

ORIGINAL

Efecto de la LDL modificada en la expresión de adipofilina en macrófagos y células musculares lisas de la pared vascular. Implicaciones para el desarrollo de arteriosclerosis

Effect of modified LDL in the expression of adipocyte differentiation-related protein in macrophages and vascular smooth muscle cells. Implications for atherosclerosis progression

Llorente-Cortés V¹, Royo T³, Juan-Babot O¹, Badimon L^{1,2}

¹Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC. Hospital de la Santa Creu I Sant Pau. ²CIBEROBN. Instituto de Salud Carlos III.

³Departamento de Biología Celular. Universidad de Barcelona.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE.

Resumen

Objetivo: Analizar si la unión e interiorización de la LDL modificada por agregación (LDLag) puede inducir la expresión de la proteína adipofilina (ADRP), un marcador de acumulación lipídica, en las células musculares lisas de la pared vascular (CMLV) y macrófagos humanos.

Resultados: La LDLag induce la sobreexpresión de ADRP tanto a nivel de ARNm (PCR tiempo real) como a nivel de proteína («western blot») en CMLV (ARNm: 3.06-veces; proteína: 8.58-veces) y también en macrófagos (ARNm: 3.5-veces; proteína: 3.71-veces). Los estudios inmunohistoquímicos evidenciaron una alta colocalización entre ADRP y CMLV y también entre ADRP y macrófagos en placas ateroscleróticas avanzadas ricas en lípido.

Conclusiones: La captación de LDLag mediante el receptor lipoproteico LRP1 juega un papel primordial en la formación de células espumosas a partir de macrófagos y de CMLV y, por tanto, en la progresión de la lesión aterosclerótica.

Palabras clave:

Adipofilina, LDL agregada, LRP1, células musculares lisas de pared vascular, macrófagos.

Abstract

Aims: The objectives of this work were to analyze whether aggregated LDL (agLDL) uptake modulates ADRP expression levels in human vascular smooth muscle cells (VSMC) and macrophages (HMDM).

Methods and Results: AgLDL strongly upregulated ADRP mRNA (Real-time PCR) and protein expression (western blot) in human VSMC (mRNA: by 3.06-fold; protein: 8.58-fold) and HMDM (mRNA: by 3.5-fold; protein: by 3.71-fold). Immunohistochemical studies evidence a high colocalization between ADRP/macrophages and ADRP/VSMC in advanced lipid-enriched atherosclerotic plaques.

Conclusions: These results demonstrate that agLDL-LRP1 engagement induces ADRP overexpression in both HMDM and human VSMC. ADRP is highly expressed in advanced lipid-enriched human atherosclerotic plaques. Therefore, LRP1-mediated agLDL uptake might play a pivotal role on vascular foam cell formation and atherosclerotic plaque progression.

Key words:

Aggregated LDL, LRP1, adipophilin, human VSMC, macrophages.

Correspondencia

V. Llorente Cortés
Científico titular CSIC
Instituto Catalán Ciencias Cardiovasculares
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona
cllorente@csic-iccc.org

Introducción

Uno de los eventos principales en el proceso aterogénico es la acumulación de lípidos, principalmente colesterol esterificado en el espacio subendotelial de la pared vascular [1-3]. *In vivo*, la LDL retenida en la pared vascular sufre modificaciones tales como la oxidación, pero sobre todo agregación y fusión [4,5]. De hecho, la mayor parte de la LDL retenida en la pared vascular se ha encontrado en forma agregada (LDLag). La LDLag es un inductor muy potente de acumulación intracelular de colesterol esterificado tanto en los macrófagos [6-8] como en las células musculares lisas de la pared vascular (CMLV) [9-11]. En CMLV, el receptor lipoproteico «*Low density lipoprotein receptor-related protein*» (LRP1), es clave para la acumulación lipídica intracelular en células vasculares ya que facilita la captación de LDLag de forma no regulada por el colesterol [11,12]. El mecanismo de internalización de LDLag por el LRP1 está favorecido en la íntima arterial, donde los proteoglicanos facilitan los procesos de modificación por agregación e internalización de la LDL [13]. La expresión del LRP1, a diferencia de la del receptor de LDL, se regula a la alza por la LDLag *in vitro* y por la hipercolesterolemia en el modelo porcino [14,15]. Por consiguiente, el LRP1 por tener un papel crucial en la formación de células espumosas en la pared vascular, podría contribuir de forma decisiva a la formación de placas ateroscleróticas «blandas», es decir con un alto contenido en lípido, cuya ruptura se asocia a la mayor parte de los síndromes coronarios agudos (angina inestable, infarto de miocardio y muerte súbita). Por ello resulta de un gran interés conocer los procesos que permiten la acumulación intracelular de lípido a partir de la captación de LDLag mediada por LRP1.

Se ha descrito que las alteraciones en la expresión de adipofilina están asociadas al síndrome metabólico [16,17]. La adipofilina se considera un marcador de acumulación lipídica en diferentes tipos celulares y en diferentes procesos patógenicos relacionados con la acumulación lipídica intracelular [18]. Además esta proteína se encuentra localizada en la superficie de los dropletos lipídicos y juega un papel fundamental en la formación de los mismos [19]. Se considera que la distribución celular tan amplia de la adipofilina se debe a que juega un papel esencial en el metabolismo lipídico, desde el empaquetamiento de los lípidos hasta la regulación de su hidrólisis. En concreto, se ha descrito que la adipofilina incrementa la acumulación lipídica en macrófagos THP-1 y que este aumento previene el eflujo de lípido en estas células [20].

Aunque sabemos que la captación de LDLag mediante LRP1 conduce a una acumulación intracelular de colesterol esterificado muy elevada tanto en macrófago [6-8] como en

la célula muscular lisa [9-11], se desconoce la forma en que se acumula intracelularmente. Los objetivos de este trabajo han sido investigar el efecto de LDLag en la expresión de ARN mensajero y proteína de adipofilina en CMLV y macrófagos, y la posible relación entre los niveles de expresión del LRP1 y los de adipofilina. Nuestros resultados demuestran 1) que existe un alto grado de colocalización entre ADRP y macrófagos y entre ADRP y CMLV en lesiones ateroscleróticas avanzadas ricas en lípido; 2) que la LDLag induce la expresión de ADRP tanto a nivel de ARNm como de proteína en CMLV y en macrófagos. Dado que la adipofilina está altamente expresada en dos de los tipos celulares claves en el desarrollo de lesión aterosclerótica, la captación de LDLag mediada por LRP1 probablemente juega un papel primordial en la formación de célula espumosa asociada a la progresión de las lesiones ateroscleróticas.

Material y Métodos

Aislamiento y caracterización de células musculares lisas de pared vascular humana

Los cultivos primarios de células musculares lisas de pared vascular (CMLV) humana se obtuvieron a partir de las coronarias procedentes de los corazones extraídos a los individuos transplantados en la Unidad de Trasplantes de Corazón (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau). Las CMLV se obtuvieron por una modificación de la técnica de explantes previamente descrita en nuestro grupo [1-3]. Las CMLV de los explantes se dejaron crecer en monocapa en medio 199 con suero bovino fetal al 20%, suero humano al 2%, L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL). Las CMLV se utilizaron para realizar los experimentos cuando estaban entre pasaje 2 y 6. La viabilidad celular se determinó mediante el método de exclusión por azul de tripano.

Aislamiento de monocitos humanos y diferenciación de macrófagos

Los monocitos se obtuvieron a partir de «*buffy-coats*» (35-40 mL) de sujetos sanos. Las células se depositaron en 15 mL de Ficoll-Hypaque y se centrifugaron a 400 g durante 40 minutos a 22 °C. Las células mononucleadas se obtuvieron a partir de la banda central blanca del gradiente. Las células se lavaron exhaustivamente en DPBS y se resuspendieron en medio RPMI suplementado con un 20% de suero humano A/B. Los monocitos se diferenciaron a macrófagos por adición al medio completo de suero humano A/B al 20% y «*macrophage colony stimulating factor*» (M-CSF) a 100 ng/mL durante 3 días.

Obtención, caracterización y modificación de las lipoproteínas

Las LDL humanas se obtuvieron a partir de una mezcla de sueros procedentes de voluntarios normolipémicos y se aislaron por ultracentrifugación secuencial. La LDL se dializaron y se determinó su concentración en proteína y colesterol. La pureza de la LDL se analizó por electroforesis en gel de agarosa. Las LDL se agregaron in vitro mediante agitación intensa en vortex durante 4 minutos de una solución de LDL de 1 mg/mL [1-3]. El nivel de agregación se comprobó por turbidimetría (absorbancia a 680 m). Para determinar el grado de oxidación se analizó la concentración de sustancias reactivas con el ácido tiobarbúrico (TBARS).

Determinación de la concentración intracelular de colesterol libre (CL) y colesterol esterificado (CE) derivado de LDL

Se indujo la quiescencia de las CMLV y posteriormente se incubaron durante 18 horas con LDL nativa o LDLag. Se realizó la extracción lipídica de las muestras y se separó CL y CE por cromatografía en capa fina. Las bandas correspondientes a CL y CE se cuantificaron densitométricamente utilizando una curva estándar de CL y palmitato de colesterol, respectivamente [1-3]. Los resultados se normalizaron por proteína.

Análisis de la expresión de ARNm de adipofilina y LRP1 por PCR tiempo real

Se sintetizó el cDNA a partir de 1 µg de RNA en una reacción que contenía 0,02 µg/ul de oligodT, 20 U RNAsin, 1 mM dNTPs, 20 mM DTT, 200 U M-MLV-RT, 50 mM Tris-HCl PH 8,3, 75 mM KCl y 3 mM MgCl₂. La reacción se realizó en una hora a 37 °C y se detuvo calentando a 75 °C durante 10 min. El cDNA se diluyó y las distintas alícuotas se utilizaron mediante la utilización de los oligonucleótidos adecuados, para amplificar el RNA de interés. La cuantificación a tiempo real se basa en la utilización de sondas Taqman marcadas con fluorescencia y cebadores específicos diseñados por el «*software Primer Express*» (PE Biosystems). La reacción de amplificación contenía 2 ul de cDNA en 25 ml de «*Taqman PCR master mix*» con 300 nM de cebadores y 250 nM de sonda. El ciclo umbral (Ct) se normalizó por gapdh y se utilizó para el cálculo de la concentración del gen [4].

Análisis de la expresión proteica de adipofilina y LRP1 mediante «*Western blot*»

Se cargaron 20-30 µg de proteína por pocillo y se separaron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida transfiriéndose a filtros de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con anticuerpos anti-LRP1 o anti-adipofilina. La

detección de la proteína se realizó mediante un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa y el sistema de detección de supersignal [4].

Immunohistoquímica

Arterias coronarias humanas se obtuvieron a partir de los corazones explantados inmediatamente después de la cirugía. Todos los procedimientos utilizados fueron aprobados por el Comité de Etica y Revisión Institucional. Las muestras embebidas en parafina se cortaron en secciones seriadas de 5 micras de grosor y se colocaron en trozos envueltos con polilisina, después se desparafinaron y se tiñeron con la tinción de tricrómico de mason o se procesaron para inmunohistoquímica. Las lesiones se caracterizaron utilizando las secciones teñidas con tricromico de Mason y se clasificaron de acuerdo con el criterio de la «*American Heart Association*» [21].

Brevemente, las secciones consecutivas se desparafinaron, se hidrataron y se bloquearon. Se aplicó el método de doble inmunofluorescencia. Los anticuerpos primarios fueron: anticuerpo monoclonal anti- α -actina (α -SMC, clon 1A4, Dako); anticuerpo monoclonal anti-macrófago, (CD68, EBM11, Dako) y anticuerpo policlonal anti-ADRP (Research Diagnostics RDI-PROGP40) durante 2 horas (dilución 1:100) a temperatura ambiente. Después de varios lavados, las secciones se incubaron con inmunoglobulinas TRITC anti-ratón (T1659; Sigma) e inmunoglobulinas FITC anticerdo (106-095-006; Jackson ImmunoResearch) durante 1 hora (dilución 1:50). Las secciones se analizaron en un microscopio Nikon Eclipse 80i. Las imágenes se capturaron mediante el programa Visilog 5.4 Noesis. Se corrieron controles para cada grupo de experimentos.

Resultados

Análisis de la expresión de adipofilina en células musculares lisas y macrófagos de lesiones ateroscleróticas avanzadas ricas en lípido

La figura 1 muestra una lesión aterosclerótica avanzada tipo V clasificada de acuerdo con la *American Heart Association*. La tinción inmunohistoquímica para CD68 (marcador de macrófagos) y adipofilina demostró un alto grado de colocación entre la adipofilina (en verde) y el CD68 (en rojo). También se observó un alto grado de colocación entre la adipofilina (en verde) y la α -actina (marcador de células musculares lisas). Por lo tanto, la adipofilina colocaliza con ambos tipos celulares de la vasculatura, los macrófagos y las células musculares lisas en lesiones ateroscleróticas avanzadas ricas en lípido (n=3).

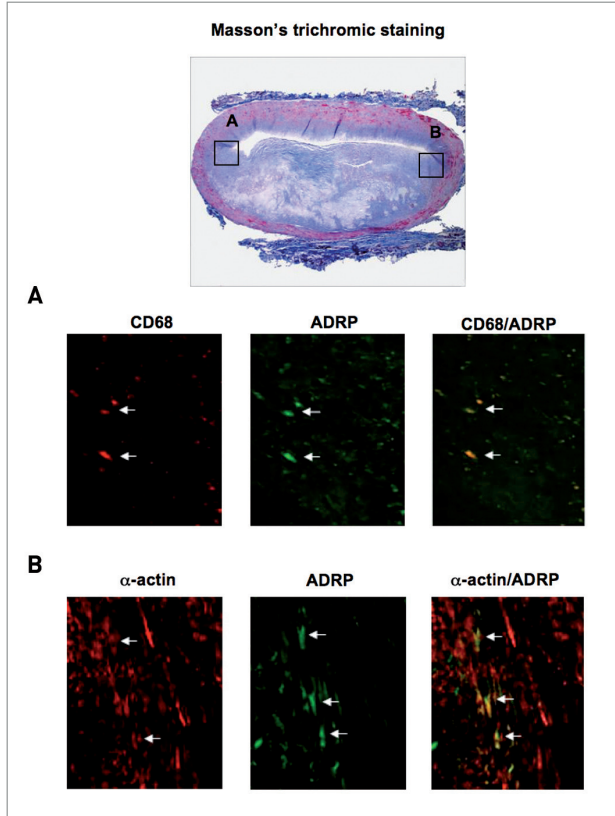


Fig. 1. Análisis de la colocalización entre la proteína ADRP y macrófagos y entre ADRP y CMLV de la pared vascular. Colocalización de ADRP (en verde) y CD68 (en rojo) (A) y colocalización de ADRP (en verde) y α -actina (en rojo) (B) en una lesión ateroesclerótica tipo V (tinción de tricrómico de Mason). Bar: 100 μ M. Las flechas muestran un alto grado de colocalización entre ADRP y células positivas para CD68 (macrófagos) y también entre ADRP y células positivas para α -actina (CMLV).

Efecto de la LDL no modificada y de la LDL modificada por agregación en la acumulación de colesterol esterificado y en la expresión de los receptores lipoproteicos LRP1, LDLR, CD36 y ABCA1 en macrófagos y células musculares lisas de la pared vascular

Por cromatografía en capa fina, se determinó el efecto de la LDL no modificada y de la LDL modificada por agregación en la acumulación intracelular de colesterol esterificado. Existe una diferencia muy importante en la acumulación lipídica inducida por un tipo u otro de lipoproteína en ambos tipos celulares (Tabla 1). La LDL modificada por agregación (100 μ g/mL; 24 horas) indujo una elevada concentración de colesterol esterificado desde niveles indetectables hasta 77,09 \pm 1,2 μ g/mg proteína en macrófagos y hasta

75 \pm 3 μ g/mg proteína en CMLV. En cambio la LDL no modificada indujo una alteración significativa pero leve de la concentración intracelular de colesterol esterificado, hasta 10,25 \pm 0,54 μ g/mg proteína en macrófagos y hasta 25,42 \pm 2,24 μ g/mg proteína en células musculares lisas durante el mismo tiempo de exposición.

Por PCR tiempo real, se analizó la expresión ARNm de los genes LRP1, LDLR, CD36 y ABCA1 en células musculares lisas y macrófagos (Tabla 1). El receptor LDL se redujo de forma muy importante por ambas LDL no modificadas y modificadas por agregación en los dos tipos celulares. En contraste, la expresión en ARNm de LRP1 no se reguló por LDLs en macrófagos y se reguló significativamente a la alza en células musculares lisas vasculares (nLDL: 1,69 \pm 0,31-veces versus agLDL: 2,70 \pm 0,25-veces en 48 horas de incubación), como se ha descrito previamente [14]. El receptor scavenger CD36 no se modificó significativamente por ninguno de los tipos de LDL ni en macrófagos ni en células musculares lisas de pared vascular. Sorprendentemente, la expresión de ARNm del gen ABCA1 se reguló a la alza por agLDL tanto en macrófagos (1,34 \pm 0,10 veces a las 24 horas, 1,67 \pm 0,04 veces a las 48 horas) como en CMLV (1,38 \pm 0,18 veces a las 24 horas, 1,40 \pm 0,11 veces a las 48 horas).

Efecto de la LDL modificada por agregación en la expresión en ARNm y proteína del gen de adipofilina en macrófagos y células musculares lisas de la pared vascular

La LDL modificada por agregación demostró una alta capacidad para inducir la overexpresión de adipofilina en macrófagos (2,67 veces a las seis horas; 3,06 veces a las 12 horas) (Figura 2). En células musculares lisas de la pared vascular, la LDL modificada por agregación también indujo de forma muy importante la expresión de ARNm de adipofilina pero a tiempos de exposición mas largos (1,36 veces a las doce horas; 3,50 veces a las 24 horas) (Figura 2). La regulación a la alza de la adipofilina en los dos tipos celulares se mantuvo a lo largo del tiempo. En contraste, la expresión de ARNm de la adipofilina aumentó solo ligeramente por LDL no modificada tanto en macrófagos (1,6 veces a las 24 horas) como en células musculares lisas de la pared vascular (1,68 veces a las 24 horas).

La expresión de proteína de adipofilina también se reguló de forma muy importante por LDL modificada por agregación (100 μ g/mL, 24 horas) en macrófagos (8,58 veces) y células musculares lisas vasculares (3,71 veces) (Figura 3). Sin embargo, la LDL no modificada apenas alteró los niveles de proteína de adipofilina en estas células (macrófagos: 1,84 veces; musculares lisas: 2,11 veces). En concordancia

Tabla 1. Acumulación intracelular de colesterol esterificado (CE) y niveles de expresión de ARNm de LRP1,LDLR, CD36 y ABCA1 en macrófagos y CMLV

Macrófagos

tiempo (horas)	24			48		
	Control	LDLn	LDLag	Control	LDLn	LDLag
Acumulación CE	No detectable	10.25 ± 0,54 *	77.09 ± 1.2 *†	No detectable	11.54 ± 1,98 *	100.4 ± 2.3 *†
ARNm LRP1	1±0	1.11 ± 0	1.04 ± 0.045	1 ± 0	1.0 ± 0.13	1.02 ± 0.10
ARNm LDLR	1±0	0.12 ± 0.01 *	0.042 ± 0.07*†	1 ± 0	0.068 ± 0.03*	0.050 ± 0,009*†
ARNm CD36	1±0	1.06 ± 0.06	1.16 ± 0.1	1 ± 0	0.89 ± 0.1	0.98 ± 0,04
ARNm ABCA1	1±0	0.98 ± 0.15	1.34 ± 0.10*†	1 ± 0	1.29 ± 0.17	1.67 ± 0,04*†

CMLV

tiempo (horas)	24			48		
	Control	LDLn	LDLag	Control	LDLn	LDLag
Acumulación CE	nodetectable	25.42 ± 2.24 *	75 ± 3 *†	nodetectable	26.35 ± 1.20 *	95 ± 2.5 *†
ARNm LRP1	1±0	1.50 ± 0.35 *	2.20 ± 0.30 *†	1 ± 0	1.69 ± 0.31*	2.70 ± 0.25*†
ARNm LDLR	1±0	0.15 ± 0.02 *	0.16 ± 0.05*	1 ± 0	0.16± 0.04*	0.25 ± 0.02*
ARNm CD36	1±0	0.92 ± 0.03	0.89 ± 0.018	1 ± 0	0.87± 0.03	0.97 ± 0.02
ARNm ABCA1	1±0	0.97 ± 0.07	1.38 ± 0.18*†	1 ± 0	1.11± 0.08	1.40 ± 0.11*†

Los macrófagos y las CMLV se incubaron en ausencia o presencia de LDLn o LDLag (100 µg/mL) durante 24 o 48 horas. Al final de este periodo, la concentración intracelular de colesterol esterificado (CE) se analizó por cromatografía en capa fina después de realizar la extracción lipídica. Los niveles de expresión de LRP1, LDLR, CD36 y ABCA1 se analizaron por PCR a tiempo real como se describe en Métodos. Los resultados de acumulación de CE se expresaron en microgramos de CE por mg de proteína. Los niveles de ARNm de los diferentes genes se expresaron en unidades arbitrarias y se normalizaron utilizando como control endógeno la *gapdh* para CMLV y *18sR-NA* para macrófagos. Los resultados se muestran como la media ± SEM de tres experimentos realizados en duplicado. * P<0.05 vs células control, † P<0.05 vs células expuestas a LDLn.

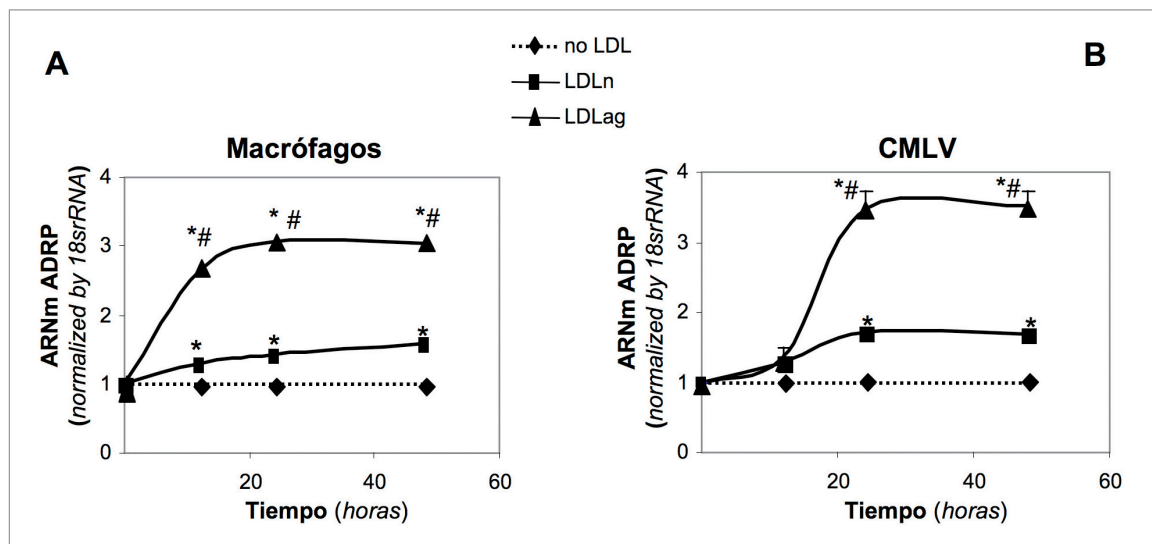


Fig. 2. Dependencia del tiempo en la expresión de ARNm de ADRP en respuesta a la exposición de las células a LDL no modificada y LDL-Lag. Los macrófagos (A) y las CMLV (B) se incubaron en ausencia (rombos), o presencia de LDL no modificada (LDLn, cuadrados) o LDL-Lag (triángulos) (100 µg/mL) durante periodos crecientes de tiempo. Las gráficas muestran la cuantificación por PCR a tiempo real de la expresión en ARNm de ADRP. Los datos se procesaron con un «software» especial basado en los Ct de cada muestra y se normalizaron por la expresión de ARNm del gen endógeno 18srRNA en los macrófagos y por la del endógeno *gapdh* en CMLV (n=3). *p<0.05 versus células control; # versus células expuestas a LDL no modificada.

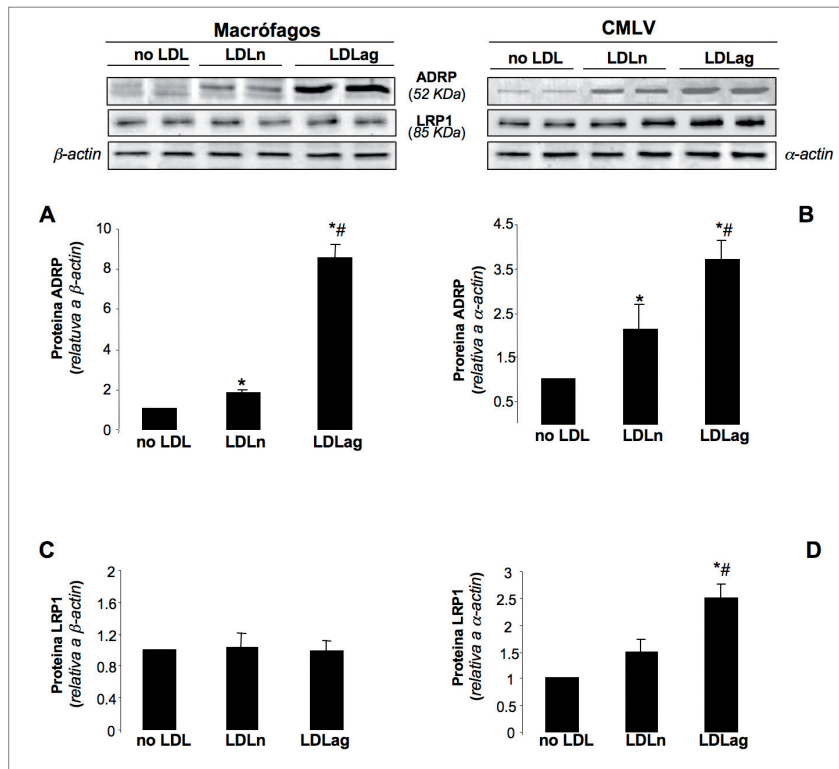


Fig. 3. Efecto de la LDL no modificada y de la LDLag en la expresión de ADRP y de LRP1. «Western blot» representativo que muestra la expresión proteica de ADRP y de LRP1 (βchain), así como de la proteína utilizada para normalizar, actina en macrófagos y CMLV incubados con LDL no modificada o LDLag (100 µg/mL, 24 horas). Gráfico de barras que muestra la cuantificación de las bandas de ADRP en macrófagos (A) y CMLV (B), y la cuantificación de las bandas de LRP1 en macrófagos (C) y CMLV (D) incubados en ausencia o presencia de LDL no modificada o LDLag. Los resultados se expresan como el porcentaje de expresión referido a las células control (incubadas en ausencia de LDL) y se muestran como la media ±SEM (n=3). *p<0.05 versus células control; # p<0.05 versus células expuestas a LDL no modificada.

con resultados obtenidos en nuestro grupo [14], y con la capacidad de la LDL modificada por agregación para inducir la expresión de LRP1 (Tabla 1), la LDL modificada por agregación indujo la expresión proteica de LRP1 en 2,50 veces en células musculares lisas (Figura 3). Sin embargo, la sobreexpresión de adipofilina inducida por LDL modificada por agregación en macrófagos se produjo sin un incremento paralelo de LRP1 (Figura 3).

Discusión

La agregación de las LDLs es una de las modificaciones más importantes de la LDL en la intima arterial ya que la mayor parte de la LDL se encuentra asociada a los proteoglicanos de la matriz extracelular en la intima arterial [4,5]. La LDL modificada por agregación induce una alta concentración intracelular de colesterol esterificado en dos de los tipos celulares que están estrechamente relacionados con la aterosclerosis, las CMLV y los macrófagos [6-14]. El LRP1 está involucrado en la captación de LDLag en los macrófagos [6-8] y en las CMLV [11-14]. En los macrófagos, donde la expresión basal de LRP1 es superior a la de las CMLV, el efecto de la LDLag en la expresión de ADRP requiere menos tiempo. El nivel de expresión basal de LRP1 en macró-

fagos es superior porque se ha descrito que hay una inducción de la expresión de LRP1 durante la diferenciación de monocito a macrófago [22] y, además, el M-CSF utilizado en los experimentos in vitro para la diferenciación de monocito a macrófago también se ha descrito que favorece la sobreexpresión de LRP1 [23].

En macrófagos e interesantemente también en CMLV humanas, la overexpresión de ADRP inducida por LDLag fue muy superior a la inducida por la LDL nativa, sugiriendo una importante relación entre la overexpresión de ADRP y la acumulación intracelular de colesterol esterificado en estos dos tipos celulares. La elevada capacidad de la LDLag para inducir la expresión de ADRP también la tienen otros tipos de LDL modificada tales como la LDL oxidada [24] o la LDL modificada enzimáticamente [25] que también inducen una alta concentración intracelular de colesterol esterificado en los macrófagos. Por lo tanto, LDLag, LDL oxidada y LDL modificada enzimáticamente, las cuales se interiorizan por diferentes mecanismos, ejercen un efecto común sobre la expresión de ADRP. En consecuencia, la expresión de ADRP en los macrófagos parece estar más relacionada con la capacidad de las lipoproteínas modificadas de interiorizar lípido a las células que con el mecanismo in-

volucrado en la captación de la LDL modificada. En contraste con la alta capacidad de diferentes lipoproteínas modificadas para inducir acumulación lipídica en macrófagos, la agregación de la LDL es la única modificación de la LDL capaz de inducir la acumulación de colesterol en las CMLV [26]. La captación de LDLag por las CMLV es por tanto el principal mecanismo para la formación de célula espumosa a partir de CMLV. La LDLag induce en paralelo la sobreexpresión de ADRP y la de LRP1 en CMLV [14]. Sin embargo, la LDLag no alteró significativamente la expresión del receptor *scavenger* CD36 ni en macrófagos ni en CMLV. De hecho, el CD36 parece estar positivamente regulado por LDL oxidadas mediante vías de señalización mediadas por proteína quinasa [27]. La inducción de LRP1 y ADRP por las LDLag puede conducir a la acumulación progresiva de colesterol esterificado en CMLV. Las LDLag también indujeron significativamente la expresión de ABCA1, una proteína que media la generación de HDL, en CMLV y macrófagos. Nuestros resultados están de acuerdo con previos resultados que demuestran la modulación positiva de la transcripción de ABCA1 por el colesterol intracelular [28]. La regulación a la alza de ABCA1 por colesterol se produce mediante una regulación a la baja de los niveles de SREBP-2 [29]. En nuestro grupo hemos demostrado previamente que la LDLag reduce la forma activa de SREBP-2 tanto en macrófagos [30] como en CMLV [14]. Por consiguiente, la LDLag podría regular a la alza la expresión de ABCA1 mediante la regulación a la baja de SREBP-2.

Aunque se sabe que existe una gran abundancia de ARNm de ADRP en las áreas ricas en macrófagos de las lesiones ateroscleróticas [27], se desconoce el papel de la sobreexpresión de ADRP en la formación de células espumosas a partir de CMLV. Los estudios inmunohistoquímicos de este trabajo demuestran una importante colocalización entre ADRP y macrófagos también entre ADRP y CMLV en las placas ateroscleróticas avanzadas ricas en lípido.

En resumen, la LDLag induce la sobreexpresión del ARNm y la proteína de ADRP en CMLV y macrófagos. Dado que la proteína ADRP está altamente expresada en macrófagos y CMLV de las placas ateroscleróticas avanzadas ricas en lípido, la captación de LDLag mediada por LRP1 juega probablemente un papel primordial en la formación de células espumosas que tiene lugar durante la progresión de las lesiones ateroscleróticas.

Agradecimientos

Este estudio se ha realizado gracias a los fondos del FIS PI051717, PN-SAF2006-10091, CB06/03, REDINCOR 06/003 y FUNDACIÓN MAPFRE.

Los autores agradecen la colaboración del equipo de Transplantes de Corazón de la División de Cardiología y Cirugía Cardíaca del Hospital de la Santa Creu I Sant Pau y también la del Banco de Sangre del Hospital de la Vall de Hebron. Los autores agradecen la ayuda técnica de Laura Nasarre. ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (part I). *N Engl J Med* 1992; 326:242-50.
2. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and acute coronary syndromes (part II). *N Engl J Med* 1992; 326:310-8.
3. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew T, Khoo J, Witztum J. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320:915-24.
4. Camejo G, Fager G, Rosengren B, Hurt-Camejo E, Bondjers G. Binding of low density lipoproteins by proteoglycans synthesized by proliferating and quiescent human arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1993; 268:14131-7.
5. Olsson U, Camejo G, Hurt-Camejo E, Elfsber K, Wiklund O, Bondjers G. Possible functional interactions of apolipoprotein B-100 segments that associate with cell proteoglycans and the apoB/E receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:149-55.
6. Khoo JC, Miller E, Mc Loufhlín P, Steinberg D. Enhanced macrophage uptake of low density lipoprotein after self-aggregation. *Arteriosclerosis* 1988; 8:348-58.
7. Zhang WY, Gaynor PM, Kruth HS. Aggregated low density lipoprotein induces and enters surface-connected compartments on human monocyte-macrophages. *J Biol Chem* 1997; 272:31700-6.
8. Buton X, Mamdouh Z, Ghosh R, Du H, Kuriakose G, Beatini N et al. Unique cellular events occurring during the initial interaction of macrophages with matrix-retained or methylated aggregated low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1999; 274:32112-21.
9. LLorente-Cortés V, Martínez-González 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; 18:738-46.
10. LLorente-Cortés V, Martínez-González J, Badimon L. Differential cholesteryl ester accumulation in two human vascular smooth muscle cell subpopulations exposed to aggrega-

- ted LDL: effect of PDGF-stimulation and HMG-CoA reductase inhibition. *Atherosclerosis* 1999; 144:335-42.
11. Llorente-Cortés V, Martínez-González J, Badimon L. LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1572-9.
 12. Llorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Hurt-Camejo E, Martínez-González J, Badimon L. Human coronary smooth muscle cells internalize versican-modified LDL through LDL receptor-related protein and LDL receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:387-93.
 13. Llorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Badimon L. Differential role of heparan sulfate proteoglycans on aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells and mouse embryonic fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1905-11.
 14. Llorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Sánchez S, Rodríguez C, Badimon L. Low density lipoprotein upregulates low density lipoprotein receptor-related protein expression in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2002; 106:3104-10.
 15. Llorente-Cortés V, Badimon L. LRP1 and the vascular wall. Implications for atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:497-504.
 16. de Roos B, Duivenvoorden I, Rucklidge G, Reid M, Ross K, Lamers RJ, et al. Response of apolipoprotein E*3-Leiden transgenic mice to dietary fatty acids: combining liver proteomics with physiological data. *FASEB J*. 2005 (en prensa).
 17. Exil VJ, Roberts RL, Sims H, McLaughlin JE, Malkin RA, Gardner CD et al. Very-long-chain acyl-coenzyme a dehydrogenase deficiency in mice. *Circ Res* 2003; 93:448-55.
 18. Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz H-R, Keenan TW. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and disease. *Cell Tissue Res* 1998; 294:309-21.
 19. Brasaemle DL, Barber T, Wolins NE, Serrero G, Blanchette-Mackie EJ, Londos C. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J Lipid Res* 1997; 38:2249-63.
 20. Larigauderie G, Furman C, Jaye M, Lasselin C, Copin C, Fruchart J-C, et al. Adipophilin enhances lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP-1 macrophages: Potential role in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:504-10.
 21. Stary HC. Composition and classification of human atherosclerotic lesions. *Virchows. Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992; 421:277-90.
 22. Hussaini IM, Srikumar K, Quesenberry PJ, Gonias SL. Colony stimulating factor-1 modulates a-macroglobulin receptor expression in murine bone marrow macrophages. *J Biol Chem* 1990; 265:19441-6.
 23. Watanabe Y, Inaba T, Shimano H, Gotoda T, Yamamoto K, Mokuno H et al. Induction of LDL receptor-related protein during the differentiation of monocyte-macrophages. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:1000-6.
 24. Imamura M, Inoguchi T, Ikuyama S, Taniguchi S, Kobayashi K, Nakashima N et al. ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283:E775-E783.
 25. Buechler C, Ritter M, Duong CQ, Orso E, Kapinsky M, Schmitz G. Adipophilin is a sensitive marker for lipid loading in human blood monocytes. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1532:97-104.
 26. Tertov VV, Orekhov AN, Sobenin IA, Gabbasov ZA, Popov EG, Yaroslovov AA, et al. Three types of naturally occurring modified lipoproteins induce intracellular lipid accumulation due to lipoprotein aggregation. *Circ Res* 1992; 71:218-28.
 27. Forcheron F, Legedz L, Chinetti G, Feugier P, Letexier D, Bricca G, et al. Genes of cholesterol metabolism in human atheroma: overexpression of perilipin and genes promoting cholesterol storage and repression of ABCA1 expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:1711-7.
 28. Venkateswaran A, Laffitte BA, Joseph SB, Mak PA, Wilpitz DC, Edwards PA, et al. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:12097-102.
 29. Zeng L, Liao H, Liu Y, Lee TS, Zhu M, Wang X, et al. Sterol-responsive element-binding protein (SREBP) 2 down-regulates ATP-binding cassette transporter A1 in vascular endothelial cells: a novel role of SREBP in regulating cholesterol metabolism. *J Biol Chem* 2004; 279:48801-7.
 30. Llorente-Cortés V, Royo T, Otero-Viñas M, Berrozpe M, Badimon L. Sterol regulatory element binding proteins downregulate LDL receptor-related protein (LRP1) expression and LRP1-mediated aggregated LDL uptake by human macrophages. *Cardiovasc Res* 2007; 74:526-36.

Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.