se denomina lesión intermedia. Si esta respuesta no cesa, este complejo celular podría engrosar la pared arterial, formando placas fibrosas, lo que se compensaría con una dilatación gradual de la arteria para que la luz del tubo no se altere (remodelación)<sup>35</sup>. La inflamación continuada provoca un incremento en el número de monocitos/macrófagos y linfocitos, los cuales migran desde la sangre y se multiplican en la lesión. La activación de estas células conlleva la liberación de enzimas hidrolíticas, citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento<sup>36</sup> que inducen más daño y eventualmente provocan necrosis focal. Por tanto, los ciclos de acúmulo de células mononucleares, la proliferación y migración de células musculares lisas y la formación de tejido fibroso llevan a un mayor crecimiento y reestructuración de la lesión, que comienza a cubrirse por un tapón o *cap* fibroso de tejido conectivo que cubre un corazón de lípidos o *core* lipídico y tejido necrótico; se origina la llamada lesión avanzada (Figura 4).

**Figura 4. Lesión avanzada. ( modificada de Ross y colaboradores<sup>7</sup>).**

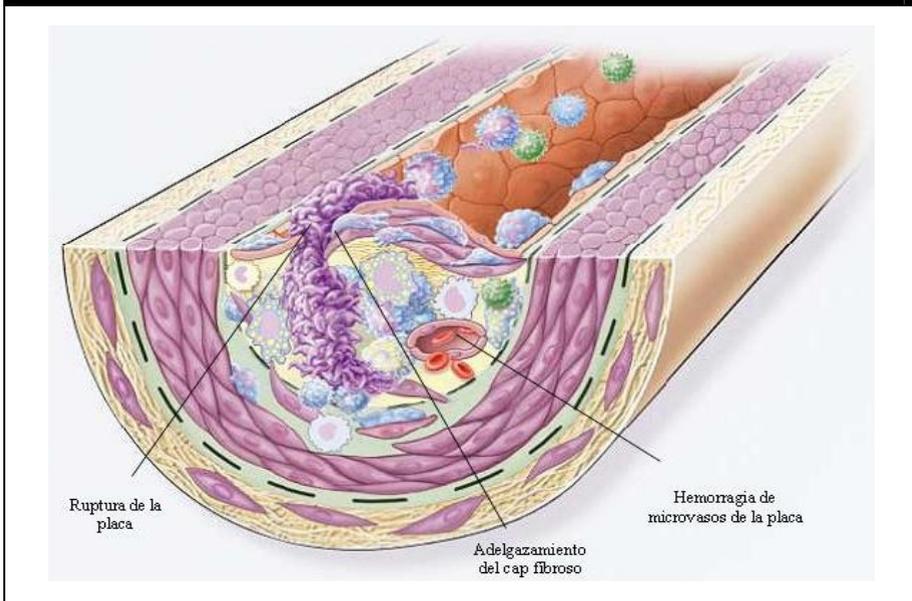


Mientras la estría grasa progresa hacia las lesiones intermedia y avanzada, tiende a formar un *cap* fibroso que cubre la lesión: una mezcla de leucocitos, lípidos y desechos, que forman el llamado *core* necrótico y que es el resultado de la apoptosis, la necrosis, el incremento de la actividad proteolítica y la acumulación de lípidos que tienen lugar en esta zona. Esta lesión se expande debido a la adhesión y entrada continua de leucocitos que promueven los mismos factores a los que hacíamos mención en las figuras 2 y 3.

En algún momento la arteria no puede compensar más la lesión por dilatación, y ésta se desplaza hacia el interior del lumen alterando el flujo normal de la sangre. La estabilidad y dureza de la placa fibrosa se debe al colágeno intersticial de la misma secretado por las células musculares lisas que forman parte de ella<sup>37-40</sup>. La inflamación constante bloquea la creación de nuevas fibras de colágeno sintetizadas por las células musculares lisas y estimula la destrucción del colágeno existente. Además, los linfocitos T que

también participan en el proceso inflamatorio, sintetizan el ligando CD40 y la interleucina-1 (IL-1). Ambas moléculas son utilizadas por los macrófagos para sintetizar a su vez, enzimas degradadoras de colágeno como las metaloproteasas, las cuales promueven la vulnerabilidad de la placa. La ruptura o fisura del *cap* fibroso, especialmente en los márgenes donde hay más macrófagos y por donde sufre un adelgazamiento, puede provocar la liberación de un trombo (Figura 5). Si no se rompe, la placa puede avanzar calcificarse y ocluir la arteria *in situ*.

**Figura 5. Placa inestable. (Modificada de Ross y colaboradores<sup>7</sup>).**



La ruptura del *cap* fibroso o la ulceración de la placa fibrosa pueden provocar una trombosis. Esta rotura ocurre normalmente donde el *cap* fibroso es más delgado. El adelgazamiento del *cap* fibroso es debido al continuo influjo y activación de macrófagos que liberan metaloproteasas y otras enzimas proteolíticas. Estas enzimas degradan la matriz, la placa puede romperse formando un trombo y producir la oclusión de otra arteria.

---

## **2. Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas.**

### **2.1 Papel de los distintos tipos celulares de la pared vascular en la aterosclerosis.**

#### **2.1.1 El endotelio.**

Inicialmente se creía que el endotelio era una simple barrera inerte entre la sangre y la pared vascular. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado, que el endotelio es un verdadero órgano de regulación vascular, un elemento activo con múltiples funciones<sup>15;41</sup>. El endotelio regula la interacción de las células y las proteínas circulantes con las células residentes en la pared vascular, ejerciendo un papel central como sensor y transmisor de señales<sup>16</sup>. Las células endoteliales son capaces de detectar los cambios tanto físicos (estrés mecánico hemodinámico) como químicos (liberación de moléculas en su entorno) y transformarlos en respuestas funcionales adaptativas. Esta capacidad de adaptación le confiere un papel clave en la regulación de la homeostasis vascular<sup>16</sup>.

El endotelio regula factores que, en algunos casos, operan antagonicamente<sup>17</sup>. Como ya habíamos adelantado, el endotelio regula el tono vascular y la presión arterial mediante la producción de moléculas vasodilatadoras como el NO y la prostaciclina, y de sustancias vasoconstrictoras como la endotelina y la angiotensina II<sup>15;41-43</sup>. El endotelio posee también propiedades antitrombóticas: inhibe la adhesión plaquetaria y la coagulación y regula el sistema fibrinolítico. Otra de sus funciones es el mantenimiento de la integridad de la pared vascular, es decir, impedir que dentro de la pared de los vasos penetren elementos presentes en la sangre como monocitos y lipoproteínas y al mismo tiempo evitar que las plaquetas

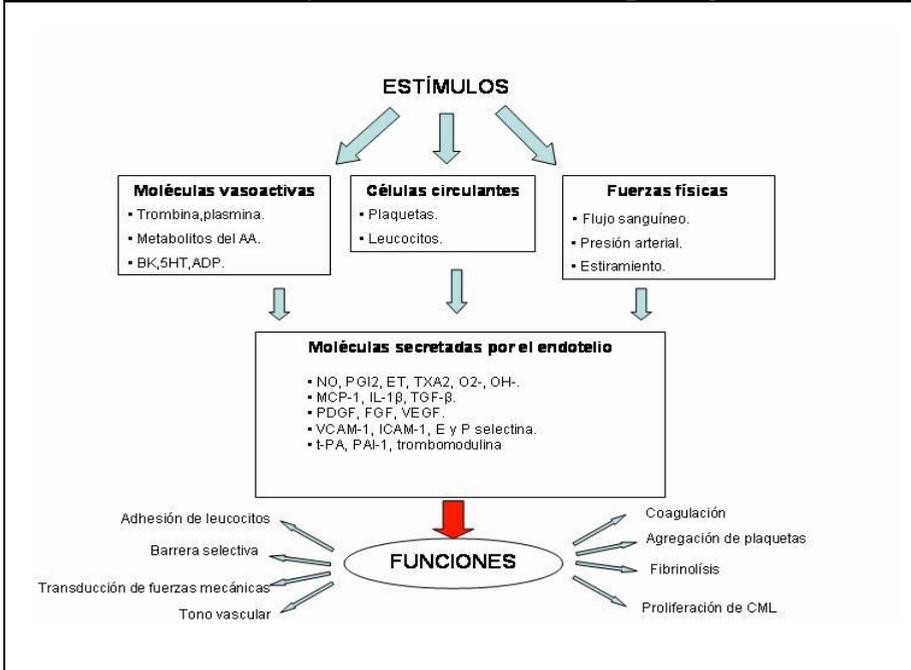
---

se adhieran a la pared. El endotelio también organiza la proliferación celular vascular que tiene lugar en las placas ateroscleróticas. La disfunción endotelial ya comentada, produce una perturbación del balance entre los agentes vasoactivos o entre sus funciones pro y anti-trombogénicas. El endotelio activado por agentes proinflamatorios expresa valores más elevados de moléculas de adhesión (CAMs) de leucocitos circulantes, de sustancias quimioatrayentes (MCP-1), expresa y secreta citocinas (IL-1) y factores de crecimiento (PDGF, FGF- $\beta$ )<sup>44</sup>. La disminución de la liberación de NO o su inadecuada formación, modifica la homeostasis vascular<sup>45</sup>. Todas estas alteraciones conllevan al incremento de la agregación plaquetaria, de la inflamación, de la vasoconstricción y de la permeabilidad vascular que en última instancia facilitan todas ellas el desarrollo de la aterosclerosis<sup>5;7;16;17</sup> (Figura 6).

El NO es clave en la disfunción endotelial y por tanto en la patogénesis de la aterosclerosis<sup>46;47</sup>. En el endotelio, es sintetizado a partir de la L-arginina por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). El NO es la molécula ateroprotectora por excelencia: vasodilatador, antiagregante plaquetario, inhibidor de la proliferación de las CML, antioxidante, inhibidor de la adhesión de monocitos y de la oxidación de las LDLs<sup>45;48</sup>, por tanto, la disminución de la liberación de NO o de su biodisponibilidad, potencia el daño endotelial y facilita la migración y proliferación de las CML y la agregación plaquetaria. Además, incrementa la contracción vascular a través de la síntesis de endotelina-1, tromboxanos y serotonina<sup>17</sup>. El papel de la eNOS en la enfermedad cardiovascular y su importancia en las complicaciones de la aterosclerosis, la corroboran diferentes estudios en modelos murinos *knock-out*<sup>49;50</sup>. También en humanos, se encuentra una asociación entre determinadas variantes polimórficas del gen de la eNOS, tanto en regiones codificantes como en la región promotora, con una

respuesta endotelial modificada<sup>17;51</sup> y con un mayor riesgo de enfermedad coronaria<sup>52</sup>.

**Figura 6. Moléculas secretadas por el endotelio en respuesta a estímulos y funciones vasculares que regula.**



AA: ácido araquidónico, BK: bradiquinina, 5HT: 5-hidroxitriptamina, ADP: adenosíndifosfato, NO: óxido nítrico, PGI<sub>2</sub>: prostaciclina, ET: endotelina, TXA<sub>2</sub>: tromboxano A<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>: anión superóxido, OH<sup>-</sup>: anión hidroxilo, MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos-1, IL-1β: interleucina-1β, TGF-β: factor de crecimiento transformante-β, PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas, FGF: factor de crecimiento de fibroblastos, VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular, VCAM-1: moléculas de adhesión de células vasculares-1, ICAM-1: moléculas de adhesión intercelular-1, tPA: activador del plasminógeno tisular, PAI-1: inhibidor-1 de tPA, CML: células musculares lisas.

---

En las últimas décadas se ha demostrado que factores de riesgo coronario bien conocidos (el colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad, el tabaquismo, la diabetes, la hipertensión) y otros factores emergentes (radicales libres del oxígeno, homocisteína, infecciones, déficit estrogénico) producen disfunción endotelial<sup>16</sup>. De hecho, el incremento de la permeabilidad endotelial, producida por las LDL, ha sido observado *in vitro*<sup>53</sup>, *ex vivo*<sup>54</sup> e *in vivo*<sup>55</sup>. Además, se ha demostrado que las LDLs oxidadas alteran la producción de NO<sup>19;20</sup> en el endotelio. A pesar de todas estas observaciones, no se puede afirmar con rotundidad que las LDLox sean las responsables únicas de la disfunción endotelial. La propia eNOS es una importante fuente de superóxido (en lugar de NO) cuando su actividad está desacoplada y a su vez, ésta misma generación de superóxido favorece el mal funcionamiento<sup>56;57</sup> y el desacople de su actividad. Por tanto, podría ocurrir que fueran el propio estrés oxidativo generado por la disfunción enzimática, el desacople de la eNOS, el aumento de radicales libres, o incluso la fosforilación de la eNOS<sup>58</sup>, los causantes de la oxidación, al menos parcial de las LDLs.

### **2.1.2 Monocitos/macrófagos.**

Debido al carácter de respuesta inflamatoria-fibroproliferativa crónica del proceso aterosclerótico, los monocitos y linfocitos T tienen un papel clave tanto en su génesis como en la progresión de las lesiones<sup>59</sup>. El aumento de la unión de monocitos al endotelio parece deberse a un incremento de la expresión, por parte del endotelio disfuncionante, de moléculas de adhesión, que son inducidas por agentes proaterogénicos como citoquinas o las LDLox<sup>59;60</sup>.

Se ha propuesto un modelo de adhesión de los monocitos a la pared, según el cual una primera interacción lábil entre el monocito y el endotelio

---

se produciría a través de las selectinas<sup>60-62</sup>. En el endotelio activado, la sobreexpresión de VCAM-1 e ICAM-1 permitiría la unión más estable de los monocitos a través de receptores específicos. Posteriormente el monocito atraviesa el endotelio a través de los espacios intercelulares donde participan otras proteínas especializadas como la molécula de adhesión plaquetar-1 (PECAM-1)<sup>62</sup>. En la íntima, los monocitos maduran hacia macrófagos e incrementan la expresión de receptores basurero para engullir lípidos modificados. Los ésteres de colesterol se acumulan en su citoplasma y los macrófagos se convierten en células espumosas que no son más que macrófagos cargados de lípidos. La activación de la transformación en la íntima de los monocitos a macrófagos es estimulada por las LDL modificadas y diferentes moléculas producidas por los linfocitos T, las células endoteliales y las CML. Los linfocitos T producen interferón- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que activan a los monocitos, así como factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), que promueve la proliferación de los macrófagos. Los macrófagos que están presentes en todos los estadios de la aterogénesis, actúan también como células presentadoras de antígenos. Los macrófagos además son el principal mediador inflamatorio de las células en el microambiente de la lesión ateromatosa<sup>62</sup>.

#### **a) Captación de las LDL modificadas: receptores basurero.**

Uno de los procesos clave en el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas es la captación de LDL modificadas (oxidadas, acetiladas, agregadas, asociadas con proteoglicanos, incorporadas a complejos autoinmunes, glicosiladas) por los macrófagos<sup>63;64</sup>. Los macrófagos, además de tener receptores para las LDL nativas (LDLR), poseen la capacidad de

---

captar LDL modificadas en grandes cantidades y de convertirse en células espumosas<sup>63;65</sup>.

La interacción de las LDL con los proteoglicanos de la íntima favorece los procesos de modificación y agregación de las mismas. Las LDL modificadas atraen a otros monocitos hacia la lesión ayudando a expandir la respuesta inflamatoria<sup>66;67</sup>.

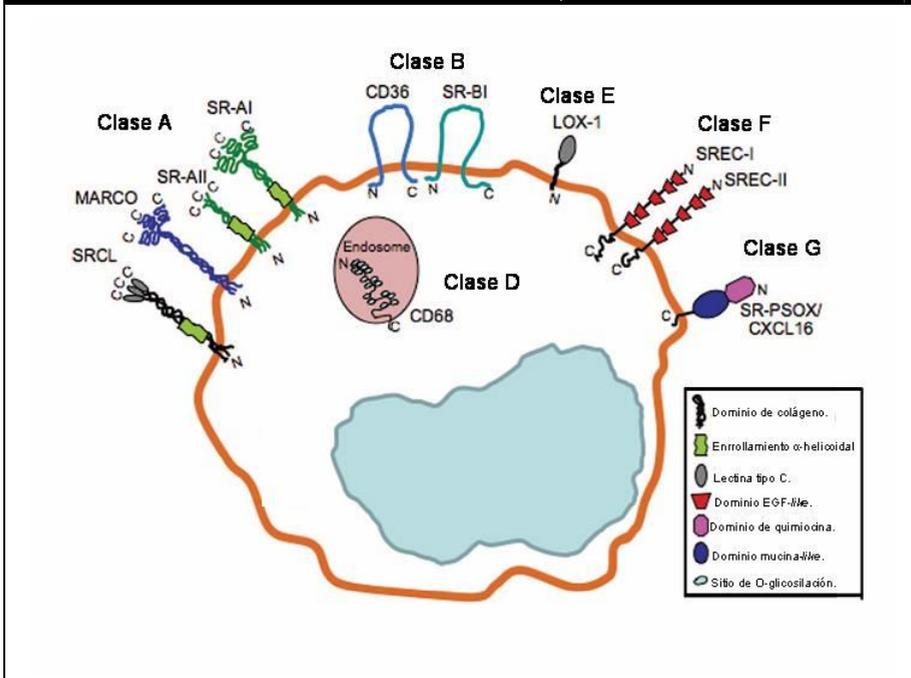
Las LDL agregadas son captadas por los macrófagos, mediante fagocitosis. Las LDLox se captan a través de los receptores basurero o *scavenger*<sup>63;68</sup>. Cuando las partículas de LDL se ven atrapadas en una arteria, se ven sometidas a una oxidación progresiva<sup>24;25</sup>. Durante el proceso de oxidación de las LDLs, los ácidos grasos sufren peroxidación, dando lugar a una serie de aldehídos de cadena corta, cetonas y otras sustancias, que se unen mediante enlaces covalentes a la apoB de las partículas de LDL. De esta manera pueden unirse al receptor *scavenger* y ser fagocitadas por los macrófagos. Después de unirse a estos receptores, las LDL modificadas inician una serie de eventos intracelulares que incluyen, la inducción de citocinas inflamatorias, manteniéndose así un círculo cerrado de inflamación-modificación de lipoproteínas-inflamación en el lugar de la arteria donde se ha producido la lesión. Este fenómeno se ve favorecido por la retención en la íntima de las LDLs oxidadas por la matriz extracelular<sup>69</sup>.

Estos mecanismos de captación de LDL a través de receptores *scavenger* no están regulados por la concentración intracelular de colesterol, por lo que se produce una acumulación de lípidos peroxidados y ésteres de colesterol en los macrófagos y en las células musculares lisas subyacentes dando lugar a las denominadas células espumosas<sup>70</sup>.

Los receptores *scavenger* han sido clonados en diferentes modelos animales y en humanos<sup>71</sup>. Estos receptores son proteínas integrales de membrana que unen una gran variedad de ligandos incluyendo LDLs

modificadas u oxidadas entre otros. Se han identificado numerosos receptores *scavenger* que se clasifican en distintas clases, tipos y subtipos (Figura 7).

**Figura 7. Representación esquemática de las diferentes familias de receptores scavenger. (Modificada de Moore y colaboradores<sup>65</sup>).**



SRCL: receptor *scavenger* con lectina tipo C, MARCO: receptor *scavenger* de macrófagos con estructura de colágeno, SR-AI: receptor *scavenger* clase A tipo I, SR-AII: receptor *scavenger* clase A tipo II, CD36: receptor *scavenger* de clase B, SR-BI ( SCARBI): receptor *scavenger* de clase B tipo I, CD68: receptor *scavenger* de clase D, LOX-1: receptor *scavenger* *lecitin-like* de LDLox, SREC-I: receptor *scavenger* de células endoteliales I, SREC-II: receptor *scavenger* de células endoteliales II, SR-PSOX/CXCL16: receptor *scavenger* de fosfatidil serina y lipoproteínas oxidadas.

---

Aunque hay evidencias de la expresión de alguno de estos receptores en las células espumosas de las placas ateroscleróticas de ratones apoE *knock-out*, como el CD68<sup>72</sup> o el LOX-1<sup>73;74</sup>, e incluso en lesiones ateroscleróticas humanas<sup>75</sup>, harían falta estudios adicionales en modelos *knock-out* específicos para estos receptores, con el fin de averiguar cual es el papel fisiológico de cada uno de ellos en el desarrollo de la aterosclerosis.

Los que si han sido bien estudiados en relación con su participación en el proceso de aterogénesis son los receptores *scavenger* para las LDLox CD36 y SCARB1. El gen SCARB1 fue originalmente identificado y clonado en ratones<sup>76</sup>. En humanos su homólogo se denomina CLA-1, acrónimo de “*CD36 and LIMP II analogous I*”<sup>77</sup>. Pertenecen a los receptores *scavenger* de clase B. Poseen una estructura de aminoácidos que atraviesa la membrana dos veces formando un gran lazo extracelular altamente glicosilado y dos pequeños dominios intracelulares amino y carboxi terminales. SCARB1 fue aislado en humanos por Calvo y Vega en 1993<sup>77</sup>. SCARB1/CLA-1 mapea en el cromosoma 5 de ratón y en el 12 en humanos.

CD36 que se sitúa en el cromosoma humano 7<sup>78</sup>, fue clonado por Tandon<sup>79</sup> en 1989. En ratones se localiza en el cromosoma 5.

A pesar de la similitud estructural entre CD36 y SCARB1 (comparten un 30% de homología en su secuencia de aminoácidos), estos dos receptores tienen un papel muy distinto en el metabolismo de lípidos y en la aterosclerosis: aunque ambos unen HDL con gran afinidad, SCARB1 facilita la toma selectiva de colesterol desde y hacia las HDLs, convirtiéndose en el protagonista esencial del transporte reverso de colesterol<sup>80</sup>. Sin embargo, CD36 es una glicoproteína que juega un importante papel en el aclaramiento de LDL oxidadas y en la acumulación de ésteres de colesterol en macrófagos. Se ha visto que ratones que no poseen el gen de CD36 manifiestan una reducción de las lesiones

---

ateroscleróticas por lo que se asume su papel proaterosclerótico<sup>81</sup>. CD36 también funciona en el macrófago como un receptor de LDLs moderadamente oxidadas, mientras que no une con gran afinidad LDLs acetiladas o muy oxidadas<sup>82;83</sup>.

SCARB1, al igual que CD36 puede unir LDL modificadas (oxidadas o acetiladas) así como HDL, LDL y VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad)<sup>76;80</sup>. Como hemos adelantado, facilita la toma selectiva de colesterol desde las HDL hacia el hígado donde se excreta a través de la bilis o heces y hacia las glándulas adrenales, ovarios y testículos, para la síntesis de hormonas (transporte reverso de colesterol). Además SCARB1 media la transferencia de colesterol desde las células hacia las HDL.

SCARB1 se expresa en gran cantidad en macrófagos y en el hígado<sup>80</sup>. Aunque los efectos antiaterogénicos de SCARB1 se le han atribuido a su habilidad para mediar en el transporte reverso de colesterol (TRC), este receptor está también muy expresado en los macrófagos de las lesiones ateroscleróticas de ratones y humanos, donde influye en el desarrollo de la lesión a través de la interiorización de lipoproteínas, y la salida de colesterol hacia las HDLs.

### **b) Degradación de la cubierta fibrosa.**

En las placas más susceptibles a rotura, hay pocas células musculares lisas, pero en ellas abundan los macrófagos y los linfocitos T, que secretan factores como el TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ) o IL-1 $\beta$  (interleucina-1 $\beta$ ), los cuales activan la producción de metaloproteasas (enzimas que degradan el tejido conectivo: colágeno y proteoglicanos) por parte de las células musculares lisas y los macrófagos.

---

### **2.1.3 Las células musculares lisas.**

Las células musculares lisas (CML) son el componente celular mayoritario al inicio de las lesiones ateroscleróticas, donde puede alcanzar hasta el 90% del contenido celular. En cambio como reseñamos anteriormente, en las lesiones avanzadas es inferior al 1%, donde predomina la matriz extracelular sobre las CML<sup>84;85</sup>. Las CML de la capa media son activadas por moléculas secretadas por el resto de células presentes en las lesiones ateroscleróticas<sup>59</sup>, con lo que sufren una transformación fenotípica: CML de fenotipo contráctil no proliferativo se transforman en células que proliferan activamente, que migran atraídas por agentes quimiotácticos y que producen proteínas de matriz extracelular (colágeno, elastina y proteoglicanos). Esta transformación activa la expresión de genes que codifican para factores de crecimiento (PDGF, IGF-1, etc.) y para sus receptores de membrana. Además, se estimula la producción de citocinas (TGF- $\beta$ , IL-1, etc.), a través de las cuales y junto con los factores de crecimiento, las CML modulan su propia actividad y la de otras células que intervienen en la aterogénesis. Después de que se produzca cierta proliferación de las CML en la media, estas migran a la íntima, donde proliferan activamente.

#### **a) Activación de las células musculares lisas en la media; migración a la íntima.**

La migración de las CML es controlada por un conjunto de mitógenos endoteliales producidos por macrófagos, como el FGF- $\beta$  (factor de crecimiento de fibroblastos  $\beta$ ), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), EGF (factor de crecimiento endotelial) y la trombina, que inducen la expresión de proteasas (plasmina y metaloproteasas) que degradan la matriz extracelular<sup>10</sup>. La actividad de estas enzimas, cuya

---

expresión se encuentra incrementada en las lesiones ateroscleróticas, facilita a su vez, la migración de las CML.

Por otro lado, el balance local entre la actividad del activador del plasminógeno tisular (t-PA) y del inhibidor-1 de dicho activador (PAI-1) puede repercutir en el proceso de migración de las CML y de síntesis/degradación de matriz extracelular y, por consiguiente, en la evolución de las lesiones.

### **b) Proliferación de las células musculares lisas en la íntima; síntesis de matriz extracelular.**

Numerosos estudios han demostrado, que el PDGF es clave en la proliferación de las CML en la íntima<sup>59;86-88</sup>.

La pérdida de endotelio producida por una lesión vascular hace que persista la interacción de plaquetas con la pared, lo que produce una liberación permanente de PDGF y que además desaparezca la inhibición que en condiciones normales ejerce el NO sobre la proliferación de las CML. Además del PDGF, otros agentes como la trombina y la angiotensina II promueven la proliferación de las CML y también facilitan la acumulación de matriz extracelular<sup>89;90</sup>. El TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante- $\beta$ ), producido en lesiones arteriales por los monocitos/macrófagos, induce la síntesis de matriz extracelular por parte de las CML<sup>59</sup>.

### **c) Formación de células espumosas.**

Las CML que proliferan activamente tienen una gran capacidad de sintetizar proteoglicanos que, al interaccionar con las LDL, favorecen su agregación y captación por estas mismas células y por los macrófagos<sup>33;34</sup>. Las CML activadas expresan receptores *scavenger* a través de los cuales captan LDL modificadas<sup>91</sup>. Estas células también captan las LDL agregadas

---

a través de un receptor denominado LRP (*low density lipoprotein receptor-related protein*) y acumulan cantidades significativas de ésteres de colesterol, considerados un marcador de formación de células espumosas<sup>92;93</sup>.

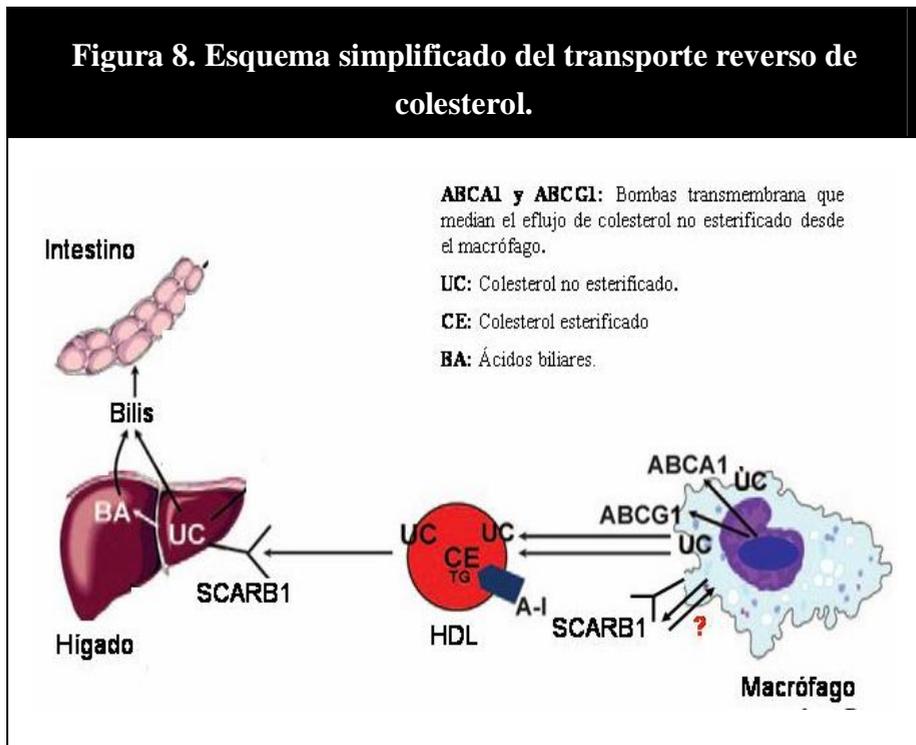
El LRP está altamente expresado en CML y no está regulado por las concentraciones intracelulares de colesterol, por lo que puede considerarse un mecanismo de alta capacidad/baja especificidad que permite la captación por parte de las CML de una gran cantidad de LDL agregadas. Además el LRP está altamente expresado en las lesiones ateroscleróticas, por lo que la captación de LDL modificada por agregación a través del LRP podría tener un papel significativo en la acumulación intracelular de lípidos en las CML de las placas ateroscleróticas.

### **3. Expresión hepática de los receptores *basurero* SCARB1 y CD36.**

La relación de la expresión hepática de SCARB1 con los niveles de HDL colesterol y con la aterosclerosis es paradójica. La sobreexpresión hepática de SCARB1 en ratones, reduce dramáticamente los niveles de HDL colesterol<sup>94;95</sup>, sin embargo, también reduce la aterosclerosis<sup>96-98</sup>. Por el contrario, la atenuación o bloqueo de SCARB1, resulta en un incremento sustancial de los niveles de HDL colesterol<sup>99</sup> y en un incremento también de la aterosclerosis<sup>100</sup>. Esta relación inversa entre la expresión hepática de SCARB1 con la aterosclerosis, está relacionada con el efecto de regulación positivo, que tiene SCARB1 sobre el transporte reverso de colesterol en el macrófago<sup>101</sup>.

El concepto de TRC fue introducido por primera vez en 1968 por Glomset<sup>102</sup> y Ross<sup>10</sup>, autores pioneros en relacionarlo con la aterosclerosis. El TRC (Figura 8) es el proceso por el cual el colesterol extrahepático o

periférico vuelve al hígado donde es excretado en la bilis. La necesidad fisiológica de este transporte es debida a que el colesterol que captan las células desde las lipoproteínas o que sintetizan *de novo*, es tóxico para las mismas si no es esterificado. En el hígado, SCARB1 media la captación hepática selectiva (el colesterol es captado, mientras que las proteínas del HDL como la apoA-I, no) de las HDL y la secreción biliar del HDL colesterol<sup>94;95;103</sup>. SCARB1 se expresa también en el macrófago, donde promueve la salida de colesterol hacia las partículas de HDLs<sup>104</sup> pero donde también promueve la toma selectiva de HDL-C. La contribución neta de este transporte bidireccional de HDL-colesterol en el macrófago, al TRC y por tanto a la aterosclerosis<sup>10</sup>, no esta totalmente comprendida<sup>105</sup>.



---

La expresión hepática de SCARB1 puede ser regulada por la dieta, el metabolismo o por manipulaciones farmacológicas<sup>106</sup>. En el hígado, la proteína soluble PDZK1 (también llamada CLAMP), se une a la región C terminal citoplasmática de SCARB1 donde parece controlar su estabilidad y actividad<sup>107</sup>. Recientemente, estudios *in vivo* e *in vitro* han indicado la importancia de ciertos receptores nucleares en la regulación de la expresión hepática de SCARB1. Así el *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$*  (PPAR- $\gamma$ ) ha sido identificado como uno de ellos<sup>108</sup>. Brevemente, aunque luego se explicará con más detalle, PPAR- $\gamma$  es, junto con otros PPARs, un factor de transcripción ligando dependiente, miembro de la superfamilia de receptores hormonales nucleares, que también incluye al receptor de ácido retinóico (RXR) y a los receptores de esteroides y hormona tiroidea<sup>109</sup>. PPAR- $\gamma$  heterodimeriza con el receptor X retinóico y funciona como un regulador transcripcional de genes relacionados con el metabolismo lipídico y la homeostasis de la glucosa<sup>109;110</sup>. Aunque la mayoría de los estudios sobre PPAR- $\gamma$  se han centrado en entender cómo regula el metabolismo de lípidos y glucosa, las investigaciones más recientes, sugieren que este receptor podría incluso jugar un papel adicional en los procesos de inflamación y aterosclerosis<sup>111;112</sup>.

La expresión del gen CD36 hepático no se había considerado fisiológicamente importante debido a los supuestos bajos niveles de expresión que se le atribuían en el hígado y al hecho de que la interiorización de lípidos hacia el hígado sea independiente de CD36<sup>113</sup>. Como consecuencia, se sabe muy poco sobre la regulación hepática del gen CD36. Sin embargo hay un estudio reciente que muestra que la expresión hepática de CD36 en ratas hembra es relevante<sup>114</sup>. Por el contrario en el macrófago se han realizado numerosos estudios sobre CD36, donde se ha determinado que PPAR- $\gamma$  es un regulador crítico de su expresión<sup>112;115</sup>. Particularmente esta

---

conclusión se deriva de los resultados de estudios en ratones genéticamente modificados<sup>116;117</sup>.

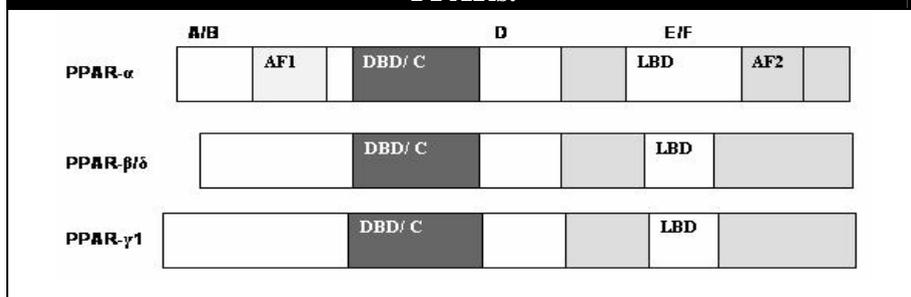
#### **4. Los receptores nucleares PPAR- $\gamma$ y Nrf-2.**

Los PPARs son factores de transcripción de la familia de los receptores hormonales nucleares, que participan en la regulación de diversos procesos biológicos como el metabolismo lipídico, la adipogénesis, la sensibilidad insulínica, la respuesta inmune o el crecimiento y diferenciación celular<sup>118-122</sup>.

Hasta hoy, tres subtipos diferentes de PPARs han sido clonados y caracterizados: PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta/\delta$ , y PPAR- $\gamma$ , este con varias isoformas: PPAR- $\gamma$ 1, PPAR- $\gamma$ 2, PPAR- $\gamma$ 3<sup>123;124</sup>. Los ligandos de los PPARs incluyen moléculas estructuralmente diversas, que varían desde compuestos químicos industriales y drogas farmacéuticas a ácidos grasos endógenos. Estos ligandos pueden inducir cambios moleculares y celulares en procesos como la adipogénesis, la  $\beta$ -oxidación o regulación del ciclo celular<sup>125</sup>.

De forma similar a otros receptores nucleares, los PPARs contienen cuatro dominios funcionales principales: el dominio de transactivación N-terminal ligando-independiente (Dominio A/B), el dominio de unión a DNA (Dominio DBD o C), el dominio de acoplamiento de cofactores (Dominio D) y el dominio C-terminal E/F que incluye al dominio de unión a ligando (LBD) y al dominio de transactivación ligando-dependiente (Dominio AF2). El LBD es multifuncional, además de la unión de ligandos este dominio tiene una región implicada en la dimerización con el Receptor retinóico X (RXR)<sup>126</sup> (Figura 9).

**Figura 9. Representación esquemática de la estructura de los PPARs.**



Estudios de mapeo génico indican que estos tres subtipos de PPAR:  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  y  $\gamma$ , son codificados por distintos genes que se localizan en los cromosomas humanos 22, 6 y 3 respectivamente e igualmente en los cromosomas 15, 17 y 6 en el ratón<sup>127</sup>. Las isoformas de PPAR- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ 1, PPAR- $\gamma$ 2 y PPAR- $\gamma$ 3), se generan por *splicing* diferencial tanto en ratones como en humanos. PPAR- $\gamma$ 1 y - $\gamma$ 3 comparten idéntica secuencia proteica, sin embargo, PPAR- $\gamma$ 2 da lugar a una proteína con 30 aminoácidos adicionales que no están presentes en las otras dos variantes. El uso diferencial de promotores, da lugar a los distintos patrones de expresión génica y distinta función biológica de los subtipos PPAR- $\gamma$ 1 y PPAR- $\gamma$ 3. La diferencia en la secuencia de aminoácidos del LBD de las tres isoformas de PPAR, explica la selectividad de cada una de ellas, por distintos ligandos. Aunque los ligandos fisiológicos que regulan la actividad de PPAR- $\gamma$  *in vivo*, no han sido establecidos con certeza, el escrutinio de sustancias naturales como ligandos candidatos, reveló que algunos metabolitos de ácidos grasos poli-insaturados se unían a PPAR- $\gamma$  con gran afinidad y activaban la transcripción de genes diana. De estos, los más potentes son el ácido 13-hidroxioctadecadienoico (HODE) y la 15-deoxiprostaglandina J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>)<sup>115;128;129</sup>. Además de estas sustancias naturales PPAR- $\gamma$  tiene ligandos

---

sintéticos como las tiazolidinadonas (TZD), usadas en clínica como antidiabéticos orales<sup>130</sup>.

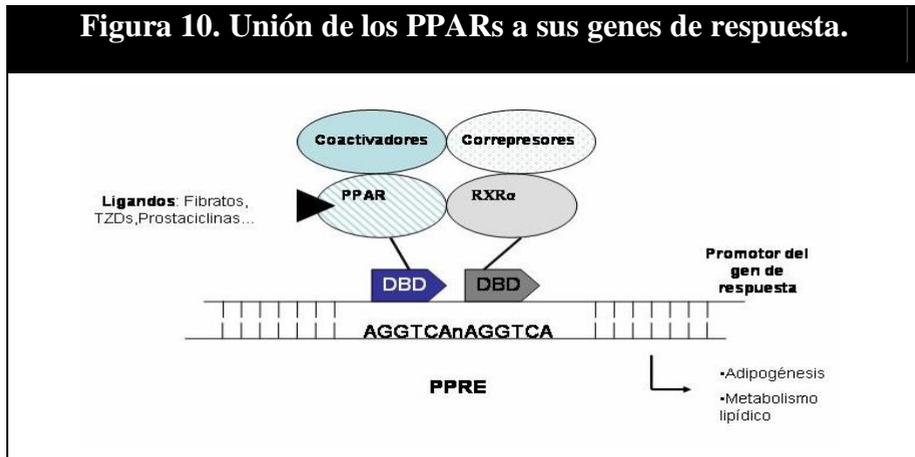
El siguiente receptor nuclear que nos atañe es el *nuclear factor-erythroid 2-related factor* (Nrf-2), un miembro de la familia de los factores de transcripción *Cap "n" Collar* con una región C-terminal básica de cremallera de leucinas (bZIP) altamente conservada y un dominio ácido N-terminal rico en ácido glutámico y aspártico<sup>131</sup>. Se localiza en el cromosoma 2 de ratón<sup>132</sup>. El factor de transcripción Nrf-2 es el mayor regulador de los genes que codifican las enzimas detoxificadoras de fase 2 y proteínas de estrés antioxidantes (NAD(P)H, quinona oxidoreductasa-1, glutatión S-transferasas, glutamato-cistina ligasa) en respuesta a agentes electrofílicos y al estrés oxidativo<sup>133</sup>. Además Nrf-2, es importante en la regulación de la síntesis de glutatión<sup>134</sup> y por tanto en la capacidad detoxificadora hepática.

#### **4.1 Mecanismo de acción de los PPARs.**

Las distintas isoformas de PPAR forman un heterodímero con el receptor- $\alpha$  retinoico X (RXR- $\alpha$ ) en presencia de sus ligandos. Un cambio conformacional en el dímero PPAR/RXR- $\alpha$  permite a través de los dominios de unión al DNA tanto de PPAR como de RXR- $\alpha$ , la unión de este heterodímero al elemento de respuesta a PPAR (PPRE) que existe en la zona promotora del gen de respuesta<sup>135-139</sup>. Los PPRE son secuencias específicas de DNA, generalmente del tipo "repetición directa 1" (DR1), formadas por la repetición de una secuencia consenso de hexanucleótidos (AGGTCA), separada por uno o dos nucleótidos. Puede estar presente en una o múltiples copias. Una vez se active el heterodímero en el PPRE, el complejo PPAR/RXR- $\alpha$  puede reclutar diversos cofactores (coactivadores o corepresores) que modulan la actividad transcripcional del heterodímero. Algunos de estos coactivadores son la proteína de unión al elemento de

respuesta a AMPc o receptores esteroideos y corepresores como receptores hormonales tiroideos y corepresores del ácido retinóico (Figura 10).

Por lo tanto, son múltiples los mecanismos involucrados en el control de la transcripción de los genes de respuesta a PPAR. El nivel de expresión de los receptores de PPAR, las propiedades químicas y concentraciones locales de ligandos PPAR-específicos y la disponibilidad de estos cofactores, todo, contribuye al efecto biológico de la activación o inactivación de PPAR<sup>140</sup>.



#### 4.2 Papel de PPAR-γ en el desarrollo de la aterosclerosis.

PPAR-γ se expresa sobre todo en tejido adiposo pero también en la vejiga urinaria, intestino, riñón, bazo, glándula suprarrenal, corazón, pulmones, cerebro, en la vasculatura y en el hígado, tanto en ciertas condiciones proaterogénicas (dieta rica en grasas y colesterol) como en ciertos modelos murinos de diabetes u obesidad<sup>141-143</sup>.

PPAR-γ juega un papel central en la adipogénesis, concretamente en la diferenciación de células adipocitarias y en la regulación de la homeostasis de la glucosa<sup>144</sup>. Muchos genes implicados en el transporte y

---

metabolismo de ácidos grasos son regulados transcripcionalmente por PPAR- $\gamma$ <sup>145</sup>. En ratones adultos se ha visto que PPAR- $\gamma$  es necesario para mantener la sensibilidad a la insulina y un equilibrio graso normal<sup>146</sup>. Además, la supresión de PPAR- $\gamma$  en tejido adiposo de ratones protege contra la obesidad inducida por dietas ricas en colesterol y grasas y contra la resistencia insulínica<sup>116</sup>.

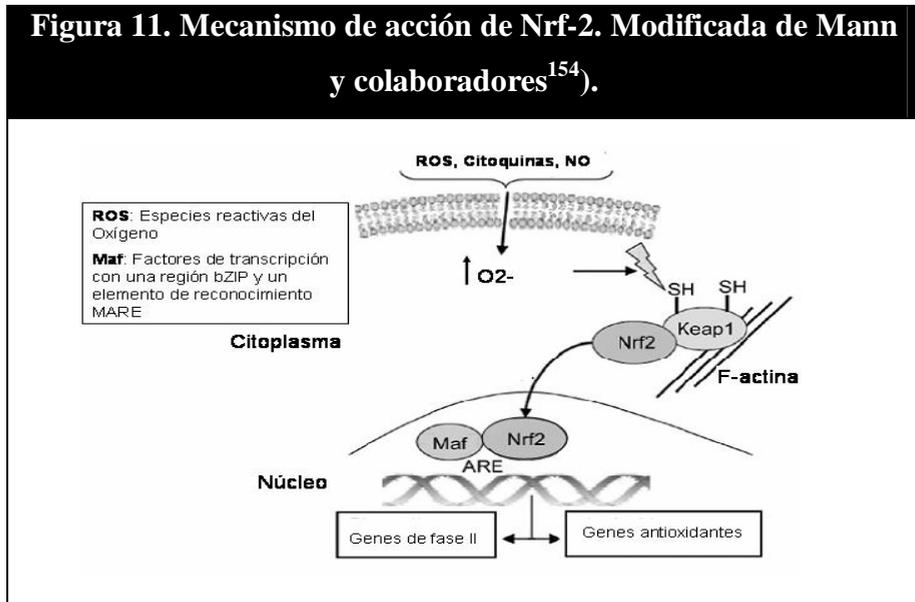
El gen de CD36 es una diana directa de PPAR- $\gamma$ , que se expresa en macrófagos<sup>112;115</sup> donde actúa como receptor de LDL oxidadas. PPAR- $\gamma$  se expresa en gran cantidad en células espumosas de lesiones ateroscleróticas de humanos y ratones<sup>112;147</sup>. Cabría esperar por tanto que agonistas de PPAR- $\gamma$  como la rosiglitazona promovieran el desarrollo de la aterosclerosis. Sin embargo, se ha demostrado que este ligando de PPAR- $\gamma$ , inhibe el desarrollo de aterosclerosis en ratones LDLR<sup>-/-</sup> sometidos a dieta aterogénica, a pesar del incremento de expresión de CD36 que se produce en las paredes arteriales de estos animales<sup>117</sup>.

El gen SCARB1 pertenece a la misma familia de receptores que CD36<sup>76;77;148</sup>, por lo que su regulación es similar. También tiene un elemento de respuesta a PPAR- $\gamma$  en su promotor y por tanto se ve afectado por las modificaciones que sufra este factor de transcripción.

Aunque son numerosos los trabajos que indican que PPAR- $\gamma$  está sobreexpresado en hígado en determinados modelos de obesidad en ratones<sup>142;143</sup>, aún se desconoce el papel fisiológico que desempeña allí. Sin embargo hay datos que indican que, PPAR- $\gamma$  hepático juega un papel crítico en la regulación del contenido de triglicéridos (TG) hepáticos, en la homeostasis de la glucosa en sangre y en la resistencia insulínica<sup>149</sup>.

### 4.3 Mecanismo de acción de Nrf-2.

Nrf-2 media su acción uniéndose específicamente al elemento de respuesta antioxidante (ARE) que se encuentra en los promotores de los genes de respuesta. La secuencia ARE se definió mediante análisis mutacionales como: 5'-TGACnnnGCA-3'<sup>150</sup>. Bajo condiciones fisiológicas normales, Nrf-2 se une a la proteína 1 *Kelch-like ECH-associated* (Keap-1) y queda sequestrada en el citoplasma, asociada a la actina del citoesqueleto. En condiciones de estrés oxidativo, Nrf-2 se libera de Keap-1 y rápidamente se transloca al núcleo donde se une con los factores de transcripción Mafs (factores de transcripción con un elemento de reconocimiento MARE muy similar a la secuencia consenso ARE y una región bZIP), a la secuencia ARE de sus genes diana<sup>133;151-153</sup> (Figura 11).



---

#### **4.4 Papel de Nrf-2 en el desarrollo de la aterosclerosis.**

Hay evidencias de que las LDLox y algunos lípidos hidroperoxidados contenidos en las LDLox, aumentan los niveles nucleares de Nrf-2 en macrófagos peritoneales de ratones produciéndose una sobrerregulación del receptor basurero CD36 y de proteínas antioxidantes de estrés. Nrf-2 por tanto actúa como un factor de transcripción secundario (además de PPAR- $\gamma$ ) que regula la expresión de CD36 y de genes de defensa antioxidantes durante el proceso de aterosclerosis<sup>155</sup>.

Por otro lado, bajo condiciones de flujo oscilatorio en las bifurcaciones de las arterias, la activación de Nrf-2 y la inducción de genes antioxidantes y de fase II están suprimidas<sup>156;157</sup>. Esto contribuiría a la progresión de la formación de la lesión aterosclerótica *in vivo*.

#### **5. Sistema renina-angiotensina adipocitario. Acción del losartán.**

El sistema renina angiotensina (SRA) juega un papel fundamental no solo en la regulación de la presión sanguínea, sino también en el desarrollo de la aterosclerosis<sup>158;159</sup>. Sabemos que los macrófagos de las lesiones ateroscleróticas sintetizan angiotensina II<sup>158</sup> y que la evolución de la aterosclerosis se ve influenciada por las acciones de la angiotensina II (ANGII) sobre: la función endotelial<sup>160</sup>, la unión y activación de monocitos<sup>161</sup>, la proliferación y migración de las CML<sup>162</sup> y la oxidación de las LDLs<sup>163</sup>. Se ha visto que los bloqueadores de los receptores tipo 1 de la angiotensina II (ARAI), que funcionan como agentes antihipertensivos, y además previenen la aterosclerosis en animales, mejoran la resistencia insulínica y el perfil lipídico<sup>164-166</sup>.

También se ha visto que la angiotensina II media la síntesis de proteoglicanos de la matriz subendotelial<sup>167</sup>.

---

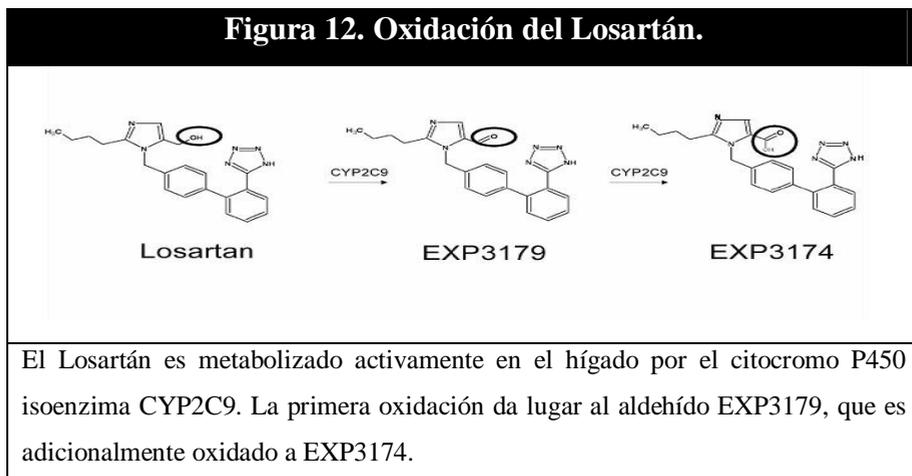
El losartán pertenece a este grupo farmacológico de agentes que modulan el SRA, por acción directa sobre los receptores tipo 1 de la angiotensina II<sup>168</sup>. Este fármaco inhibe de forma completa y específica las acciones de la ANGII que tienen lugar a través de su unión con los receptores de tipo 1, entre otras la vasoconstricción y la secreción de vasopresina y aldosterona<sup>168</sup>. Bloqueando esta unión por tanto, se consigue disminuir los niveles de presión arterial que, en última instancia pueden predisponer al desarrollo de aterosclerosis.

El estudio LIFE (*Losartan Intervention For End Point reduction in Hypertension*) mostró que los pacientes hipertensos que recibían el ARAII losartán, tenían una tasa 25% menor de diabetes de nuevo inicio que los pacientes que estaban tratados con el beta bloqueante atenolol<sup>169</sup>.

Se ha demostrado que diferentes ARAII, incluyendo el losartán, inducen la actividad parcial de PPAR- $\gamma$ <sup>170;171</sup>. La activación directa del dominio de unión a ligando de PPAR- $\gamma$  por los ARAII, es independiente de sus acciones bloqueadoras del receptor 1 de angiotensina (AT<sub>1</sub>R)<sup>171</sup>. PPAR- $\gamma$  funciona como un regulador transcripcional en tejido adiposo, donde regula múltiples genes implicados en el metabolismo de lípidos y glucosa. Por tanto, activado por agonistas totales sintéticos como las glitazonas, PPAR- $\gamma$  aumenta de forma general la sensibilidad a la insulina, produciendo un descenso en los niveles de glucosa, insulina y triglicéridos en el plasma<sup>172</sup>.

El losartán ejerce su acción antihipertensiva *in vivo* a través de su principal metabolito, el EXP3174<sup>173</sup>. Durante la metabolización hepática del losartán también se produce un metabolito activo adicional llamado EXP3179, homólogo estructural de la indometacina (inhibidor de la COX-2 endotelial, capaz de activar a PPAR- $\gamma$ <sup>173;174</sup>)(Figura12). EXP3179 aumenta la diferenciación adipocitaria, induce la expresión de genes diana de PPAR- $\gamma$  y activa el dominio de unión a ligando de PPAR- $\gamma$ <sup>175</sup> por lo que se cree

responsable de proporcionar la beneficiosa acción antidiabética del losartán que se observa en los ensayos clínicos y en estudios con animales.

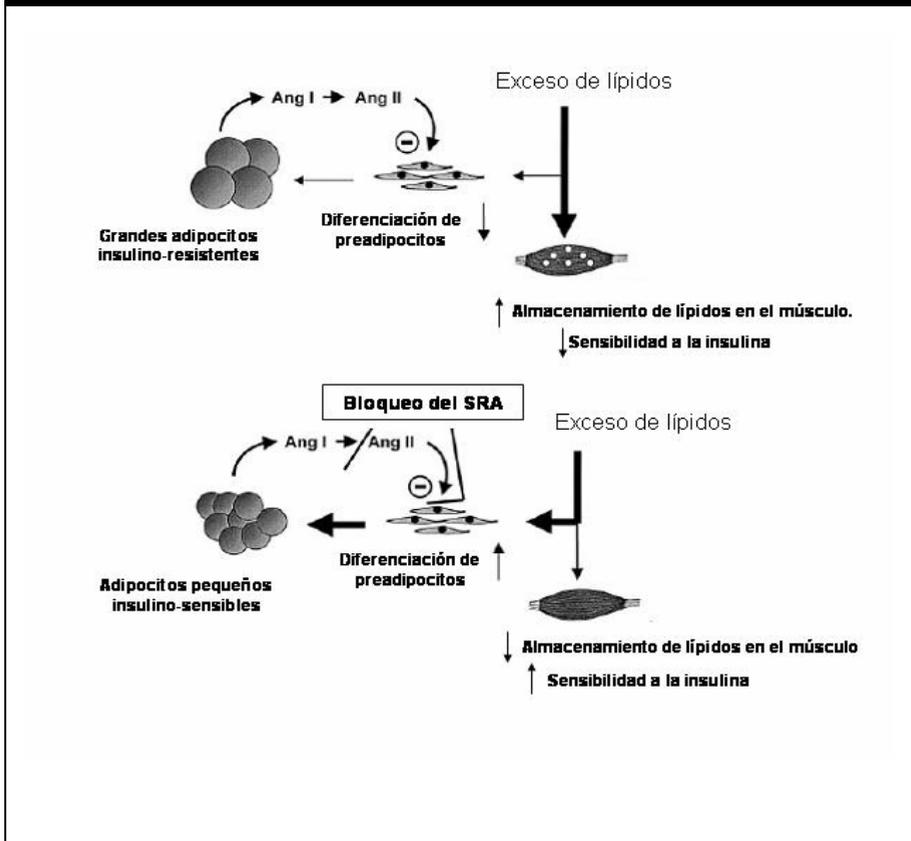


El bloqueo del SRA también tiene consecuencias sobre el tejido adiposo. Por un lado la ANGII inhibe la diferenciación de adipocitos humanos a través del  $AT_1R$ <sup>176</sup>. Además, se ha visto que la expresión de ciertas enzimas que participan en la síntesis de ANGII en el tejido adiposo correlaciona inversamente con la sensibilidad a la insulina<sup>177</sup>.

Ambas observaciones llevaron a Arya Sharma y colaboradores<sup>178</sup> a sugerir que la síntesis incrementada de ANGII por parte de los grandes adipocitos insulino-resistentes es la responsable de inhibir el reclutamiento y diferenciación de preadipocitos, lo que produce un incremento en el almacenamiento de lípidos en el músculo y en otros tejidos y por tanto un aumento de la resistencia a la insulina. Por el contrario, el bloqueo del SRA, promueve la diferenciación adipocitaria y por tanto aumenta el número de pequeños adipocitos insulino-sensibles. Los lípidos se redistribuyen desde el músculo y otros tejidos hacia el tejido adiposo mejorando la sensibilidad a la insulina<sup>178</sup> (Figura 13).

Es importante destacar que un trabajo realizado en roedores indica que, justo al contrario de lo que ocurre en humanos, la ANGII promueve la diferenciación adipocitaria<sup>179</sup>. Sin embargo, estudios más recientes demuestran que suprimiendo específicamente el AT<sub>1</sub>R en ratones apoE<sup>-/-</sup> (ratones deficientes para el gen de la apo E), se logra una reducción importante del tamaño de los adipocitos y se promueve la diferenciación de los preadipocitos<sup>180</sup>.

**Figura 13. Acción del bloqueo del SRA sobre el metabolismo de lípidos. (Modificada de Sharma y colaboradores<sup>178</sup>).**



---

## 6. Tiazolidinadionas: efectos antiaterogénicos. La rosiglitazona.

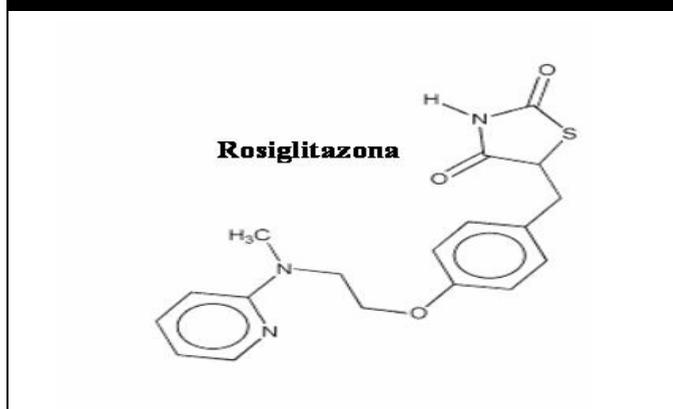
Las tiazolidinadionas son agonistas de PPAR- $\gamma$  que mejoran la sensibilidad insulínica, reducen los niveles de triglicéridos y disminuyen el riesgo de aterosclerosis en pacientes diabéticos.

Las TZDs también ejercen efectos directos sobre las células vasculares de la pared<sup>181-183</sup>. Los tratamientos con TZDs inhiben las lesiones de la íntima<sup>184</sup>, impiden que los monocitos elaboren citoquinas inflamatorias<sup>185</sup>, impiden la activación de macrófagos<sup>186</sup>, y la expresión de moléculas de adhesión celular<sup>187</sup>, lo cual disminuiría el riesgo de aterosclerosis.

Como anotamos anteriormente, las TZDs incrementan la expresión del RNAm del gen proaterogénico CD36 a través de la activación de PPAR- $\gamma$ . Sin embargo, la mayoría de los autores sugieren que el efecto de las TZDs sobre el aumento de la expresión de CD36 es contrarrestado por sus efectos antiaterogénicos<sup>117;188</sup>.

A través también de PPAR- $\gamma$ , las TZDs modulan la diferenciación adipocitaria, incrementando el número de adipocitos pequeños insulino-sensibles y movilizandando la grasa localizada en las vísceras hacia depósitos subcutáneos<sup>189;190</sup>. Como ya hemos visto la ANGII juega un papel crítico en la progresión de la aterosclerosis e hipertensión vía su receptor tipo 1. En distintos tipos celulares se ha visto que, PPAR- $\gamma$  suprime la transcripción del gen del AT<sub>1</sub>R. Agonistas de PPAR- $\gamma$  como las glitazonas contribuyen a la supresión transcripcional del gen del receptor de la ANGII<sup>116</sup>.

**Figura 14. Estructura química de la Rosiglitazona.**



La rosiglitazona (RG) pertenece a la familia de las TZD (Figura 14). Posee propiedades antiinflamatorias protectoras frente al desarrollo de la aterosclerosis independientes de sus efectos metabólicos, es decir de PPAR- $\gamma$ <sup>117;182;183;191</sup>. Se ha visto que este agonista de PPAR- $\gamma$ , mejora de forma notable la biodisponibilidad del NO y reduce la producción de superóxido, en un modelo de animales no diabéticos en condiciones de hipercolesterolemia. Esto justificaría que la RG ejerciera su función protectora endotelial reduciendo el estrés oxidativo y el estrés nitrosativo<sup>191</sup>. Igualmente atenúa la aterosclerosis asociada a diabetes en ratones diabéticos apoE<sup>-/-</sup>, sin que se observe un efecto sobre los niveles de insulina y glucosa plasmáticas<sup>182</sup> lo que indicaría que esta mejora en la disminución de la placa aterosclerótica, podría estar relacionada con vías de modulación del estrés oxidativo e inflamación en el tejido vascular.

Recientemente en humanos un metaanálisis<sup>192</sup> asocia el uso de la rosiglitazona con un aumento del riesgo de muerte por infarto de miocardio. Un nuevo estudio<sup>193</sup> ha corregido los errores metodológicos del metaanálisis de Nissen y concluye que el riesgo de infarto de miocardio asociado al uso de

---

rosiglitazona no es estadísticamente significativo. Aún así, se han incluido ciertas advertencias de uso en la ficha técnica de éste antidiabético oral y se ha iniciado una vigilancia intensiva de sus posibles efectos cardiovasculares adversos.

## 7. Modelos murinos de aterosclerosis.

Durante muchos años el ratón no fue utilizado como modelo de experimentación para la investigación en aterosclerosis debido a la creencia de que no podría sobrevivir bajo dietas aterogénicas, las lesiones no eran reproducibles, y la mayoría de los ratones ni siquiera desarrollaban la lesión o estas no se correspondían con las de la aterosclerosis humana<sup>194</sup>. Sin embargo hoy en día, el ratón se ha convertido en la especie preeminente para el estudio experimental de la aterosclerosis<sup>194</sup>. Su popularidad, como especie para el estudio de esta enfermedad se centra en lo relativamente económico de su adquisición y mantenimiento, su corto tiempo de generación (sobre las 9 semanas), la posibilidad de mantener grandes cohortes de animales, lo relativamente rápido que desarrollan aterosclerosis y por supuesto la facilidad con que su genoma puede ser manipulado<sup>195</sup>. Casi todas estas manipulaciones genéticas dependen de lograr una modificación sobre la regulación normal de lipoproteínas y de su metabolismo<sup>194</sup>. Su genética ha sido bien establecida desde el año 2002 por *The Mouse Genome Sequencing Consortium* que publicó una secuencia de alta calidad del genoma de la cepa de ratón C57BL/6J<sup>196</sup>. Gracias al avance de la genética molecular, hoy es posible añadir genes exógenos al genoma del ratón e incluso es posible bloquear o reemplazar genes endógenos.

El ratón es de forma natural un animal rico en lipoproteínas de alta densidad (HDL), teniendo solo bajas concentraciones de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de lipoproteínas de baja densidad (LDL).

Tanto las dietas como las modificaciones genéticas orientadas a promover la aterosclerosis implican un cambio en este balance, en el que predominan las lipoproteínas que contienen la apolipoproteína B (apoB) (VLDL, IDL y LDL). En la Tabla 1 se resumen los fenotipos de varios modelos de ratón usados para la investigación en aterosclerosis. Una característica común en cada uno de estos modelos es la acumulación de VLDL y/o LDL en el plasma. En los modelos genéticos esto se consigue con la ausencia del ligando apolipoproteína E (apoE) o del receptor para LDLs (LDLR), claves en el proceso de aclaramiento de lipoproteínas de baja densidad.

**Tabla 1. Fenotipos de modelos murinos de aterosclerosis.**

Modelos de ratón	Dieta	CT(mg/dL)	Perfil lipoprotéico predominante	Fenotipo de la lesión
ApoE <sup>-/-</sup>	Estándar (Chow)	600	VLDL, IDL	Generalizado
LDLR <sup>-/-</sup> , apobec-1 <sup>-/-</sup>	Chow	400-650	LDL	Generalizado, complejo
ApoB tg, LDLR <sup>-/-</sup>	Chow	800	LDL (pocas VLDL)	Generalizado, avanzado
LDLR <sup>-/-</sup>	Chow	200-300	LDL	Muy modesto
ApoE <sup>-/-</sup>	Tipo Occidental (Western)	1300-2,000	VLDL, IDL	Generalizado, complejo
LDLR <sup>-/-</sup> , apobec-1 <sup>-/-</sup>	Western	1600-1750	VLDL, LDL	Generalizado, complejo
LDLR <sup>-/-</sup>	Western	1500-2000	VLDL, LDL	Generalizado
LDLR <sup>-/-</sup>	Rica en grasa, colato	1880	VLDL, LDL	Generalizado
ApoB tg	Dieta Paigen (colato)	310	LDL	Generalizado, estria grasa
Tipo salvaje	Dieta Paigen (colato)	140-190	VLDL, HDL	Pequeño, aorta proximal (placas grasas)

C57BL/6 es el linaje de ratón que más se utiliza en experimentación. La mayoría de las estirpes de ratón son relativamente resistentes al desarrollo

---

de la aterosclerosis a excepción de la estirpe C57BL/6J. Esta en particular es proporcionada por los Laboratorios *Jackson* que tras al menos veinte cruces de generaciones consecutivas de hermanos por hermanas, genera animales genéticamente similares, homocigóticos para todos sus loci al 98%, asegurando así la reproducibilidad de las conclusiones que se obtengan en los experimentos en los que se usen como modelo estos animales. C57BL/6J, vive durante un largo periodo de tiempo y tiene baja susceptibilidad a desarrollar tumores. Alimentados con una dieta aterogénica, desarrollan obesidad, hiperglicemia e hiperinsulinemia, y a las 14 semanas lesiones ateroscleróticas. También desarrollan una alopecia severa en las etapas tardías de su vida (*The Jackson Laboratory Mice Database*).

Fueron Robert Wissler y colaboradores<sup>197-199</sup>, quienes en los años cincuenta describieron el primer modelo de aterosclerosis inducida por dieta. Debido a su toxicidad, Beverly Paigen y colaboradores, posteriormente modificaron esta dieta y elaboraron una nueva dieta aterogénica con la que se pudo examinar la sensibilidad de distintas estirpes salvajes de ratón a la aterosclerosis<sup>200-202</sup>. La composición de la dieta de Paigen es la siguiente: 15% de grasa (derivada de ácidos grasos saturados de origen vegetal o de grasas animales), 1.25% de colesterol y 0.5% de colato (se añade para acentuar la hipercolesterolemia inducida por el colesterol y el contenido rico en grasas de la dieta, pues facilita la absorción de grasas y colesterol y se cree que inhibe la  $7\alpha$ -colesterol hidroxilasa<sup>203</sup> clave en la síntesis de sales biliares a partir del colesterol).

Debido a su susceptibilidad para la aterosclerosis inducida por dieta y aunque la patología de las lesiones son pequeñas y no se ajustan del todo a un modelo de aterosclerosis humano, decidimos usar C57BL/6J como modelo experimental debido a su bajo costo y disponibilidades de la cepa y dieta aterogénica. Su homólogo resistente a dieta aterogénica es la cepa

---

C3H/HeJ. La cepa C3H Heston de *Jackson* también asegura la similitud genotípica al 98%. La diferencia en la susceptibilidad a aterosclerosis entre las cepas C57BL/6J y C3H/HeJ, se debe a un solo gen, *Ath1*, con el alelo s de susceptibilidad y el r para la resistencia<sup>204;205</sup>. La cepa C57BL/6J difiere de la C3H/HeJ, en una reducción de casi el doble de los niveles de HDL colesterol plasmático cuando son alimentadas con dieta aterogénica<sup>206</sup>.

Otros modelos animales desarrollan una aterosclerosis compleja y generalizada alimentados con dieta normal<sup>207;208</sup>. En este grupo se encuentran los ratones apoE *knock-out* (apoE<sup>-/-</sup>)<sup>209</sup> y modelos genéticos más complejos basados en la deficiencia del receptor de LDL (LDLR<sup>-/-</sup>)<sup>194;208</sup>.

Existen también animales genéticamente manipulados para los principales genes de los que hemos hablado. Se han podido crear modelos animales *knock-down* y *knock-out* tejido específico. Un ejemplo es el *knock-down* para PPAR- $\gamma$  en tejido adiposo blanco, desarrollados por Koutnikova y colaboradores<sup>210</sup>, mediante un vector diseñado para recombinar de forma homóloga con el exón B del gen PPAR- $\gamma$ . Puesto que el exón B es exclusivo de la isoforma PPAR- $\gamma$ 2 de expresión adipocitaria se inhibe su expresión en este tejido. Los animales así obtenidos mostraron lipodistrofia severa, hiperlipidemia y retraso en el crecimiento. Este fenotipo resultó activar un programa de expresión génica compensador en el músculo que permite una oxidación eficiente del exceso de lípidos.

De igual forma hay animales *knock-out* específicos de PPAR- $\gamma$  en tejido adiposo blanco<sup>211</sup>.

Matsusue y col<sup>149</sup>, desarrollaron el *knock-out* específico de hígado en ratones salvajes y en el ratón deficiente para la leptina mediante el uso del sistema “recombinasa Cre” bajo el control de un promotor específico de tejido hepático. La pérdida de PPAR- $\gamma$  en hígado produjo en el ratón deficiente para la leptina un incremento de niveles de ácidos grasos libres y

triglicéridos en el plasma y aumento de la resistencia insulínica si bien se observaron niveles normalizados de triglicéridos en el hígado.

Norris y col<sup>212</sup> generaron el ratón *knock-out* para PPAR- $\gamma$  en tejido de músculo esquelético. Estos ratones desarrollaron obesidad y resistencia insulínica (con ciertas diferencias en algunos tejidos). Cuando se les administró dieta rica en grasas desarrollaron hiperinsulinemia y pérdida de la homeostasis de la glucosa.

Se sigue sin conocer los genes que contribuyen a las formas de aterosclerosis complejas. Los estudios genéticos realizados en humanos se han centrado en identificar los genes que predisponen hacia los factores de riesgo tradicionales, como los niveles de lípidos o la presión sanguínea, pero éstos no han tenido mucho éxito. El uso de ratones para dilucidar la compleja etiología genética de la aterosclerosis, ofrece una alternativa viable a los estudios humanos, ya que los parámetros experimentales, como el medioambiente, el patrón de alimentación o el fenotipo, pueden ser controlados.



Justificación y Objetivos



## **IV) Justificación y Objetivos.**

Los sucesivos planes de salud elaborados en nuestra Comunidad Autónoma de Canarias coinciden, a través de los años, en la importancia que tienen las enfermedades cardiovasculares en general y la cardiopatía isquémica en particular por su alta morbi-mortalidad y costes asociados. La frecuencia de los factores de riesgo, ha hecho que la comunidad médica se plantee que quizá sea el mejor o mayor control terapéutico junto a la adquisición de hábitos de vida saludables, las estrategias que en el futuro puedan revertir esta situación.

Durante el último siglo se han obtenido logros relevantes en el campo de la biología vascular. Se han descubierto importantes mediadores del tono vascular y la inflamación como el óxido nítrico y la angiotensina, y se han desarrollado herramientas farmacológicas para manipular sus efectos. La importancia de la presencia de células inflamatorias en las lesiones ateroscleróticas está siendo comprendida, y como consecuencia están desarrollándose estrategias terapéuticas que actúan directamente sobre la respuesta inflamatoria. Estos importantes logros en el campo de la biología vascular han tenido un enorme impacto sobre las terapias cardiovasculares durante los últimos 20 años. De los principales descubrimientos obtenidos por los biólogos vasculares, se han desarrollado nuevos fármacos como los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, las estatinas y los trombolíticos y nuevos usos para fármacos más antiguos como la aspirina y los beta bloqueadores.

En este sentido y orientado hacia una mayor comprensión y control de las terapias farmacológicas, el objetivo de este trabajo se centra en el conocimiento de los mecanismos de acción básicos de dos fármacos comúnmente empleados en pacientes con factores de riesgo asociados a la

enfermedad vascular, como son la diabetes tipo 2 y la hipertensión arterial. Estos fármacos son: el antidiabético oral rosiglitazona: una tiazolidinadiona con propiedades antiinflamatorias independientes de sus efectos metabólicos y otras propiedades pleiotrópicas a veces controvertidas, y el antagonista del receptor 1 de la angiotensina II, losartán: fármaco de la familia de los ARAII que inhibe de forma completa y específica las acciones de la angiotensina II, (vasoconstricción, secreción de vasopresina y aldosterona) y que es capaz también, a través del metabolito EXP 3179, de activar el receptor/factor de transcripción nuclear PPAR- $\gamma$ .

Concretamente hemos evaluado la capacidad de preservación de la actividad PPAR- $\gamma$  de los fármacos losartán y rosiglitazona que se observa en animales C57BL/6J susceptibles a aterogénesis inducida por dieta que habían sido alimentados con una dieta alta en grasas y en colesterol. Para ello evaluamos la expresión relativa del propio gen PPAR- $\gamma$  y de sus genes de respuesta SCARB1 y CD36. Así mismo, analizamos las posibles diferencias fenotípicas entre ambos grupos de animales en tratamiento farmacológico y en relación a sus controles comparando perfiles lipídicos: colesterol total, colesterol-HDL y triglicéridos; las actividades enzimáticas asociadas al colesterol-HDL paraxonasa y arilesterasa; la capacidad antioxidante del colesterol-HDL y el contenido plasmático en lípidos peroxidados. El análisis conjunto de los resultados obtenidos nos permitió ahondar en diferencias en la capacidad antioxidante y antiinflamatoria entre ambos fármacos evaluando la expresión relativa de genes clave: CYBA (p22phox), eNOS, iNOS e IL-6 entre otros y analizando también la participación de los reguladores transcripcionales PPAR- $\gamma$  y Nrf2 en las diferencias observadas.

Con este trabajo y sabiendo que aún tienen que resolverse muchos aspectos importantes de la medicina cardiovascular, nuestro objetivo

pretende ser una pequeña aportación en la comprensión y la búsqueda de nuevas terapias farmacológicas que puedan frenar el desarrollo de la aterosclerosis.



## Material y Métodos



## V) Material y Métodos.

### 1. Animales de experimentación.

Para nuestros experimentos utilizamos ratones hembras (con el objetivo de disminuir la mortandad asociada al género) de dos meses de edad y de las estirpes C57BL/6J y C3H/HeJ, que permanecieron estabulados a 25°C con un ciclo luz-oscuridad de 12 horas, durante todo el periodo experimental. Se les suministró comida y agua *ad libitum*.

Al inicio del experimento, día 0, los animales C57BL/6J se sometieron o bien a dieta normal (chow) (CAPISA. La Palmas de Gran Canaria. Chow: 22% maíz, 20% salvado de trigo, 17% harina de pan, 16% harina de soja, 15% cebada, 2.3 % carbonato de calcio, 0.49% jabon cálcico, 0.40% cloruro de sodio, aditivos) o bien a dieta aterogénica (Panlab, S.L., Barcelona. HFHC (*High Fat High Cholesterol*): 15% grasa, 1.25% colesterol y 0.5% colato). Un total de 206 animales (treinta y ocho en los grupos 2, 3 y 4 y cuarenta y seis en los grupos 0 y 1) criados durante doce semanas, fueron seleccionados al azar y asignados a cada uno de los siguientes grupos:

**Grupo 0:** animales C3H/HeJ (Cepa resistente a dieta aterogénica) en dieta HFHC.

**Grupo 1 (control):** animales C57BL/6J (Cepa sensible as dieta aterogénica) en dieta normal.

**Grupo 2 (control):** animales C57BL/6J en dieta HFHC.

**Grupo 3:** animales C57BL/6J en dieta HFHC+RG.

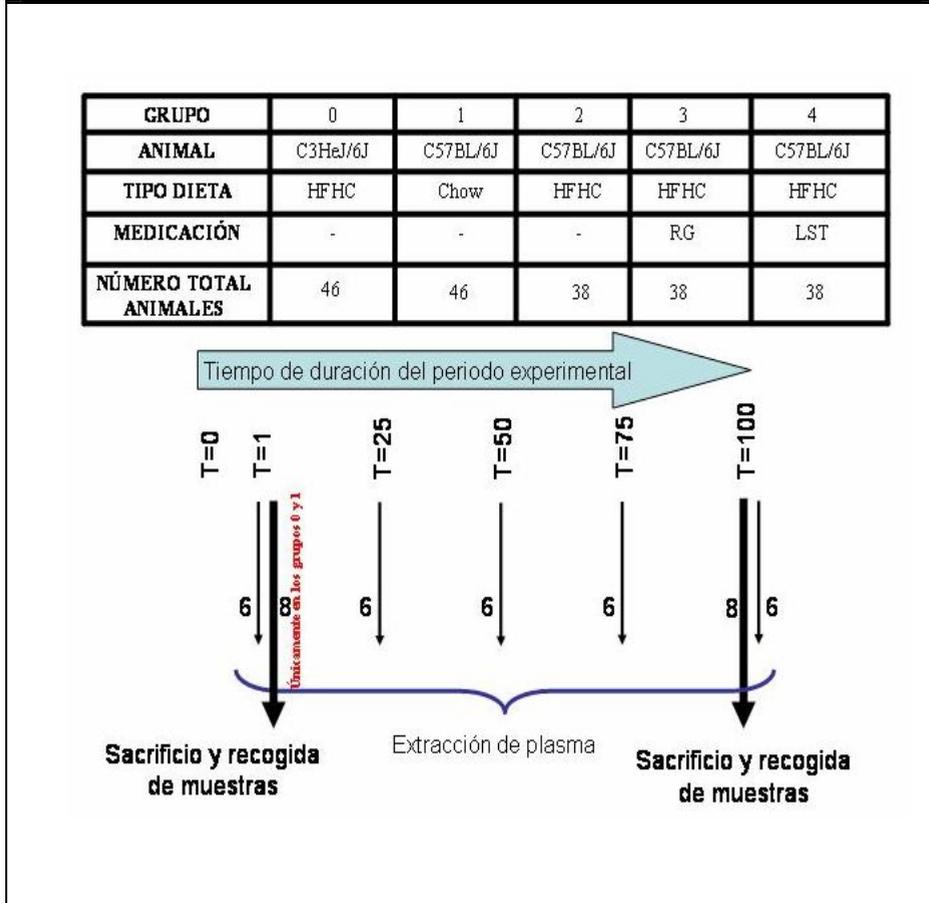
**Grupo 4:** animales C57BL/6J en dieta HFHC+LST.

La RG (25mg/Kg peso/día) se administró en la comida; el consumo de alimento fue monitorizado cada día. El LST (100mg/L) se suministró en

el agua de bebida. El consumo de agua se monitorizó semanalmente. Se estima que cada ratón bebe 1.5 ml de agua e ingiere 2.5 g de alimento al día, por cada 10 g de peso.

Los animales se anestesiaron con 5  $\mu$ l por gramo de un cóctel de anestésicos que contenía Ketolar (Ketamina hidroclicorada a 50 mg/ml) (*Parke-Davis, S.L.; Barcelona, Spain*) y Rompún (Xilazina al 2% administrada a 2.5 mg/ml) (*Bayer Health Care, AG, Alemania*) en solución salina.

Se obtuvieron muestras de sangre mediante punción cardiaca del ventrículo izquierdo de 6 animales por grupo elegidos entre los animales estabulados durante los días: 1, 25, 50, 75 y 100. Al final del periodo de estudio (día 100), ocho ratones por grupo fueron anestesiados y perfundidos con suero salino estéril para extraer inmediatamente después, muestras de tejido. A día 1, y únicamente en los grupos 0 y 1, también se realizaron 8 sacrificios por grupo para recogida de muestras de tejido. Posteriormente, las muestras fueron congeladas por inmersión en N<sub>2</sub> líquido y luego conservadas a -80°C hasta su utilización posterior (Figura 15). Todas las determinaciones bioquímicas realizadas se llevaron a cabo en muestras de plasma obtenido tras punción cardiaca. Las expresiones relativas de los genes objeto de estudio, así como los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina, fueron realizados en muestras de tejido hepático. Las muertes de animales que se produjeron a lo largo del periodo de experimentación, sobre todo a partir de los cincuenta días, eran suplidas con nuevos animales con las mismas características de los que sustituían.

**Figura 15. Esquema del diseño experimental.**

Todos los procedimientos experimentales llevados a cabo en animales, se realizaron de acuerdo con la guía de bienestar animal del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, la guía nacional (Real Decreto 1201/2005) sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, la ley 32/2007 para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio y la guía internacional (Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio

publicada por *The US National Institutes of Health*). Los procesos de cría, selección, estabulación, salud e higiene animal, fueron supervisados por el técnico-cuidador del animalario de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr Negrín, Don Heriberto Grosó García, homologado con las categorías A y B según el Real Decreto 11201/2005.

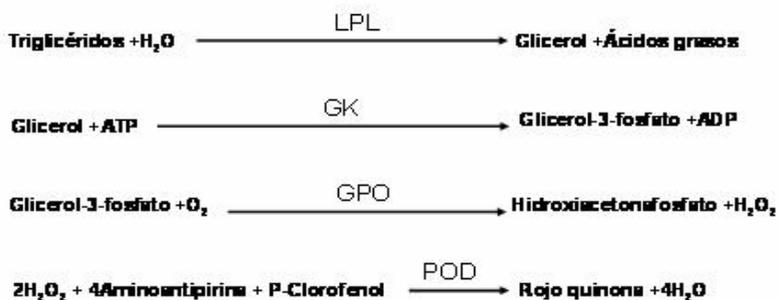
## 2. Análisis de los lípidos plasmáticos y la peroxidación lipídica.

Se extrajo sangre de los animales previo ayuno de seis horas y se guardaron muestras de plasma a  $-80^{\circ}\text{C}$ , donde se midieron varios parámetros bioquímicos: triglicéridos, colesterol total, HDL-colesterol e hidroperóxidos lipídicos.

La concentración de triglicéridos (TG) se determinó con el kit de Wako Diagnostics basado en los trabajos de Fossati y Young<sup>213;214</sup>. Los triglicéridos de las muestras son hidrolizados a glicerol y ácidos grasos por la lipoproteín lipasa (LPL). El glicerol es entonces fosforilado por la glicerol kinasa (GK) en presencia de adenosina trifosfato (ATP) y magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ). En el siguiente paso el glicerol-3-fosfato es oxidado por la glicerol-3-fosfato oxidasa (GPO), en presencia de oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ). Finalmente se forma un producto de color a partir de agua oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 4-aminoantipirina y p-clorofenol, en presencia de la peroxidasa (POD), cuyo máximo de absorbancia (A), se encuentra a 505 nm (Figura 16) y que da cuenta de la concentración (C) de TG en el plasma mediante la fórmula siguiente.

$$C_{\text{muestra}} = \left( \frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{estándar}}} \right) \times C_{\text{estándar}}$$

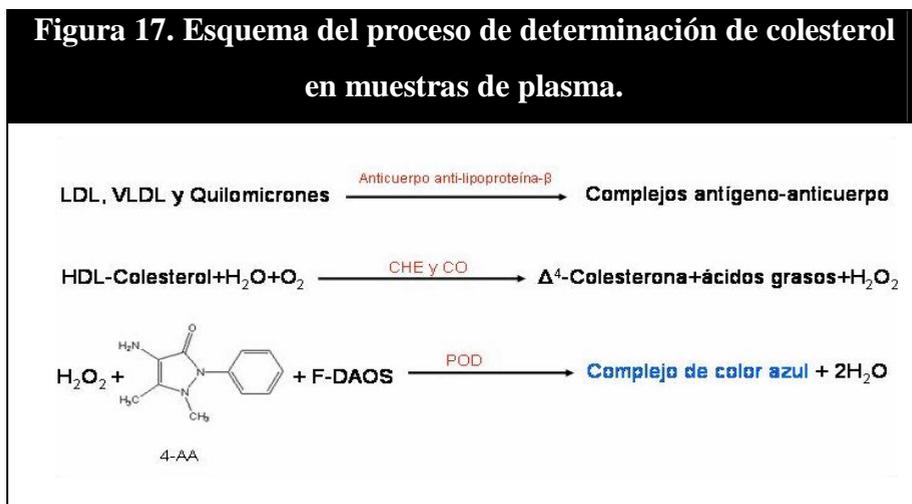
**Figura 16. Reacciones químicas que tienen lugar durante la determinación de triglicéridos en plasma.**



Los niveles plasmáticos de colesterol total (TC) y HDL-colesterol (HDL-C) se midieron de forma manual, usando un kit de Wako Diagnostics. El anticuerpo anti apolipoproteína- $\beta$  humana, se une a las lipoproteínas LDL, VLDL y quilomicrones; los complejos antígeno-anticuerpo formados bloquean la reacción enzimática cuando se añade el reactivo correspondiente del kit. Solo el HDL-C reacciona con la colesterol esterasa (CHE) y la colesterol oxidasa (CO) de este reactivo. El peróxido de hidrógeno que genera la reacción, da lugar a un complejo de color azul por condensación oxidativa de la F-DAOS (Sal sódica [N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxi-4-fluoroanilina]) y la 4-aminoantipirina (4-AA) en presencia de peroxidasa (POD) (Figura 17). La concentración de HDL-C puede ser calculada midiendo la absorbancia del complejo de color azul que se produce, a una longitud de onda de 593 nm, comparándola con la absorbancia de un calibrador.

El colesterol total se midió en el plasma conteniendo LDL, VLDL, quilomicrones y HDL con el mismo kit, antes de tratar el plasma con el

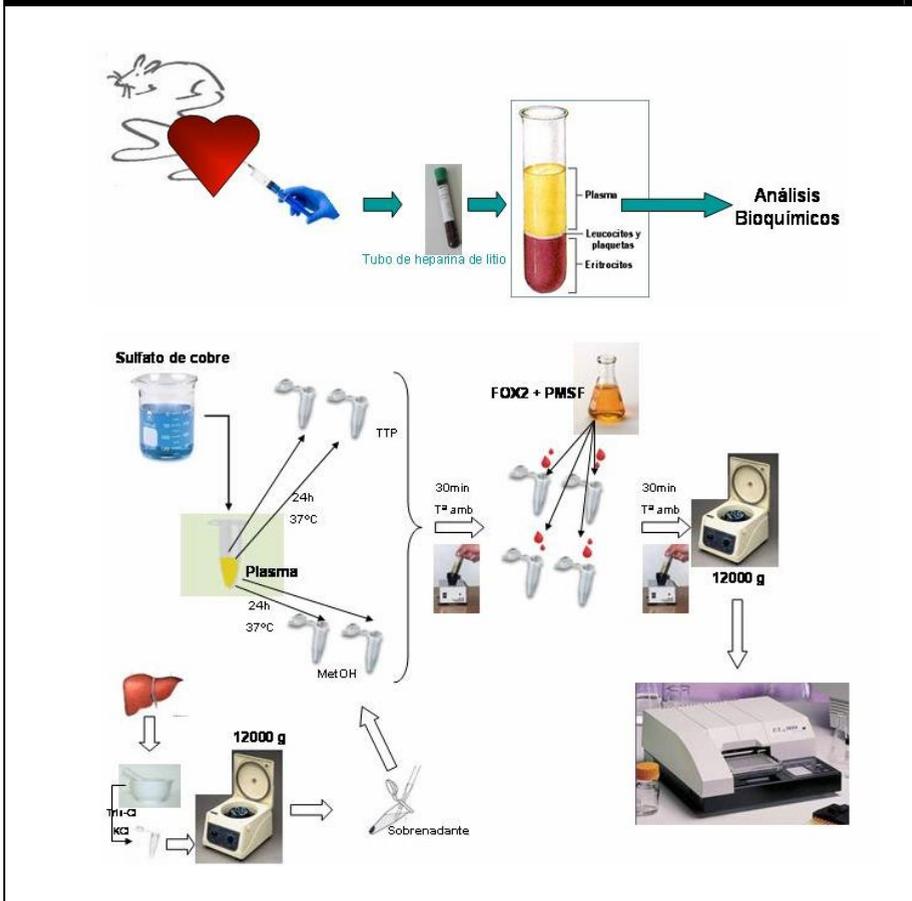
anticuerpo anti lipoproteína- $\beta$ .



Los hidroperóxidos lipídicos totales en plasma se calcularon mediante el ensayo con Xylenol Orange tal y como lo describió Nourooz-Zadeh y colaboradores<sup>215</sup>. El reactivo FOX2, se preparó disolviendo *Xylenol Orange* (*Prolabo. Fontenay/Bois*) y sulfato amónico (*Sigma Chemical. CO*) en 250 mM de sulfato de cobre (*Sigma Chemical. CO*), para dar una concentración final de 1 mM y 2.5 mM respectivamente. Un volumen de este reactivo concentrado fue añadido a nueve volúmenes de metanol HPLC-grade (*Merck. KGaA. Germany*) que contenía 4.4 mM de PSMF (Inhibidor de serín-proteasas) (*Roche Diagnostics. GmbH. Germany*), para hacer el reactivo de trabajo. Las muestras de plasma (40  $\mu$ l) se mezclaron con sulfato de cobre a una concentración final de 10 mM y se mantuvieron a 37°C, durante 24 horas. Por duplicado, se prepararon alícuotas de 10  $\mu$ l de estos plasmas que fueron transferidos a tubos *ependorf* que contenían 2  $\mu$ l de metanol o bien 2  $\mu$ l de TPP (trifenilfosfina) (*Sigma-Aldrich Chemical. GmbH. Germany*) 1 mM en metanol. Luego se mezclaron e incubaron

durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añadió el reactivo de color FOX2 (90  $\mu$ l), se mezcló y se incubó nuevamente otra media hora a temperatura ambiente. Las muestras fueron entonces centrifugadas durante 10 minutos a 12000g, y posteriormente fue medida la absorbancia de sus sobrenadantes a 560 nm en un lector de placas EL<sub>X</sub>800 (*Bio-Tek Instruments, INC.*) (Figura 18).

**Figura 18. Obtención de plasma e hígado, donde se midieron hidroperóxidos lipídicos por el método del Xilenol Orange.**



El contenido de hidroperóxidos se determinó usando el coeficiente de extinción molar de  $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1215}$  o por referencia a una curva estándar de agua oxigenada. El nivel de hidroperóxidos en las muestras de plasma, se determinó usando la diferencia entre la media de absorbancias de las muestras con y sin TTP. La desviación estándar (SD) para la concentración de hidroperóxidos se halló con todas las SDs obtenidas de las muestras, con y sin TTP.

También se determinaron los niveles de peroxidación lipídica en las muestras de hígado que fueron primero homogeneizadas en un *buffer* que contenía 50 mM de Tris-Clorhídrico (*USB Corporation. Cleveland OH USA.*) (pH 7.4) y 1.15% de cloruro potásico (KCl) (*Sigma-Aldrich Chemical. GmbH. Germany.*), y luego centrifugadas para usar el sobrenadante. Los niveles de peroxidación lipídica en sobrenadantes de homogenizados de tejido, se midieron por el ensayo con *Xylenol Orange* como describimos antes, y los valores fueron ajustados al contenido proteico. El contenido en proteínas se determinó con el ensayo de proteínas de Bio-Rad (*Bio-Rad Protein Assay. Bio-Rad Laboratorios GmbH.*)

### **3. Actividades Paroxonasa y Arilesterasa.**

Las actividades paroxonasa (PON p.asa) y arilesterasa (PON ar.asa), se evaluaron por los métodos descritos por Garin y Mackness<sup>216;217</sup>.

La actividad PON p.asa se determinó usando el paroxón (O,O-dietil-o-p-nitro-fenilfosfato) (*Sigma Chemical Co*) como sustrato y se midió por incrementos en la absorbancia a 412 nm debido a la formación de p-nitrofenol. La actividad PON p.asa se expresó en unidades por litro (U/L) de suero y una unidad de actividad paroxonasa se definió como 1 nmol de p-nitrofenol formado por minuto.

La actividad PON ar.asa, se midió espectrofotométricamente usando fenilacetato (*Sigma Co, London, UK*) como sustrato. Los ensayos se realizaron monitorizando el ratio de generación de fenol a 270 nm. La actividad PON ar.asa se expresó en U/L de suero y una unidad de actividad arilesterasa se definió como la cantidad de enzima que hidroliza 1  $\mu\text{mol}$  de fenilacetato por minuto.

Los coeficientes de extinción molar que se usaron para ambas determinaciones fueron:  $1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y  $1310 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  respectivamente<sup>216;217</sup>.

#### 4. Ensayo de diclorofluoresceína.

Se precipitó el HDL total usando el reactivo DS1. Éste se preparó disolviendo en agua 10 mg/l de Dextrán Sulfato (*Dextralip®50, Sigma*), 0.5 mol/l de  $\text{MgCl}_2$ , y 0.05% de azida sódica. Mediante espectrofotometría utilizando el reactivo de medición de Bio-rad, se determinó el contenido en proteínas del precipitado de HDL y se ajustaron las muestras a un contenido similar de proteínas con suero salino. El ensayo con diclorofluoresceína se realizó como describe Navab<sup>218</sup>, donde el HPODE mimetiza el papel de los lípidos peroxidados y el sustrato PAPC (L- $\alpha$ -1-palmitoyl-2-araquidonyl-sn-glicero-3-fosfocolina), el componente de las LDLs susceptible a ser oxidado. Para determinar la capacidad del HDL de prevenir la oxidación del PAPC en presencia de HPODE, se pusieron diez microlitros de DCFH-DA (Diclorofluoresceín diacetato) (*Molecular Probes, Eugene, OR*) disueltos en metanol, en tubos de polipropileno y se evaporaron bajo presión al vacío. Luego se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de PAPC (2.5 mg/ml) disuelto en cloroformo (*Avanti Polar Lipids. Alabaster, AL*) y la mezcla se sometió de nuevo a evaporación. Posteriormente 20  $\mu\text{l}$  de 13(S)-HPODE (0.5 mg/ml) (*Biomol.Plymouth Meeting, PA*) en etanol fue añadido a cada uno de los

tubos. Finalmente, se añadieron 25  $\mu$ l de solución salina o de HDL (500  $\mu$ g/ml) a cada tubo y se ajustó el volumen total a 1 ml usando también solución salina. Las muestras fueron incubadas durante dos horas a temperatura ambiente y en oscuridad antes de medirlas en el lector de fluorescencia FLx800. La intensidad de fluorescencia se determinó a una longitud de onda de excitación de 485 nm y a una longitud de onda de emisión de 530 nm durante media hora.

### **5. Medida de los metabolitos totales del óxido nítrico.**

Previamente al ensayo, las muestras de plasma fueron diluidas y filtradas a través de columnas *Microcon YM-10* de *Millipore*. La concentración total de metabolitos de óxido nítrico se evaluó en los efluentes de las muestras que habían pasado por las columnas, usando un kit colorimétrico y siguiendo las instrucciones del suministrador (*R&D System*). Este ensayo determina las concentraciones de óxido nítrico basándose en la conversión enzimática de nitratos en nitritos por medio de la nitrato reductasa. A esta reacción le sigue la de detección de nitritos, marcados con un reactivo de color que absorbe entre 540 y 570 nm de longitud de onda.

### **6. Determinación semicuantitativa de la expresión génica mediante PCR en tiempo real.**

Aislamos RNA total del hígado de ratones mediante el método Chomczynski<sup>219</sup>. La posibilidad de aislar RNA lo más intacto posible es esencial para el análisis de la expresión génica. El éxito de cualquier extracción de RNA es dependiente de la eliminación de toda posible contaminación de ribonucleasas (RNasas) que degradan el RNA durante y después de la extracción, provocando bajos rendimientos de RNA de

longitud completa.

A diferencia del DNA, el RNA es muy inestable una vez obtenido el tejido, por la presencia de las RNAsas celulares. Por ello resulta crítica la congelación del tejido o su rápida homogeneización en una solución desnaturizante. Una fuente potencialmente grande de contaminación con RNAsas son las manos por lo que es necesario el uso de guantes tanto al realizar la extracción como al preparar las soluciones de trabajo. Los recipientes a utilizar deben ser de plástico y estériles. Hay que trabajar, además, con soluciones libres de RNAsas contaminantes, y esto se consigue tratándolas previamente con DEPC (dietil pirocarbonato). El DEPC es un agente alquilante que inactiva las RNAsas. Una vía para eliminar la degradación del RNA durante la extracción es desnaturizar todas las proteínas celulares, incluyendo las RNAsas. Para ello se utiliza el tiocianato de guanidinio, agente caotrópico capaz de desnaturizar las proteínas incluidas las RNAsas, en contraste con la estructura secundaria de los ácidos nucleicos, que casi no se ve afectada. La solución en que el tejido debe ser homogeneizado debe tener por tanto tiocianato de guanidinio y además detergentes (como el SDS o el sarcosil) que ayudan a romper las membranas celulares y desnaturizar proteínas, y agentes reductores (como el  $\beta$ -mercapto-etanol) que contribuyen también a la desnaturización proteica mediante la rotura de puentes disulfuro, típicos de las RNAsas. Tras el homogeneizado del tejido hay que aislar físicamente el RNA del resto de componentes celulares. Para realizar esta separación usamos la extracción fenólica, basada en la propiedad de los ácidos nucleicos de ser más solubles en soluciones acuosas que en solventes orgánicos. El principio básico de la extracción fenólica es la desproteinización del homogeneizado celular (solución acuosa que contiene los ácidos nucleicos) y la eliminación de los componentes no hidrosolubles mediante una separación de fases con distinta

solubilidad. En primer lugar, se efectúa la homogeneización del tejido mediante un triturador de émbolo. Se añade un volumen de fenol y tras una intensa agitación, se centrifuga la mezcla, dando como resultado la separación de dos fases: una fase inferior orgánica (fenólica) que contiene lípidos, proteínas y fragmentos subcelulares varios, y una fase superior acuosa (menos densa) que contiene polisacáridos, ácidos nucleicos y otras pequeñas moléculas hidrosolubles, quedando la mayor parte de las proteínas en la interfase. En esta separación, el fenol suele usarse en combinación con cloroformo para aumentar la eficiencia de la extracción.

El DNA es retenido en la fase orgánica y la interfase, quedando el RNA en la fase acuosa. Transferida la fase acuosa a un tubo nuevo, las etapas siguientes están destinadas a purificar cada vez más el RNA mediante precipitaciones a baja temperatura con alcoholes (como etanol e isopropanol) y centrifugaciones secuenciales, produciendo un *pellet* cada vez más libre de contaminantes.

Una vez extraído el RNA, éste se cuantificó por espectrofotometría usando como blanco agua tratada con DEPC.

Posteriormente, se sintetizó cDNA a partir de 1 a 2 µg de RNA, usando la transcriptasa inversa MMLV (*Mouse Moloney Murine Leukemia Virus*) de *Roche Diagnostics* siguiendo las instrucciones del proveedor. La transcriptasa inversa (RT), utiliza como molde una molécula de RNA a la que se une un pequeño fragmento de DNA que actúa como cebador, en nuestro caso, *random primers* (hexanucleótidos con secuencias al azar). La enzima copia sólo los RNAm en sentido 3'-5'.

Usando este cDNA como sustrato, se diseñaron las condiciones específicas de PCR en tiempo real para cada gen en un aparato *LightCycler*, usando como fluorocromo *SYBR Green* y la *hot start* DNA polimerasa contenida en el kit *FastStart DNA Master SYBR Green I* de *Roche*

*Diagnostics*, de acuerdo con el protocolo que proporciona el propio kit. Las amplificaciones por PCR en tiempo real se diseñaron para analizar los cambios en los niveles de RNAm de los genes en estudio, en los diferentes grupos de experimentación. Este tipo de PCR nos permite visualizar el proceso de amplificación en todo momento y es más sensible que la PCR convencional, debido a la utilización de un fluorocromo intercalante (*SYBR Green I*) que es capaz de emitir fluorescencia cuando se une al DNA de doble hélice. De esta manera el incremento de DNA en cada ciclo, se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. La polimerasa que se utiliza en este tipo de reacción de síntesis de DNA requiere de temperaturas elevadas.

El NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) proporciona las secuencias conocidas de los mensajeros para ratón de los genes a evaluar y el programa de acceso libre en la red Primer 3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi))<sup>220</sup>, nos permitió seleccionar los *primers* o cebadores más adecuados para amplificar los cDNAs. Los criterios que usamos para seleccionar los *primers* fueron: que no existiera complementariedad de los cebadores entre sí, especialmente en los extremos 3', ya que esto iría consumiéndolos durante la reacción por la formación de los llamados dímeros de primer, que tuvieran un tamaño adecuado suficientemente grande como para favorecer la unión con alta especificidad a la región de interés y no a otras regiones del genoma, que el porcentaje de (G+C) rondara el 50% en ambos y finalmente que no existiera otra región en el genoma capaz de unirse con un 100% de especificidad a alguno de los *primers*. En el caso específico de la amplificación mediante PCR en tiempo real, el tamaño del amplificado no debe exceder de las 200 pares de bases (pb) de longitud. Para obtener resultados óptimos se selecciona una longitud de producto entre las 100 y las 200 pb.

---

Se usaron las parejas de cebadores siguientes: 5'-TTTTCAAGGGTGCCAGTTTC-3' y 5'AATCCTTGGCCCTCTGAGAT-3' para amplificar un fragmento de 198 pb del exón 6 del gen PPAR- $\gamma$  [GenBank NM\_011146] y 5'-GAAAAAGCGCCAAGTACAGC-3' y 5'-CAGGCTGTGGAACTCTAGC-3' para amplificar un fragmento de 248 pb del gen SCARB1 [GenBank NM\_016741].

Se amplificaron también fragmentos de los genes: CD36, PON1, 5-Lipoxigenasa (Alox-5), 15 Lipoxigenasa tipoA (Alox-15) y 15-Lipoxigenasa B (Alox-15b) usando los siguientes pares de *primers*: 5'-GAGCAACTGGTGGATGGTTT-3' y 5'-GCAGAATCAAGGGAGAGCAC-3' generando un fragmento de 207 pb del gen CD36 [GenBank NM\_007643]; 5'-CACCCGTCTCGATTCCTTTA-3' y 5'-CAGCCTGTCCATCTGTCTCA-3' que amplifica un fragmento de 178 pb del gen PON1 [GenBank NM\_011134]; 5'-GTGCTGCTTGAGGATGTGAA-3' y 5'-CTACGATGTCACCGTGGATG-3' que amplifica un fragmento de 235 pb del gen Alox-5 [GenBank L42198]; 5'-GATTGTGCCATCCTTCCAGT-3' y 5'-CAGGGATCGGAGTACACGTT-3' que amplifica un fragmento de 186 pb del gen Alox-15 [GenBank NM\_009660]; y finalmente 5'-GCTAAAGCATGCCAGTGTGA-3' y 5'-GCTCTGATTAACGGCTTTGC-3' que comprende un fragmento de 229 pb del gen Alox-15b [GenBank NM\_009661].

El fragmento del gen Interleucina 6 (IL-6) se amplificó usando la pareja de *primers*: 5'-ACAACCACGGCCTTCCTACTT-3' y 5'-CACGATTTCCCAGAGAACATGTG-3'. Para el gen CYBA (p22phox) se usaron los *primers* 5'-GTCCACCATGGAGCGATGTG-3' y 5'-CAATGGCCAAGCAGACGGTC-3'. Para la amplificación de un fragmento

---

del gen de la Oxido Nítrico Sintasa Endotelial 3 (NOS3) (eNOS), los *primers forward* y *reverse* fueron: 5'-AACCAGCGTCCTGCAAACC-3' y 5'-CAATGTGAGTCCGAAAATGTCC-3', respectivamente, dando lugar a un amplicón de 133 bp. Para la Oxido Nítrico Sintasa Calcio Independiente (NOS2) (iNOS), el *primer forward* fue: 5'-GCATGGACCAGTATAAGGCAAGCA-3' y el *reverse*: 5'-GCTTCTGGTCGATGTCATGAGCAA-3' que amplificaron un fragmento de 222 pb [GenBank NM\_010927].

El fragmento de 223 pb del gen GAPDH se amplificó con los siguientes *primers*: 5'-ACACATTGGGGGTAGGAACA-3' y 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3' [GenBank NM\_008084].

Para cuantificar los resultados obtenidos por la PCR en tiempo real y evaluar las posibles variaciones cuantitativas de los niveles de RNAm, usamos dos estrategias: el método comparativo del *Cycle Threshold* (método comparativo Ct) o el método de la curva estándar.

En el método comparativo Ct, la cantidad del fragmento de DNA del gen diana, normalizada respecto a un amplicón de GAPDH (Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa) y relativizada por un calibrador, viene dada por la fórmula:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Para el cálculo del  $\Delta\Delta Ct$ , es necesario que la eficiencia del amplificado objeto de estudio y la eficiencia del amplificado del gen de referencia GAPDH, sean aproximadamente iguales. Un método para verificar que dos amplicones tienen similar eficiencia es observar cómo varía el  $\Delta Ct$  al hacer diluciones seriadas de los amplificados. Si los  $\Delta Ct$  no varían entre las diluciones realizadas, podemos afirmar que las eficiencias son iguales (Tabla 2).

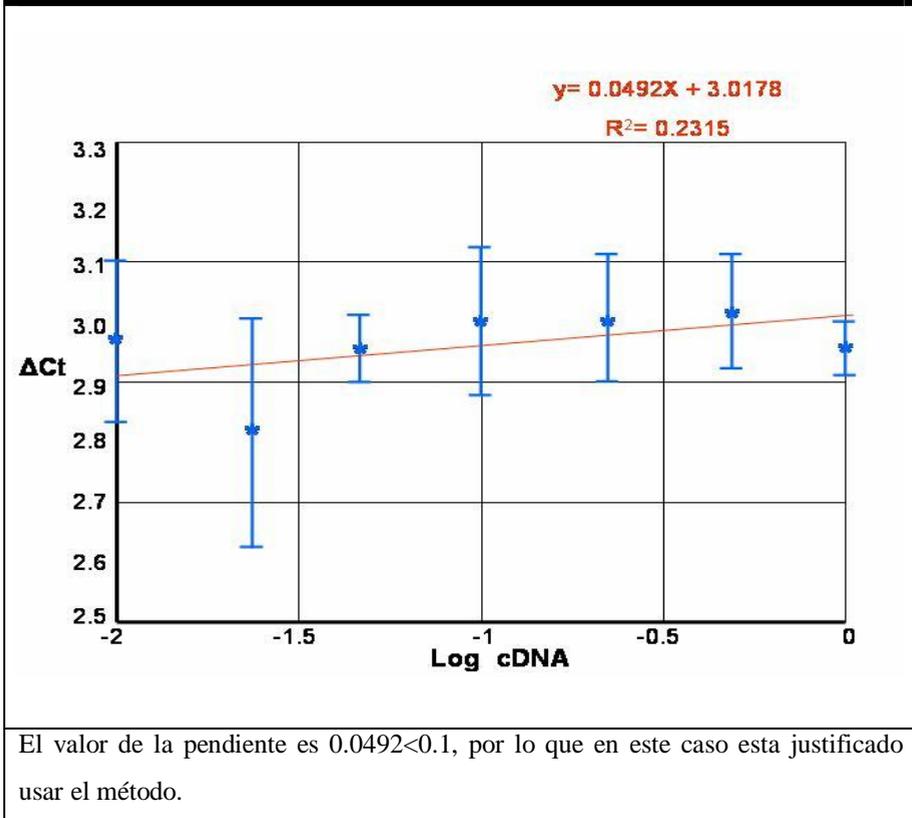
**Tabla 2. Media de los valores Ct para un gen objeto de estudio y GAPDH a diferentes concentraciones de cDNA.**

Cantidad de cDNA	Media del Ct del gen de estudio	Media del Ct de GAPDH	$\Delta$ Ct gen- GAPDH
1	25.59±0.04	22.64±0.03	<b>2.98</b> ±0.05
0.5	26.77±0.09	23.73±0.05	<b>3.04</b> ±0.10
0.2	28.14±0.05	25.12±0.10	<b>3.02</b> ±0.11
0.1	29.18±0.13	26.16±0.02	<b>3.01</b> ±0.13
0.05	30.14±0.03	27.17±0.06	<b>2.97</b> ±0.07
0.02	31.44±0.16	28.62±0.10	<b>2.82</b> ±0.19
0.01	32.42±0.12	29.45±0.08	<b>2.97</b> ±0.14

El Ct es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal base. De manera práctica, es Ct es el ciclo en el que la fluorescencia emitida empieza a crecer exponencialmente según aumenta el número de ciclos de PCR y es obtenido por el programa utilizado para la PCR en tiempo real por el *Light Cycler*. La finalidad de normalizar por GAPDH es obviar las posibles variaciones en la cantidad y calidad del RNA derivados del proceso de extracción del mismo.

Posteriormente, realizamos un experimento de validación en el que hay que comprobar que el valor absoluto de la pendiente de la recta resultante de graficar el logaritmo de las distintas cantidades de cDNA versus los correspondientes  $\Delta$ Ct, es inferior a 0.1 (Figura 19). Solo si esta condición se cumple se puede usar el método  $\Delta\Delta$ Ct y calcular la expresión relativa sin necesidad de realizar una curva estándar.

**Figura 19. Experimento de validación del método de cuantificación relativa  $\Delta\Delta Ct$ .**



Superadas estas premisas, calculamos la expresión relativa de los genes objeto de estudio en cada uno de los grupos (en nuestro caso validamos el método para los genes PPAR- $\gamma$ , PON-1, iNOS, eNOS, IL-6 y p22phox). A partir de los datos medios de Ct se calculan el  $\Delta Ct$ , el  $\Delta\Delta Ct$  y la expresión relativa de los genes a estudiar como sigue:

1. El valor  $\Delta Ct$  se determina restando la media del valor del Ct de GAPDH al valor medio Ct del gen correspondiente. La desviación estándar

de esta diferencia se calcula de los valores de desviación estándar del gen en cuestión ( $s_1$ ) y de GAPDH ( $s_2$ ) usando la fórmula:  $s = \sqrt{(s_1)^2 + (s_2)^2}$ .

2. El valor  $\Delta\Delta Ct$  se calcula restando el  $\Delta Ct$  del calibrador. Este se establece por ser el  $\Delta Ct$  máximo o mínimo y será por el cual se comparen las cantidades relativas de las otras muestras. Como el valor del calibrador es una constante, las desviaciones estándar de los  $\Delta\Delta Ct$  son las mismas que las de los  $\Delta Ct$ .

3. La expresión relativa del gen se calcula mediante la fórmula:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . El intervalo de confianza viene dado por:  $(2^{-(\Delta\Delta Ct + s)}, 2^{-(\Delta\Delta Ct - s)})$ , donde  $s$  es la desviación estándar del valor  $\Delta\Delta Ct$  (Tabla 3).

**Tabla 3. Ejemplo de cuantificación relativa de un gen usando el método Ct.**

Grupo	Valor medio Ct del gen problema	Valor medio Ct del gen GAPDH	$\Delta Ct$ gen-GAPDH	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
1	30.49±0.15	23.63±0.09	6.86±0.17	0.00±0.17	1 (0.9-1.1)
2	27.03±0.06	22.66±0.08	4.37±0.10	-2.50±0.10	5.6 (5.3-6.0)
3	26.25±0.07	24.60±0.07	1.65±0.10	-5.21±0.10	37.0 (34.5-39.7)
4	25.83±0.07	23.01±0.07	2.81±0.10	-4.05±0.10	16.5 (15.4-17.7)

Handwritten annotations in the table include:  
 - Above the  $\Delta Ct$  column:  $\sqrt{(0.15)^2 + (0.09)^2}$   
 - Above the  $\Delta\Delta Ct$  column:  $30.49 - 23.63$   
 - Above the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  column:  $4.37 - 6.86$   
 - Below the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  column:  $2^{-(5.21+0.10)}$   
 - Below the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  column:  $2^{-(5.21-0.10)}$

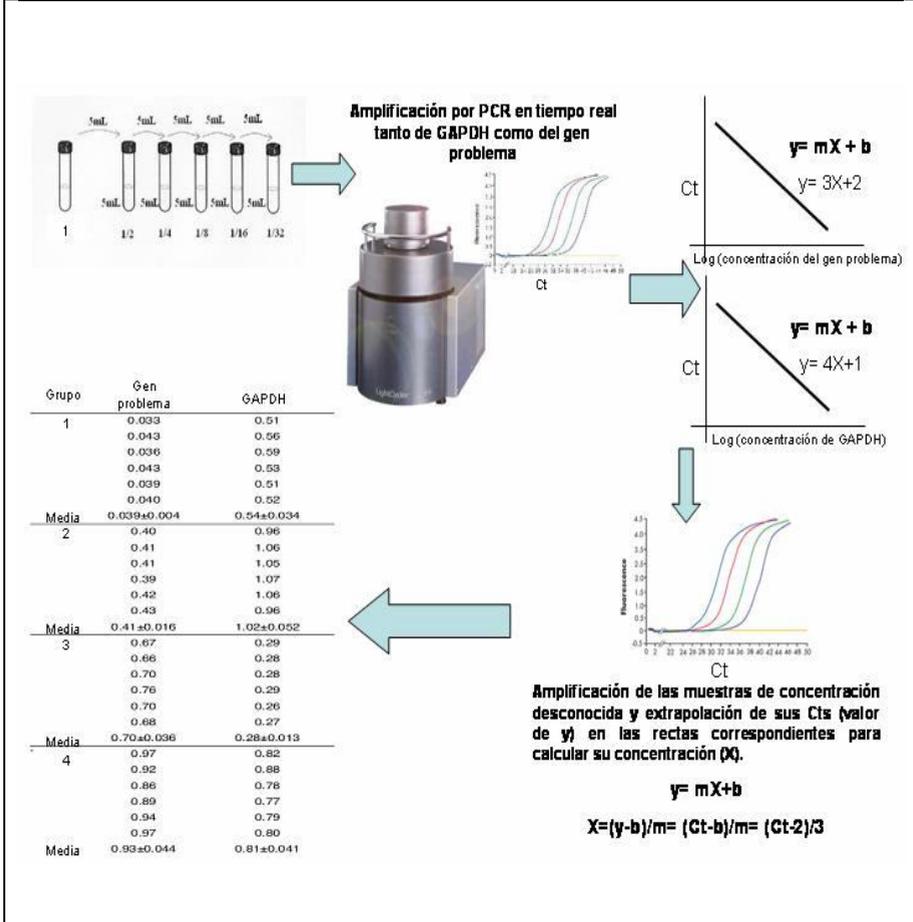
En caso de no poder utilizar el método Delta Ct, la expresión relativa se determinó mediante el uso de rectas de estándares. Los puntos de la recta

estándar se calcularon partiendo de una mezcla de cDNAs mediante diluciones seriadas de la misma a un medio, un cuarto, un octavo, un dieciseisavo y un treintadosavo. De esta forma, la muestra sin diluir se convierte en el calibrador y las otras cantidades son expresadas como *n*-veces diluidas respecto a ella. Se le asigna una concentración arbitraria a la muestra sin diluir de forma que las diluciones seriadas sucesivas representan la concentración a la mitad, a un cuarto etcétera. Las unidades en las que expresemos las diluciones, son por tanto irrelevantes. Para normalizar respecto a un calibrador endógeno, se realizaron rectas estándar tanto del gen GAPDH (calibrador endógeno), como del gen objeto de estudio (en nuestro caso los genes SCARB1, CD36, Alox-5, Alox-15 y Alox-15b fueron analizados por recta estándar). Para cada muestra, la concentración relativa del gen diana y de GAPDH se determinó a partir de la recta estándar correspondiente (extrapolación matemática). Luego la concentración del gen diana es dividida por la concentración del calibrador interno (GAPDH) con el fin de obtener los valores de expresión relativa normalizados. Estos valores de expresión normalizados carecen de unidades y pueden ser usados para comparar la expresión relativa del gen en diferentes muestras.

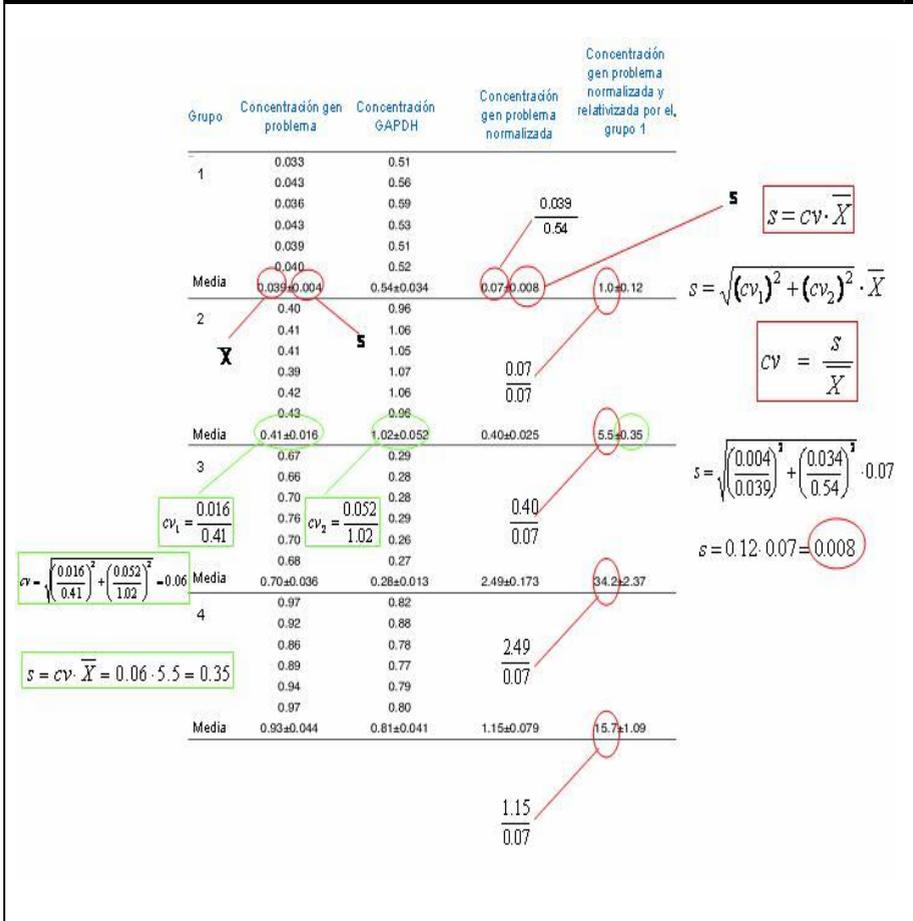
En el ejemplo siguiente (Figura 20) se muestra como se obtienen la correspondientes rectas estándar de los genes GAPDH y problema a partir de las diluciones seriadas de una mezcla de cDNAs.

Obtenidas las concentraciones, se normalizan los valores de expresión relativa y por último se designa un grupo (normalmente el de menor concentración normalizada media) por el que se relativiza la expresión del gen a estudiar (Figura 21).

**Figura 20. Cálculo de las concentraciones del gen problema y GAPDH a partir de una recta estándar.**



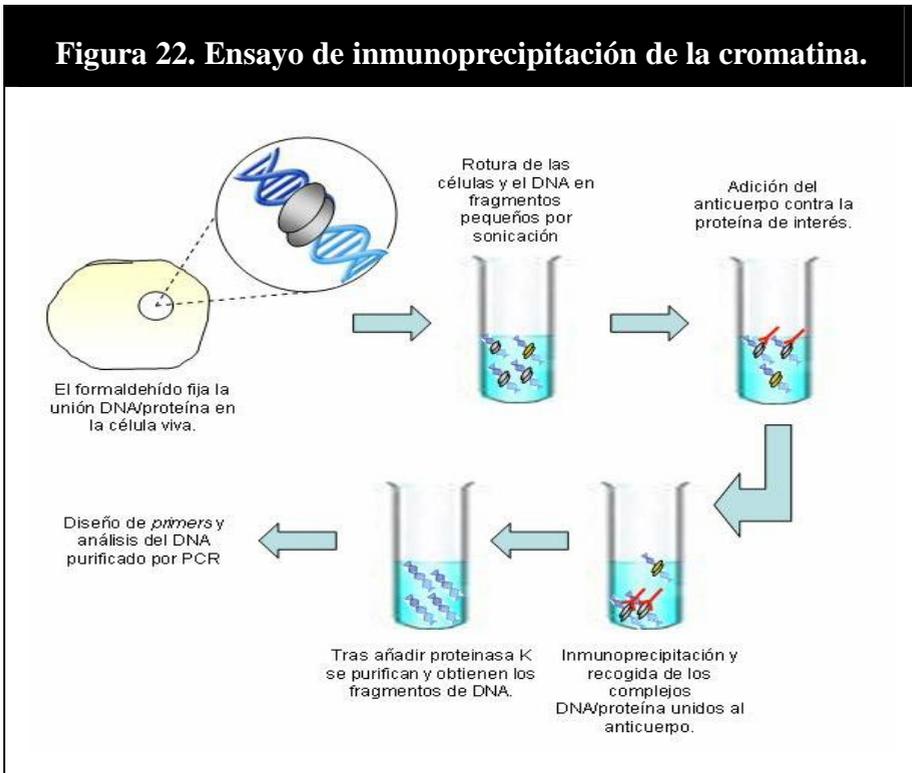
**Figura 21. Cálculo de los valores normalizados de concentración de un gen problema.**



Los valores normalizados de concentración del gen problema se calculan dividiendo la concentración de este gen por la de GAPDH. La expresión relativa se ha relativizado respecto al grupo 1 de modo que por ejemplo en el grupo 2 hay 5.5 veces mas expresión del gen problema respecto al grupo 1. Las desviaciones (s) de los valores relativizados se calculan usando los coeficientes de variación (cv) de los valores normalizados.

## 7. Ensayo de Inmunoprecipitación de la cromatina.

El ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) es una poderosa herramienta para estudiar las interacciones DNA/proteínas. En este método, las células o el tejido se fijan usando formaldehído que preserva y se une a la interacción DNA/proteína. El DNA es posteriormente roto en fragmentos pequeños y uniformes por sonicación, y los complejos DNA/proteína específicos son inmunoprecipitados usando un anticuerpo dirigido contra la proteína de unión al DNA. Después de la inmunoprecipitación, la unión DNA/proteína es revertida, las proteínas eliminadas con proteinasa K y el DNA purificado. El DNA es luego analizado para determinar que fragmentos del mismo estaban unidos a la proteína de interés (Figura 22).



Las muestras de hígado de 0.5 gramos, se descongelaron sobre hielo en un medio DMEM sin suero y luego se les añadió formaldehído durante 5 minutos. Los fragmentos de hígado se homogenizaron y las fracciones citosólica y nuclear se separaron y prepararon, usando el kit de extracción nuclear de Active Motif siguiendo las instrucciones del fabricante. El lisado nuclear se sonicó en hielo con pulsos cortos de medio minuto en un sonicador *hielscher UP200H*. Tan pronto tiene lugar la rotura de la fracción nuclear, comienzan la proteólisis, la desfosforilación y la desnaturalización de las proteínas, por lo que se hace necesario añadir un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas en el *buffer* de sonicación. Además este *buffer* ha de contribuir al mantenimiento de la conformación nativa de las proteínas y a minimizar la desnaturalización del sitio de unión del anticuerpo. La muestra así obtenida representa el total de la cromatina celular (Input). Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se llevaron a cabo añadiendo a 50 µl de estos complejos de cromatina, o bien 10 µl de anticuerpo anti Nrf2 denominado αNrf2 (C20) (*Santa Cruz Biotechnology, sc-722*) o bien 10 µl de anticuerpo anti PPAR-γ denominado PPAR-γ (H-100) (*Santa Cruz Biotechnology, sc-7196*). Las cantidades de anticuerpo recomendadas dependen de la abundancia de la proteína a precipitar y de su afinidad por la misma. Nrf2 (C20) es un anticuerpo policlonal de conejo purificado, contra un péptido localizado en la región C terminal del factor de transcripción Nrf2 de origen humano. Nrf2 regula la expresión de algunos genes a través de su interacción con elementos de reconocimiento de Maf (MAREs) en los mismos, pero esta proteína también se une a los elementos de respuesta antioxidantes (ARE) y está implicada en la regulación de enzimas detoxificadoras y de respuesta al estrés oxidativo. PPAR-γ (H-100) es un anticuerpo policlonal de conejo contra el aminoácido 8-106 del PPAR-γ de origen humano. Como sabemos los PPARs son receptores hormonales

nucleares que promueven la transcripción, formando heterodímeros con miembros de la familia de receptores X retinoides (RXR) para unirse a elementos de respuesta a PPAR (PPREs) en DNAs específicos.

También hubo otra fracción a la que no se le añadió anticuerpo alguno que dio cuenta del ruido o *background* generado durante los procesos de inmunoprecipitación y purificación a los que se sometieron las muestras (Mock).

Para la precipitación de estos complejos DNA-proteína-anticuerpo, se usó una agarosa A/G (*Immunopure Immobilized Protein A/G on Agarose. PIERCE, 20421.*), con gran afinidad por los mismos. Los complejos se unen al reactivo con agarosa, mientras que el resto de residuos generados en las muestras a consecuencia de la lisis no lo hacen. De esta forma, gracias a una serie de pasos de centrifugación y lavados repetidos con PBS, se consigue la precipitación de los complejos de interés. Posteriormente las uniones DNA-proteína han de extraerse de este entramado de agarosa y purificarse. La extracción de los complejos pasa por un proceso repetitivo de adición de un *buffer* de elusión y precipitación del entramado de agarosa. Una vez liberados los complejos DNA-proteína, la adición de proteinasa K revierte la unión de la proteína al fragmento de DNA y continuamos con la purificación de las muestras. Este es un proceso complejo que conlleva varios pasos de lavado, elusión y precipitación con distintos *buffers* de distinta composición (Buffer Baja Sal: 50 mM HEPES pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 % Triton 100X, 0.1 % Deoxicolato sódico e inhibidores de proteasas, Buffer Alta Sal: 50 mM HEPES pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 % Triton 100X, 0.1 % Deoxicolato sódico e inhibidores de proteasas, CiLi Buffer: 10 mM Tris pH 8.0, 250 mM LiCl, 0.5 % NP-40, 0.5 % Deoxicolato sódico, 1 mM EDTA) , cuyo fin último es la obtención de un fragmento de DNA limpio con capacidad de ser amplificado.

Las muestras de DNA que se recuperaron tras la inmunoprecipitación y purificación, se sometieron a análisis por PCR en tiempo real. Usando el programa Primer 3, se diseñaron *primers* específicamente para amplificar fragmentos flanqueantes al sitio ARE (*antioxidant response element*) probable en el promotor del gen de CD36 en el caso de las muestras inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti Nrf2 y para amplificar fragmentos flanqueantes a los sitios PPRE (*peroxisome proliferator response element*) identificados en el promotor del gen de la Apolipoproteína A-I, iNOS y SCARB1, en el caso de las muestras inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti PPAR- $\gamma$ .

Las unidades de promotor correspondiente a cada uno de los genes se calcularon como la diferencia entre el Ct del Input (total de la cromatina) y el Ct de la cromatina inmunoprecipitada con el anticuerpo correspondiente, todo ello dividido por el Ct del Mock (ruido de fondo).

$$\%UP = \frac{Ct_{INPUT} - Ct_{SAMPLE}}{Ct_{MOCK}}$$

Los *primers* flanqueantes del PPRE del gen de la iNOS, que ya habían sido descritos por Crosby y colaboradores fueron: 5'-TGAGGAGAAGTCACACTCTG-3' y 5'-TGGGTCAGCTCTTGTGAATG-3'<sup>221</sup>.

En el promotor del gen CD36, identificamos un presunto sitio ARE (RTGAYnnnGC) localizado entre las posiciones 1425 a 1434, usando la secuencia [GenBank AF 434766]. Esta secuencia se analizó y completó de gaps y errores considerando la información publicada hasta el momento<sup>222;223</sup> y se diseñaron los *primers* flanqueantes usando el programa Primer-3: 5'-TGCTCTGAGCTCTACCCTCTG-3' y 5'-TCTGTCCCCTCTTTTGCAGT-3'.

En el caso del gen murino de la Apo-AI, no está descrita la secuencia de su promotor. Por tanto lo que hicimos fue utilizar la región 5'UTR de la secuencia promotora de Apo-AI de rata [GenBank X 54210], por homología filogenética para hacer un BLAST con la secuencia completa del cromosoma 9 de ratón donde se localiza su gen de la Apo-AI. Con ello se identificó la secuencia de ratón, homóloga a la región Apo A-I 5'UTR de la secuencia del promotor Apo-AI de la rata. Este resultado ser un fragmento largo de 562 pb desde la posición 171971 a la 172532 del cromosoma 9 de ratón (Clon RP24-302M3 [GenBank AC 116503]), y fue por tanto analizado en busca del potencial sitio de unión PPRE. El resultado de esta búsqueda fue una secuencia consenso de la forma RG(G/T)TCA como sigue: **AGTTCAAGGATCA** . Esta secuencia constituye un elemento DR1 de la forma RG(G/T)TCA con una secuencia perfecta 5': **AGTTCA** y una 3' imperfecta: **GGATCA**.

Los *primers* usados para flanquear el sitio putativo PPRE en la región promotora del gen de la Apolipoproteína A-I murina, fueron 5'-TCTGGGTGTCCAGCTCTTCT-3' y 5'-CCTGTTTGCCCACTCTGTTT-3'.

Con SCARB1 ocurrió lo mismo que con Apo A-1. De forma similar a lo que se hizo con este gen, se realizó una búsqueda BLAST usando la región promotora del gen SCARB1 de la rata [gi: 50881992]. Se seleccionó un fragmento común con el clon BAC del cromosoma 5 de ratón [gi: 71533446]. Se identificó un sitio PPRE en el fragmento de 360 pb encontrado y esta secuencia se usó para diseñar los *primers* flanqueantes de la región promotora de SCARB1 murino. Los *primers* fueron: 5'-TTGTGTCCTGAGTGGAATGC-3' y 5'-AGCAGGGTGGTAGGGACTCT-3'.

Las regiones promotoras de CD36, SCARB1 y apolipoproteína A-I, también fueron amplificadas por PCR estándar y sometida a electroforesis en gel. Las bandas de agarosa fueron escindidas, purificadas (*QUIAGEN Gel Extraction Kit*) y secuenciadas en un *ABI Prism 310* usando el *BigDye®v.3.1 Terminator Cycle Sequencing Kit* de acuerdo con las instrucciones del suministrador (*Applied Biosystems*). Con ello nos aseguramos de que efectivamente las secuencias ARE o PPRE estaban en los genes motivo de estudio.

## **8. Análisis estadístico.**

Las variables cuantitativas se describen y representan gráficamente como valores medios  $\pm$  la desviación típica, a menos que se especifique como valores medios  $\pm$  el error típico de la media.

Las variables cualitativas se representan y grafican como porcentajes.

Las comparaciones entre pares para grupos relacionados, se realizaron mediante la prueba de Wilcoxon, o mediante el U-test de Mann-Whitney para las comparaciones a pares de grupos no relacionados. Ambos son test no paramétricos. Estas pruebas no exigen ningún tipo de distribución a las variables y por ello no utilizan los valores obtenidos ni ningún parámetro calculado con ellos, sino los rangos que se pueden establecer con estos valores. El test de Wilcoxon/Mann-Whitney contrasta la hipótesis nula de que una distribución continua es simétrica en torno a una mediana hipotética  $M_0$ . Si la hipótesis nula es cierta, entonces estas diferencias han sido tomadas de una distribución que es simétrica con respecto a cero. Las pruebas de Wilcoxon y la U de Mann-Whitney son la alternativa a la T de Student bajo el supuesto de normalidad.

En nuestro trabajo las comparaciones intragrupo e intergrupo entre cepas iguales, se realizaron mediante el test de Wilcoxon. Las comparaciones intergrupo entre cepas distintas se realizaron aplicando el test Mann-Whitney.

El nivel de significación se estableció considerando un valor de  $P < 0.05$ . Todos los análisis se realizaron haciendo uso del software estadístico SPSS 15.0.

El tamaño de la muestra en nuestro estudio se calculó en base a la fórmula que lo estima a partir de la comparación de proporciones:

$$n = \frac{\left[ Z_{\alpha} \times \sqrt{2p(1-p)} + Z_{\alpha} \times \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)} \right]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

Considerando un poder del 80%, un riesgo del 0.05 y asumiendo que queremos detectar una reducción de la expresión génica del 90%, el tamaño muestral resultó ser 4. Sin duda por experiencia previa, este número resulta una estimación mínima para lograr significación estadística, por lo que decidimos incrementarlo.

Resultados



---

## VI) Resultados.

Como ya introdujimos en el apartado de material y métodos, para nuestros experimentos utilizamos ratones hembras de las cepas C57BL/6J y C3H/HeJ. El consumo de alimento y bebida fueron monitorizados a diario.

Las comparaciones se realizaron mediante el contraste de Wilcoxon o Mann-Whitney, tal como hemos comentado en el apartado de metodología. Es importante destacar que en las figuras que se presentan a continuación se grafican valores medios  $\pm$  la desviación estándar o el error típico (especificado en el pie de figura) y que lo que el test no paramétrico Wilcoxon mide es una relación de orden, independiente de la magnitud y basado en la diferencia entre medianas y no de medias.

### 1. Pesos.

El peso de cada animal se recogió a los días indicados, a lo largo del periodo de experimentación. Como se muestra en la figura 23 y en la tabla 4 donde se presentan los contrastes estadísticos realizados, no se observaron diferencias significativas a destacar, si bien merece mención el hecho de que los animales en tratamiento farmacológico y en dieta aterogénica así como el grupo de C57BL/6J en dieta aterogénica pero no medicados, ofrezcan unas curvas de incremento de pesos por debajo de las observadas para la de los animales C3H/HeJ (HFHC) e incluso para las de los C57BL/6J en dieta normal no aterogénica.

Figura 23. Evolución de los pesos a lo largo del tiempo.

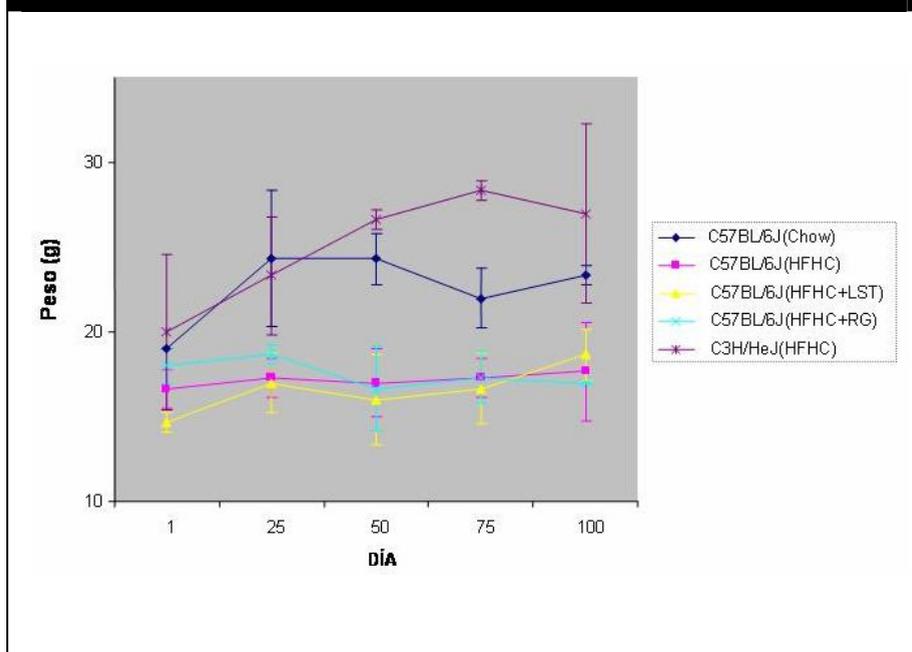


Tabla 4. Comparaciones inter e intra grupo.

Pesos

Comparaciones intragrupo	Día 1-Día100	Comparaciones intergrupo	Día 1	Día 100
C3H/HeJ (HFHC)	p= 0.109	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (Chow)	p= 0.655	p= 0.180
C57BL/6J (Chow)	p=0.102	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (HFHC)	p= 0.180	p= 0.109
C57BL/6J (HFHC)	p= 0.317	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (HFHC+LST)	p= 0.109	p= 0.102
C57BL/6J (HFHC+LST)	p= 0.109	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.414	p= 0.180
C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.180	C57BL/6J (Chow)- C57BL/6J (HFHC)	p= 0.102	p= 0.102
		C57BL/6J (Chow)- C57BL/6J (HFHC+LST)	p= 0.102	p= 0.102
		C57BL/6J (Chow)- C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.180	p= 0.180
		C57BL/6J (HFHC)- C57BL/6J (HFHC+LST)	p= 0.109	p= 0.414
		C57BL/6J (HFHC)-C57BL/6J (HFHC+RG)	P=0.102	P=0.655
		C57BL/6J (HFHC+LST)- C57BL/6J (HFHC+RG)	p=0.102	p= 0.180

---

## 2. Lípidos plasmáticos.

Valoramos la concentración plasmática de colesterol total, HDL colesterol, de las actividades enzimáticas paroxonasa y arilesterasa vinculadas a las lipoproteínas de alta densidad, de triglicéridos e hidroperóxidos lipídicos tal y como se describe en la metodología.

### 2.1 Colesterol total.

La evolución de los niveles de colesterol total a lo largo del periodo experimental, se representan en la figura 24. Los contrastes tanto intergrupo como intragrupo realizados a día 1 y día 100, se resumen en la tabla 5.

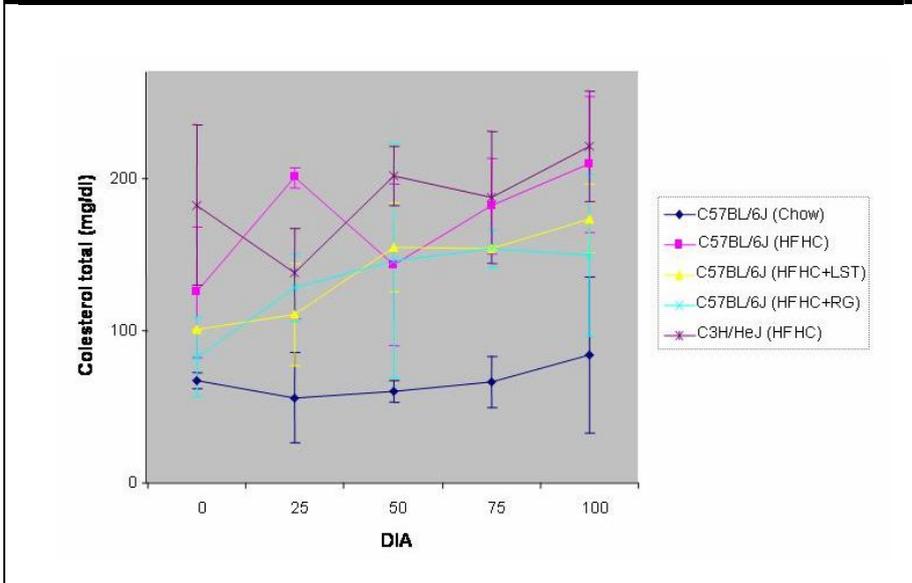
En el grupo tratado con rosiglitazona observamos un aumento significativo de los niveles de colesterol total entre el día 1 y el 100 ( $P=0.026$ ).

Entre el grupo control en dieta chow y el C57BL/6J en dieta aterogénica se observaron diferencias significativas al inicio del experimento ( $P=0.026$ ). En el día 100, haciendo esta misma comparación, se observó una tendencia hacia una mayor concentración de colesterol total ( $P=0.063$ ).

Los niveles de colesterol total fueron significativamente mayores al inicio y al final del periodo de estudio en los animales C3H/HeJ en dieta aterogénica respecto al grupo control C57BL/6J en dieta normal ( $P<0.026$  para ambos contrastes).

Se encontró que las comparaciones entre los grupos C3H/HeJ en dieta aterogénica y C57BL/6J en dieta aterogénica y tratamiento con rosiglitazona diferían a día 1 y a día 100 ( $P<0.026$  para ambas comparaciones).

**Figura 24. Evolución de los niveles de colesterol total a lo largo del tiempo.**



**Tabla 5. Comparaciones inter e intra grupo.**

Colesterol total				
Comparaciones intragrupo	Día 1-Día100	Comparaciones intergrupo	Día 1	Día 100
C3H/HeJ (HFHC)	p= 0.026	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (Chow)	p= 0.026	p= 0.026
C57BL/6J (Chow)	p= 0.916	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (HFHC)	p= 0.026	p= 0.458
C57BL/6J (HFHC)	p= 0.063	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (HFHC+LST)	p= 0.157	p= 0.113
C57BL/6J (HFHC+LST)	p= 0.157	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.026	p= 0.026
C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.026	C57BL/6J (Chow)- C57BL/6J (HFHC)	p= 0.026	p= 0.063
		C57BL/6J (Chow)- C57BL/6J (HFHC+LST)	p= 0.157	p= 0.026
		C57BL/6J (Chow)- C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.113	p= 0.113
		C57BL/6J (HFHC)- C57BL/6J (HFHC+LST)	p= 0.157	p= 0.063
		C57BL/6J (HFHC)- C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.113	p= 0.458
		C57BL/6J (HFHC+LST)- C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.157	p= 0.459

---

## 2.2 Colesterol HDL.

La figura 25 muestra la concentración plasmática media  $\pm$  la desviación estándar del colesterol HDL en los distintos grupos experimentales a lo largo del tiempo. La tabla 6 muestra los valores de significación para las comparaciones intragrupo e intergrupo.

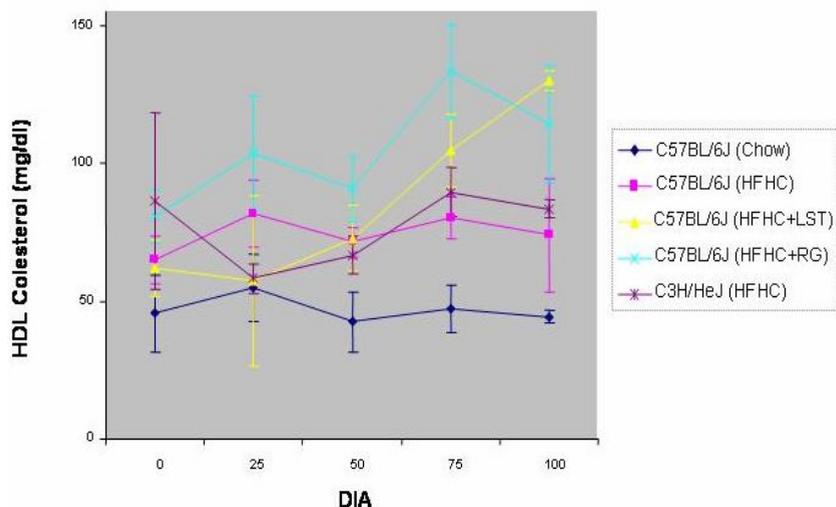
Como puede observarse, en los animales en dieta aterogénica y tratados con rosiglitazona, se obtuvo una diferencia significativa en los niveles de HDL medidos a día 1 versus día 100 ( $P=0.026$ ).

Así mismo, en las comparaciones intergrupo la diferencia significativa más destacable es, la que se obtuvo a día 100 entre el grupo C57BL/6J control y el C57BL/6J en dieta aterogénica ( $P=0.026$ ), lo que indica que la dieta aterogénica se asocia con aumentos de los niveles de HDL colesterol. Hay que tener en cuenta que el metabolismo lipídico de ratones es distinto al de humanos, y que el incremento de valores medios de HDL colesterol en animales en dieta aterogénica se realiza a expensas de incrementos de colesterol total. Además como veremos más adelante este HDL colesterol es disfuncional.

Tanto el grupo tratado con losartán como el tratado con rosiglitazona tenían niveles de HDL significativamente mayores que el grupo control en dieta normal pese a ser alimentados con una dieta aterogénica ( $P=0.026$  para ambos). Lo mismo ocurría cuando comparabamos estos grupos con el de animales C57BL/6J en dieta aterogénica ( $P=0.026$  para ambos).

Respecto al grupo C3H/HeJ resistente a dieta aterogénica, los grupos tratados con losartán y rosiglitazona diferían en sus niveles de HDL a día 100 ( $P=0.026$  para ambos). También se observó una diferencia de las concentraciones a día 1 y a día 100 de los animales C3H/HeJ en dieta aterogénica versus C57BL/6J en dieta control ( $P=0.026$ ).

**Figura 25. Evolución de los niveles de HDL colesterol a lo largo del tiempo.**



**Tabla 6. Comparaciones inter e intra grupo.**

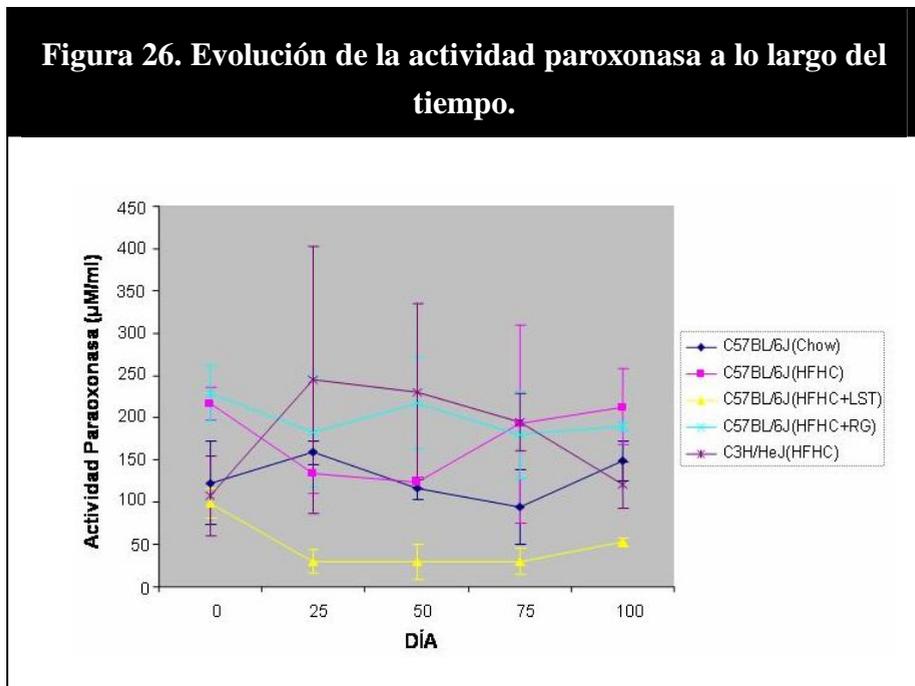
HDL Colesterol

Comparaciones intragrupo	Dia 1-Dia100	Comparaciones intergrupo	Dia 1	Dia 100
C3H/HeJ (HFHC)	p=0.459	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (Chow)	p= 0.026	p= 0.026
C57BL/6J (Chow)	p=0.459	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (HFHC)	p= 0.113	p= 0.113
C57BL/6J (HFHC)	p=0.459	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (HFHC+LST)	p= 0.063	p= 0.026
C57BL/6J (HFHC+LST)	p=0.458	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.026	p= 0.026
C57BL/6J (HFHC+RG)	p=0.026	C57BL/6J (Chow)- C57BL/6J (HFHC)	p= 0.113	p= 0.026
		C57BL/6J (Chow)- C57BL/6J (HFHC+LST)	p= 0.063	p= 0.026
		C57BL/6J (Chow)- C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.026	p= 0.026
		C57BL/6J (HFHC)- C57BL/6J (HFHC+LST)	p= 0.063	p= 0.026
		C57BL/6J (HFHC)- C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.026	p= 0.026
		C57BL/6J (HFHC+LST)- C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.458	p= 0.113

### 2.2.1 Actividades Paroxonasa y Arilesterasa.

Como se ha comentado en la introducción, la actividad paroxonasa evaluada como hidrólisis del paraoxón y la actividad arilesterasa, evaluada como hidrólisis del para-nitrofenol, se vinculan junto con otras a la proteína paroxonasa (PON1). A su vez ésta se encuentra estrechamente ligada a subfracciones de HDL colesterol con actividad antioxidante preservada. Los resultados de la monitorización en el tiempo de las actividades medias paroxonasa y arilesterasa se muestran en la figuras 26 y 27 respectivamente. Los resultados de las comparaciones intragrupo e intergrupo en las tablas 7 y 8 respectivamente.

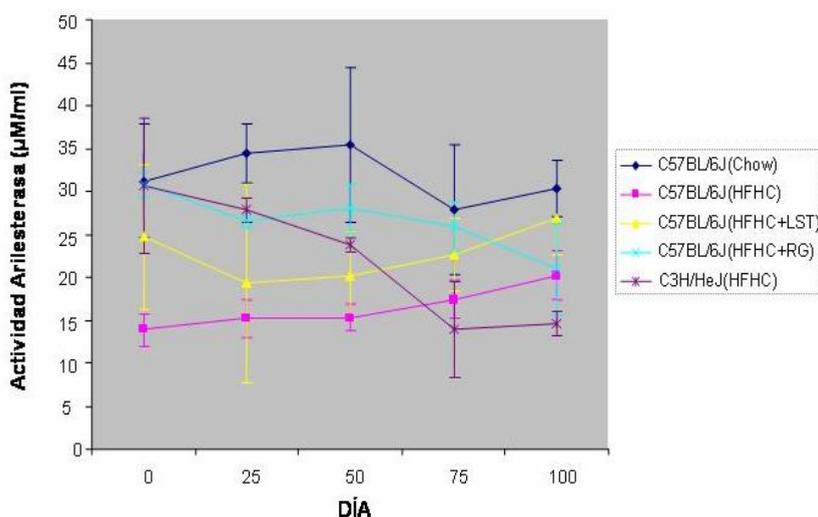
Como puede observarse, ninguno de los dos tratamientos farmacológicos modificó significativamente las actividades asociadas al HDL.



**Tabla 7. Comparaciones inter e intra grupo.**

Actividad Paraoxonasa

Comparaciones intragrupo	Día 1-Día100	Comparaciones intergrupo	Día 1	Día 100
C3H/HeJ (HFHC)	p= 0.593	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (Chow)	p= 1	p= 0.285
C57BL/6J (Chow)	p= 1	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (HFHC)	p= 0.109	p= 0.109
C57BL/6J (HFHC)	p= 0.593	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (HFHC+LST)	p= 0.655	p= 0.109
C57BL/6J (HFHC+LST)	p= 0.180	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.109	p= 0.109
C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.109	C57BL/6J (Chow)- C57BL/6J (HFHC)	p= 0.109	p= 0.109
		C57BL/6J (Chow)- C57BL/6J (HFHC+LST)	p= 0.655	p= 0.109
		C57BL/6J (Chow)- C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.109	p= 0.109
		C57BL/6J (HFHC)- C57BL/6J (HFHC+LST)	p= 0.180	p= 0.109
		C57BL/6L (HFHC)-C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.285	p= 0.593
		C57BL/6J (HFHC+LST)- C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.180	p= 0.109

**Figura 27. Evolución de la actividad arilesterasa a lo largo del tiempo.**

**Tabla 8. Comparaciones inter e intra grupo.**

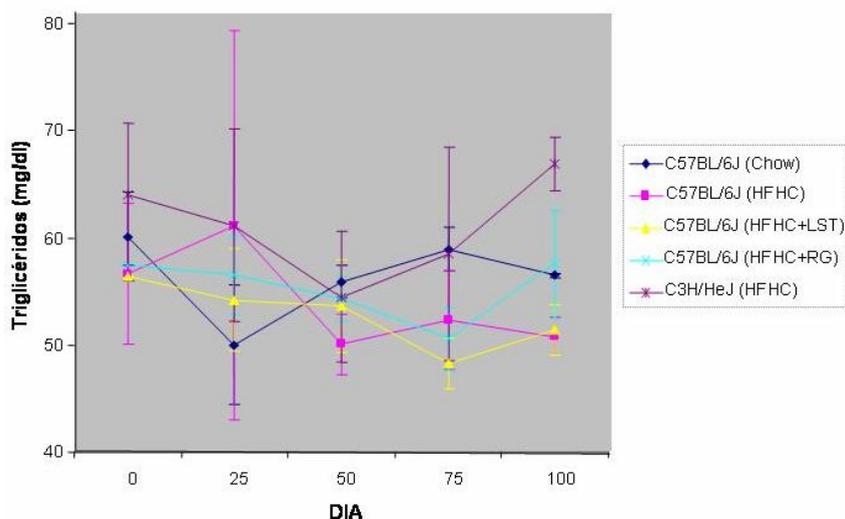
Actividad Arilesterasa				
Comparaciones intragrupo	Día 1-Día100	Comparaciones intergrupo	Día 1	Día 100
C3H/HeJ (HFHC)	p= 0.109	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (Chow)	p= 0.593	p=0.109
C57BL/6J (Chow)	p= 0.593	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (HFHC)	p= 0.109	p= 0.109
C57BL/6J (HFHC)	p= 0.109	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (HFHC+LST)	p= 0.655	p= 0.109
C57BL/6J (HFHC+LST)	p= 0.655	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 1	p= 0.285
C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.109	C57BL/6J (Chow)- C57BL/6J (HFHC)	p= 0.109	p= 0.109
		C57BL/6J (Chow)- C57BL/6J (HFHC+LST)	p=0.655	p= 0.593
		C57BL/6J (Chow)- C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 1	p= 0.109
		C57BL/6J (HFHC)- C57BL/6J (HFHC+LST)	p= 0.180	p= 0.109
		C57BL/6J (HFHC)- C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.109	p= 1
		C57BL/6J (HFHC+LST)- C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.655	p= 0.285

### 2.3 Triglicéridos.

La evolución de los niveles de triglicéridos a lo largo del tiempo se representa en la figura 28 y los contrastes intergrupo e intragrupo en la tabla 9. En la evaluación de sus concentraciones se observó que no existían diferencias significativas en los niveles de triglicéridos entre el día 1 y el 100. Al final del periodo de experimentación, los grupos tratados con losartán y con rosiglitazona mostraron unos niveles de triglicéridos significativamente inferiores, respecto al grupo de animales C3H/HeJ en dieta aterogénica ( $P<0.026$  para ambas comparaciones). Este resultado pudiera vincularse como se verá más adelante a la preservación de la actividad PPAR- $\gamma$ .

La comparación a término entre los dos grupos de animales en dieta aterogénica y tratados farmacológicamente resultó significativa ( $P=0.026$ ).

**Figura 28. Evolución de los niveles de triglicéridos a lo largo del tiempo.**



**Tabla 9. Comparaciones inter e intra grupo.**

Triglicéridos

Comparaciones intragrupo	Día 1-Día100	Comparaciones intergrupo	Día 1	Día 100
C3H/HeJ (HFHC)	p= 0.113	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (Chow)	p= 0.459	p= 0.063
C57BL/6J (Chow)	p= 0.063	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (HFHC)	p= 0.458	p= 0.063
C57BL/6J (HFHC)	p= 0.063	C3H/HeJ(HFHC)- C57BL/6J (HFHC+LST)	p= 0.157	p= 0.026
C57BL/6J (HFHC+LST)	p= 0.157	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.157	p= 0.026
C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.157	C57BL/6J (Chow)- C57BL/6J (HFHC)	p= 0.458	p= 0.157
		C57BL/6J (Chow)- C57BL/6J (HFHC+LST)	p= 0.157	p= 0.063
		C57BL/6J (Chow)- C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 1	p= 0.458
		C57BL/6J (HFHC)- C57BL/6J (HFHC+LST)	-	p= 0.063
		C57BL/6J (HFHC)- C57BL/6J (HFHC+RG)	-	p= 0.063
		C57BL/6J (HFHC+LST)- C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.157	p= 0.026

---

## 2.4 Hidroperóxidos Lipídicos.

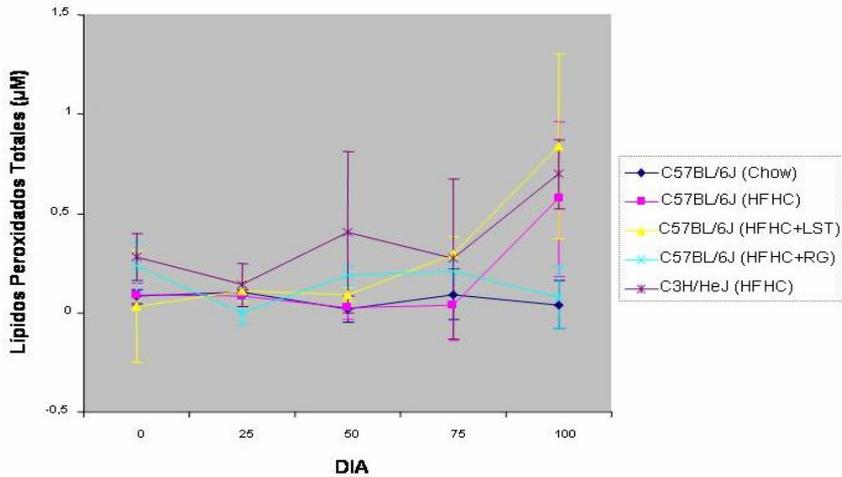
En este caso la figura 29 representa cómo variaron los niveles de concentración de lípidos peroxidados a lo largo del periodo experimental y la tabla 10 recoge las comparaciones realizadas.

En el grupo C57BL/6J en dieta aterogénica y tratamiento con rosiglitazona se encontró una diferencia significativa en los niveles de lípidos peroxidados entre el inicio y el final del experimento ( $P=0.026$ ).

Es importante destacar que al comparar las cifras de LOOH entre el grupo C57BL/6J en dieta aterogénica y el grupo C57BL/6J en dieta aterogénica y tratamiento con rosiglitazona a día 100, se observó una disminución de los niveles de lípidos peroxidados en éste último grupo, si bien ésta no alcanzó significación estadística.

Por último, se observó una disminución estadísticamente significativa ( $P= 0.026$ ) de los niveles de lípidos peroxidados a día 100 en el grupo de animales en dieta aterogénica y tratados con rosiglitazona respecto a los animales en dieta aterogénica y tratados con losartán.

**Figura 29. Evolución de los niveles de lípidos peroxidados a lo largo del tiempo.**



En este caso se ha representado el error típico de la media y no la desviación típica.

**Tabla 10. Comparaciones inter e intra grupo.**

Lípidos peroxidados

Comparaciones intragrupo	Día 1-Día100	Comparaciones intergrupo	Día 1	Día 100
C3H/HeJ (HFHC)	p= 0.113	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (Chow)	p= 0.063	p= 0.157
C57BL/6J (Chow)	p= 0.157	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (HFHC)	p= 0.458	p= 0.458
C57BL/6J (HFHC)	p= 0.157	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (HFHC+LST)	p= 0.458	p= 0.459
C57BL/6J (HFHC+LST)	p= 0.458	C3H/HeJ (HFHC)- C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.458	p= 0.063
C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.026	C57BL/6J (Chow)- C57BL/6J (HFHC)	p= 0.063	p= 0.157
		C57BL/6J (Chow)- C57BL/6J (HFHC+LST)	p= 0.157	p= 0.157
		C57BL/6J (Chow)- C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.063	p= 0.113
		C57BL/6J (HFHC)- C57BL/6J (HFHC+LST)	p= 0.157	p= 0.458
		C57BL/6J (HFHC)- C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.063	p= 0.066
		C57BL/6J (HFHC+LST)- C57BL/6J (HFHC+RG)	p= 0.063	p= 0.026

---

### 3. Niveles de Insulina.

Aunque no los introdujimos en el apartado de material y métodos, los niveles de insulina también fueron cuantificados. La insulina fue medida con el kit de Abbott en el analizador IMx (*Laboratorios Abbott USA*), por gentileza del Dr. Don Antonio Losada (Servicio de Análisis Clínicos. Farmacia. Hospital Universitario de Gran Canaria Dr Negrín). Sin embargo no obtuvimos muestra suficiente como para realizar contrastes estadísticos que arrojaran información de interés. Los valores a término resultaron constantes.

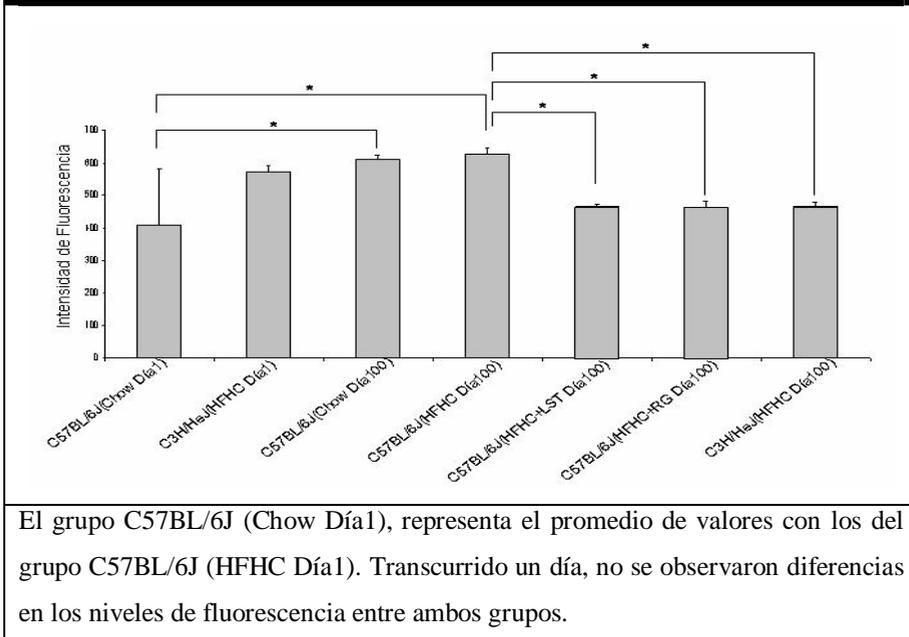
### 4. Medida de la capacidad antioxidante del HDL.

Evaluamos la capacidad antioxidante del HDL precipitado a partir de muestras de plasma pretratado con sulfato de cobre, como se describe en el apartado de métodos. En primer lugar, comprobamos que no existían diferencias significativas entre los valores promedio de fluorescencia obtenidos en el grupo C57BL/6J en dieta aterogénica, transcurrido un día tras empezar a ser alimentados con dieta aterogénica (a día 1) y el grupo C57BL/6J en dieta chow transcurrido un solo día. Por lo tanto, se asumió que todos estos valores podían agruparse como si pertenecieran al grupo único C57BL/6J chow día 1. Partiendo de esta premisa, tal y como se muestra en la figura 30, encontramos diferencias significativas en los valores de fluorescencia en el grupo C57BL/6J chow, entre el día 1 y el día 100 ( $P=0.012$ ) y entre el grupo C57BL/6J chow a día 1 y el C57BL/6J en dieta aterogénica a día 100 ( $P=0.012$ ). Por tanto, la dieta HFHC y el tiempo se asocian con una disminución de la capacidad antioxidante del HDL.

Por otro lado, resultaron significativas las diferencias entre el grupo C57BL/6J en dieta aterogénica a día 100, y ambos grupos en tratamiento farmacológico también a día 100. Como puede observarse en los grupos

C57BL/6J en dieta aterogénica y tratados farmacológicamente los valores medios de fluorescencia se encontraron disminuidos con respecto a los obtenidos en el HDL de los animales C57BL/6J en dieta aterogénica sin tratamiento ( $P=0.011$  para ambas comparaciones). De igual forma, la comparación C57BL/6J en dieta aterogénica con el grupo C3H/HeJ en dieta aterogénica al final del periodo experimental también mostró que estos últimos tenían niveles de fluorescencia inferiores ( $P=0.011$ ). Se hace evidente que tanto la rosiglitazona como el losartán son capaces de preservar la capacidad antioxidante del HDL pese a que, como mostramos anteriormente, no se observen diferencias en sus actividades paroxonasa o arilesterasa ni, como veremos más adelante, en los niveles de expresión del gen paroxonasa-1 (PON1).

**Figura 30. Medida de la capacidad antioxidante del HDL mediante el ensayo de la diclorofluoresceína.**



---

## **5. Porcentaje de apolipoproteína A-1 recuperado tras inmunoprecipitación con anticuerpo frente a PPAR- $\gamma$ .**

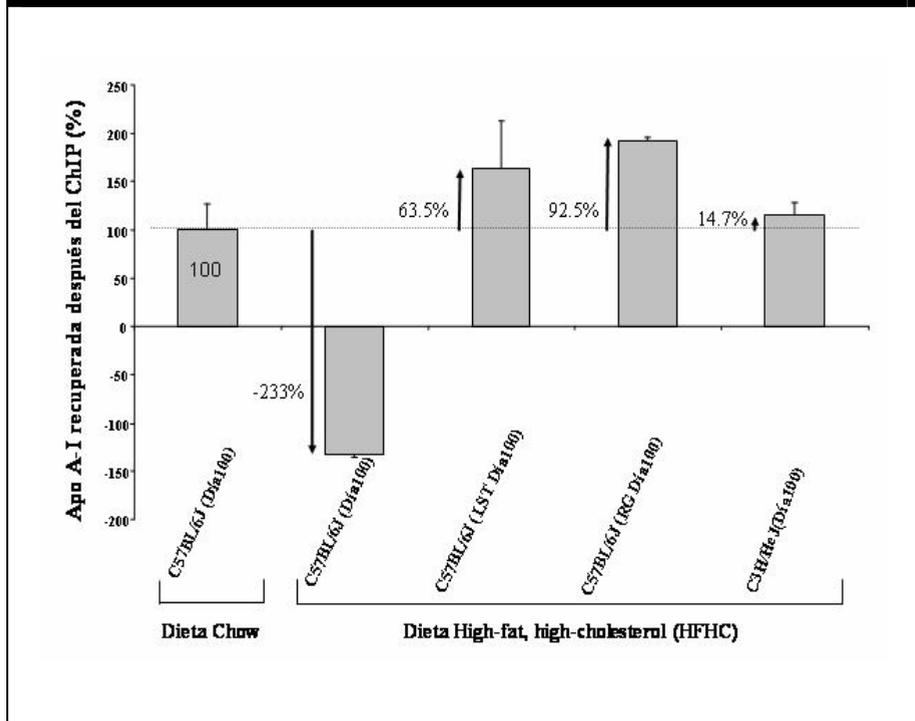
Como hemos sugerido con anterioridad y como se verá más adelante, nuestros resultados señalan que, tanto el losartán como la rosiglitazona, parecen preservar la actividad PPAR- $\gamma$ . Destacamos también que las cifras medias de colesterol HDL resultaron superiores en los animales tratados con rosiglitazona con respecto a las obtenidas en los animales en dieta aterogénica y tratados con losartán. No obstante la capacidad de prevenir la oxidación del PAPC en presencia de HPODE resultó similar para las HDL aisladas de ambos grupos experimentales tratados. Como hemos señalado, la concentración de apolipoproteína A-1 es un parámetro principal que da cuenta de la habilidad antioxidante de las HDL. En el gen de la apolipoproteína A-1 humano se ha descrito la presencia de un sitio PPRE. Para tratar de discriminar si las diferencias en los niveles de HDL entre los grupos tratados con rosiglitazona versus losartán se debían a diferencias en la activación PPAR- $\gamma$  mediada en el gen de la apolipoproteína A-1 murino, realizamos una inmunoprecipitación con un anticuerpo frente a PPAR- $\gamma$  tras localizar identificar y secuenciar un sitio PPRE en el gen de la apo A-1 de ratón, tal y como se describe en la metodología.

En la figura 31 donde se representa el porcentaje de apo A-1 recuperado posteriormente a la realización del ensayo de inmunoprecipitación, se observa un 63.5% y un 92.5% de amplificación de apo A-1 en el grupo tratado con losartán y rosiglitazona respectivamente, respecto al grupo C57BL/6J en dieta chow considerado arbitrariamente como referencia (100 %).

No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos tratados farmacológicamente lo que indica que la transcripción de apo A-1

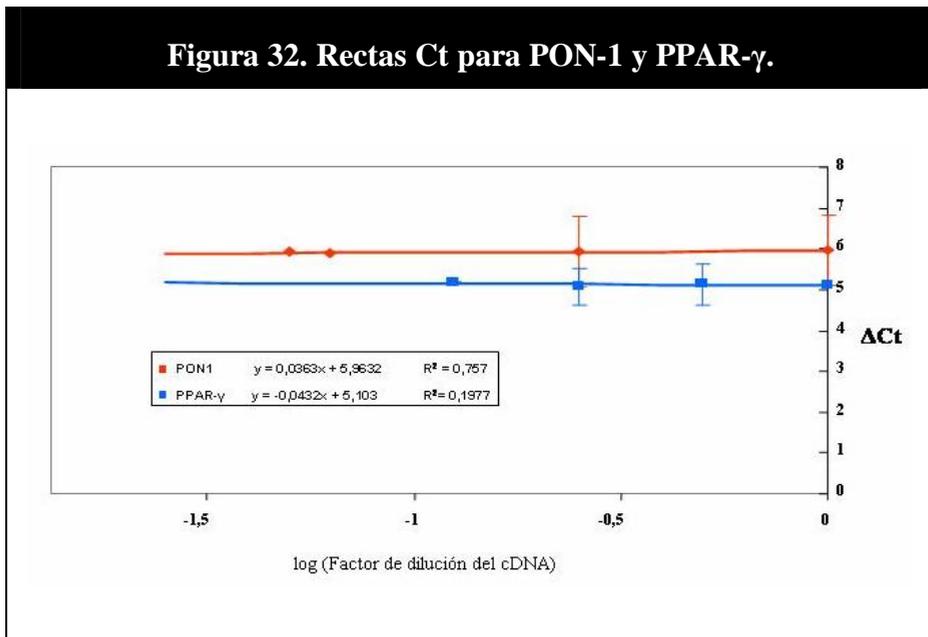
mediada por PPAR- $\gamma$ , resultó similar en ambos. De esta puede deducirse que, las cifras de HDL colesterol, superiores en los animales tratados con rosiglitazona con respecto a los tratados con losartán, no son debidas a diferencias de expresión del gen apoA-1, mediadas por una actividad diferente de PPAR- $\gamma$  entre ambos grupos experimentales tratados farmacológicamente.

**Figura 31. Porcentajes de recuperación de apolipoproteína A-I tras ChIP (Chromatin Immunoprecipitation Assay).**



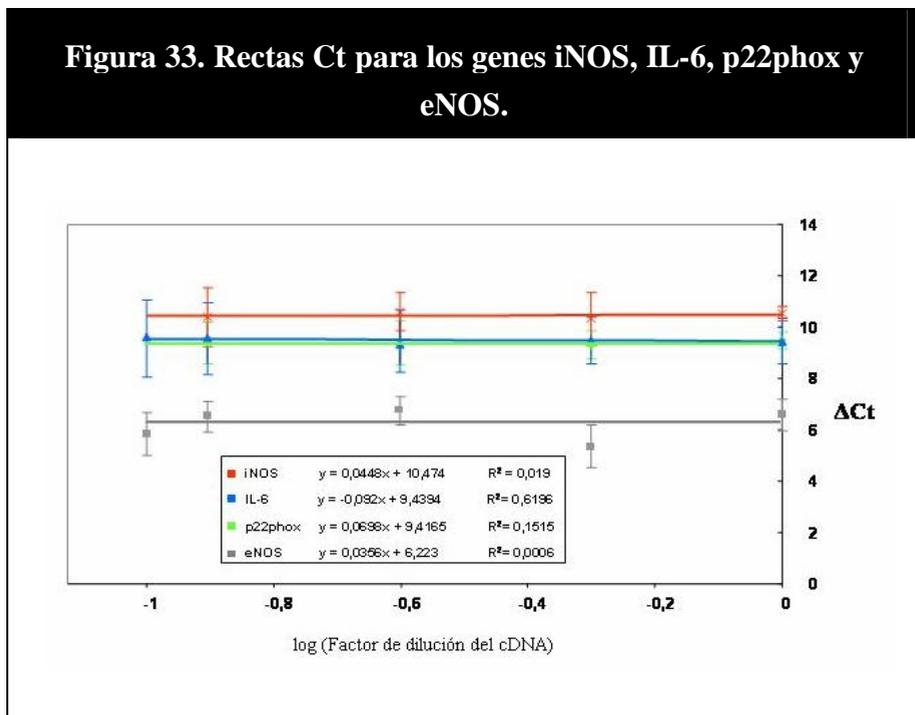
## 6. Validación de los métodos $\Delta\Delta Ct$ y recta estándar de los diferentes genes objeto de estudio.

En la figura 32 se muestra el experimento de validación delta Ct, donde se representa el logaritmo de los valores de dilución para una mezcla de cDNAs obtenido del grupo C57BL/6J en dieta normal (n = 4), frente a la media de valores delta Ct (Ct del gen a analizar - Ct de GAPDH) para los genes PPAR- $\gamma$  y PON-1. Los valores representan la media de tres experimentos con sus correspondientes replicados. Para ambos genes, el valor absoluto de la pendiente de sus correspondientes rectas (valores que acompañan a la x) resultó ser menor de 0.1, por lo fue posible aplicar el método  $\Delta\Delta Ct$ .



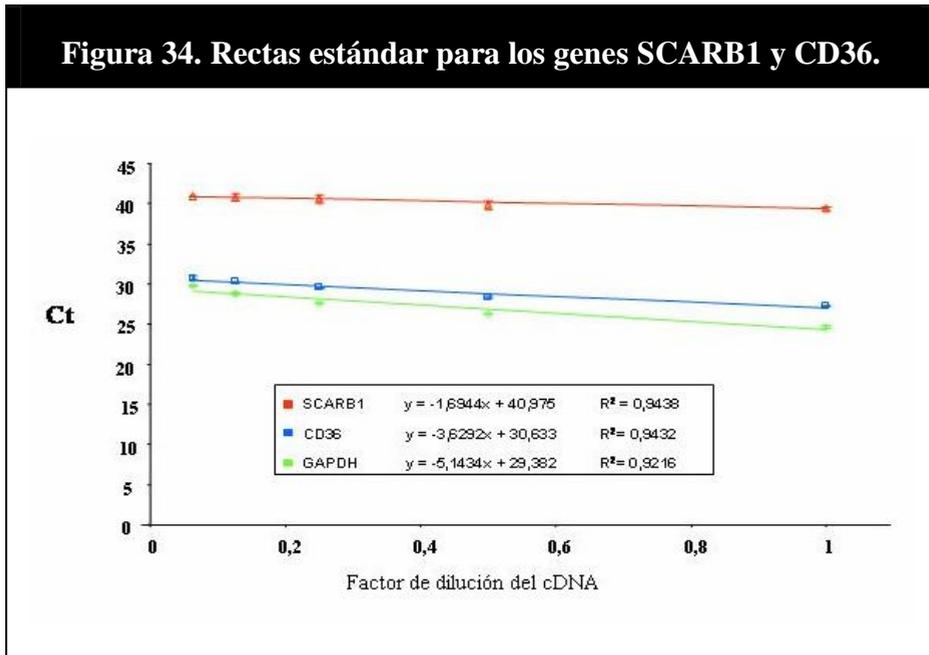
Para los genes de la sintetasa de la óxido nítrico endotelial constitutiva (eNOS) e inducible (iNOS), de la cadena ligera de la citocromo b552 ó p22phox (CYBA) y de la interleucina 6 (IL-6), se representó el

logaritmo de los valores de dilución para una mezcla de cDNAs obtenido del grupo C57BL/6J en dieta normal o chow (n = 4), frente a la media de valores delta Ct (Ct del gen a analizar - Ct de GAPDH), como puede observarse en la figura 33. Igual que en el caso anterior, los valores absolutos de las pendientes resultaron ser inferiores al valor 0.1 e igualmente, los valores representan la media de tres experimentos con sus correspondientes replicados.



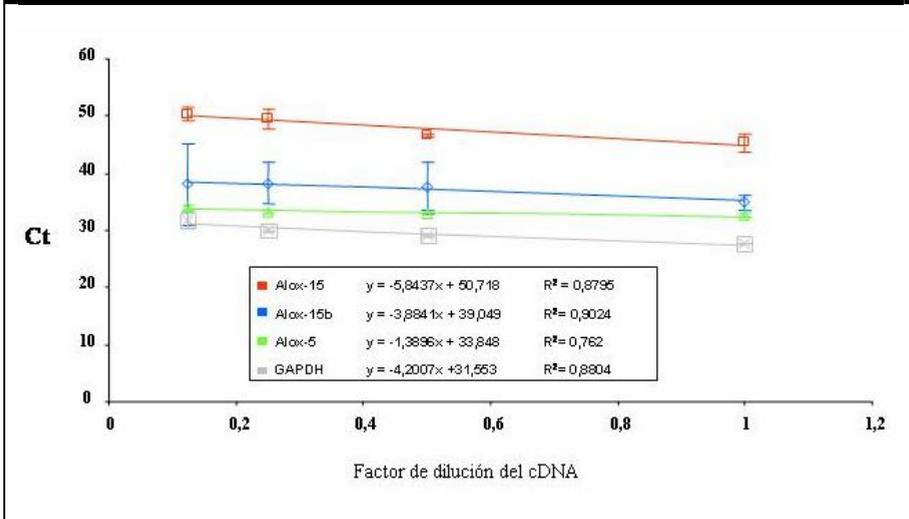
Para los genes SCARB1 y CD36, las pendientes de las rectas resultaron ser superiores al valor 0.1. Las rectas de estándares que se muestran en la figura 34 son las correspondientes a los fragmentos amplificados de los genes SCARB1, CD-36 y GAPDH. En la gráfica se representa el valor medio  $\pm$  la desviación típica del ciclo umbral (Ct)

obtenido para cada punto. Los cDNA analizados corresponden a la mezcla obtenida de distintos cDNAs ( $n = 4$ ) del grupo C57BL/6J en dieta normal. Los valores representan la media de tres experimentos con sus correspondientes replicados.



A continuación en la figura 35, se muestran las rectas de estándares para los fragmentos amplificados de los genes Alox-5, Alox-15, Alox-15b y GAPDH. En la gráfica se representa el valor medio  $\pm$  la desviación típica del ciclo umbral (Ct) obtenido para cada punto. Cada punto del eje de ordenadas corresponde a su vez al valor de dilución del cDNA. Los cDNA analizados corresponden al pool obtenido del grupo C57BL/6J en dieta no aterogénica ( $n=4$ ). Los valores representan la media de tres experimentos con sus correspondientes replicados.

**Figura 35. Rectas estándar para los genes Alox-15, Alox-15b y Alox-5.**



## 7. Expresión relativa de PPAR- $\gamma$ .

La figura 36 muestra la expresión relativa del amplificado del gen del factor de transcripción PPAR- $\gamma$  determinada a lo largo del periodo experimental.

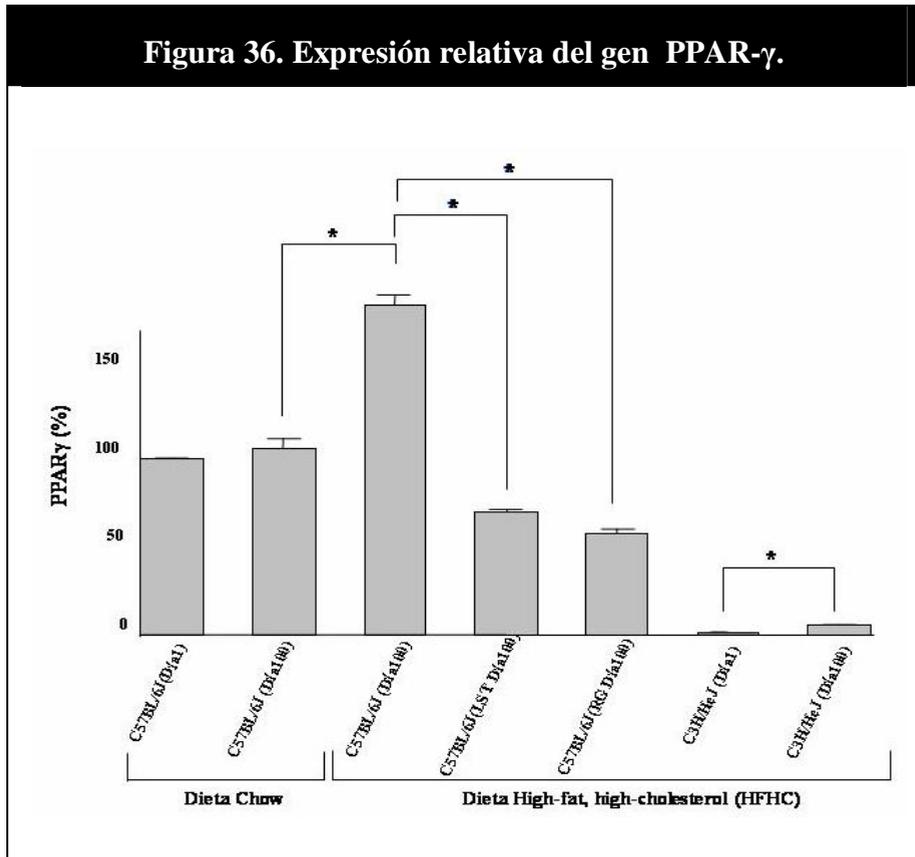
Se observó un incremento significativo en la expresión de PPAR- $\gamma$  en el grupo en dieta aterogénica respecto al de dieta normal o chow ( $P=0.026$ ) al final del periodo de experimentación (día 100).

No se detectaron diferencias en los niveles de expresión de PPAR- $\gamma$  entre los dos grupos tratados farmacológicamente.

Sin embargo hay que destacar que los niveles de expresión de PPAR- $\gamma$  tanto en el grupo C57BL/6J en dieta aterogénica tratado con losartán como en el grupo C57BL/6J en dieta aterogénica tratado con rosiglitazona, no aumentaron respecto a su control C57BL/6J en dieta aterogénica. Estas comparaciones resultaron significativas ( $P=0.026$  para

ambos).

La diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) de los niveles de expresión relativa del amplificado de PPAR- $\gamma$  entre el día 1 y el 100 en el grupo de animales C3H/HeJ, indica que la dieta aterogénica es capaz por si sola de incrementar los niveles de PPAR- $\gamma$ .



## 8. Expresión relativa de SCARB1.

La figura 37 muestra la expresión relativa del amplificado del gen de respuesta a PPAR- $\gamma$ , SCARB1.

Se observó un descenso significativo en la expresión de SCARB1 en

---

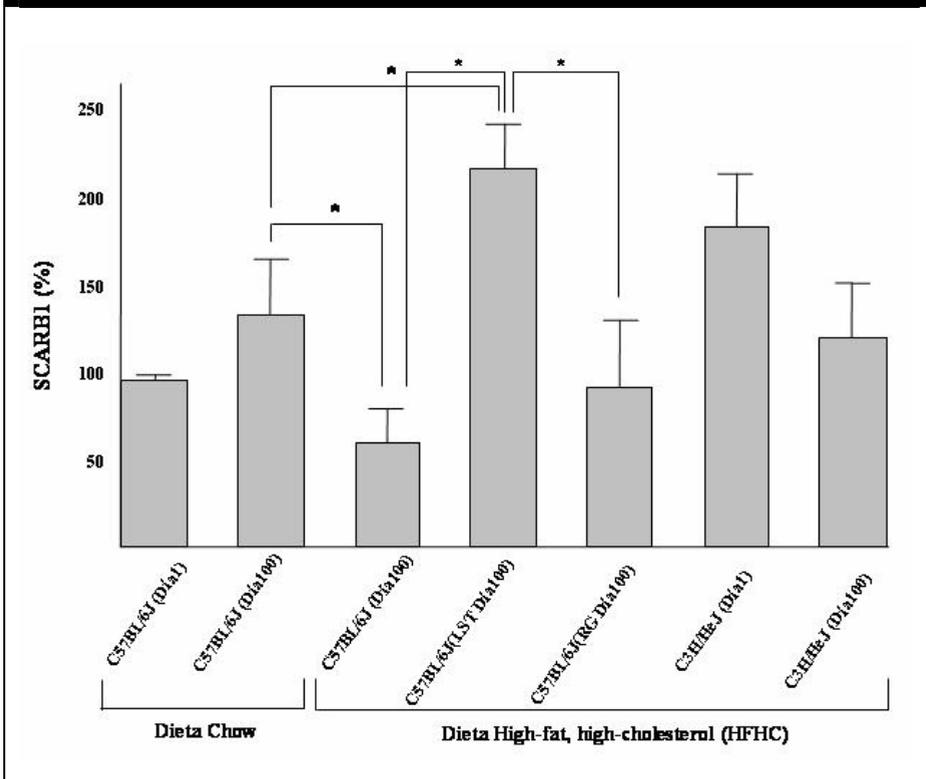
el grupo C57BL/6J en dieta aterogénica a día 100 respecto al grupo de animales C57BL/6J en dieta chow también a día 100 ( $P=0.026$ ).

La expresión del gen SCARB1 aumentó en el grupo de animales C57BL/6J en dieta aterogénica y tratado con losartán respecto al grupo de animales C57BL/6J en dieta normal ( $P=0.026$ ) y el grupo de animales C57BL/6J en dieta aterogénica ( $P=0.026$ ).

Se observó además una diferencia en los niveles de expresión relativa del gen objeto de estudio entre los grupos C57BL/6J en dieta aterogénica y tratado con losartán y el C57BL/6J en dieta aterogénica y tratado con rosiglitazona, que resultó ser significativa ( $P=0.026$ ). Cabe destacar el aumento que se produjo en la expresión relativa del amplificado de SCARB1 en los dos grupos en dieta aterogénica y tratados farmacológicamente, respecto a su control en dieta aterogénica y sin tratamiento.

Evaluando en conjunto los datos de expresión relativa media para los genes PPAR- $\gamma$  y SCARB1, en los animales en dieta aterogénica y no tratados farmacológicamente, observamos que se produjo un incremento de la expresión relativa del gen PPAR- $\gamma$  que paradójicamente se acompañaba de una disminución de la expresión relativa del gen de respuesta SCARB1. Por el contrario, tanto en los animales tratados con losartán como en los tratados con rosiglitazona, la expresión relativa del gen PPAR- $\gamma$  no aumentó respecto al control (grupo C57BL/6J en dieta aterogénica) sin embargo, si se observó un incremento de la expresión del gen de respuesta SCARB1 que además resultó significativo en los animales tratados con losartán. Como resultado de estas observaciones llegamos a la conclusión de que en los grupos de animales tratados farmacológicamente la actividad del factor de transcripción PPAR- $\gamma$  está preservada.

**Figura 37. Expresión relativa del gen SCARB1.**

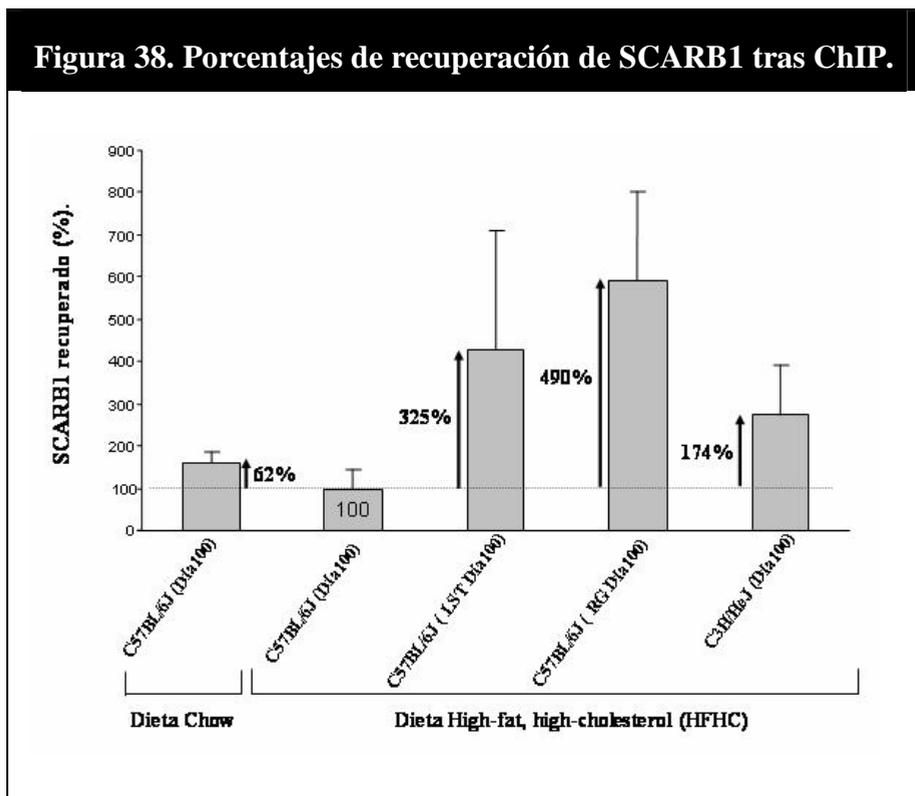


## 9. Porcentaje de SCARB1 recuperado tras inmunoprecipitación con anticuerpo frente a PPAR- $\gamma$ .

Para confirmar que la actividad PPAR- $\gamma$  se encontraba preservada en ambos grupos en tratamiento farmacológico realizamos experimentos de inmunoprecipitación con un anticuerpo frente a PPAR- $\gamma$  y amplificación posterior de la región promotora del gen SCARB1 con primers que flanqueaban el sitio PPRE del gen, tal y como se describe en nuestro material y métodos.

En la figura 38 se representan los porcentajes de amplificación del fragmento del gen SCARB1 recuperado posteriormente a la realización del

ensayo de inmunoprecipitación. En este caso y en las sucesivas gráficas de ensayos de inmunoprecipitación, el grupo de referencia será el de animales C57BL/6J a día 100 en dieta aterogénica. Respecto a éste grupo de animales, los grupos C57BL/6J en dieta aterogénica y tratado con losartán y C57BL/6J en dieta aterogénica y tratado con rosiglitazona, tienen un mayor porcentaje de promotor de SCARB1 unido a PPAR- $\gamma$  (un 325% y un 490% respectivamente), por lo que de alguna manera la actividad de PPAR- $\gamma$  en estos grupos está preservada a pesar de que sus niveles de expresión de PPAR- $\gamma$  son menores que en el grupo de animales C57BL/6J en dieta aterogénica.



---

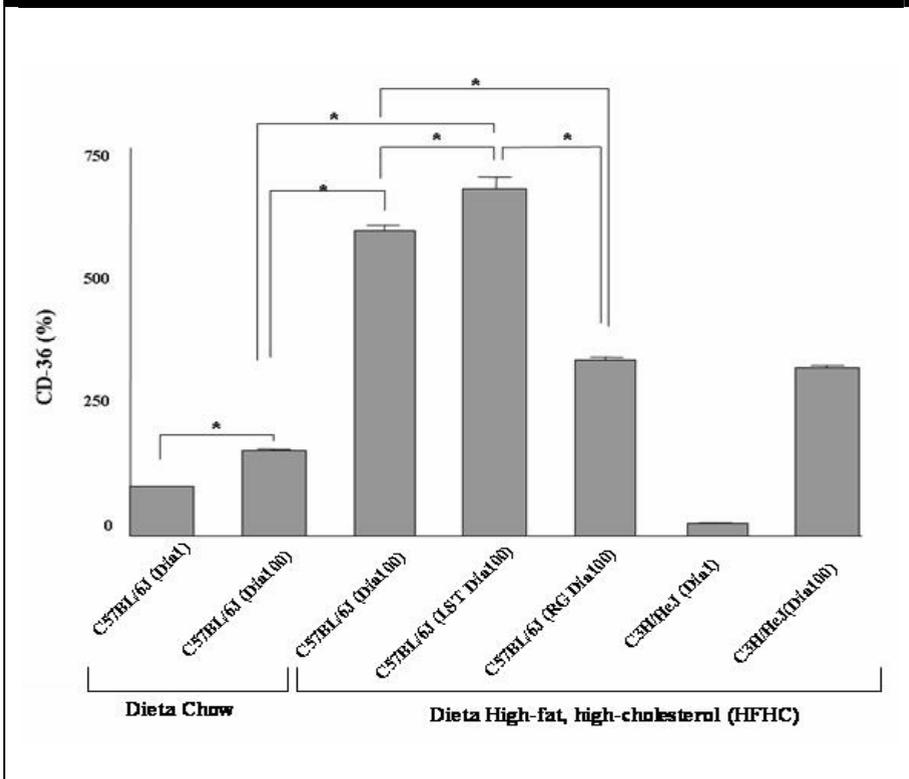
## 10. Expresión relativa del gen CD36.

Los niveles de expresión porcentuales del gen CD36 se representan en la figura 39. Como puede observarse, se encontró una diferencia significativa en los niveles de expresión de CD36 al inicio y al final del periodo experimental, en el grupo de animales C57BL/6J en dieta normal ( $P=0.026$ ).

En los animales en dieta aterogénica se observaron niveles de expresión del gen CD36 significativamente mayores que los animales en dieta chow ( $P=0.026$ ).

Destacamos el incremento significativo de CD36 en el grupo tratado con losartán respecto a los animales en dieta normal no tratados ( $P=0.026$ ). También se observó un aumento de los niveles de expresión de este gen en el grupo C57BL/6J en dieta aterogénica tratado con losartán respecto a los animales en dieta aterogénica ( $P=0.026$ ).

De forma destacable señalar que hubo una reducción estadísticamente significativa en los niveles de expresión de CD36 en el grupo tratado con rosiglitazona, en relación a los animales C57BL/6J en dieta aterogénica y tratados con losartán y a los animales C57BL/6J sin tratar en dieta aterogénica ( $P=0.026$  respectivamente).

**Figura 39. Expresión relativa del gen CD36.**

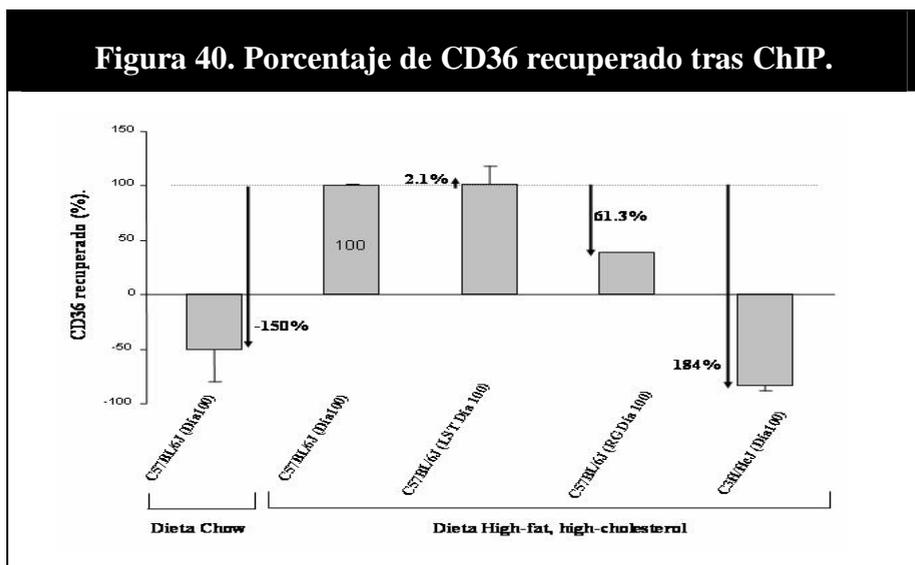
### 11. Porcentaje de CD36 recuperado tras inmunoprecipitación con anticuerpo frente a Nrf-2.

Como hemos señalado en la introducción el factor de transcripción Nrf-2 aparece como un regulador principal en la transcripción del gen CD36. Considerando entonces los siguientes hechos: que los niveles medios de hidroperóxidos lipídicos sin llegar a alcanzar significación estadística se encontraron disminuidos en los animales tratados con rosiglitazona respecto a los tratados con losartán y en segundo lugar, que observamos una disminución de la expresión relativa del gen CD36 en los animales tratados con rosiglitazona respecto al observado en los animales tratados con

losartán, hipotetizamos el posible papel de Nrf-2 como mediador de estas diferencias. Para ello realizamos experimentos de inmunoprecipitación con un anticuerpo frente a Nrf-2 y posterior amplificación de la región promotora del gen que flanquea al sitio ARE identificado como se describe en el apartado de material y métodos.

En la figura 40 se muestra el porcentaje de CD36 recuperado tras el ensayo de inmunoprecipitación.

La cantidad de promotor del gen CD36 activado por Nrf-2 aumentó aunque no significativamente en el grupo de animales C57BL/6J en dieta aterogénica y tratado con losartán, respecto al grupo de referencia (2.1%). En el grupo en dieta aterogénica y tratado con rosiglitazona se observó una disminución del 61.3% de la cantidad de promotor activado. Entre los grupos de animales C57BL/6J tratados farmacológicamente se observó una diferencia significativa en los niveles de promotor de CD36 recuperado ( $P=0.026$ ), por lo que la rosiglitazona previene de alguna manera la activación del gen proaterogénico CD36, de forma Nrf-2 dependiente.



---

## 12. Expresión relativa de los genes iNOS y eNOS.

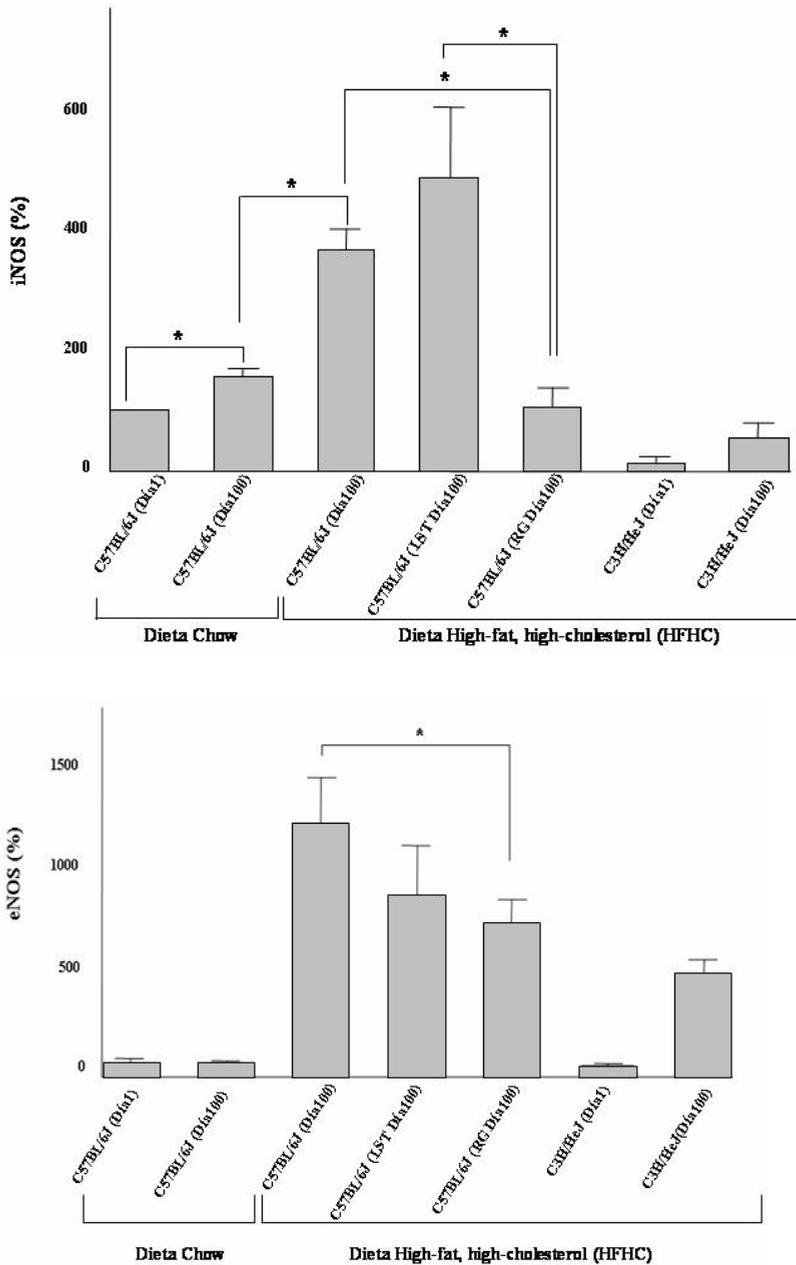
La figura 41 recoge las graficas de expresión relativa de los genes iNOS y eNOS. En la figura superior se muestran los niveles de expresión del gen iNOS. Se observó una disminución de su expresión en el grupo de animales C57BL/6J en dieta aterogénica y tratado con rosiglitazona respecto al grupo tratado con losartán ( $P=0.026$ ). Así mismo, se observó una disminución en la expresión de iNOS respecto al grupo de animales C57BL/6J en dieta aterogénica y sin tratamiento ( $P=0.026$ ), que llega incluso a igualar a los niveles de expresión de iNOS para el grupo C57BL/6J en dieta normal.

Entre los grupos C57BL/6J en dieta chow y el C57BL/6J en dieta aterogénica, se observó una diferencia significativa ( $P=0.026$ ), lo que indica que la dieta por si misma induce aumentos de los niveles de expresión del gen iNOS en nuestro modelo experimental. Además, el tiempo transcurrido durante el periodo experimental, también contribuye a aumentar la expresión de iNOS ( $P=0.026$ ).

Evaluamos también los niveles de expresión de eNOS, representados en la gráfica inferior, en los que ocurre prácticamente lo mismo; la rosiglitazona disminuye la expresión de eNOS significativamente respecto al grupo de animales C57BL/6J en dieta aterogénica no tratados ( $P=0.043$ ).

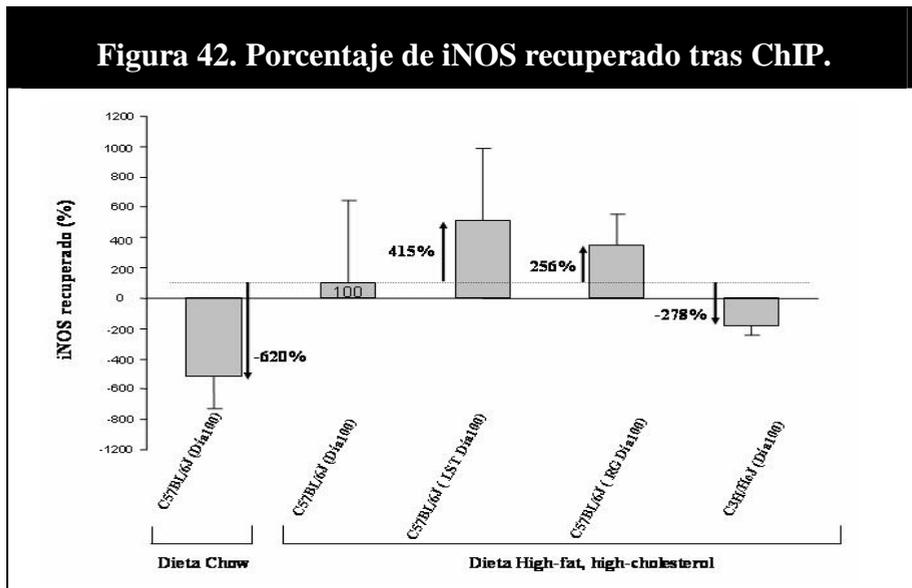
De acuerdo con estas observaciones está el hecho de que los valores plasmáticos de los metabolitos del óxido nítrico, sean menores en el grupo tratado con rosiglitazona respecto al de losartán como veremos más adelante.

**Figura 41. Expresiones relativas de los genes iNOS y eNOS.**



### 13. Porcentaje de iNOS recuperado tras inmunoprecipitación con anticuerpo frente a PPAR- $\gamma$ .

Debido a la caracterización e identificación reciente de una región PPRE en el promotor del gen iNOS, evaluamos si las drogas utilizadas preservaban la actividad PPAR- $\gamma$ , haciendo un ChIP para este último. Los resultados se muestran en la figura 42 donde se observa una disminución en los niveles medios de amplificación de la región promotora que flanquea al sitio PPRE en el grupo de animales en dieta normal con respecto a los niveles obtenidos en los animales alimentados con dieta aterogénica (-620%). Los niveles de amplificación fueron mayores en los grupos tratados farmacológicamente (415% y 256% para losartán y rosiglitazona respectivamente), si bien la comparación entre ambos no mostró diferencia significativa. Por tanto estos resultados parecen validar que la habilidad para acceder al sitio de unión PPRE en el gen diana está preservada en ambos grupos.



---

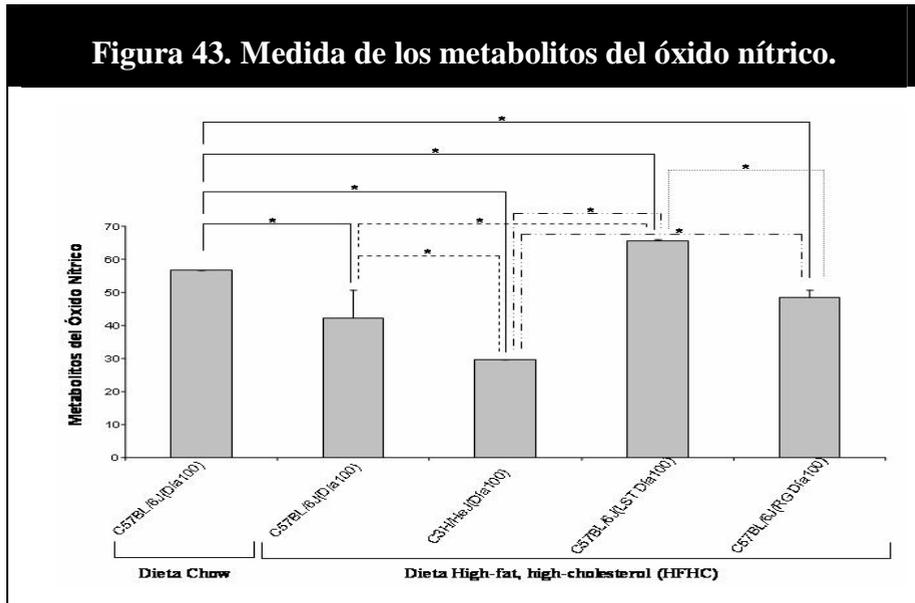
## 14. Medidas de los metabolitos del óxido nítrico.

Los niveles de metabolitos del óxido nítrico medidos como indicamos en el apartado de material y métodos desde muestras de plasma filtradas, se muestran en la figura 43. Como vemos, entre el grupo C57BL/6J en dieta chow al final del experimento y los grupos C57BL/6J (HFHC), C3H/HeJ (HFHC) y C57BL/6J (HFHC+RG) los niveles de metabolitos del óxido nítrico, fueron significativamente inferiores ( $P=0.02$ ,  $P=0.014$  y  $P=0.026$  respectivamente). La diferencia entre el grupo C57BL/6J en dieta chow y el grupo tratado con losartán resultó ser también significativa ( $P=0.026$ ) siendo los niveles de nitratos y nitritos, superiores en el grupo tratado con losartán. Esta observación se corresponde con el hecho de que los niveles de expresión de la iNOS estuvieran incrementados también en el grupo de animales C57BL/6J en dieta aterogénica tratados con losartán (ver figura 41 superior).

Por otro lado los niveles de metabolitos del óxido nítrico fueron significativamente menores en el grupo C3H/HeJ en dieta aterogénica, respecto al grupo C57BL/6J en dieta aterogénica con una  $P=0.026$ . Por el contrario y con el mismo valor de significación ( $P=0.026$ ), se observó un aumento de los metabolitos del óxido nítrico en el grupo C57BL/6J en dieta aterogénica y tratado farmacológicamente con losartán respecto al C57BL/6J en dieta aterogénica. Al comparar este mismo grupo con el de animales en dieta aterogénica tratados con rosiglitazona se observó también un aumento de los metabolitos del óxido nítrico aunque éste no llegó a ser significativo ( $P=0.063$ ). Tanto en el grupo C57BL/6J en dieta aterogénica y losartán como en el C57BL/6J en dieta aterogénica y rosiglitazona los niveles de metabolitos del óxido nítrico aumentaron significativamente respecto al grupo C3H/HeJ en dieta aterogénica ( $P=0.026$ ).

Finalmente, en nuestro modelo experimental, se observó que el

grupo tratado con rosiglitazona tenía niveles de concentración de los metabolitos del óxido nítrico inferiores al grupo tratado con losartán ( $P=0.026$ ).



## 15. Expresión relativa de los genes Alox-15, Alox-15b y Alox-5.

Como se observa en el gráfico de expresión del gen Alox-15, correspondiente a la figura 44, se observó una mayor diferencia de la expresión de este gen en el grupo de animales C57BL/6J en dieta aterogénica y tratado con losartán, respecto al grupo C57BL/6J en dieta aterogénica al final del experimento, y aunque no llegara a ser significativa queremos destacar que esta diferencia sin duda se aproxima al umbral de la significación ( $P=0.06$ ).

En el grupo C57BL/6J en dieta aterogénica y tratado con rosiglitazona, también se observó un aumento de la expresión de Alox-15

---

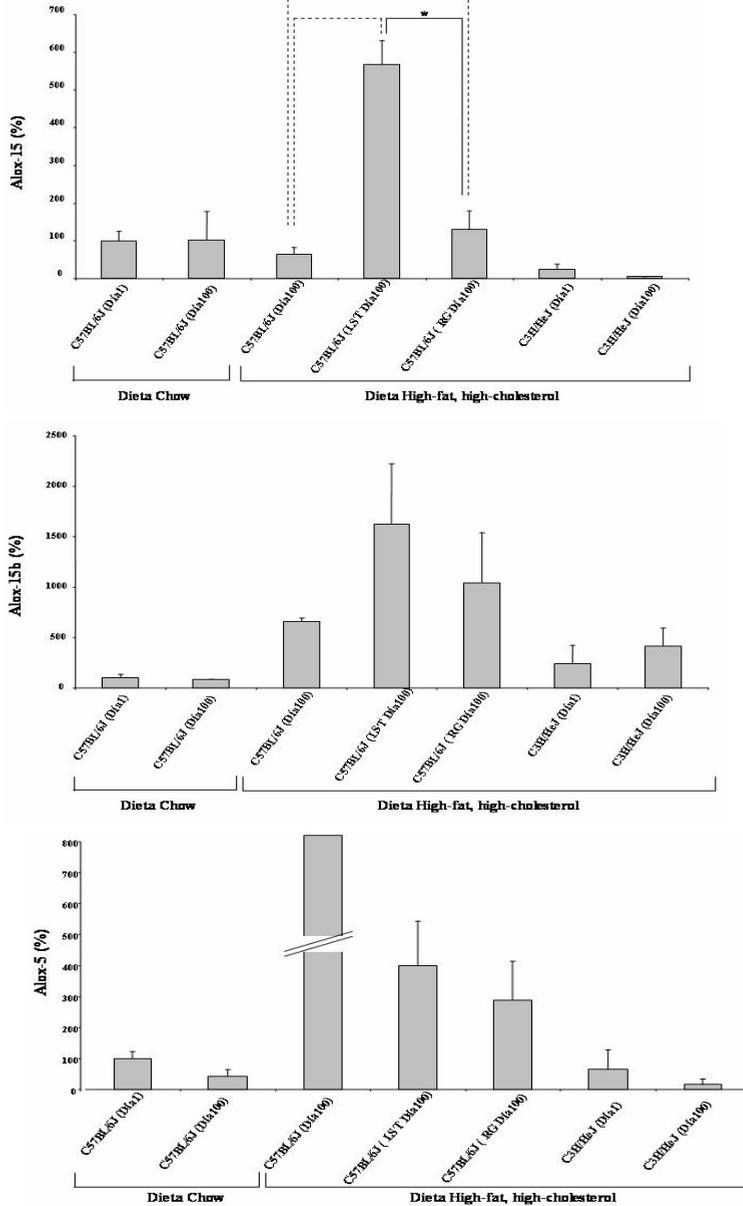
respecto al grupo C57BL/6J en dieta aterogénica a día 100, igualmente cercano al umbral de significación ( $P=0.06$ ).

Entre ambos grupos tratados farmacológicamente si que se obtuvo una diferencia significativa ( $P=0.026$ ) siendo en el grupo tratado con losartán donde mayor expresión de Alox-15 se produjo.

Por otro lado, como se muestra en la figura 44 no se observaron diferencias significativas en la expresión del gen Alox-15b entre los distintos grupos estudiados.

En la gráfica de expresión del gen Alox-5, tampoco se observaron diferencias significativas.

**Figura 44. Expresión de los genes: Alox-15, Alox-15b y Alox-5.**



---

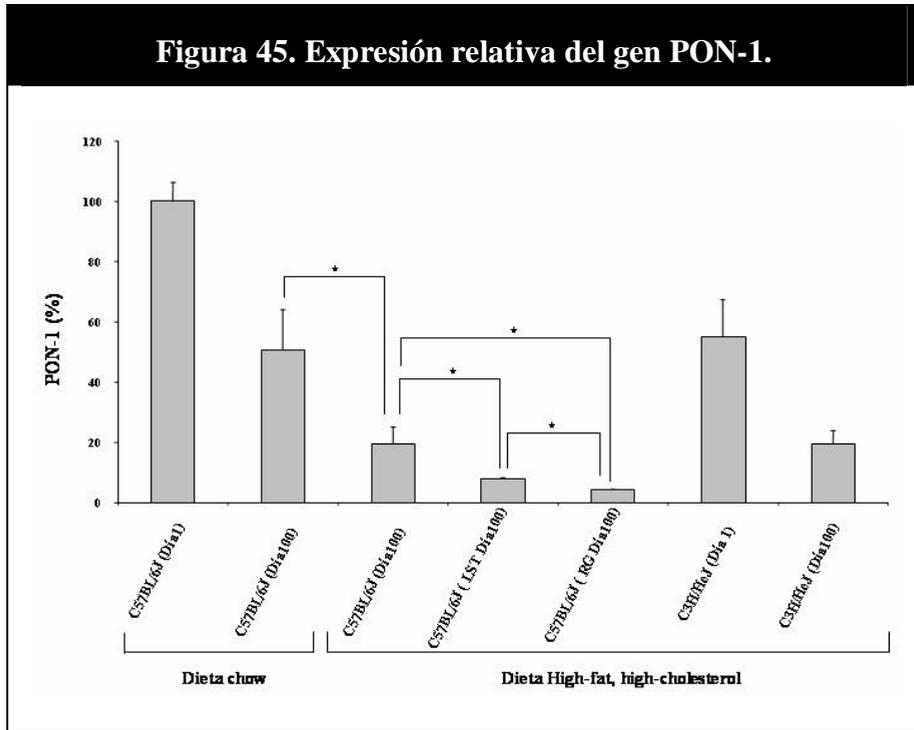
## 16. Expresión relativa de los genes paroxonasa-1 (PON-1) y CYBA (p22phox).

Se ha demostrado que ratones en dieta aterogénica, susceptibles a la misma, tienen disminuidos los niveles de expresión del gen PON<sup>224;225</sup> y que la IL-6 es crítica para la regulación de este gen a corto plazo<sup>226</sup>.

La paroxonasa-1, es una esterasa estrechamente asociada al HDL, que confiere propiedades antioxidantes al HDL<sup>227</sup>. En este sentido, la PON1 se ha demostrado eficaz para hidrolizar los fosfolípidos oxidados presentes en las LDLs, lo que retrasa la oxidación de estas lipoproteínas y atenúa sus efectos pro-inflamatorios<sup>22;228;229</sup>. Se sabe que la oxidación del LDL está influenciada por la dieta, alterando tanto la susceptibilidad de las LDLs a la oxidación como la actividad PON1 en suero<sup>230;231</sup>. De este modo, el consumo de alto contenido de grasa, así como la dieta hipercolesterolémica, se ha asociado con una reducción de la actividad PON1 tanto en ratones como en conejos<sup>228;232</sup>.

La figura 45 representa la variación de los niveles de expresión relativa del fragmento amplificado del gen de la PON-1 en los diferentes grupos experimentales. Destacamos la disminución significativa ( $P=0.023$ ) de la expresión del gen PON-1 en el grupo C57BL/6J en dieta aterogénica, respecto al los grupos C57BL/6J en dieta chow que se produjo al final del experimento. Por tanto parece que la dieta rica en grasa por si misma es capaz de disminuir la expresión de la enzima paroxonasa. También se observó que en los grupos tratados con los fármacos rosiglitazona y losartán disminuyeron los niveles de expresión del PON-1 respecto al grupo C57BL/6J a día 100 en dieta aterogénica ( $P=0.023$  para ambas comparaciones) lo que indica que ninguna de las dos drogas fue capaz de revertir el efecto que la dieta tiene sobre la expresión del gen PON-1. Los niveles de expresión relativa del gen PON-1 en los grupos tratados

farmacológicamente diferían con significación ( $P=0.023$ ).



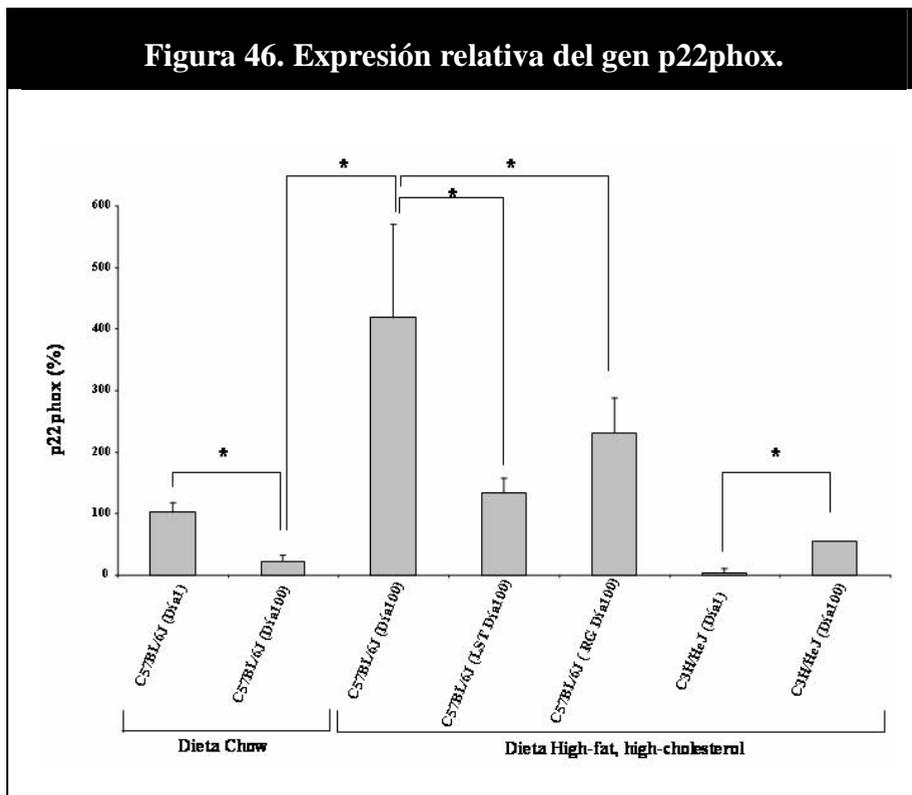
La subunidad p22phox de la NAD(P)H es necesaria para que tenga lugar la actividad oxidasa en células musculares lisas de las arterias coronarias humanas<sup>233</sup>. La funcionalidad de p22phox es fundamental para la actividad de la NAD(P)H, ya que la inhibición del mensajero de p22phox con un RNA antisentido en células musculares vasculares lisas, disminuye la producción de superóxido y peróxido de hidrógeno en respuesta a la angiotensina II<sup>234;235</sup>. Además ciertos polimorfismos en el gen de esta subunidad se ha visto que reducen la actividad oxidasa vascular de la NAD(P)H<sup>236</sup>.

Respecto a la expresión relativa de la subunidad p22phox (CYBA) de la NADPH oxidasa, representada en la figura 46, decir que el paso del

tiempo parece que fue condición suficiente para que hubiera una disminución significativa de su expresión ( $P=0.043$ ). Por otro lado la dieta aterogénica aumentó de forma considerable la expresión de p22phox respecto al grupo de animales C57BL/6J en dieta chow ( $P=0.028$ ). Pero lo más destacado es la capacidad tanto del losartán ( $P=0.028$ ) como de la rosiglitazona ( $P=0.043$ ) de disminuir de forma significativa los niveles de expresión de p22phox y por tanto de la NADPH oxidasa, generadora de especies reactivas del oxígeno.

Finalmente en el grupo de animales C3H/HeJ en dieta aterogénica también se observó un aumento significativo de la expresión de p22phox al final del experimento ( $P=0.04$ ).

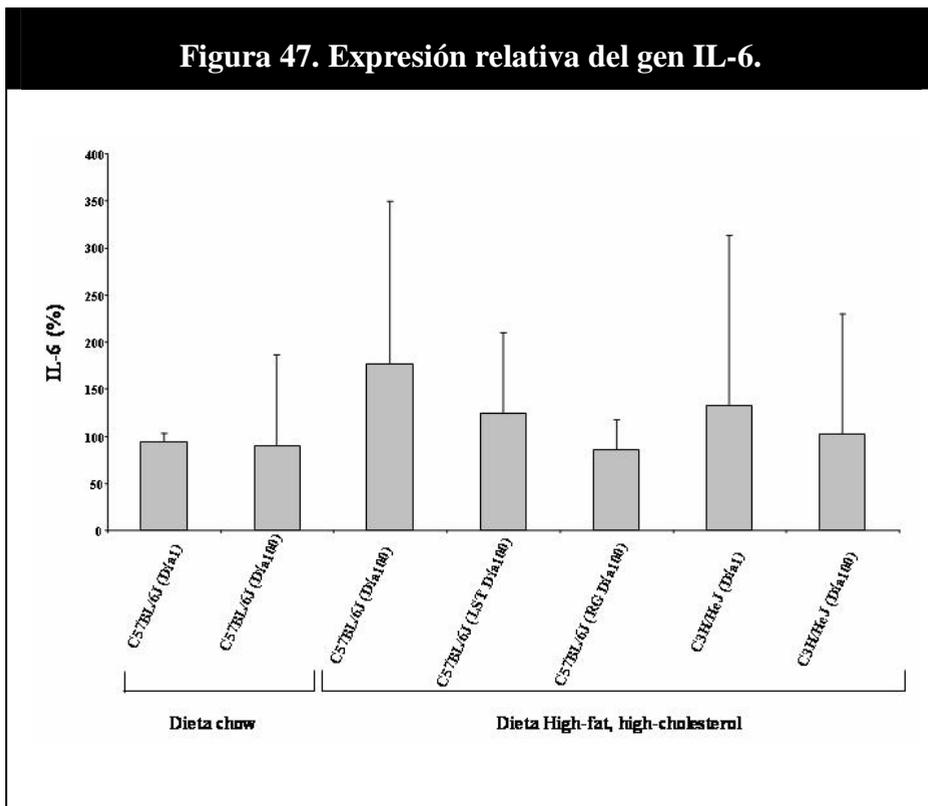
**Figura 46. Expresión relativa del gen p22phox.**



## 17. Expresión relativa del gen de la IL-6.

La IL-6 es una citoquina, indicadora de inflamación implicada en la patogénesis de la aterosclerosis, de la resistencia insulínica y de la disfunción endotelial en humanos. En el hígado, actúa como un mediador crucial en la respuesta de fase aguda<sup>237</sup> y se ha visto que suministrada de forma exógena, aumenta las lesiones ateroscleróticas en modelos animales. También se sabe que aumenta la síntesis hepática de apolipoproteínas y de reactantes de fase aguda tanto in vivo como in vitro<sup>238;239</sup>.

La expresión de esta citoquina no varía en ninguno de los grupos considerados, como se muestra en la figura 47.



Discusión



---

## VII) Discusión.

En este estudio demostramos que la administración de las drogas rosiglitazona o losartán a las dosis y en la forma mencionada a animales susceptibles a hipercolesterolemia-aterosclerosis inducida por dieta y, alimentados con una dieta rica en grasas (HFHC), preserva, en ambos grupos, la actividad del receptor PPAR- $\gamma$ . A esta conclusión se llega tras el análisis de los niveles de expresión del factor de transcripción PPAR- $\gamma$ , de los genes de respuesta a PPAR- $\gamma$  y también porque los niveles de amplificación relativos de los amplicones flanqueantes a los sitios de unión PPRE de los genes diana SCARB1, apoA-1 e iNOS, resultaron ser aproximadamente iguales en los dos grupos tratados farmacológicamente.

Estudios previos en dos modelos murinos de aterosclerosis: el knockout para el receptor de LDL y el knockout para la apo E, mostraron que el tratamiento con agonistas de PPAR- $\gamma$ , protegía contra el desarrollo de la aterosclerosis<sup>117;118;188</sup>. Sin embargo en nuestro trabajo encontramos que, a la dosis administrada, se lograba igualar la actividad PPAR- $\gamma$  en los animales tratados con losartan a un nivel similar al logrado con la administración de rosiglitazona. Paradójicamente, la rosiglitazona se asoció con un mejor perfil aterosclerótico, esto es, el grupo tratado con rosiglitazona poseía niveles inferiores de lípidos peroxidados totales y unos niveles de expresión relativa de los amplificadores de los genes iNOS e IL-6 y de metabolitos del NO inferiores también, respecto al grupo tratado con losartán. Estos niveles menores de expresión relativa de iNOS en el grupo tratado con rosiglitazona no se debieron a la diferencia en la actividad transcripcional mediada por PPAR- $\gamma$  como se deduce del ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina. Además, debido a que los niveles de concentración de los metabolitos del NO son resultado tanto de la actividad iNOS como de la actividad eNOS y

---

dado que los niveles de expresión de gen de la eNOS son similares en ambos grupos tratados farmacológicamente, cabría la posibilidad de que el aumento en la concentración de los metabolitos del NO que observamos en el grupo tratado con losartán se deban exclusivamente a los niveles aumentados de expresión del gen de la iNOS que se produce en este grupo de animales respecto al tratado con rosiglitazona, y que contribuiría su mejor perfil oxidativo.

Es por tanto posible, que la rosiglitazona posea acciones antioxidantes y efectos antiinflamatorios que son, al menos parcialmente independientes de PPAR- $\gamma$ , y que justificarían estas observaciones. Nosotros hemos observado unos niveles de HDL colesterol, superiores en el grupo tratado con rosiglitazona respecto al tratado con losartán. Como sabemos, el HDL no solo participa en la regulación del transporte reverso de colesterol (TRC) sino que muestra también propiedades antiinflamatorias y antioxidantes<sup>24;25;31;240</sup> asociadas a su fracción apoprotéica, que podrían justificar por si mismas el mejor perfil antioxidante y aterosclerótico observado en el grupo tratado con rosiglitazona. Otras funciones adicionales de las HDLs, no relacionadas con su papel en el transporte de lípidos plasmáticos podrían también proteger frente al desarrollo de la aterosclerosis. Así por ejemplo se ha visto que el HDL colesterol es antitrombótico<sup>241</sup> y que modula la función endotelial probablemente estimulando la producción de la eNOS<sup>242</sup>, aspectos estos insuficientemente explorados en nuestro trabajo.

Demostramos sin embargo, que dos cualidades de gran importancia en la actividad vascular de las HDL: sus propiedades antioxidantes (actividades paraoxonasa y arilesterasa) y la regulación del gen apo-A-1 mediada por la actividad PPAR- $\gamma$ , resultaron similares entre los grupos en tratamiento farmacológico. Así, realizando el ensayo de la

---

diclorofluoresceína, se demostró que el HDL de ambos grupos tratados farmacológicamente no difería en su capacidad de prevenir la oxidación del PACPC por el HPODE. Además dado que el gen de la apo A-1 tiene un sitio PPRE, cabía la posibilidad de que PPAR- $\gamma$  estuviera sobreexpresando este gen a nivel transcripcional y por tanto participando directamente en el incremento de los niveles de HDL encontrados en el grupo de animales tratados con rosiglitazona respecto al tratado con losartán. Esta posibilidad se descartó tras realizar el ChIP para apo A-1 y ver que en ambos grupos tratados farmacológicamente los niveles de transcripción del gen apo A-1 eran similares. Puesto que el contenido total en apolipoproteínas y, particularmente en apolipoproteína A-1 no fue evaluado en nuestro estudio, los experimentos que hemos realizado no descartan la posibilidad de que otros reguladores transcripcionales den cuenta de mayores niveles de expresión de apo-A-1 en el grupo de ratones tratados con rosiglitazona y que esta diferencia sea fundamental en el mejor perfil antiaterogénico de los animales tratados con rosiglitazona.

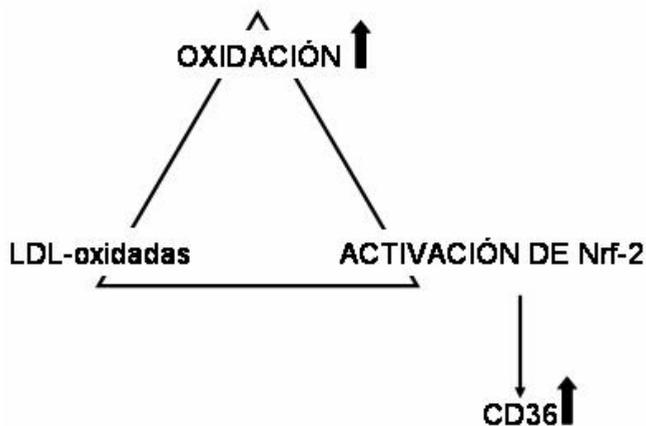
Las lipoxigenasas son una familia de genes estructuralmente relacionados, cuya función fundamental es incorporar oxígeno molecular a los ácidos grasos polinsaturados como el ácido araquidónico o el ácido linoléico, dando lugar a los ácidos eicosanoides HPETE (el AA) y HPODE (el ácido linoléico), capaces de modificar oxidativamente las LDLs, o a leucotrienos, que son lípidos eicosanoides mediadores de inflamación. Desempeñan un importante papel en los procesos inflamatorios. Así por ejemplo la vía de la 5-lipoxigenasa se ha relacionado con el desarrollo de aterosclerosis en ratones<sup>243;244</sup>. También la expresión de este gen se ha asociado con la inflamación dependiente de la hiperlipidemia de las paredes arteriales de ratones Apo-E knockout<sup>245</sup> y durante la aterosclerosis en humanos<sup>246</sup>. Esto es objeto de debate. Así por ejemplo, Qiu y colaboradores

---

observan un aumento del RNAm de Alox-5 en placas ateroscleróticas de humanos pero no de ratones<sup>247</sup>. Por otro lado, y aunque hay evidencias que asocian el gen Alox-15 con procesos antiinflamatorios<sup>248-250</sup> lo cierto es que en los últimos años nuevos hallazgos indican una implicación más compleja de la 15 lipoxigenasa en los procesos inflamatorios y en última instancia en el desarrollo de la aterosclerosis. En esta línea van los trabajos que indican que Alox-15 puede aumentar además la adhesión de los monocitos al endotelio durante el desarrollo temprano de la aterosclerosis<sup>251-254</sup> y que es la expresión de la 15 lipoxigenasa en los macrófagos de ratones apoE<sup>-/-</sup>, la que juega un papel dominante en el desarrollo de la aterosclerosis promoviendo la inflamación endotelial y la formación de células espumosas<sup>255</sup>. Respecto a la expresión del gen Alox-15b los estudios muestran resultados controvertidos ya que se le han asociado características tanto pro como antiinflamatorias<sup>256</sup>. Considerando en nuestro caso, un papel proinflamatorio y proaterogénico de Alox-15, nuestros resultados mostrarían como la rosiglitazona participa en la mejora global del estatus aterosclerótico.

Como hemos comentado, en ambos grupos tratados farmacológicamente la actividad PPAR- $\gamma$  se encontraba preservada y por lo tanto, se esperaría que los niveles de expresión de los genes de respuesta CD36<sup>115;257</sup> y SCARB1, fueran similares. Incluso se esperarían niveles de expresión de los genes CD36 y SCARB1, superiores en el grupo tratado con rosiglitazona respecto al tratado con losartán, debido a su naturaleza agonista de PPAR- $\gamma$ . Lo que ocurrió en nuestro modelo experimental fue justamente lo contrario, es decir, que no solo no observamos esa similitud en los niveles de expresión de los genes diana entre los dos grupos tratados farmacológicamente, sino que, contra todo pronóstico resultaron mayores en el grupo tratado con losartán. La pregunta que nos hicimos entonces fue: ¿Qué estaba ocurriendo para que se produjera esta aparente incongruencia?

Nuestros objetivos se centraron en el estudio de la diferencia en los niveles de expresión relativos del gen CD36. Algunos estudios han demostrado que en monocitos humanos expuestos a LDL oxidadas, se induce la expresión de PPAR- $\gamma$ <sup>112;115</sup>. Además, evidencias experimentales muestran que el factor de transcripción Nrf-2 posee un papel esencial en la regulación de la expresión de CD36<sup>155;188</sup> e incluso se sabe que las LDL oxidadas activan genes de respuesta a Nrf-2<sup>155</sup>. Por estas razones supusimos que en nuestro modelo experimental podría estar pasando algo similar es decir, que el más favorable estatus oxidativo del grupo de animales tratado con rosiglitazona, estuviera impidiendo de alguna manera la sobreexpresión del gen CD36 mediado por Nrf-2 y de ahí las diferencias encontradas en nuestro modelo experimental.



El ChIP con anticuerpo frente a Nrf-2 y posterior amplificación de la secuencia ARE del promotor del gen CD36 confirmó nuestras suposiciones demostrando que, en los ratones en dieta aterogénica y tratamiento con rosiglitazona, los niveles inferiores de expresión hepática del gen CD36 respecto al grupo tratado con losartán, se debían a una menor unión del factor de transcripción Nrf2 al sitio ARE correspondiente del gen CD36. Por tanto, se demostró que efectivamente, rosiglitazona tiene propiedades

---

antiaterogénicas adicionales parcialmente independientes de sus propiedades como agonista de PPAR- $\gamma$ .

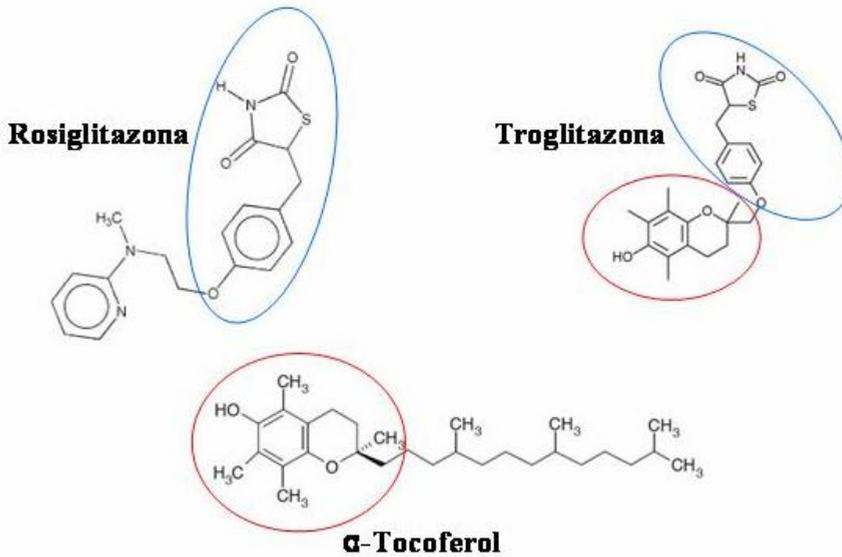
¿Qué es lo que justifica entonces que la rosiglitazona sea tan especial, esto es, que explica que proporcione un mejor perfil aterogénico que el losartán en nuestro modelo experimental? Hay autores que encuentran que las propiedades y efectos protectores en la pared vascular que ejercen las TZDs son mediadas por su habilidad de regular al alza la expresión de la eNOS<sup>258;259</sup>. Si bien en nuestro trabajo se evaluó la expresión hepática y no vascular de estos genes debemos señalar que nosotros, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión relativa del gen eNOS, entre los grupos tratados farmacológicamente. La actividad de la eNOS depende de la activación de la calcio-calmodulina, además su actividad es regulada también a otros niveles, que incluyen: la biodisponibilidad de su sustrato L-arginina o de sus cofactores (NADPH, FAD, FMN y BH<sub>4</sub>), la acilación post-transcripcional, la S-nitrosilación y la fosforilación<sup>260-262</sup>. Entre todas, la fosforilación de la eNOS parece ser la que mayor importancia tiene en la regulación de su activación<sup>263;264</sup>. Dado por tanto que la regulación del gen eNOS es compleja, la evaluación de las diferencias en los niveles de expresión relativa sin considerar otros mecanismos de regulación, junto con la propia actividad enzimática eNOS, solo nos da una idea parcial de lo que pudiera estar ocurriendo. Recientemente se han publicado evidencias de que la rosiglitazona en un modelo murino, protege frente a la disfunción contráctil del miocardio inducida por isquemia reperfusión, mediando la fosforilación de la proteína eNOS, sin que se observen incrementos en la concentración total de eNOS<sup>265</sup>. Cabe la posibilidad de que en nuestro modelo esté ocurriendo algo parecido y que aunque no se observen diferencias en los niveles de expresión del gen de la eNOS, entre los grupos tratados farmacológicamente, se estén

---

produciendo diferencias en los grados de fosforilación de la proteína eNOS.

Otra respuesta plausible como hemos sugerido, podría ser que la actividad agonista de PPAR $\gamma$  de la rosiglitazona, estuviera disminuyendo los niveles de iNOS en el grupo de animales tratados con este fármaco. Esto implicaría una mejora en el perfil aterogénico respecto al grupo de animales tratados con losartán.

Parece ser por tanto que, las propiedades antiaterogénicas de las tiazolidinadionas, son parcialmente independientes de PPAR- $\gamma$ . Algunos estudios previos sugieren que pudiera *depender* de las características estructurales de cada tiazolidinadiona. Así por ejemplo, se ha visto que la troglitazona tiene una fracción tocoferólica ( $\alpha$ -tocoferol) que no posee la rosiglitazona y que es capaz de inhibir la expresión del gen de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, enzima relacionada con un mecanismo antioxidante, también PPAR- $\gamma$  independiente<sup>266</sup>. Además se ha sugerido que las propiedades que tiene la troglitazona sobre las células endoteliales (aumenta la expresión de la eNOS) están ligadas a su estructura de 6-hidroxicromano (homólogo del  $\alpha$  tocoferol)<sup>258</sup> y no a su acción como agonista de PPAR- $\gamma$ . Jiang y colaboradores<sup>267</sup> han demostrado que el  $\gamma$ -tocoferol es capaz de disminuir la síntesis de la COX-2 (asociada con daño endotelial, inflamación y proliferación) en macrófagos. Por lo tanto, parece ser que algunas TZDs poseen propiedades antiinflamatorias comunes que son independientes de PPAR- $\gamma$ , y que se producen en parte por su relación estructural con los tocoles.



Es importante tener en cuenta que nuestros resultados se obtienen en fracciones hepáticas. Nuestro trabajo se ha centrado en analizar la expresión hepática de PPAR- $\gamma$ , de los genes diana de Nrf-2 y en la evaluación de algunos marcadores séricos. Aunque es importante profundizar en la situación *in vivo*, también es importante reconocer que las diferencias de regulación de la expresión de los genes regulados por PPAR- $\gamma$  y Nrf-2 son tejido<sup>155</sup> y contexto dependientes<sup>268</sup>. Por esta razón debemos ser cautos con la interpretación de nuestros resultados, se necesitarían mas estudios *in vivo* para explorar el papel de Nrf-2 en la modulación de la formación y progresión de células espumosas y en la aterosclerosis, así como de estudios *in vitro* en cultivos celulares para ir un paso más allá en nuestras conclusiones.

Enfoque Traslacional



## VIII) Enfoque Traslacional.

Mientras que los investigadores en ciencia básica trabajan para desentrañar los misterios de las causas de las enfermedades y los mecanismos celulares y moleculares implicados, los investigadores clínicos estudian los efectos de los nuevos medicamentos. Durante décadas, se han realizado esfuerzos para juntar las dos puntas del espectro de la investigación, para traducir los hallazgos del laboratorio en tratamientos contra la enfermedad cada vez más efectivos. Los descubrimientos también viajan de la clínica al laboratorio en forma de observaciones clínicas, tejidos humanos, muestras de sangre etcétera, todo lo cual es usado por los investigadores para desentrañar los secretos de la enfermedad.

La Investigación Traslacional trata de integrar el progreso que se está realizando en el laboratorio con el progreso que se está realizando en la clínica. En años recientes, se ha tratado de que este espíritu colaborativo se convierta en el enfoque primordial de la investigación pero lo cierto es que en España hay contados grupos que hacen Investigación Traslacional en su propia institución, además de ser escasa y centrada en problemas concretos. La investigación básica ha mejorado enormemente en los últimos años y está capacitada para una Investigación Traslacional. Sin embargo, es necesaria una comunicación fluida y constante entre las dos vertientes de la investigación, básica y clínica, para que se pueda llevar a cabo una Investigación Traslacional real. La necesidad de superar estas barreras es especialmente relevante en el área de las enfermedades cardiovasculares debido a la enorme importancia sanitaria y socioeconómica de estas afecciones.

En el contexto de la aterosclerosis además de la propia dificultad que implica el desarrollo de estas ideas, el verdadero problema se plantea en su

---

aplicación a la clínica diaria. La contribución de la herencia a la susceptibilidad aterogénica se cifra según reconocidos autores en torno al 50%. Se hace por tanto necesario profundizar en este conocimiento. Las respuestas dinámicas de los genes mediante mecanismos que regulan la transcripción y traducción, genéticos y epigenéticos y de las proteínas, su regulación, actividad y función pueden ser modificadas. Es en este sentido donde creemos que se circunscribe nuestro trabajo y su relevancia traslacional. Hemos evaluado que a las dosis administradas, tanto la rosiglitazona como el losartán preservan la actividad PPAR- $\gamma$  y sin embargo la rosiglitazona es capaz de evitar parcialmente la activación de Nrf-2 justificándose que posee propiedades antioxidantes adicionales, las cuales podrían ser beneficiosas para los pacientes en tratamiento con este antidiabético oral. Creemos que la caracterización o al menos el planteamiento de que las propiedades adicionales de la rosiglitazona no se deban a su actividad como agonista farmacológico de PPAR $\gamma$  plantea interesantes cuestiones y augura futuros estudios en esta línea, si bien es verdad que en nuestro trabajo, el hecho de no incluir otros ARA-II y/o Glitazonas, en la comparativa realizada, constituye una limitación en el desarrollo de esta idea. Parece especialmente útil la información que pudiera derivarse de aquellos pacientes con diabetes y alto grado de riesgo vascular.

**Conclusiones**



## IX) Conclusiones.

1. La capacidad antioxidante del HDL colesterol es similar en los animales tratados con rosiglitazona y con losartán.
2. La administración de las drogas rosiglitazona o losartán a animales susceptibles a aterosclerosis inducida por dieta, preserva en ambos grupos la actividad del receptor PPAR- $\gamma$ .
3. La rosiglitazona tiene propiedades antiaterogénicas parcialmente independientes de sus propiedades como agonista de PPAR- $\gamma$ .
4. El aumento de los niveles de HDL colesterol y la disminución de los niveles de lípidos peroxidados, son parcialmente independientes de la actividad PPAR- $\gamma$  asociada a la rosiglitazona.
5. La disminución de los niveles de expresión relativa del gen iNOS en el grupo de animales tratados con rosiglitazona, es independiente de la acción del factor de transcripción PPAR- $\gamma$ .
6. El aumento de HDL colesterol en el grupo de animales en dieta aterogénica y tratamiento con rosiglitazona *versus* losartán, no se debe a diferencias en la regulación de PPAR- $\gamma$  sobre el sitio PPRE del gen de la apolipoproteína A-1.
7. La expresión aumentada del gen CD36 en el grupo de animales en dieta aterogénica y tratados con losartán está mediada por el factor de transcripción Nrf-2.



Publicaciones



## **Rosiglitazone but not losartan prevents Nrf-2 dependent CD36 gene expression up-regulation in an *in vivo* atherosclerosis model**

**Y Hernandez-Trujillo<sup>1</sup>, F Rodriguez-Esparragon<sup>1</sup>, A Macias-Reyes<sup>1</sup>, A Caballero-Hidalgo<sup>1</sup> and Jose C Rodriguez-Perez<sup>1,2,3</sup>**

<sup>1</sup>Research Unit, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>2</sup>Nephrology Service, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria

<sup>3</sup>Department of Medical and Surgical Sciences, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), Las Palmas de Gran Canaria. Spain

*Cardiovascular Diabetology* 2008, 7: 3doi: 10.1186/1475-2840-7-3

### **Abstract**

---

#### **Background**

Thiazolidinediones exert anti-inflammatory and anti-oxidative roles and attenuate atherosclerosis by mechanisms partially independent of their metabolizing actions. High doses of angiotensin type 1 receptor (AT<sub>1</sub>R) blocker losartan (LST) seem to promote fat cell formation by preserving PPAR $\gamma$  activity.

#### **Methods**

C57BL/6J diet-induced atherosclerotic susceptible mice randomly received a normal or a high-fat high-cholesterol (HFHC) diet and were treated with rosiglitazone (RG), LST or a vehicle for 12 weeks.

#### **Results**

HFHC was associated with increased PPAR $\gamma$  gene expression without an over regulation of PPAR $\gamma$  responsive genes, whereas RG and LST treatments were found to maintain PPAR $\gamma$  activity without resulting in increased PPAR $\gamma$  gene expression. A better anti-inflammatory and antioxidant profile in mice treated with RG regarding LST was observed in spite of a similar PPAR $\gamma$  preserved activity. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays revealed that animals under HFHC diet treated with RG showed a significant nuclear factor erythroid 2-like 2 (Nrf2)-dependent down-regulation of the expression of the CD36 gene.

---

## Conclusion

The PPAR $\gamma$  agonist RG exerts antioxidant properties that significantly reduced Nrf-2-dependent CD-36 up-regulation in mice under HFHC diet. Because LST treatment was also associated with a preserved PPAR $\gamma$  activity, our data suggests that these RG antioxidant effects are partially independent of its PPAR $\gamma$  metabolizing properties.

---

## Background

Superoxide generation occurs in conditions such as hypertension, hypercholesterolemia, diabetes, and cigarette smoking. Oxidant stress alters many functions of the endothelium which, associated with traditional risk factors, triggers early vascular inflammation and a predisposition to atherosclerosis [1-3]. Low-density lipoproteins (LDLs) are susceptible to oxidative damage. Oxidative stress-mediated LDLs modification (ox-LDLs) has a key role in initiation of the atherosclerotic process [1,4,5]. Ox-LDLs are taken up via different scavenger receptors. The CD36 scavenger receptor constitutes the major ox-LDL receptor [6]. Studies employing transgenic and knock-out mice have demonstrated that CD36 is proatherogenic according to observations that targeted disruption of the gene was protective against atherosclerosis [7]. Components of ox-LDL activate peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) resulted in an up-regulation of the CD36 scavenger receptor [8,9].

Thiazolidinediones (TZDs) are PPAR $\gamma$  agonists that improve insulin sensitivity, reduce triglyceride levels and decrease the risk of atherosclerosis in diabetic patients. TZDs also exert direct effects on vascular wall cells [10-12]. TZDs treatments inhibit intimal lesions [13], suppress monocyte elaboration of inflammatory cytokines [14], macrophage activation [15], and the expression of cell adhesion molecules [16]. TZDs also increase the mRNA expression of the proatherogenic CD36 gene. PPAR $\gamma$  seems to be determinant in the CD36 gene regulation as deduced from macrophages derived from mice in which the PPAR $\gamma$  gene has been "floxed out" [17]. However, most authors suggest that the CD36-increasing effects of TZDs might be overwhelmed by the antiatherogenic effects of other factors. Rosiglitazone (RG) is a TZD that possesses several anti-inflammatory properties demonstrating a protective action in regulating atherosclerosis development [18-20].

Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is a member of the Cap 'n' Collar family of basic region-leucine zipper transcription factors. Transcription factor Nrf2 is a major regulator of genes encoding phase 2 detoxifying enzymes and antioxidant stress protein in response to electrophilic agents and oxidative stress. Evidence that ox-LDLs and some lipid hydroperoxides contained in ox-LDL enhanced nuclear levels of Nrf2 in macrophages has been reported [21]. This increase results in an up-regulation of the scavenger receptor CD36 and antioxidant stress proteins [21]. Thus, Nrf2 appears as an additional transcription factor regulating CD36 gene expression.

Adipocyte differentiation seems to be linked to an improvement of insulin sensitivity [22]. Sharma et al [23-25] proposed the hypothesis that blockade of the renin-angiotensin system prevents diabetes by promoting the recruitment and differentiation of adipocytes. *In vitro* studies further demonstrate that several angiotensin receptor blockers or their metabolites induce PPAR $\gamma$  activity and opposite, ligand activated-PPAR $\gamma$  suppressed AT $_1$ R gene transcription [25-27]. Paradoxically, studies reveal that a moderate reduction of PPAR $\gamma$  activity as observed in heterozygous PPAR $\gamma$ -deficient mice, or the Pro12Ala polymorphism in human PPAR $\gamma$  gene,

prevent insulin resistance and obesity induced by a high-fat diet [28]. This reduction is thought to occur because PPAR $\gamma$  expression is regulated by nutritional state [29]. Oxidative and inflammatory mediators as those produced in long-term high-fat high-cholesterol (HFHC) diets are known to be inducers of different responses that regulate PPAR $\gamma$  gene activity. The activity of PPAR $\gamma$  can be finely tuned through integration of diverse phosphorylation events [29-32].

The aim of the present study was to show that RG and losartan (LST) treatments preserved the liver PPAR $\gamma$  activity in mice that were fed with a HFHC diet. On the contrary, a loss of PPAR $\gamma$  activity was observed instead of an increase of the PPAR $\gamma$  gene expression in the untreated hypercholesterolemic control mice. Lipid hydroperoxides levels and the relative expression values of the inflammatory mediators inducible nitric oxide synthase (iNOS) and Interleukin-6 (IL-6) genes were diminished in mice treated with RG with respect to LST treated mice. These findings were suggestive of RG additional properties independent of its metabolizing actions. A difference in the CD36 gene expression level between treated groups was observed. Because oxidative stress activates Nrf2 responses and recently has been described as the essential

contribution of Nrf2 to the CD36 gene expression, we also investigated whether Nrf2 mediates the CD36 gene up-regulation observed in the LST group. A chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay revealed that in the RG prevents Nrf2-dependent CD36 up-regulation.

## Methods

### Animals

Two-month old female inbred strain C57BL/6J and C3HeJ/6J mice that differ strikingly in aortic fatty streak development when fed a high-fat diet were housed at 25°C on a 12-hour light/dark cycle and provided with food and water *ad libitum*. At day 0, C57BL/6J animals were maintained either on a chow diet or a high-cholesterol diet containing 15% fat, 1.25% cholesterol, and 0.5% cholic acid (Panlab, S.L., Barcelona, Spain) for 12 weeks. Twenty-three mice per group were randomly selected in one of the following groups: group 1 (control) was maintained on chow diet; group 2 (control) was maintained on high-cholesterol diet; group 3 constituted C57BL/6J mice maintained on high-cholesterol diet that received RG administered at 25 mg/Kg/day; and group 4 was composed of C57BL/6J mice on high-cholesterol diet that received LST administered in the drinking water at 100 mg/L. RG was administered by

food and was monitored every day. Similarly, the water consumption in the LST group was monitored weekly. Each mouse was estimated to drink 1.5 ml of water/10 grams of body weight/day. A group of 25 C3HeJ female mice fed on high-cholesterol diet was also created (group 0). All experimental procedures were performed in accordance with the animal welfare guidelines of the Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín; the national guide (Royal Decree 223/1988) and the international guide (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the US National Institutes of Health) for the use and care of animals for experimentation. All investigators directly involved in the handling of animals possess the relevant approvals from the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food of the Directorate General of Animal Husbandry of the Canary Islands Government in the B and C categories (Royal Decree 1201/2005).

Animals were anesthetized with 5 µl per grams of body weight using an anesthetic cocktail of Ketolar (ketamine hydrochloride at 50 mg/ml) (Parke-Davis, S.L.; Barcelona, Spain) and Rompún (xylazine at 2% administered at 2.5 mg/ml; Bayer Health Care, AG, Germany) in saline solution. Blood

samples were collected by cardiac left ventricular puncture in three animals per group, chosen between housed at days 1, 25, 50, 75, and 100. At the end of the study period (day 105) five mice per group were anesthetized and transcardially perfused with saline following tissue samples collection. Liver samples were obtained, snap-frozen by immersion in liquid nitrogen and stored at -20°C until use.

### **Analysis of plasma lipids and lipid peroxidation**

Blood was collected from 6-hour fasted animals and plasma samples were stored at -70°C. Insulin was measured by the Abbott kit insulin (Abbott Laboratories, USA). Plasma levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and HDL-cholesterol were measured enzymatically by using Wako kits. Total plasma lipid hydroperoxide (LOOH) content was calculated by the Xylenol Orange (FOX) assay as described elsewhere [33] and analyzed after being mixed with copper sulphate at a final concentration of 10 µM at 37°C for 24 h, using triphenyl phosphine (TPP) for signal authentication. The absorbance of the supernatants was monitored at 560 nm and the hydroperoxide content determined using a molar absorption coefficient of  $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  or by reference to an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standard curve.

LOOH content was also measured in the supernatant of cultured cells by the modified method of Auerbach [34]. To 40 µl aliquots were added to a 96-well microtiter plate containing ethanol (10 µL) and *N*-benzoyl leucomethylene blue (LMB) color reagent (100 µL). The LMB reagent was prepared with 5 mg of LMB (Tokyo Kasei Kogyo) dissolved in 8 mL of *N,N*-dimethyl-formamide and 90 mL of 0.05 mol/L potassium phosphate buffer, pH 5, 1.4 g of Triton X-100, and 5.5 mg of hemoglobin. Linoleic acid hydroperoxide (13-hydroperoxy-9,11-octadecadienoic acid, ranging from 1 to 20 nmol in 10 µL ethanol) was added as a standard to wells containing saline (40 µL) and LMB. After 40 minutes at room temperature, the standards and samples were read at 650 nm using a microtiter plate reader. A standard curve for absorbency versus LOOH concentration was generated, and the hydroperoxide levels in samples were determined from this curve.

### **Analysis of Paraoxonase/arylesterase activities**

Paraoxonase (PON p. ase) and arylesterase (PON ar.ase) activities were evaluated by previously described methods [35,36].

### **Analysis of Total Nitric Oxide Metabolites**

Plasma samples were filtered through Microcon YM-10 columns (Millipore). Total nitric oxide metabolites concentration was evaluated in sample columns effluent by using a colorimetric kit assay according to the manufacturer instructions (R & D Systems).

### **Cell-Free Dichlorofluorescein (DCF) assay**

Total HDL was prepared by precipitation using the DS1 reagent. DS1 was prepared dissolving in water 10 mg/L dextran sulphate (Dextralip®50, Sigma), 0.5 mol/L MgCl<sub>2</sub>, and 0.05% sodium azide. The protein content of precipitated HDL was determined and HDL samples were subsequently adjusted to similar protein content with saline.

The cell-free Dichlorofluorescein (DCF) assay was performed essentially as described [37]. Ten microliters of DCFH-DA (Molecular Probes, Eugene, OR) dissolved in methanol were placed in polypropylene tubes and evaporated under vacuum. A similar procedure was conducted following addition of L- $\alpha$ -1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PAPC) (10  $\mu$ l at 2.5 mg/ml in chloroform) and 20  $\mu$ l of HPODE at 0.5 mg/ml in ethanol. Finally, 25  $\mu$ l of saline or HDL at 500  $\mu$ g/ml was added to each tube and the volume adjusted to 1

ml with saline. Samples were incubated for 2 hours at room temperature in the dark before counting in a FLx800 Microplate Fluorescence Reader. Authentic L- $\alpha$ -1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PAPC) was obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) and 13(S)-HPODE was obtained from Biomol (Plymouth Meeting, PA).

### **Cell Culture and Stimulation**

3T3-L1 pre-adipocytes were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) to confluence and differentiated with 0.5 mM of isobutylmethylxanthine (IBMX), 1  $\mu$ M dexamethasone, 10  $\mu$ g/ml insulin and 5% calf serum for 48 hours essentially as described [26]. Insulin was maintained for 2 additional days in the differentiated control cells group. For the remaining groups, cells were washed with PBS and incubated in medium containing RG at 40  $\mu$ M, LST at 100  $\mu$ M, or a vehicle for 5 days. Medium was replaced every day. At day 5, quiescent cells incubated with RG and LST were exposed to oxidized PAPC (ox-PAPC) for 24 h. Oxidized PAPC (ox-PAPC) was prepared and isolated as described [38]. 3T3-L1 preadipocyte and adipocytes were stained with Oil Red O essentially as described [39].

## Analysis of mRNA levels by real-time PCR

Total RNA was isolated from mice liver and cells by the Chomczynski method. Hepatic and cultured cells cDNAs was synthesized using MMLV (Roche Diagnostics) following the instructions provided by the manufacturer. Real-time PCR was performed on a LightCycler device using the FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics) according to the provided protocol. Amplifications of PPAR $\gamma$  gene and of the PPAR $\gamma$  target gene SCARB1 were performed using the primers pairs: 5'-TTTTCAAGGGTGCCAGTTTC-3' and 5'-AATCCTTGGCCCTCTGAGAT-3' spanning 198 base pairs of the exon 6 of the PPAR $\gamma$  gene [GenBank accession number [NM\\_011146](#)] and 5'-GAAAAAGCGCCAAGTACAGC-3' and 5'-CAGGCTGTGGAACTCTAGC-3' spanning 248 bp of the SCARB1 gene [GenBank [NM\\_016741](#)]. Fragments of the CD36; Paraoxonase 1 (PON1); 5-lipoxygenase (Alox5); 15 lipoxygenase type A (Alox15) and 15 lipoxygenase B (Alox15b) genes were amplified using the following primer pairs: 5'-GAGCAACTGGTGGATGGTTT-3' and 5'-GCAGAATCAAGGGAGAGCAC-3' which yields a 207 bp fragment of the CD36 gene [GenBank [NM\\_007643](#)]; 5'-CACCCGTCTCGATTCTTTA-3' and 5'-CAGCCTGTCCATCTGTCTCA-3' that amplified a 178 bp fragment of the

PON1 gene [GenBank [NM\\_011134](#)]; 5'-GTGCTGCTTGAGGATGTGAA-3' and 5'-CTACGATGTCACCGTGGATG-3' that amplified a 235 bp fragment of the Alox5 gene [GenBank [L42198](#)]; 5'-GATTGTGCCATCCTTCCAGT-3' and 5'-CAGGGATCGGAGTACACGTT-3' that amplified a 186 bp fragment of the Alox15 [GenBank [NM\\_009660](#)]; 5'-GCTAAAGCATGCCAGTGTGA-3' and 5'-GCTCTGATTAACGGCTTTGC-3' that yield a 229 bp fragment of the Alox15b gene [GenBank [NM\\_009661](#)]. Fragments of the IL-6, CYBA (p22phox), eNOS and iNOS genes were amplified using previously described primers [[40,41](#)]. When linearity and efficiencies were similar between targets and the reference amplified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) fragment, relative expression analyses were performed by the comparative threshold cycle quantitation method. Alternatively, targets and the GAPDH fragment were analyzed by using serial dilutions of pooled cDNA and then applying the standard curve quantitation method. The 223 bp fragment of the GAPDH gene was amplified with the following primers: 5'-ACA CAT TGG GGG TAG GAA CA-3' and 5'-AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG-3' [GenBank [NM\\_008084](#)]. Primers design was done by using the public domain software Primer3 [[42](#)].

## Chromatin immunoprecipitation assays

Liver samples ( $\approx$  0.05 grams per mouse) were allowed to thaw on ice in serum-free DMEM and then cross-linked with 5% formaldehyde for 5 minutes. Liver fragments were homogenized and nuclear and cytosolic fractions extracts prepared by using a nuclear extraction kit from Active Motif according to the manufacturer instructions. Nuclear lysates were sonicated on ice. As a positive control (input) undiluted aliquots were retained for further processing in parallel with all the other samples at the reversal of the crosslinked step. ChIP assays were performed adding to the chromatin complexes 10  $\mu$ l of  $\alpha$ Nrf2-C20 or PPAR $\gamma$  (H-100) antibodies (Santa Cruz) or without antibody overnight at 4°C. DNA samples were recovered and subjected to analysis by real time PCR amplification. Primers used were specifically designed to amplify a putative antioxidant response element (ARE) in the CD36 gene promoter and a putative peroxisome proliferator response element (PPRE) in the Apolipoprotein A-I (Apo A-I) gene promoter by using the software Primer3. Primers flanking a PPRE at iNOS gene were as described [43]. A putative CD36 ARE (RTGAYnnnGC) site was identified located between base positions 1425 to 1434 in the CD36 gene promoter [GenBank

[AF434766](#)] and primers flanking this sequence were designed with the sequences: 5'-TGCTCTGAGCTCTACCCTCTG-3' and 5'-TCTGTCCCCTCTTTTGCACT-3'. The CD36 promoter sequence was analyzed and completed for gap and errors considering the previously published information [44,45]. Mouse sequence data homologous to the Apo A-I 5' UTR region of the *Rattus norvegicus* Apo A-I promoter sequence [GenBank [X54210](#)] was identified after a BLAST search. A large fragment encompassing 562 bases from 171971 to 172532 of the *Mus musculus* chromosome 9 sequence, clone RP24-302M3 [GenBank [AC116503](#)], matched with the promoter sequence and was subsequently explored to find potential PPRE binding sites. A consensus sequence of the form RG(G/T)TCA was found. The identified sequence AGTCAAGGATCA constitutes a DR1 element of the form with a perfect RG(G/T)TCA 5'-motif and an imperfect 3'-motif. Primers flanking a putative PPRE in the apo A-I promoter regions used were 5'-TCTGGGTGCCAGCTCTTCT-3' and 5'-CCTGTTTGCCCACTCTGTTT-3'. Similarly, a BLAST search was performed using the SCARB1 promoter region of *Rattus norvegicus* [gi:50881992]. A fragment that was in common with the BAC clone of the *Mus musculus* chromosome 5

[gi:71533446] was selected. A PPRE site was identified in the fragment encompassing 360 base pair. This sequence was used to design primers flanking the SCARB1 promoter region with the sequences 5'-TTGTGTCCTGAGTGGAATGC-3' and 5'-AGCAGGGTGGTAGGGACTCT-3'.

The CD36, SCARB1 and apo A-I promoter regions were also amplified by standard PCR and subjected to gel electrophoresis. Agarose bands were excised, purified (QIAGEN Gel Extraction Kit) and sequenced on an ABI Prism 310 device using the BigDye® v. 3.1 Terminator Cycle Sequencing Kit according to the manufacturer instructions (Applied Biosystems).

## Statistical analyses

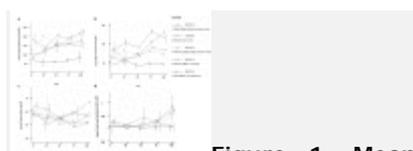
Quantitative variables are presented as mean  $\pm$  SEM unless otherwise specified and qualitative variables as percentages. Pair wise related group comparisons were performed using the Wilcoxon test whereas the Mann-Whitney U-test was used for comparisons of unrelated groups. The level of significance was set at  $P < 0.05$ .

## Results

### Lipid profile and HDL concentration between treated groups

No differences in the food and water consumption were visible among animals of one experimental group or between experimental or control groups. There were no significant differences in insulin levels between treated and untreated mice.

Animals that were fed on HFHC treated with RG showed a significant difference in HDL-cholesterol level with respect to mice fed only on HFHC diet at the beginning ( $p = 0.02$ ) and at the end of the study period ( $p = 0.019$ ). Mice treated with RG showed a significant increase in HDL-cholesterol levels between day 1 and day 100 ( $p = 0.016$ ) (Figure 1b). No differences in total cholesterol and triglycerides levels were observed.

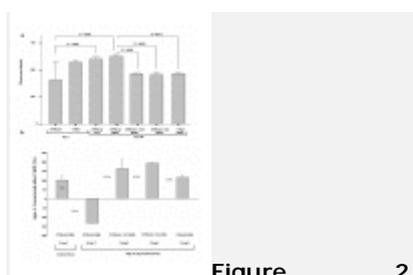


**Figure 1.** Mean total cholesterol (a), HDL-cholesterol (b), triglycerides (c) and lipid hydroperoxides (d) content in plasma of study groups. Triplicate measurements were taken in three animals per group before the onset of the study period (day 0), at day 1 and each 25 days elapsed after completing 100 days. Inter-group comparisons were made at day 1 and at day 100 and intra-group between days 1 and 100. Data are expressed as mean  $\pm$  SD.

As shown in Figure 1d, we found lower, albeit not significant ( $p = 0.06$ ), levels of total LOOH in mice fed on HFHC diet treated with RG with respect to those observed in mice fed on HFHC diet. Also, lower levels of LOOH were observed in the RG group with respect to mice treated with LST or even with respect to the C3HeJ control group. A significant difference in LOOH content in the RG group between days 1 and 100 ( $p = 0.02$ ) was observed.

As pointed out above, raised HDL levels in RG with respect to LST treated mice were observed. Increase in apoA-I gene, a main determinant of HDL concentration levels, might occur after RG treatment because of its ability to act on PPRE elements located at the apoA-I gene which might also preserve HDL-associated antioxidant properties [18]. Therefore, these two possibilities were analyzed as follows. First, we tested the ability of isolated HDL to inhibit the oxidation of PACP by HPODE by the DCF cell-free assay. Fluorescence signal comparisons between HDL obtained from either C57BL/6J mice on a chow diet and C57BL/6J that fed a HFHC between day 1 and day 100 were significant (Figure 2a). Therefore, both time elapsed and hypercholesterolemic diet were associated with a reduction of the HDL antioxidant properties. As deduced from Figure 2a, we

observed that both RG and LST treatment preserved the antioxidant properties of HDL. Interestingly, no differences in the HDL-linked Paraoxonase and arylesterase activities as well as in the PON1 gene expression were observed between pharmacological treated groups (not shown). Second, the Apo A-I proximal promoter levels were evaluated after PPAR $\gamma$  CHIP assay as described in our methods. As depicted in Figure 2b, experiments demonstrated respectively a 63.5% and a 92.5% of DNA amplified after CHIP in the LST and RG treated mice groups with respect to mice fed on HFHC diet. The difference between both pharmacological treated animal groups was not significant. This finding suggested that the PPAR $\gamma$ -mediated transcription of apo-A-I was not different in treated groups and interestingly that a preserved PPAR $\gamma$  activity was also present in the LST group.



**Figure 2.**

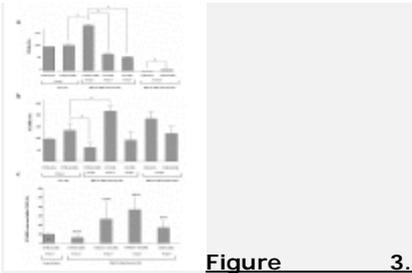
**Treatments preserve HDL antioxidant properties and apolipoprotein A-I-(apo A-I)-PPAR $\gamma$ -mediated gene expression. (a). Fluorescence**

intensity (arbitrary units) was determined as described in Methods. There was no difference in the fluorescence signal levels measured of the HDL isolated from mice under control diet with respect to that obtained from mice that fed a HFHC diet after 1 day elapsed; thus the average fluorescence value obtained of the HDL from both groups was taken as "Day 1" reference value. Data are mean  $\pm$  SD from three separate experiments. **(b)**. CHIP with a PPAR $\gamma$  antibody of study groups were used to amplify an apo A-I promoter fragment. CHIP figures percentages indicate increments or decrements regarding C57BL/6J mice fed HFHC diet. Data of C57BL/6J mice fed chow diet was established as 100%.

### **PPAR $\gamma$ and the levels of the PPAR $\gamma$ -responsive gene SCARB1 were similar between treated groups**

As seen in Figure 3a at day 100, a significant increase in PPAR $\gamma$  gene relative expression was observed in animals fed on HFHC diet with respect to chow ( $p = 0.01$ ). No difference was observed in the PPAR $\gamma$  expression levels between LST and RG treated mice. Gene expression levels of the PPAR $\gamma$  response gene SCARB1 were next evaluated. At day 100 a significant decrease in SCARB1 gene expression in mice fed on HFHC diet with respect to mice fed on chow diet ( $p = 0.02$ ) was observed. SCARB1 expression levels were

significantly higher in hypercholesterolemic mice treated with LST in respect to untreated HFHC fed mice. Jointly considered PPAR $\gamma$  and SCARB1 expression data are suggestive of a preserved PPAR $\gamma$  activity in both pharmacological treated groups. To specifically evaluate this PPAR $\gamma$  preserved activity, ChIP assays were conducted. Following PPAR $\gamma$ -mediated immunoprecipitation assays revealed that there was a 38% reduction in the amplified level of SCARB1 promoter region that was accessible to PPAR $\gamma$  in mice fed with a HFHC diet compared to mice fed a control low-fat diet ( $p = 0.109$ ) (Figure 3c). It seems that in mice fed on HFHC diet, in spite of a significant increase in the PPAR $\gamma$  expression levels, this nuclear receptor seems to be unable to efficiently bind to the PPRE site in the SCARB1 gene. In this context, we observed that in those animals fed on HFHC diet that were also treated with LST or RG, the amplified values of SCARB1 DNA were respectively 162% and 265% higher than those in C57BL/6J fed a HFHC diet. The difference between LST and RG groups did not reach statistical significance.



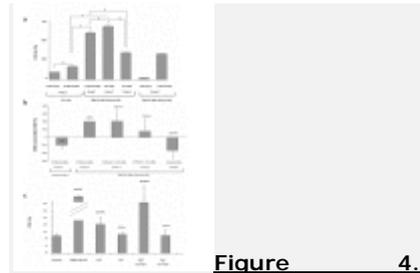
**Figure 3.**

**Treatments preserve PPAR $\gamma$  activity and PPAR $\gamma$  responsive gene expression.** (a) PPAR $\gamma$  mRNA relative expression in pooled liver samples from analyzed groups normalized to GAPDH expression. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM percentage of mean values obtained from equal numbers of C57BL/6J and C3He/6J mice. \*P < 0.05. (b). SCARB1 mRNA relative expression in liver samples from analyzed groups normalized to GAPDH expression. \*P < 0.05 (c). ChIP with a PPAR $\gamma$  antibody of study groups was used to amplify a SCARB1 promoter fragment. ChIP figures percentages indicate increments or decrements regarding C57BL/6J mice fed HFHC diet. Data of C57BL/6J mice fed chow diet was established as 100%.

### **Difference in CD36 relative gene expression between treated mice; rosiglitazone prevents Nrf2-dependent CD36 up-regulation**

Increased gene expression level of CD36 gene was shown in animals that were fed on HFHC diet with respect to chow-fed mice ( $p = 0.02$ ) (Figure 4a). We observed a significant increase in CD36 relative

expression level in mice treated with LST with respect to mice control groups feeding on either chow or HFHC diet ( $p < 0.05$  for both). Mice that were fed on HFHC diet treated with RG showed higher but not significant CD36 relative gene expression level regarding chow-fed mice. A significant reduction in CD36 expression levels was observed in RG treated mice with regard to both HFHC control mice and HFHC mice treated with LST ( $p < 0.05$  for both).



**Figure 4.**

**Rosiglitazone prevents Nrf2-dependent CD-36 up-regulation in hypercholesterolemic C57BL/6J mice.** (a) CD36 mRNA relative expression in pooled liver samples from analyzed groups normalized to GAPDH expression. \*P < 0.05. (b) ChIP with a Nrf2 antibody of study groups was used to amplify a CD36 promoter fragment. ChIP figures percentages indicate increments or decrements regarding C57BL/6J mice fed HFHC diet. Data of C57BL/6J mice fed chow diet was established as 100%. (c) Quiescent day-5 adipocytes incubated with RG and LST were treated with ox-PACP for additional 24 h. RNA was isolated to measure adipose protein 2 by

conventional PCR and CD36 expression using real-time PCR. Values were normalized to GAPDH expression. Figure bar plots represent mean  $\pm$  SEM percentage from vehicle-treated cells of at least 4 experiments with duplicate measurements.

Previous results suggested similar levels of PPAR $\gamma$  activity between our treated groups. Studies have established the role of Nrf2 as a novel signalling pathway involved in the regulation of the CD36 gene. Evidence that ox-LDLs and certain oxidized lipids of LDL particles are inducers of Nrf2 [21] has been reported. Thus, we next explored the possibility that Nrf2 could be playing a pivotal role in the observed diminished total plasma LOOH levels in mice that fed a HFHC diet treated with RG with respect to either LST treated and untreated hypercholesterolemic mice as well as in the observed diminution in the relative expression levels of CD36 gene in the RG mice group with respect to the mice LST group. To address this possibility, ChIP assays using an antibody against Nrf2 followed with real-time analysis of the ARE site at the CD36 gene promoter identified as described in the methods were performed. A significant Nrf2-dependent increase in the amplified CD36 gene promoter region was observed in animals fed with a HFHC diet with respect to

control chow mice ( $p < 0.05$ ) (Figure 4b); similarly, mice treated with LST showed increased amplification levels of the CD36 promoter region regarding chow mice ( $p < 0.05$  for both). Those RG treated mice showed moderate but significant lower amplification levels of the CD36 promoter fragment with respect to the amplification levels obtained in the control chow-fed group (Figure 4b). Remarkably, as depicted in Figure 4b, we found a 125.8% decrease in hypercholesterolemic mice treated with RG with respect to LST treated mice ( $p = 0.02$ ).

### **Rosiglitazone prevents CD36 up-regulation in 3T3 differentiate cells exposed to ox-PACP**

Adipocyte differentiated cells were treated with LST or RG at the doses and times previously described. Differentiation was confirmed by the increased oil-red staining and evaluating the relative expression of the adipogenic marker gene adipose protein 2 (ap2). Statistical comparisons revealed that cells treated with the differentiation cocktail showed significant higher level of ap2 amplified fragment regarding all analyzed groups. Those LST or RG treated cells showed similar levels of ap2 gene. Cells treated with both RG and LST showed diminished CD36 expression

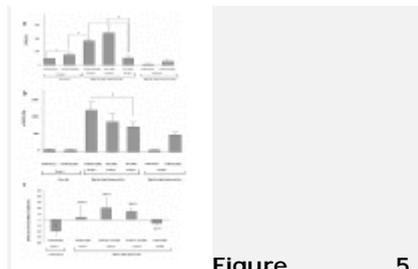
levels than those observed in differentiated untreated cells ( $p < 0.05$  for both) (Figure 4c). However, no difference between both treated cell groups was observed. Then, we tried to simulate *in vivo* oxidative conditions by exposing treated cells to ox-PAPC. Cells treated with LST exposed to ox-PAPC showed no difference in the CD36 relative expression levels with respect to its differentiated cells group ( $p = 0.07$ ) (Figure 4c). However, a statistical significant reduction in CD36 relative expression levels in cells treated with RG exposed to ox-PAPC with respect to differentiated control non-exposed cells ( $p = 0.03$ ) was observed (Figure 4c).

Moreover, we found that the LOOH content in the supernatant of differentiated cells was significantly increased with respect to its undifferentiated controls ( $p = 0.007$ ). This increase positively correlated with the CD36 gene expression levels ( $p = 0.034$ ). On the contrary, we observed that both LST and RG treatments produced a significant decrease in the LOOH content with respect to differentiated cells group ( $p = 0.044$  and  $p = 0.001$ , respectively). Again, no difference in LOOH levels was observed between treated cells. Cells treated with RG or LST exposed to ox-PAPC showed mean lower levels of LOOH than those obtained in unexposed cells

treated only with LST or RG ( $p < 0.001$  for both). Statistical comparison showed no differences between either ox-PAPC treated group. Notably, this occurred in spite of the fact that CD36 gene expression levels were observed to be higher in cells treated with LST plus ox-PAPC regarding cells treated with RG plus ox-PAPC.

### Assessing the relative expression of Nitric Oxide Synthase and Interleukin-6 genes

RG treated mice showed a statistically significant reduction of the iNOS relative gene expression, with respect to both chow-fed animals and HHFC-fed mice treated with LST ( $p < 0.05$  for both) (Figure 5a). IL-6 relative gene expression values although lowers in RG treated mice did not differ among analyzed groups (not shown).



**Figure 5.**

**Treatments modified iNOS gene expression while PPAR $\gamma$ -mediated iNOS amplification levels were similar. (a) iNOS mRNA relative expression in pooled liver samples from analyzed groups**

normalized to GAPDH expression. \*P < 0.05. (b) eNOS mRNA relative expression in pooled liver samples from analyzed groups normalized to GAPDH expression. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM percentage of mean values obtained from equal numbers of C57BL/6J and C3He/6J mice. \*P < 0.05. (c) ChIP with a PPAR $\gamma$  antibody of study groups was used to amplify an iNOS promoter fragment. ChIP figures percentages indicate increments or decrements regarding C57BL/6J mice fed HFHC diet. Data of C57BL/6J mice fed chow diet was established as 100%.

Mean eNOS gene expression values in mice fed on a HFHC diet treated with RG or LST were smaller than those obtained in HFHC fed control mice. This reduction was significant for the comparison of mice treated with RG with respect to HFHC-fed control group ( $p = 0.04$ ) (Figure 5b). Accordingly, group comparison showed that plasma nitric oxide metabolites values were found to be reduced in RG regarding LST treated mice ( $p = 0.02$ ).

### Differences in the iNOS gene expression and its PPAR $\gamma$ dependence

ChIP assays using an antibody against PPAR $\gamma$  followed by real-time amplification of an iNOS gene fragment flanking the recently identified PPRE [43] at iNOS gene showed a 119% increase in average mean amplification values in mice

under HFHC diet with respect to those obtained in chow-fed mice (-100%) ( $p = 0.1$ ) (Figure 5c). In line with our previous results, amplification levels were higher after amplifying DNA from PPAR immunoprecipitates obtained from HFHC-fed mice treated with LST and RG (199% and 168% respectively). Comparison between treated groups yielded no difference ( $p > 0.05$ ) (Figure 5c). Thus, although PPAR $\gamma$  expression levels were not increased in these groups regarding mice fed only on a HFHC diet, the ability to access PPRE binding sites in target genes seems to be preserved in both treated mice groups. Thus, the observed iNOS up-regulation in LST treated mice seems to be independent of the PPAR preserved activity.

## Discussion

In this study we demonstrated that the administration of RG or LST to diet-induced atherosclerosis susceptible mice fed a HFHC diet preserves to the same extent in both groups the activity of nuclear receptor PPAR $\gamma$ . Conclusions derived from the analysis of the expression levels of PPAR $\gamma$  responsive gene SCARB1 and the amplification levels of PPRE binding sites of target genes amplified after ChIP which were shown to be approximately equal.

Previous studies in two murine models of atherosclerosis have shown that treatment with PPAR $\gamma$  agonists protected against the development of atherosclerosis [17-19]. However, lessons obtained from murine models of atherogenesis with or without diabetes should be viewed with caution given the known differences between vascular lesions from those animal models compared to those seen in humans [46]. Interestingly, we find that in spite of the similarly preserved PPAR $\gamma$  activity, RG administration was associated with a better "antiatherogenic" profile than this found in animals treated with LST exposed to the same diet. Thus, we found that hypercholesterolemic mice treated with RG showed inferior levels of total peroxidized lipids than those measured in hypercholesterolemic mice treated with LST. Moreover, when the relative gene expression levels of the iNOS and IL-6 genes were evaluated, we found lower expression levels in mice treated with RG with respect to those obtained in LST treated mice. Values reached significance for iNOS gene expression. Further enhancements of iNOS expression in mice that fed a HFHC diet treated with RG with respect to LST treated mice was not due to PPAR $\gamma$ -mediated transcriptional activity as deduced from ChIP assays. Because there is a second target of PPAR $\gamma$  activation,

the liver X receptor  $\alpha$  whose activity was not analyzed in our work, care must taken with the interpretation of our results. Nevertheless, we suggested possible additional antioxidants and anti-inflammatory effects of the RG that seem to be partially independent of its action on PPAR $\gamma$  activity. It is important to note that in our experimental model, we also observed a difference in the HDL-cholesterol concentration level. Values were higher in mice treated with RG compared to those found in the LST treated group. Besides the key role of HDL particles in the regulation of cholesterol homeostasis by enhancement reverse cholesterol transport, it is known that HDL also exhibits antioxidant and anti-inflammatory properties that participate in its general antiatherogenic effect. The antioxidant ability of HDL is due to the apoprotein moiety and to the presence of associated enzymes [47]. The apoA-I has also been shown to be capable of removing seeding molecules from LDL, thus preventing the oxidation of LDL-derived phospholipids [38,48]. Therefore we considered if this observed HDL increase would justify by itself the best antioxidant profile obtained in mice treated with RG as compared to LST treated mice. We showed that the HDL particles isolated from both treated animal groups exhibited similar

characteristics regarding their capacity to avoid the oxidation of PACPC by HpODE. However, these experiments do not exclude the fact that perhaps this difference in the HDL levels could be relevant by itself. The determinant role of apo A-I in increasing HDL levels has been clearly established in apoE-knockout mice [49]. According to this, it could be possible that non-evaluated differences in apo A-I concentrations, and therefore differences in HDL concentrations and activities, were justified by other transcriptional regulators that were not analyzed in our work. Interestingly, because of the existence of a peroxisome proliferator-responsive element (PPRE) at the apo A-I gene, it also could be possible that as suggested [18] the apo A-I gene might be positively regulated by PPAR $\gamma$ . This possibility was analyzed in our work. Thus, because we observed similar of PPAR $\gamma$ -mediated apo A-I gene transcription we concluded that the apo A-I is certainly positively regulated by PPAR $\gamma$  agonists but also indirectly we concluded that the PPAR $\gamma$  activity was preserved in both treated animal groups.

The role of PPAR $\gamma$  as a transcriptional regulator of CD36 gene expression has been previously established [9,17]. Surprisingly, we observed a statistical difference in the relative expression levels of the CD36 gene

between both treated animal groups while no difference was observed in the relative expression levels of PPAR $\gamma$ -responsive gene SCARB1. Our results suggested differences at inflammatory and oxidative levels between both treated animal groups being less harmful in mice treated with RG than in mice treated with LST. Studies have demonstrated PPAR $\gamma$  induction in human monocytes following exposure to oxLDL [9,50]. Notably new evidence has been provided that Nrf2 plays an essential role in regulating CD36 expression [18,21]. Moreover, ox-LDLs are known to activate Nrf2-mediated gene responses [21]. Therefore, we thought that in our experimental model some similar situation would justify the observed difference in the CD36 gene relative expression levels where Nrf2 could be important. Thus, we performed gene expression analysis and ChIP experiments and concluded that in HFHC-fed mice treated with RG the smaller expression levels of the hepatic CD36 gene were observed as opposed to HFHC-fed mice treated with LST because RG prevents Nrf2-mediated CD36 up-regulation. It has been reported that PPAR $\gamma$  ligands, 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) (PGJ(2)), and troglitazone inhibits Nrf2-induced expression of the thromboxane synthase gene in macrophages [51]. Because Nrf2 also regulates CD36 gene expression,

authors [21] suggested that the transcriptional regulators PPAR $\gamma$  and Nrf2 may interact functionally to modulate CD36 gene expression. As has been previously noted, we demonstrated similarly preserved PPAR $\gamma$  activity in hypercholesterolemic mice treated with RG or LST. Therefore we deduced that RG seems to afford some additional antiatherogenic properties that prevent Nrf2-dependent CD-36 up-regulation which are partially independent of its metabolizing properties as a PPAR $\gamma$  agonist.

We did not find statistically significant differences in the eNOS relative gene expression levels between treated groups with similarly preserved PPAR $\gamma$  activity. Authors suggest that TZDs protective effects on vascular wall cells are mediated by its ability to up-regulate eNOS gene expression [52,53]. This effect of TZDs may explain its *in vivo* vasodilating and blood pressure-lowering effects and, at least for some TZDs, seems to be independent of their PPAR $\gamma$  metabolizing effects. However, although the molecular mechanisms by which TZDs increase NO release are not completely worked out, they are likely to depend on each particular TZD. For example Troglitazone, has an alpha-tocopherol (vitamin E) moiety that is

not present in other TZDs, and treatment of hepatocytes with vitamin E and Troglitazone but not with RG led to an inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression suggesting a PPAR $\gamma$ -independent, antioxidant-related mechanism [54]. Goya et al [52] suggested that the antioxidant and anti-inflammatory properties observed following troglitazone administration to cells were linked to the 6-hydroxychromonanes structure of troglitazone. Jiang et al [55] proved that  $\gamma$ -tocopherol diminished prostaglandin E2 (PGE2) synthesis in macrophages. Therefore, some TZDs share common anti-inflammatory properties with PPAR $\gamma$  independency, which are partially mediated by its structural relations with tocopherols. Gonon et al [56] recently provide evidences that RG results in protection against myocardial contractile dysfunction induced by ischemia reperfusion in mice receiving RG by mediating eNOS protein phosphorylation without increasing total eNOS concentration.

Our work has concentrated in analyzing the hepatic expression of PPAR $\gamma$  and Nrf2 target genes and the valuation of some serum markers. Although it is important to go deep in the *in vivo* situation it is also important to recognize the differences of regulation of the expression of genes regulated by

PPAR and Nrf2 are tissue [21] and context-dependent [57]. Thus, caution is required in the interpretation of our results. Particularly, further in vivo studies should be necessary to explore the role of Nrf2 transcription factor in modulating the progression of foam cell formation and atherosclerosis.

## Conclusion and Clinical Perspective

---

The present study indicates that the administration of RG or LST to diet-induced atherosclerosis susceptible mice fed a HFHC diet preserves in both groups the PPAR $\gamma$  activity. RG seems to have antioxidant effects in addition to its main metabolic activity in a manner that actually diminishes rather than increases the expression of the gene CD36 by inhibiting its Nrf-2-dependent up-regulation. Despite the favourable effects of RG observed in this study, it must be acknowledged that the meta-analysis of Nissen et al [58] on RG and cardiovascular risk raises the hypothesis that TZDs treatments may increase the risk of myocardial

infarction and cardiovascular events. However, the general consensus is that this hypothesis needs further evaluation [59]. Currently, animal and human studies suggest that PPAR $\gamma$  ligands have anti-inflammatory, antioxidant and vasculo-protective protective effects. However, though there are similarities in TZD-induced improvement in insulin sensitivity between experimental models and

humans, there are also substantial differences. Studies have focused on the role of adipocytokines in metabolic control and their regulation by TZDs. Nevertheless, growing evidence suggests that the vasculo-protective effects of PPAR $\gamma$  ligands can be dissociated from its metabolizing actions. Thus, there may be important implications for the development of improved anti-atherogenic and antidiabetic drug treatments. Additionally, the identification of potential benefits associated with the common molecular structure among these drugs will have interesting clinical repercussions

## Abbreviations

---

AT<sub>1</sub>R = Angiotensin Type 1 Receptor; ChIP = Chromatin Immunoprecipitation; eNOS (NOS3) = Nitric Oxide Synthase 3; HDL = High Density Lipoprotein; HFHC = high-fat high-cholesterol; IL-6 = Interleukin 6; iNOS (NOS2) = Nitric Oxide Synthase, inducible; LOOH = Lipid Hydroperoxide; LST = Losartan; NO = Nitric Oxide;

Nrf2 = Nuclear Factor Erythroid 2-Like 2; PPAR $\gamma$  = Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma; RG = Rosiglitazone.

## Acknowledgements

This work was supported by grant PI/06 from the Fundación Canaria de Investigación y Salud (FUNCIS) with an extension. Authors gratefully acknowledge the technical assistance of Erika Hernández Velazquez, Lidia Estupiñán-Quintana, Juan Verona and Clara Martel. We also thank Sarah Goldsmith for help on the English edition of the manuscript.

## References

1. Ross R: Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999, 340:115-126.
2. Steinberg D: Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997, 272:20963-20966.
3. Davignon J, Ganz P: Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004, 109:III27-III32.
4. Chang MY, Olin KL, Tsoi C, Wight TN, Chait A: Human monocyte-derived macrophages secrete two forms of proteoglycan-macrophage colony-stimulating factor that differ in their ability to bind low density lipoproteins. *J Biol Chem* 1998, 273:15985-15992.
5. Nakashima Y, Fujii H, Sumiyoshi S, Wight TN, Sueishi K: Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, 27:1159-1165.
6. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL: CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 2001, 108:785-791.
7. Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, Sharma K, Silverstein RL: Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* 2000, 105:1049-1056.
8. Barlic J, Zhang Y, Foley JF, Murphy PM: Oxidized lipid-driven chemokine receptor switch, CCR2 to CX3CR1, mediates adhesion of human macrophages to coronary artery smooth muscle cells through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent pathway. *Circulation* 2006, 114:807-819.
9. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM: Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 1998, 93:229-240.
10. Bagi Z, Koller A, Kaley G: PPARgamma activation, by reducing oxidative stress, increases NO bioavailability in coronary arterioles of mice with Type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004, 286:H742-H748.
11. Calkin AC, Forbes JM, Smith CM, Lassila M, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA, Allen TJ: Rosiglitazone attenuates atherosclerosis in

- a model of insulin insufficiency independent of its metabolic effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, 25:1903-1909.
12. Crosby MB, Svenson JL, Zhang J, Nicol CJ, Gonzalez FJ, Gilkeson GS: Peroxisome proliferation-activated receptor (PPAR)gamma is not necessary for synthetic PPARgamma agonist inhibition of inducible nitric-oxide synthase and nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 2005, 312:69-76.
  13. Shinohara E, Kihara S, Ouchi N, Funahashi T, Nakamura T, Yamashita S, Kameda-Takemura K, Matsuzawa Y: Troglitazone suppresses intimal formation following balloon injury in insulin-resistant Zucker fatty rats. *Atherosclerosis* 1998, 136:275-279.
  14. Jiang C, Ting AT, Seed B: PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998, 391:82-86.
  15. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK: The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998, 391:79-82.
  16. Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ET: Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation* 2000, 101:235-238.
  17. Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM: PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med* 2001, 7:48-52.
  18. Chen Z, Ishibashi S, Perrey S, Osuga J, Gotoda T, Kitamine T, Tamura Y, Okazaki H, Yahagi N, Iizuka Y, Shionoiri F, Ohashi K, Harada K, Shimano H, Nagai R, Yamada N: Troglitazone inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice: pleiotropic effects on CD36 expression and HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001, 21:372-377.
  19. Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 2000, 106:523-531.
  20. Tao L, Liu HR, Gao E, Teng ZP, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL, Batinic-Haberle I, Willette RN, Ohlstein EH, Yue TL: Antioxidative, antinitrative, and vasculoprotective effects of a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist in hypercholesterolemia. *Circulation* 2003, 108:2805-2811.
  21. Ishii T, Itoh K, Ruiz E, Leake DS, Unoki H, Yamamoto M, Mann GE: Role of Nrf2 in the regulation of CD36 and stress protein expression in murine macrophages: activation by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynonenal. *Circ Res* 2004, 94:609-616.
  22. Hosono T, Mizuguchi H, Katayama K, Koizumi N, Kawabata K, Yamaguchi T, Nakagawa S, Watanabe Y, Mayumi T, Hayakawa T: RNA interference of PPARgamma using fiber-modified

- adenovirus vector efficiently suppresses preadipocyte-to-adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Gene* 2005, 348:157-165.
23. Sharma AM, Janke J, Gorzelnik K, Engeli S, Luft FC: Angiotensin blockade prevents type 2 diabetes by formation of fat cells. *Hypertension* 2002, 40:609-611.
  24. Janke J, Engeli S, Gorzelnik K, Luft FC, Sharma AM: Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors. *Diabetes* 2002, 51:1699-1707.
  25. Schupp M, Janke J, Clasen R, Unger T, Kintscher U: Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity. *Circulation* 2004, 109:2054-2057.
  26. Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI, Chittiboyina A, Desai P, Pravenec M, Qi N, Wang J, Avery MA, Kurtz TW: Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPARgamma-modulating activity. *Hypertension* 2004, 43:993-1002.
  27. Sugawara A, Takeuchi K, Uruno A, Ikeda Y, Arima S, Kudo M, Sato K, Taniyama Y, Ito S: Transcriptional suppression of type 1 angiotensin II receptor gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 2001, 142:3125-3134.
  28. Jones JR, Barrick C, Kim KA, Lindner J, Blondeau B, Fujimoto Y, Shiota M, Kesterson RA, Kahn BB, Magnuson MA: Deletion of PPARgamma in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102:6207-6212.
  29. Vidal-Puig A, Jimenez-Linan M, Lowell BB, Hamann A, Hu E, Spiegelman B, Flier JS, Moller DE: Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest* 1996, 97:2553-2561.
  30. Han J, Hajjar DP, Zhou X, Gotto AM Jr., Nicholson AC: Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated gene expression. A new mechanism of action for high density lipoprotein. *J Biol Chem* 2002, 277:23582-23586.
  31. Zhang B, Berger J, Zhou G, Elbrecht A, Biswas S, White-Carrington S, Szalkowski D, Moller DE: Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 1996, 271:31771-31774.
  32. Diradourian C, Girard J, Pegorier JP: Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance. *Biochimie* 2005, 87:33-38.
  33. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Ling KL, Wolff SP: Low-density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in plasma. Relevance to determination of total plasma lipid hydroperoxide concentrations. *Biochem J* 1996, 313 (Pt 3):781-786.
  34. Auerbach BJ, Kiely JS, Cornicelli JA: A spectrophotometric microtiter-based assay for the detection of hydroperoxy derivatives of linoleic acid. *Anal Biochem* 1992, 201:375-380.

- 
35. Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanche H, Passa P, Froguel P, Ruiz J: Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest* 1997, 99:62-6.
36. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN: Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett* 1998, 423:57-60.
37. Navab M, Hama SY, Hough GP, Subbanagounder G, Reddy ST, Fogelman AM: A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids. *J Lipid Res* 2001, 42:1308-1317.
38. Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, Reddy ST, Sevanian A, Fonarow GC, Fogelman AM: Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res* 2000, 41:1495-1508.
39. Ramirez-Zacarias JL, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuch W: Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry* 1992, 97:493-497.
40. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I: Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004, 114:1752-1761.
41. Rubin J, Murphy TC, Zhu L, Roy E, Nanes MS, Fan X: Mechanical strain differentially regulates endothelial nitric-oxide synthase and receptor activator of nuclear kappa B ligand expression via ERK1/2 MAPK. *J Biol Chem* 2003, 278:34018-34025.
42. Rozen S, Skaletsky H: Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000, 132:365-386.
43. Crosby MB, Svenson J, Gilkeson GS, Nowling TK: A novel PPAR response element in the murine iNOS promoter. *Mol Immunol* 2005, 42:1303-1310.
44. Sato O, Kuriki C, Fukui Y, Motojima K: Dual promoter structure of mouse and human fatty acid translocase/CD36 genes and unique transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma ligands. *J Biol Chem* 2002, 277:15703-15711.
45. Teboul L, Febbraio M, Gaillard D, Amri EZ, Silverstein R, Grimaldi PA: Structural and functional characterization of the mouse fatty acid translocase promoter: activation during adipose differentiation. *Biochem J* 2001, 360:305-312.
46. Hsueh WA, Brummer D: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: implications for cardiovascular disease. *Hypertension* 2004, 43:297-305.
47. Navab M, Anantharamaiah 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.
48. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L, Subbanagounder G, Faull KF, Reddy ST, Miller NE, Fogelman AM: Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res* 2000, 41:1481-1494.
49. 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.
50. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM: PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 1998, 93:241-252.
51. Ikeda Y, Sugawara A, Taniyama Y, Uruno A, Igarashi K, Arima S, Ito S, Takeuchi K: Suppression of rat thromboxane synthase gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor gamma in macrophages via an interaction with NRF2. *J Biol Chem* 2000, 275:33142-33150.
52. Goya K, Sumitani S, Otsuki M, Xu X, Yamamoto H, Kurebayashi S, Saito H, Kouhara H, Kasayama S: The thiazolidinedione drug troglitazone up-regulates nitric oxide synthase expression in vascular endothelial cells. *J Diabetes Complications* 2006, 20:336-342.
53. Polikandriotis JA, Mazzella LJ, Rupnow HL, Hart CM: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands stimulate endothelial nitric oxide production through distinct peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, 25:1810-1816.
54. Davies GF, Khandelwal RL, Wu L, Juurlink BH, Roesler WJ: Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene expression by troglitazone: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma)-independent, antioxidant-related mechanism. *Biochem Pharmacol* 2001, 62:1071-1079.
55. Jiang Q, Elson-Schwab I, Courtemanche C, Ames BN: gamma-tocopherol and its major metabolite, in contrast to alpha-tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:11494-11499.
56. Gonon AT, Bulhak A, Labruto F, Sjoquist PO, Pernow J: Cardioprotection mediated by rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, in relation to nitric oxide. *Basic Res Cardiol* 2007, 102:80-89.
57. Kavanagh IC, Symes CE, Renaudin P, Nova E, Mesa MD, Boukouvelas G, Leake DS, Yaqoob P: Degree of oxidation of low density lipoprotein affects expression of CD36 and PPARgamma, but not cytokine production, by human monocyte-macrophages. *Atherosclerosis* 2003, 168:271-282.

58. Nissen SE, Wolski K: Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 2007, 356:2457-2471.
59. Rosen CJ: The rosiglitazone story--lessons from an FDA Advisory Committee meeting. *N Engl J Med* 2007, 357:844-846.



## Bibliografía



---

## X) Bibliografía.

1. Saez T, Suarez C, Blanco F, Gabriel R. [Epidemiology of cardiovascular diseases in the Spanish elderly population]. *Rev Esp Cardiol.* 1998;51:864-873.
2. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 2001;285:2486-2497.
3. Davidson MH. Overview of prevention and treatment of atherosclerosis with lipid-altering therapy for pharmacy directors. *Am J Manag Care.* 2007;13 Suppl 10:S260-S269.
4. Smith SC, Jr., Allen J, Blair SN, Bonow RO, Brass LM, Fonarow GC, Grundy SM, Hiratzka L, Jones D, Krumholz HM, Mosca L, Pearson T, Pfeffer MA, Taubert KA. AHA/ACC guidelines for secondary prevention for patients with coronary and other atherosclerotic vascular disease: 2006 update endorsed by the National Heart, Lung, and Blood Institute. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:2130-2139.
5. Badimon L, Martinez-Gonzalez J, Llorente-Cortes V, Rodriguez C, Padro T. Cell biology and lipoproteins in atherosclerosis. *Curr Mol Med.* 2006;6:439-456.
6. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105:1135-1143.
7. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-126.
8. Rosenfeld ME, Palinski W, Yla-Herttuala S, Carew TE. Macrophages, endothelial cells, and lipoprotein oxidation in the pathogenesis of atherosclerosis. *Toxicol Pathol.* 1990;18:560-571.
9. French JE. Atherosclerosis in relation to the structure and function of the arterial

- 
- intima, with special reference to the endothelium. *Int Rev Exp Pathol.* 1966;5:253-353.
10. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science.* 1973;180:1332-1339.
  11. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med.* 1976;295:369-377.
  12. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *N Engl J Med.* 1976;295:420-425.
  13. Ross R, Harker L. Hyperlipidemia and atherosclerosis. *Science.* 1976;193:1094-1100.
  14. Ross R. George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherosclerosis: a problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components. *Arteriosclerosis.* 1981;1:293-311.
  15. Luscher TF, Barton M. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol.* 1997;20:II-10.
  16. Badimon L, Martinez-Gonzalez J. [Endothelium and vascular protection: an update]. *Rev Esp Cardiol.* 2002;55 Suppl 1:17-26.
  17. Yang Z, Ming XF. Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Clin Med Res.* 2006;4:53-65.
  18. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109:III27-III32.
  19. Chin JH, Azhar S, Hoffman BB. Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. *J Clin Invest.* 1992;89:10-18.
  20. Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1995;270:319-324.

21. Stremler KE, Stafforini DM, Prescott SM, McIntyre TM. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Oxidatively fragmented phospholipids as substrates. *J Biol Chem.* 1991;266:11095-11103.
22. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, Navab M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1995;96:2882-2891.
23. Chen N, Liu Y, Greiner CD, Holtzman JL. Physiologic concentrations of homocysteine inhibit the human plasma GSH peroxidase that reduces organic hydroperoxides. *J Lab Clin Med.* 2000;136:58-65.
24. Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, Reddy ST, Sevanian A, Fonarow GC, Fogelman AM. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res.* 2000;41:1495-1508.
25. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L, Subbanagounder G, Faull KF, Reddy ST, Miller NE, Fogelman AM. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res.* 2000;41:1481-1494.
26. Stafforini DM, Tjoelker LW, McCormick SP, Vaitkus D, McIntyre TM, Gray PW, Young SG, Prescott SM. Molecular basis of the interaction between plasma platelet-activating factor acetylhydrolase and low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1999;274:7018-7024.
27. Kelso GJ, Stuart WD, Richter RJ, Furlong CE, Jordan-Starck TC, Harmony JA. Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry.* 1994;33:832-839.
28. Rodrigo L, Mackness B, Durrington PN, Hernandez A, Mackness MI. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J.* 2001;354:1-7.
29. Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, Castellani LW, Furlong CE,

- 
- Costa LG, Fogelman AM, Lusis AJ. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*. 1998;394:284-287.
30. Van Lenten BJ, Navab M, Shih D, Fogelman AM, Lusis AJ. The role of high-density lipoproteins in oxidation and inflammation. *Trends Cardiovasc Med*. 2001;11:155-161.
31. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res*. 2004;95:764-772.
32. 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.
33. Tabas I, Li Y, Brocia RW, Xu SW, Swenson TL, Williams KJ. Lipoprotein lipase and sphingomyelinase synergistically enhance the association of atherogenic lipoproteins with smooth muscle cells and extracellular matrix. A possible mechanism for low density lipoprotein and lipoprotein(a) retention and macrophage foam cell formation. *J Biol Chem*. 1993;268:20419-20432.
34. Tertov VV, Orekhov AN, Sobenin IA, Gabbasov ZA, Popov EG, Yaroslavov AA, Smirnov VN. Three types of naturally occurring modified lipoproteins induce intracellular lipid accumulation due to lipoprotein aggregation. *Circ Res*. 1992;71:218-228.
35. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1987;316:1371-1375.
36. Young JL, Libby P, Schonbeck U. Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2002;88:554-567.
37. Orbe J, Rodriguez JA, Arias R, Belzunce M, Nespereira B, Perez-Illzarbe M, Roncal C, Paramo JA. Antioxidant vitamins increase the collagen content and reduce MMP-1 in a porcine model of atherosclerosis: implications for plaque stabilization.

- 
- Atherosclerosis*. 2003;167:45-53.
38. Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation*. 2001;103:926-933.
  39. Lafont A. Basic aspects of plaque vulnerability. *Heart*. 2003;89:1262-1267.
  40. Shah PK. Pathophysiology of plaque rupture and the concept of plaque stabilization. *Cardiol Clin*. 2003;21:303-14, v.
  41. Kinlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol*. 2001;12:383-389.
  42. Drexler H. Factors involved in the maintenance of endothelial function. *Am J Cardiol*. 1998;82:3S-4S.
  43. Sowers JR. Hypertension, angiotensin II, and oxidative stress. *N Engl J Med*. 2002;346:1999-2001.
  44. Martinez-Gonzalez J, Llorente-Cortes V, Badimon L. [Cellular and molecular biology of atherosclerotic lesions]. *Rev Esp Cardiol*. 2001;54:218-231.
  45. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 1994;78:915-918.
  46. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:29-38.
  47. Stocker R, Keaney JF, Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*. 2004;84:1381-1478.
  48. Lerman A, Zeiher AM. Endothelial function: cardiac events. *Circulation*. 2005;111:363-368.
  49. Huang PL. Disruption of the endothelial nitric oxide synthase gene: effect on

- 
- vascular response to injury. *Am J Cardiol*. 1998;82:57S-59S.
50. Kawashima S, Yokoyama M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:998-1005.
  51. Heltianu C, Costache G, Gafencu A, Diaconu M, Bodeanu M, Cristea C, Azibi K, Poenaru L, Simionescu M. Relationship of eNOS gene variants to diseases that have in common an endothelial cell dysfunction. *J Cell Mol Med*. 2005;9:135-142.
  52. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM, Brown MJ. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation*. 1999;100:1515-1520.
  53. Langelier EG, Snelting-Havinga I, van Hinsbergh VW. Passage of low density lipoproteins through monolayers of human arterial endothelial cells. Effects of vasoactive substances in an in vitro model. *Arteriosclerosis*. 1989;9:550-559.
  54. Gardner G, Banka CL, Roberts KA, Mullick AE, Rutledge JC. Modified LDL-mediated increases in endothelial layer permeability are attenuated with 17 beta-estradiol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:854-861.
  55. Rangaswamy S, Penn MS, Saidel GM, Chisolm GM. Exogenous oxidized low-density lipoprotein injures and alters the barrier function of endothelium in rats in vivo. *Circ Res*. 1997;80:37-44.
  56. Cai H. NAD(P)H oxidase-dependent self-propagation of hydrogen peroxide and vascular disease. *Circ Res*. 2005;96:818-822.
  57. Chalupsky K, Cai H. Endothelial dihydrofolate reductase: critical for nitric oxide bioavailability and role in angiotensin II uncoupling of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:9056-9061.
  58. Sessa WC. eNOS at a glance. *J Cell Sci*. 2004;117:2427-2429.
  59. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801-809.

- 
60. Vora DK, Fang ZT, Liva SM, Tyner TR, Parhami F, Watson AD, Drake TA, Territo MC, Berliner JA. Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins. Separate effects on synthesis and surface expression. *Circ Res*. 1997;80:810-818.
  61. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994;76:301-314.
  62. Rosen SD. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:129-156.
  63. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76:333-337.
  64. Kunjathoor VV, Febbraio M, Podrez EA, Moore KJ, Andersson L, Koehn S, Rhee JS, Silverstein R, Hoff HF, Freeman MW. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem*. 2002;277:49982-49988.
  65. Moore KJ, Freeman MW. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1702-1711.
  66. Hurt-Camejo E, Camejo G, Rosengren B, Lopez F, Ahlstrom C, Fager G, Bondjers G. Effect of arterial proteoglycans and glycosaminoglycans on low density lipoprotein oxidation and its uptake by human macrophages and arterial smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb*. 1992;12:569-583.
  67. Katsuda S, Kaji T. Atherosclerosis and extracellular matrix. *J Atheroscler Thromb*. 2003;10:267-274.
  68. Nakata A, Nakagawa Y, Nishida M, Nozaki S, Miyagawa J, Nakagawa T, Tamura R, Matsumoto K, Kameda-Takemura K, Yamashita S, Matsuzawa Y. CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1333-1339.

- 
69. Wang X, Greilberger J, Ratschek M, Jurgens G. Oxidative modifications of LDL increase its binding to extracellular matrix from human aortic intima: influence of lesion development, lipoprotein lipase and calcium. *J Pathol.* 2001;195:244-250.
  70. Itabe H. Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified. *Biol Pharm Bull.* 2003;26:1-9.
  71. Freeman MW. Macrophage scavenger receptors. *Curr Opin Lipidol.* 1994;5:143-148.
  72. de Beer MC, Zhao Z, Webb NR, van der Westhuyzen DR, de Villiers WJ. Lack of a direct role for macrosialin in oxidized LDL metabolism. *J Lipid Res.* 2003;44:674-685.
  73. Chen M, Kakutani M, Minami M, Kataoka H, Kume N, Narumiya S, Kita T, Masaki T, Sawamura T. Increased expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in initial atherosclerotic lesions of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1107-1115.
  74. Inoue K, Arai Y, Kurihara H, Kita T, Sawamura T. Overexpression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 induces intramyocardial vasculopathy in apolipoprotein E-null mice. *Circ Res.* 2005;97:176-184.
  75. Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, Minami M, Moriwaki H, Murase T, Sawamura T, Masaki T, Hashimoto N, Kita T. Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions. *Circulation.* 1999;99:3110-3117.
  76. Acton SL, Scherer PE, Lodish HF, Krieger M. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem.* 1994;269:21003-21009.
  77. Calvo D, Vega MA. Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. *J Biol Chem.* 1993;268:18929-18935.
  78. Fernandez-Ruiz E, Armesilla AL, Sanchez-Madrid F, Vega MA. Gene encoding the collagen type I and thrombospondin receptor CD36 is located on chromosome

- 
- 7q11.2. *Genomics*. 1993;17:759-761.
79. Tandon NN, Lipsky RH, Burgess WH, Jamieson GA. Isolation and characterization of platelet glycoprotein IV (CD36). *J Biol Chem*. 1989;264:7570-7575.
80. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*. 1996;271:518-520.
81. Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, Sharma K, Silverstein RL. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest*. 2000;105:1049-1056.
82. Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 1993;268:11811-11816.
83. Murphy JE, Tedbury PR, Homer-Vanniasinkam S, Walker JH, Ponnambalam S. Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis*. 2005;182:1-15.
84. Gordon D, Reidy MA, Benditt EP, Schwartz SM. Cell proliferation in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:4600-4604.
85. WISSLER RW, Vesselinovitch D, Komatsu A. The contribution of studies of atherosclerotic lesions in young people to future research. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;598:418-434.
86. Nabel EG, Yang Z, Liptay S, San H, Gordon D, Haudenschild CC, Nabel GJ. Recombinant platelet-derived growth factor B gene expression in porcine arteries induce intimal hyperplasia in vivo. *J Clin Invest*. 1993;91:1822-1829.
87. Fishbein I, Waltenberger J, Banai S, Rabinovich L, Chorny M, Levitzki A, Gazit A, Huber R, Mayr U, Gertz SD, Golomb G. Local delivery of platelet-derived growth factor receptor-specific tyrophostin inhibits neointimal formation in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:667-676.

- 
88. Raines EW, Ross R. Multiple growth factors are associated with lesions of atherosclerosis: specificity or redundancy? *Bioessays*. 1996;18:271-282.
  89. Noda-Heiny H, Fujii S, Sobel BE. Induction of vascular smooth muscle cell expression of plasminogen activator inhibitor-1 by thrombin. *Circ Res*. 1993;72:36-43.
  90. Varela O, Martinez-Gonzalez J, Badimon L. The response of smooth muscle cells to alpha-thrombin depends on its arterial origin: comparison among different species. *Eur J Clin Invest*. 1998;28:313-323.
  91. Inaba T, Gotoda T, Shimano H, Shimada M, Harada K, Kozaki K, Watanabe Y, Hoh E, Motoyoshi K, Yazaki Y, . Platelet-derived growth factor induces c-fms and scavenger receptor genes in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1992;267:13107-13112.
  92. Llorente-Cortes V, Martinez-Gonzalez J, Badimon L. Esterified cholesterol accumulation induced by aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells is reduced by HMG-CoA reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:738-746.
  93. Llorente-Cortes V, Martinez-Gonzalez J, Badimon L. LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1572-1579.
  94. Kozarsky KF, Donahee MH, Rigotti A, Iqbal SN, Edelman ER, Krieger M. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature*. 1997;387:414-417.
  95. Wang N, Arai T, Ji Y, Rinninger F, Tall AR. Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein ApoB, low density lipoprotein ApoB, and high density lipoprotein in transgenic mice. *J Biol Chem*. 1998;273:32920-32926.
  96. Kozarsky KF, Donahee MH, Glick JM, Krieger M, Rader DJ. Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the

- 
- cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:721-727.
97. Arai T, Wang N, Bezouevski M, Welch C, Tall AR. Decreased atherosclerosis in heterozygous low density lipoprotein receptor-deficient mice expressing the scavenger receptor BI transgene. *J Biol Chem.* 1999;274:2366-2371.
98. Ueda Y, Gong E, Royer L, Cooper PN, Francone OL, Rubin EM. Relationship between expression levels and atherogenesis in scavenger receptor class B, type I transgenics. *J Biol Chem.* 2000;275:20368-20373.
99. Rigotti A, Trigatti BL, Penman M, Rayburn H, Herz J, Krieger M. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:12610-12615.
100. Braun A, Trigatti BL, Post MJ, Sato K, Simons M, Edelberg JM, Rosenberg RD, Schrenzel M, Krieger M. Loss of SR-BI expression leads to the early onset of occlusive atherosclerotic coronary artery disease, spontaneous myocardial infarctions, severe cardiac dysfunction, and premature death in apolipoprotein E-deficient mice. *Circ Res.* 2002;90:270-276.
101. Zhang Y, Da Silva JR, Reilly M, Billheimer JT, Rothblat GH, Rader DJ. Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest.* 2005;115:2870-2874.
102. Glomset JA. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res.* 1968;9:155-167.
103. Ji Y, Wang N, Ramakrishnan R, Shayek E, Huszar D, Breslow JL, Tall AR. Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile. *J Biol Chem.* 1999;274:33398-33402.
104. Yancey PG, Llera-Moya M, Swarnakar S, Monzo P, Klein SM, Connelly MA, Johnson WJ, Williams DL, Rothblat GH. High density lipoprotein phospholipid

- 
- composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI. *J Biol Chem.* 2000;275:36596-36604.
105. Cuchel M, Rader DJ. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation.* 2006;113:2548-2555.
106. Rigotti A, Miettinen HE, Krieger M. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr Rev.* 2003;24:357-387.
107. Silver DL. A carboxyl-terminal PDZ-interacting domain of scavenger receptor B, type I is essential for cell surface expression in liver. *J Biol Chem.* 2002;277:34042-34047.
108. Malerod L, Sporstol M, Juvet LK, Mousavi A, Gjoen T, Berg T. Hepatic scavenger receptor class B, type I is stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and hepatocyte nuclear factor 4alpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;305:557-565.
109. Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem.* 2000;43:527-550.
110. Gearing KL, Gottlicher M, Teboul M, Widmark E, Gustafsson JA. Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:1440-1444.
111. Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, Rose DW, Willson TM, Rosenfeld MG, Glass CK. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature.* 2005;437:759-763.
112. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell.* 1998;93:241-252.
113. Out R, Hoekstra M, Spijkers JA, Kruijt JK, van Eck M, Bos IS, Twisk J, Van

- 
- Berkel TJ. Scavenger receptor class B type I is solely responsible for the selective uptake of cholesteryl esters from HDL by the liver and the adrenals in mice. *J Lipid Res.* 2004;45:2088-2095.
114. Stahlberg N, Rico-Bautista E, Fisher RM, Wu X, Cheung L, Flores-Morales A, Tybring G, Norstedt G, Tollet-Egnell P. Female-predominant expression of fatty acid translocase/CD36 in rat and human liver. *Endocrinology.* 2004;145:1972-1979.
115. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell.* 1998;93:229-240.
116. Jones JR, Barrick C, Kim KA, Lindner J, Blondeau B, Fujimoto Y, Shiota M, Kesterson RA, Kahn BB, Magnuson MA. Deletion of PPARgamma in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:6207-6212.
117. Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest.* 2000;106:523-531.
118. Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med.* 2001;7:48-52.
119. Hiji AK, Michalik L, Wahli W. PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59:790-798.
120. Li L, Beauchamp MC, Renier G. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma agonists upregulate human macrophage lipoprotein lipase expression. *Atherosclerosis.* 2002;165:101-110.
121. Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald ML, Randow F, Andersson LP, Altshuler D, Milstone DS, Mortensen RM, Spiegelman BM, Freeman MW. The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nat Med.* 2001;7:41-47.

- 
122. Tarrade A, Schoonjans K, Pavan L, Auwerx J, Rochette-Egly C, Evain-Brion D, Fournier T. PPARgamma/RXRalpha heterodimers control human trophoblast invasion. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:5017-5024.
  123. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 1994;79:1147-1156.
  124. Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett.* 1998;438:55-60.
  125. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev.* 1999;20:649-688.
  126. Diradourian C, Girard J, Pegorier JP. Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance. *Biochimie.* 2005;87:33-38.
  127. Jones PS, Savory R, Barratt P, Bell AR, Gray TJ, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Bell DR. Chromosomal localisation, inducibility, tissue-specific expression and strain differences in three murine peroxisome-proliferator-activated-receptor genes. *Eur J Biochem.* 1995;233:219-226.
  128. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell.* 1995;83:803-812.
  129. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell.* 1995;83:813-819.
  130. Willson TM, Cobb JE, Cowan DJ, Wiethe RW, Correa ID, Prakash SR, Beck KD, Moore LB, Kliewer SA, Lehmann JM. The structure-activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones. *J Med Chem.* 1996;39:665-668.
  131. Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the

- 
- tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:9926-9930.
132. Chan JY, Cheung MC, Moi P, Chan K, Kan YW. Chromosomal localization of the human NF-E2 family of bZIP transcription factors by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet*. 1995;95:265-269.
133. Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med*. 2004;10:549-557.
134. Chan K, Han XD, Kan YW. An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:4611-4616.
135. Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*. 1992;68:879-887.
136. Feige JN, Gelman L, Tudor C, Engelborghs Y, Wahli W, Desvergne B. Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand. *J Biol Chem*. 2005;280:17880-17890.
137. Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*. 1992;358:771-774.
138. Tugwood JD, Issemann I, Anderson RG, Bundell KR, McPheat WL, Green S. The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J*. 1992;11:433-439.
139. Dowhan DH, Downes M, Sturm RA, Muscat GE. Identification of deoxyribonucleic acid sequences that bind retinoid-X receptor-gamma with high affinity. *Endocrinology*. 1994;135:2595-2607.
140. Guan Y. Peroxisome proliferator-activated receptor family and its relationship to

- 
- renal complications of the metabolic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:2801-2815.
141. Vidal-Puig A, Jimenez-Linan M, Lowell BB, Hamann A, Hu E, Spiegelman B, Flier JS, Moller DE. Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest.* 1996;97:2553-2561.
  142. Memon RA, Tecott LH, Nonogaki K, Beigneux A, Moser AH, Grunfeld C, Feingold KR. Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. *Endocrinology.* 2000;141:4021-4031.
  143. Rahimian R, Masih-Khan E, Lo M, van Breemen C, McManus BM, Dube GP. Hepatic over-expression of peroxisome proliferator activated receptor gamma2 in the ob/ob mouse model of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Mol Cell Biochem.* 2001;224:29-37.
  144. Kliewer SA, Willson TM. The nuclear receptor PPARgamma - bigger than fat. *Curr Opin Genet Dev.* 1998;8:576-581.
  145. Lowell BB. PPARgamma: an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell.* 1999;99:239-242.
  146. Duan SZ, Ivashchenko CY, Whitesall SE, D'Alecy LG, Duquaine DC, Brosius FC, III, Gonzalez FJ, Vinson C, Pierre MA, Milstone DS, Mortensen RM. Hypotension, lipodystrophy, and insulin resistance in generalized PPARgamma-deficient mice rescued from embryonic lethality. *J Clin Invest.* 2007;117:812-822.
  147. Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:7614-7619.

- 
148. Webb NR, de Villiers WJ, Connell PM, de Beer FC, van der Westhuyzen DR. Alternative forms of the scavenger receptor BI (SR-BI). *J Lipid Res.* 1997;38:1490-1495.
  149. Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, Yim SH, Gavrilova O, Ward JM, Brewer B, Jr., Reitman ML, Gonzalez FJ. Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J Clin Invest.* 2003;111:737-747.
  150. Rushmore TH, Pickett CB. Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *J Biol Chem.* 1990;265:14648-14653.
  151. Ishii T, Itoh K, Takahashi S, Sato H, Yanagawa T, Katoh Y, Bannai S, Yamamoto M. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J Biol Chem.* 2000;275:16023-16029.
  152. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, O'Connor T, Yamamoto M. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells.* 2003;8:379-391.
  153. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:89-116.
  154. Mann GE, Niehueser-Saran J, Watson A, Gao L, Ishii T, de Winter P, Siow RC. Nrf2/ARE regulated antioxidant gene expression in endothelial and smooth muscle cells in oxidative stress: implications for atherosclerosis and preeclampsia. *Sheng Li Xue Bao.* 2007;59:117-127.
  155. Ishii T, Itoh K, Ruiz E, Leake DS, Unoki H, Yamamoto M, Mann GE. Role of Nrf2 in the regulation of CD36 and stress protein expression in murine macrophages: activation by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynonenal. *Circ Res.* 2004;94:609-616.

- 
156. Chen XL, Varner SE, Rao AS, Grey JY, Thomas S, Cook CK, Wasserman MA, Medford RM, Jaiswal AK, Kunsch C. Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells. A novel anti-inflammatory mechanism. *J Biol Chem.* 2003;278:703-711.
  157. Hosoya T, Maruyama A, Kang MI, Kawatani Y, Shibata T, Uchida K, Warabi E, Noguchi N, Itoh K, Yamamoto M. Differential responses of the Nrf2-Keap1 system to laminar and oscillatory shear stresses in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2005;280:27244-27250.
  158. Potter DD, Sobey CG, Tompkins PK, Rossen JD, Heistad DD. Evidence that macrophages in atherosclerotic lesions contain angiotensin II. *Circulation.* 1998;98:800-807.
  159. Ferrario CM, Smith R, Levy P, Strawn W. The hypertension-lipid connection: insights into the relation between angiotensin II and cholesterol in atherogenesis. *Am J Med Sci.* 2002;323:17-24.
  160. Clozel M, Kuhn H, Hefti F, Baumgartner HR. Endothelial dysfunction and subendothelial monocyte macrophages in hypertension. Effect of angiotensin converting enzyme inhibition. *Hypertension.* 1991;18:132-141.
  161. Kim JA, Berliner JA, Nadler JL. Angiotensin II increases monocyte binding to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;226:862-868.
  162. Kubo A, Fukuda N, Soma M, Izumi Y, Kanmatsuse K. Inhibitory effect of an angiotensin II type 1 receptor antagonist on growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1996;27:58-63.
  163. Yanagitani Y, Rakugi H, Okamura A, Moriguchi K, Takiuchi S, Ohishi M, Suzuki K, Higaki J, Ogihara T. Angiotensin II type 1 receptor-mediated peroxide production in human macrophages. *Hypertension.* 1999;33:335-339.
  164. Strawn WB, Chappell MC, Dean RH, Kivlighn S, Ferrario CM. Inhibition of early atherogenesis by losartan in monkeys with diet-induced hypercholesterolemia. *Circulation.* 2000;101:1586-1593.

- 
165. Shinozaki K, Ayajiki K, Nishio Y, Sugaya T, Kashiwagi A, Okamura T. Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in vascular dysfunction associated with insulin resistance. *Hypertension*. 2004;43:255-262.
  166. Nakaya K, Ayaori M, Hisada T, Sawada S, Tanaka N, Iwamoto N, Ogura M, Yakushiji E, Kusahara M, Nakamura H, Ohsuzu F. Telmisartan enhances cholesterol efflux from THP-1 macrophages by activating PPARgamma. *J Atheroscler Thromb*. 2007;14:133-141.
  167. Huang F, Thompson JC, Wilson PG, Aung HH, Rutledge JC, Tannock LR. Angiotensin II increases vascular proteoglycan content preceding and contributing to atherosclerosis development. *J Lipid Res*. 2008;49:521-530.
  168. Goa KL, Wagstaff AJ. Losartan potassium: a review of its pharmacology, clinical efficacy and tolerability in the management of hypertension. *Drugs*. 1996;51:820-845.
  169. Lindholm LH, Ibsen H, Dahlof B, Devereux RB, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Julius S, Kjeldsen SE, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H, Aurup P, Edelman J, Snapinn S. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet*. 2002;359:1004-1010.
  170. Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI, Chittiboyina A, Desai P, Pravenec M, Qi N, Wang J, Avery MA, Kurtz TW. Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPARgamma-modulating activity. *Hypertension*. 2004;43:993-1002.
  171. Schupp M, Janke J, Clasen R, Unger T, Kintscher U. Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity. *Circulation*. 2004;109:2054-2057.
  172. Staels B, Fruchart JC. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes*. 2005;54:2460-2470.

- 
173. Kramer C, Sunkomat J, Witte J, Luchtefeld M, Walden M, Schmidt B, Tsikas D, Boger RH, Forssmann WG, Drexler H, Schieffer B. Angiotensin II receptor-independent antiinflammatory and antiaggregatory properties of losartan: role of the active metabolite EXP3179. *Circ Res.* 2002;90:770-776.
  174. Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem.* 1997;272:3406-3410.
  175. Schupp M, Lee LD, Frost N, Umbreen S, Schmidt B, Unger T, Kintscher U. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by losartan metabolites. *Hypertension.* 2006;47:586-589.
  176. Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Luft FC, Sharma AM. Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors. *Diabetes.* 2002;51:1699-1707.
  177. Gorzelniak K, Engeli S, Janke J, Luft FC, Sharma AM. Hormonal regulation of the human adipose-tissue renin-angiotensin system: relationship to obesity and hypertension. *J Hypertens.* 2002;20:965-973.
  178. Sharma AM, Janke J, Gorzelniak K, Engeli S, Luft FC. Angiotensin blockade prevents type 2 diabetes by formation of fat cells. *Hypertension.* 2002;40:609-611.
  179. Saint-Marc P, Kozak LP, Ailhaud G, Darimont C, Negrel R. Angiotensin II as a trophic factor of white adipose tissue: stimulation of adipose cell formation. *Endocrinology.* 2001;142:487-492.
  180. Tomono Y, Iwai M, Inaba S, Mogi M, Horiuchi M. Blockade of AT(1) Receptor Improves Adipocyte Differentiation in Atherosclerotic and Diabetic Models. *Am J Hypertens.* 2008;21:206-212.
  181. Bagi Z, Koller A, Kaley G. PPARgamma activation, by reducing oxidative stress, increases NO bioavailability in coronary arterioles of mice with Type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286:H742-H748.
  182. Calkin AC, Forbes JM, Smith CM, Lassila M, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA,

- 
- Allen TJ. Rosiglitazone attenuates atherosclerosis in a model of insulin insufficiency independent of its metabolic effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1903-1909.
183. Crosby MB, Svenson JL, Zhang J, Nicol CJ, Gonzalez FJ, Gilkeson GS. Peroxisome proliferation-activated receptor (PPAR)gamma is not necessary for synthetic PPARgamma agonist inhibition of inducible nitric-oxide synthase and nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;312:69-76.
184. Shinohara E, Kihara S, Ouchi N, Funahashi T, Nakamura T, Yamashita S, Kameda-Takemura K, Matsuzawa Y. Troglitazone suppresses intimal formation following balloon injury in insulin-resistant Zucker fatty rats. *Atherosclerosis.* 1998;136:275-279.
185. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature.* 1998;391:82-86.
186. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.* 1998;391:79-82.
187. Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation.* 2000;101:235-238.
188. Chen Z, Ishibashi S, Perrey S, Osuga J, Gotoda T, Kitamine T, Tamura Y, Okazaki H, Yahagi N, Iizuka Y, Shionoiri F, Ohashi K, Harada K, Shimano H, Nagai R, Yamada N. Troglitazone inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice: pleiotropic effects on CD36 expression and HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:372-377.
189. Adams M, Montague CT, Prins JB, Holder JC, Smith SA, Sanders L, Digby JE, Sewter CP, Lazar MA, Chatterjee VK, O'Rahilly S. Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *J Clin Invest.* 1997;100:3149-3153.

- 
190. Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest.* 1998;101:1354-1361.
  191. Tao L, Liu HR, Gao E, Teng ZP, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL, Batinic-Haberle I, Willette RN, Ohlstein EH, Yue TL. Antioxidative, antinitrative, and vasculoprotective effects of a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist in hypercholesterolemia. *Circulation.* 2003;108:2805-2811.
  192. Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med.* 2007;356:2457-2471.
  193. Diamond GA, Bax L, Kaul S. Uncertain effects of rosiglitazone on the risk for myocardial infarction and cardiovascular death. *Ann Intern Med.* 2007;147:578-581.
  194. Jawien J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol.* 2004;55:503-517.
  195. van der WL, Adams DJ, Bradley A. Tools for targeted manipulation of the mouse genome. *Physiol Genomics.* 2002;11:133-164.
  196. Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J, Campbell RD, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Clee C, Collins FS, Cook LL, Copley RR, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaunty KD, Deri J, Dermitzakis ET, Dewey C, Dickens NJ, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn DM, Eddy SR, Elnitski L, Emes RD, Eswara P, Eyraas E, Felsenfeld A, Fewell GA, Flicek P, Foley K, Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves TA, Green ED, Gregory S, Guigo R, Guyer M, Hardison RC, Haussler D, Hayashizaki Y, Hillier LW, Hinrichs A, Hlavina W, Holzer T, Hsu F, Hua A, Hubbard T, Hunt A, Jackson I, Jaffe DB,

- 
- Johnson LS, Jones M, Jones TA, Joy A, Kamal M, Karlsson EK, Karolchik D, Kasprzyk A, Kawai J, Keibler E, Kells C, Kent WJ, Kirby A, Kolbe DL, Korf I, Kucherlapati RS, Kulbokas EJ, Kulp D, Landers T, Leger JP, Leonard S, Letunic I, Levine R, Li J, Li M, Lloyd C, Lucas S, Ma B, Maglott DR, Mardis ER, Matthews L, Mauceli E, Mayer JH, McCarthy M, McCombie WR, McLaren S, McLay K, McPherson JD, Meldrim J, Meredith B, Mesirov JP, Miller W, Miner TL, Mongin E, Montgomery KT, Morgan M, Mott R, Mullikin JC, Muzny DM, Nash WE, Nelson JO, Nhan MN, Nicol R, Ning Z, Nusbaum C, O'Connor MJ, Okazaki Y, Oliver K, Overton-Larty E, Pachter L, Parra G, Pepin KH, Peterson J, Pevzner P, Plumb R, Pohl CS, Poliakov A, Ponce TC, Ponting CP, Potter S, Quail M, Reymond A, Roe BA, Roskin KM, Rubin EM, Rust AG, Santos R, Sapojnikov V, Schultz B, Schultz J, Schwartz MS, Schwartz S, Scott C, Seaman S, Searle S, Sharpe T, Sheridan A, Shownkeen R, Sims S, Singer JB, Slater G, Smit A, Smith DR, Spencer B, Stabenau A, Stange-Thomann N, Sugnet C, Suyama M, Tesler G, Thompson J, Torrents D, Trevaskis E, Tromp J, Ucla C, Ureta-Vidal A, Vinson JP, Von Niederhausern AC, Wade CM, Wall M, Weber RJ, Weiss RB, Wendl MC, West AP, Wetterstrand K, Wheeler R, Whelan S, Wierzbowski J, Willey D, Williams S, Wilson RK, Winter E, Worley KC, Wyman D, Yang S, Yang SP, Zdobnov EM, Zody MC, Lander ES. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 2002;420:520-562.
197. Wissler RW. The production of atheromatous lesions in the albino rat. *Proc Inst Med Chic*. 1952;19:79-80.
198. Wissler RW, Eilert ML, Schroeder MA, Cohen L. Production of lipomatous and atheromatous arterial lesions in the albino rat. *AMA Arch Pathol*. 1954;57:333-351.
199. Seskind CR, Wheatley VR, Rasmussen RA, Wissler RW. Serum lipid analyses in rats fed natural and hydrogenated cottonseed oil with cholesterol and cholate. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1959;102:90-95.
200. Ishida BY, Blanche PJ, Nichols AV, Yashar M, Paigen B. Effects of atherogenic diet consumption on lipoproteins in mouse strains C57BL/6 and C3H. *J Lipid Res*. 1991;32:559-568.
201. Nishina PM, Verstuyft J, Paigen B. Synthetic low and high fat diets for the study of

- 
- atherosclerosis in the mouse. *J Lipid Res.* 1990;31:859-869.
202. Paigen B. Genetics of responsiveness to high-fat and high-cholesterol diets in the mouse. *Am J Clin Nutr.* 1995;62:458S-462S.
203. Ando H, Tsuruoka S, Yamamoto H, Takamura T, Kaneko S, Fujimura A. Regulation of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase mRNA expression in C57BL/6 mice fed an atherogenic diet. *Atherosclerosis.* 2005;178:265-269.
204. Paigen B, Albee D, Holmes PA, Mitchell D. Genetic analysis of murine strains C57BL/6J and C3H/HeJ to confirm the map position of Ath-1, a gene determining atherosclerosis susceptibility. *Biochem Genet.* 1987;25:501-511.
205. Paigen B, Mitchell D, Holmes PA, Albee D. Genetic analysis of strains C57BL/6J and BALB/cJ for Ath-1, a gene determining atherosclerosis susceptibility in mice. *Biochem Genet.* 1987;25:881-892.
206. Paigen B, Mitchell D, Reue K, Morrow A, Lusic AJ, LeBoeuf RC. Ath-1, a gene determining atherosclerosis susceptibility and high density lipoprotein levels in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:3763-3767.
207. Moore RE, Kawashiri MA, Kitajima K, Secreto A, Millar JS, Pratico D, Rader DJ. Apolipoprotein A-I deficiency results in markedly increased atherosclerosis in mice lacking the LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1914-1920.
208. Teupser D, Persky AD, Breslow JL. Induction of atherosclerosis by low-fat, semisynthetic diets in LDL receptor-deficient C57BL/6J and FVB/NJ mice: comparison of lesions of the aortic root, brachiocephalic artery, and whole aorta (en face measurement). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1907-1913.
209. Getz GS, Reardon CA. Diet and murine atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:242-249.
210. Koutnikova H, Cock TA, Watanabe M, Houten SM, Champy MF, Dierich A, Auwerx J. Compensation by the muscle limits the metabolic consequences of lipodystrophy in PPAR gamma hypomorphic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:14457-14462.

- 
211. He W, Barak Y, Hevener A, Olson P, Liao D, Le J, Nelson M, Ong E, Olefsky JM, Evans RM. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:15712-15717.
  212. Norris AW, Chen L, Fisher SJ, Szanto I, Ristow M, Jozsi AC, Hirshman MF, Rosen ED, Goodyear LJ, Gonzalez FJ, Spiegelman BM, Kahn CR. Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. *J Clin Invest*. 2003;112:608-618.
  213. Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem*. 1982;28:2077-2080.
  214. Young DS, Pestaner LC, Gibberman V. Effects of drugs on clinical laboratory tests. *Clin Chem*. 1975;21:1D-432D.
  215. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Ling KL, Wolff SP. Low-density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in plasma. Relevance to determination of total plasma lipid hydroperoxide concentrations. *Biochem J*. 1996;313 ( Pt 3):781-786.
  216. Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanche H, Passa P, Froguel P, Ruiz J. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest*. 1997;99:62-66.
  217. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett*. 1998;423:57-60.
  218. Navab M, Hama SY, Hough GP, Subbanagounder G, Reddy ST, Fogelman AM. A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids. *J Lipid Res*. 2001;42:1308-1317.
  219. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid

- 
- guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-159.
220. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 2000;132:365-386.
221. Crosby MB, Svenson J, Gilkeson GS, Nowling TK. A novel PPAR response element in the murine iNOS promoter. *Mol Immunol.* 2005;42:1303-1310.
222. Sato O, Kuriki C, Fukui Y, Motojima K. Dual promoter structure of mouse and human fatty acid translocase/CD36 genes and unique transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma ligands. *J Biol Chem.* 2002;277:15703-15711.
223. Teboul L, Febbraio M, Gaillard D, Amri EZ, Silverstein R, Grimaldi PA. Structural and functional characterization of the mouse fatty acid translocase promoter: activation during adipose differentiation. *Biochem J.* 2001;360:305-312.
224. Navab M, Hama-Levy S, Van Lenten BJ, Fonarow GC, Cardinez CJ, Castellani LW, Brennan ML, Lusis AJ, Fogelman AM, La Du BN. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *J Clin Invest.* 1997;99:2005-2019.
225. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, La Du BN, Fogelman AM, Navab M. 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.
226. Van Lenten BJ, Wagner AC, Navab M, Fogelman AM. Oxidized phospholipids induce changes in hepatic paraoxonase and ApoJ but not monocyte chemoattractant protein-1 via interleukin-6. *J Biol Chem.* 2001;276:1923-1929.
227. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connelly PW, Hegele RA. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol.* 1996;7:69-76.

- 
228. Mackness M, Boullier A, Hennuyer N, Mackness B, Hall M, Tailleux A, Duriez P, Delfly B, Durrington P, Fruchart JC, Duverger N, Caillaud JM, Castro G. Paraoxonase activity is reduced by a pro-atherosclerotic diet in rabbits. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;269:232-236.
229. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G, Cheroutre H, Faull KF, Berliner JA, Witztum JL, Lusis AJ. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem.* 2000;275:17527-17535.
230. Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol.* 2005;69:541-550.
231. Lapointe A, Couillard C, Lemieux S. Effects of dietary factors on oxidation of low-density lipoprotein particles. *J Nutr Biochem.* 2006;17:645-658.
232. Shih DM, Gu L, Hama S, Xia YR, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *J Clin Invest.* 1996;97:1630-1639.
233. Azumi H, Inoue N, Takeshita S, Rikitake Y, Kawashima S, Hayashi Y, Itoh H, Yokoyama M. Expression of NADH/NADPH oxidase p22phox in human coronary arteries. *Circulation.* 1999;100:1494-1498.
234. Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1996;271:23317-23321.
235. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension.* 1998;32:488-495.
236. Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis. *Circulation.*

- 
- 2000;102:1744-1747.
237. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Adipose tissue as a source of inflammatory cytokines in health and disease: focus on end-stage renal disease. *Kidney Int Suppl.* 2003;S65-S68.
238. Koj A. Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1317:84-94.
239. Mullen PG, Windsor AC, Walsh CJ, Fowler AA, III, Sugeran HJ. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 selectively regulate neutrophil function in vitro. *J Surg Res.* 1995;58:124-130.
240. 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.
241. Viswambharan H, Ming XF, Zhu S, Hubsch A, Lerch P, Vergeres G, Rusconi S, Yang Z. Reconstituted high-density lipoprotein inhibits thrombin-induced endothelial tissue factor expression through inhibition of RhoA and stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase but not Akt/endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res.* 2004;94:918-925.
242. Zeiher AM, Schachinger V. Coronary endothelial vasodilator dysfunction: clinical relevance and therapeutic implications. *Z Kardiol.* 1994;83 Suppl 4:7-14.
243. Mehrabian M, Allayee H, Wong J, Shi W, Wang XP, Shaposhnik Z, Funk CD, Lusis AJ. Identification of 5-lipoxygenase as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice. *Circ Res.* 2002;91:120-126.
244. 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.
245. Zhao L, Moos MP, Grabner R, Pedrono F, Fan J, Kaiser B, John N, Schmidt S, Spanbroek R, Lotzer K, Huang L, Cui J, Rader DJ, Evans JF, Habenicht AJ, Funk

- 
- CD. The 5-lipoxygenase pathway promotes pathogenesis of hyperlipidemia-dependent aortic aneurysm. *Nat Med.* 2004;10:966-973.
246. Spanbroek R, Grabner R, Lotzer K, Hildner M, Urbach A, Ruhling K, Moos MP, Kaiser B, Cohnert TU, Wahlers T, Zieske A, Plenz G, Robenek H, Salbach P, Kuhn H, Radmark O, Samuelsson B, Habenicht AJ. Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:1238-1243.
247. Qiu H, Gabrielsen A, Agardh HE, Wan M, Wetterholm A, Wong CH, Hedin U, Swedenborg J, Hansson GK, Samuelsson B, Paulsson-Berne G, Haeggstrom JZ. Expression of 5-lipoxygenase and leukotriene A4 hydrolase in human atherosclerotic lesions correlates with symptoms of plaque instability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:8161-8166.
248. Steinberg D. At last, direct evidence that lipoxygenases play a role in atherogenesis. *J Clin Invest.* 1999;103:1487-1488.
249. Cyrus T, Witztum JL, Rader DJ, Tangirala R, Fazio S, Linton MF, Funk CD. Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J Clin Invest.* 1999;103:1597-1604.
250. 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.
251. Patricia MK, Kim JA, Harper CM, Shih PT, Berliner JA, Natarajan R, Nadler JL, Hedrick CC. Lipoxygenase products increase monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2615-2622.
252. Reilly KB, Srinivasan S, Hatley ME, Patricia MK, Lannigan J, Bolick DT, Vandenhoff G, Pei H, Natarajan R, Nadler JL, Hedrick CC. 12/15-Lipoxygenase activity mediates inflammatory monocyte/endothelial interactions and atherosclerosis in vivo. *J Biol Chem.* 2004;279:9440-9450.
253. Bolick DT, Orr AW, Whetzel A, Srinivasan S, Hatley ME, Schwartz MA, Hedrick

- 
- CC. 12/15-lipoxygenase regulates intercellular adhesion molecule-1 expression and monocyte adhesion to endothelium through activation of RhoA and nuclear factor-kappaB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2301-2307.
254. Bolick DT, Srinivasan S, Whetzel A, Fuller LC, Hedrick CC. 12/15 lipoxygenase mediates monocyte adhesion to aortic endothelium in apolipoprotein E-deficient mice through activation of RhoA and NF-kappaB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1260-1266.
255. Huo Y, Zhao L, Hyman MC, Shashkin P, Harry BL, Burcin T, Forlow SB, Stark 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.
256. Brash AR, Boeglin WE, Chang MS. Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:6148-6152.
257. Glass CK. Potential roles of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in macrophage biology and atherosclerosis. *J Endocrinol.* 2001;169:461-464.
258. Goya K, Sumitani S, Otsuki M, Xu X, Yamamoto H, Kurebayashi S, Saito H, Kouhara H, Kasayama S. The thiazolidinedione drug troglitazone up-regulates nitric oxide synthase expression in vascular endothelial cells. *J Diabetes Complications.* 2006;20:336-342.
259. Polikandriotis JA, Mazzella LJ, Rupnow HL, Hart CM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands stimulate endothelial nitric oxide production through distinct peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1810-1816.
260. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001;357:593-615.
261. Huang PL. Unraveling the links between diabetes, obesity, and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2005;96:1129-1131.

- 
262. Shaul PW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol.* 2002;64:749-774.
263. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999;399:601-605.
264. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 1999;399:597-601.
265. Gonon AT, Bulhak A, Labruto F, Sjoquist PO, Pernow J. Cardioprotection mediated by rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, in relation to nitric oxide. *Basic Res Cardiol.* 2007;102:80-89.
266. Davies GF, Khandelwal RL, Wu L, Juurlink BH, Roesler WJ. Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene expression by troglitazone: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma)-independent, antioxidant-related mechanism. *Biochem Pharmacol.* 2001;62:1071-1079.
267. Jiang Q, Elson-Schwab I, Courtemanche C, Ames BN. gamma-tocopherol and its major metabolite, in contrast to alpha-tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:11494-11499.
268. Kavanagh IC, Symes CE, Renaudin P, Nova E, Mesa MD, Boukouvalas G, Leake DS, Yaqoob P. Degree of oxidation of low density lipoprotein affects expression of CD36 and PPARgamma, but not cytokine production, by human monocyte-macrophages. *Atherosclerosis.* 2003;168:271-282.