



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Efectos de la hipercolesterolemia sobre monocitos/macrófagos y la inmunidad innata

Oscar Rafael Escate Chávez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

**Efectos de la hipercolesterolemia sobre
monocitos/macrófagos y la inmunidad innata**

Oscar Rafael Escate Chávez

2016

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

**EFECTOS DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA SOBRE
MONOCITOS/MACRÓFAGOS Y LA INMUNIDAD INNATA**

Tesis presentada por:

OSCAR RAFAEL ESCATE CHÁVEZ

Para optar al grado de:

Doctor por la Universidad de Barcelona

Instituto Catalán de Ciencias Cardiovasculares (CSIC-ICCC)

El Director

El Codirector

El Tutor

El Doctorando

Prof. Lina Badimon

Dra. Teresa Padró

Dra. Dolors Serra

Rafael Escate

2016

*A mi Familia del Perú y España, Escate Ros,
Que son mi inspiración, motivación y dirección.*

AGRADECIMIENTOS

Después de un continuo aprendizaje y de experiencias vividas, llega a concretarse uno de mis sueños y objetivos, la obtención del Doctorado. En esta etapa donde la dedicación y la paciencia han sido parte fundamental de este logro.

Ante todo quiero agradecer a la Prof. Lina Badimon por brindarme la oportunidad de aprender y pertenecer a su grupo de investigación. Me llevo de recuerdo y ejemplo a seguir su capacidad resolutive para sacarle el máximo provecho en la investigación. Muchas gracias por su dirección. Dra. Teresa Padró, muchas gracias por la paciencia y la ayuda en las tantas reuniones frutos de los resultados. Así, como el compartir su criterio y experiencia para el desarrollo de esta tesis. Dra Gemma Vilahur, muchas gracias por toda la ayuda.

De forma muy especial quiero agradecer a Chema (Dr. José María Belloso), compañero en experimentales y en las tantas charlas de regulación post-transcripcional. Mientras estuvo en nuestro grupo siempre estuvo disponible en ayudarme y compartir su experiencia para poder enriquecer mi aprendizaje. Me acuerdo de sus críticas constructivas a mis ideas y criterios sobre los análisis in silico, reforzando así mi interés en las herramientas bioinformáticas. Muchas gracias por la amistad.

Quiero agradecer a las maravillosas personas con las cuales he tenido la oportunidad de compartido mesa en el comedor: Chema, Anna, Quim, Pepi, Patricia, Daniel, Ona, Esther G., Javier, Pablo, Josep, Crespo, Mónica B., Maribel, María Angels y Oriol. Gracias a ustedes las comidas fueron amenas y entretenidas con tantos diversos temas. Me siento afortunado de haberles conocido un poquito más. Nia y Esther G, gracias por la comprensión en los pedidos urgentes y de última hora de materiales de cultivos. Así, como de los aislamientos de LDL. Quizás en el

ímpetu de querer finalizar o acabar rápido los experimentos, ponía a prueba su paciencia. Sin ustedes, varios resultados hubiesen demorado.

Oriol y María Angels me llevo un buen recuerdo de ustedes. Siempre llanos en ayudarme y aconsejarme, tanto a nivel académico y personal, les tengo aprecio. Aún recuerdo los amplios temas de conversación, desde el compartir sus anécdotas hasta temas relacionados con historia, geografía, religión, política, etc. Usted Oriol tiene mucho mundo.

Javier, muchas gracias por compartir tus anécdotas y los chistes que en más del 50% me hizo reír. Usted siempre tenía alguna novedad y curiosidad sobre mi País, tanto así que fue a visitarlo por sus vacaciones. Gracias por la elección y me siento muy honrado.

Crespo, me llevo el recuerdo que sin importar tener la agenda de citometría tan congestionada, siempre le pones calma y humor. Rosa A. me llevo el recuerdo de su constancia, la amistad y las tantas conversaciones en la biblioteca. Roberta, muchas gracias por tus consejos proteicos y la disponibilidad de resolver mis inquietudes, que todo vaya bien en Suecia y muchos éxitos. Mar, Ingrid, Elena, Laura, Olivier, Ricardo, Jose, Roi, Paula, Silvia, gracias por toda la ayuda.

A todo el personal técnico que de alguna u otra forma me brindaron su ayuda en mis experimentos, le estoy muy agradecido por su tiempo y paciencia. Especialmente, muchas gracias Montse por toda tu ayuda e interés más allá de tu responsabilidad cuando yo ya no podía llegar, fuiste mis manos y mis ojos y estoy más que servido con los resultados.

Sandra, gracias por la ayuda y la siempre disponibilidad a las tantas consultas estadísticas y de genómica, acompañado de una gentiliza, paciencia y comprensión. María Borrell, me llevo de usted la dedicación que le pone en su investigación y sobre todo la priorización en avanzar y

no demorar más de lo científicamente requerido. Son características muy apreciadas para enriquecer mi experiencia. Rosa S. muchas gracias por la ayuda.

Como dejar de mencionar a mis compañeros y colegas de la Facultad de Farmacia y la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona que con ellos compartí laboratorio, anécdotas, deportes y fiestas durante la obtención de mis Masters, como Karel, Enric, Maxime, Albert, Marçal, Francesc, Josep, Vicente, Sergi, Miguel, Victor, Mariona, Roser, Janna, Anna y de los Doctores que me dieron su aprecio como Santi, Narciso, Dolors, Lluisa, Monserrat, Francisco. Gracias por su amistad que aún perdura.

A mis amigos, compañeros, profesores y luego colegas de profesión de la Universidad Nacional Federico Villarreal, Universidad Nacional Mayor San Marcos y Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins, muchas gracias por sus consejos que me animaron a migrar e iniciar mi travesía en el post-grado.

Todo esto no hubiese sido posible sin la educación, sacrificio y confianza que mis Padres, Oscar y Dalila, me brindaron de muy pequeño, estoy eternamente agradecido que ni en dos vidas podría retribuir lo que hicieron por mí. Mi familia consanguínea está en Perú, pero aquí también conseguí una familia y me siento muy contento de pertenecer a ella. Muchas gracias Meritxell, Julia y Joaquim, ustedes apostaron y siguen apostando por mí. Gracias por tratarme como un hijo.

Para ser justicia debería de haber escrito más cosas, sin embargo no quisiera ser tedioso en ello. Al terminar esta etapa, me llevo algo de ustedes y ustedes tienen algo de mí. Esta es mi mejor despedida entre nosotros. Hasta luego

PREFACIO

La respuesta inmunitaria innata mediada por el monocito - macrófago, cumple una función importante en la iniciación, progresión y resolución de la aterosclerosis. Esta enfermedad conlleva al desarrollo de patologías cardiovasculares, que son la primera causa de muerte de las llamadas enfermedades no transmisibles a nivel mundial.

La aterosclerosis es un proceso patológico dinámico que se caracteriza por el acúmulo de lípidos en pared arterial, como consecuencia del alto nivel de colesterol plasmático, lo cual es potenciado por las mutaciones en el receptor de la LDL. Estas mutaciones son una de las características moleculares determinantes de la hipercolesterolemia familiar, enfermedad autosómica dominante que en su forma heterocigota afecta a 1 de cada 500 habitantes.

La migración del monocito al espacio subendotelial promueve su diferenciación a macrófago. Además, la LDL infiltrada sufre modificaciones aterogénicas, que facilitan su internalización por los macrófagos. Cuando la homeostasis del colesterol intracelular está afectada, la acumulación descontrolada del colesterol transforma el macrófago en célula espumosa, que es un marcador celular temprano de la lesión aterosclerótica.

La presente Tesis ha sido realizada en el grupo de investigación de la Profesora Lina Badimon, Directora del Instituto Catalán de Ciencias Cardiovasculares (ICCC). Específicamente, el trabajo de esta tesis pretende expandir el conocimiento existente sobre los procesos moleculares y funciones que ocurren tanto en el monocito

como en el macrófago humano, cuando son expuestos a concentraciones patológicas de LDL en su forma nativa o agregada. Estas formas son representativas de la circulación periférica o de las lesiones ateroscleróticas. Para el desarrollo de esta investigación se han realizado ensayos moleculares y análisis *in silico*. Los resultados de esta tesis aportan nuevos conocimientos sobre la regulación de genes y proteínas por la LDL, siendo de potencial interés su uso como futuras dianas terapéuticas.

INDICE DE CONTENIDOS

PREFACIO	XIII
INDICE DE CONTENIDOS	XVIII
INDICE DE FIGURAS	XXIII
INDICE DE TABLAS	XXVII
ABREVIACIONES	XXXI
I. INTRODUCCION	1
1. Enfermedad cardiovascular	3
2. Aterosclerosis	5
2.1. Lipoproteínas	6
2.1.1. Composición	7
2.1.2. Lipoproteínas de baja densidad (LDL)	8
2.1.3. Modificación de la LDL	9
2.2. Receptores de LDL	12
2.2.1. Familia de receptores “scavengers”	12
2.2.2. Familia de receptores de LDL	13
2.3. Composición de la pared arterial	15
2.4. Evolución anatomopatológica de la aterosclerosis.....	16
2.5. Fisiopatología de la aterosclerosis	17
2.5.1. Formación de la lesión inicial.....	17
2.5.2. Progresión de la lesión.....	19
2.5.3. Lesiones avanzadas y complicación	20
3. Inmunidad innata	22
3.1. Monocito	22
3.1.1. Subtipos por expresión de CD14 y CD16	22
3.1.2. Quimiotaxis, infiltración vascular	25
3.1.3. Apoptosis celular	27
3.2. Macrófago.....	32
3.2.1. Captación de lipoproteínas	32
3.2.2. Metabolismo celular del colesterol	34
3.2.3. Activación de la inmune innata	36
3.2.4. Polarización del macrófago	39
4. Factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular	41

4.1. Dislipemia	42
4.1.1. Clasificación.....	44
4.1.2. Hipercolesterolemia familiar (FH)	45
5. RNA no codificante	50
5.1. RNA no codificante largo (lncRNA)	51
5.2. MiRNAs	52
5.2.1. Organización genómica del miRNA y biogénesis.....	53
5.2.2. Mecanismo de regulación	57
5.2.3. MiRNAs en la patología vascular	59
6. Aspectos pendientes de resolver	60
II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	63
III. MATERIALES Y METODOS	67
1. Diseño experimental	69
2. Población de estudio.....	70
2.1. Variables clínicas.....	74
2.2. Obtención de la muestra sanguínea.....	75
3. Preparación de Lipoproteínas.....	76
3.1. Aislamiento de LDL	76
3.2. Cuantificación y pureza de la LDL	76
3.3. Obtención de agLDL.....	77
4. Cultivo celulares	78
4.1. Aislamiento de monocitos humanos y diferenciación a macrófago	78
4.2. Medio de cultivo celular	79
4.3. Tratamiento con LDL.....	79
4.4. Tratamiento con agLDL	80
4.5. Respuesta inflamatoria	80
4.6. Análisis funcional	81
4.7. Tinción de lípidos	81
5. Análisis de RNA.....	82
5.1 Extracción y cuantificación	82
5.2 PCR a tiempo real.....	83
5.3. Análisis de datos generados mediante PCR a tiempo real	87

6. Métodos <i>in silico</i> en el análisis de miRNAs y genes diana	88
6.1. Anotación de los miRNAs	88
6.2. Herramientas computacionales.....	89
6.3. Diseño del análisis <i>in silico</i>	90
7. Análisis de proteínas	92
7.1 Extracción y cuantificación de proteínas	92
7.2 Western blot.....	93
8. Análisis estadístico	94
9. Métodos adicionales	95
IV. RESULTADOS	97
Artículo 1.....	101
Artículo 2.....	125
Artículo 3.....	151
V. DISCUSIÓN GLOBAL.....	191
VI. CONCLUSIONES	207
VII. PARTICIPACIÓN EN LOS ARTÍCULOS.....	211
VIII. BIBLIOGRAFÍA	215

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Presentación de las enfermedades cardiovasculares.....	3
Figura 2. Muertes por enfermedades no transmisibles.....	4
Figura 3. Progresión de la aterosclerosis en la población general.....	6
Figura 4. Estructura general de las lipoproteínas.	7
Figura 5. Composición de las lipoproteínas.....	8
Figura 6. Agregación de la LDL por proteoglicanos.....	10
Figura 7. Miembros de la familia LRP.....	14
Figura 8. Estructura de la pared arterial.....	16
Figura 9. Integridad endotelial.....	18
Figura 10. Evolución esquemática de la lesión aterosclerótica.....	21
Figura 11. Receptor CD14.....	23
Figura 12. Receptor CD16.....	24
Figura 13. Reclutamiento del monocito.....	27
Figura 14. Regulación de la apoptosis.....	31
Figura 15. Captación de lipoproteínas, eflujo del colesterol por el macrófago.....	39
Figura 16. Mecanismo de las mutaciones en FH.....	47
Figura 17. Efecto de las estatinas.....	48
Figura 18. Clasificación del RNA humano.....	50
Figura 19. Interacción entre lncRNA y miRNA.....	52
Figura 20. Regiones y tipo de agrupación de los miRNAs.....	54
Figura 21. Regiones de la estructura secundaria del pri-miR.....	55
Figura 22. Biogénesis de los miRNAs vs otros RNAs pequeños.....	57
Figura 23. Regulación de los microRNAs.....	58
Figura 24. Esquema del diseño experimental en humanos.....	69
Figura 25. Diseño de los subestudios de población SAFEHEART.....	72
Figura 26. Microscopia electrónica de la LDL.....	77
Figura 27. Citomorfología del monocito y macrófago.....	78
Figura 28. Esquema del tratamiento con nLDL.....	79
Figura 29. Esquema del tratamiento con agLDL.....	80
Figura 30. Presencia de lípido intracelular.....	82
Figura 31. Proceso para la anotación del miRNA.....	88
Figura 32. Esquema del diseño del in silico.....	90
Figura 33. Red obtenida mediante el IPA.....	92

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. LDL aterogénicas.	9
Tabla 2. Receptores “scavengers” y ligandos lipoproteicos.....	13
Tabla 3. Clasificación de la lesión aterosclerótica	17
Tabla 4. Clasificación de los factores de riesgo	42
Tabla 5. Guía de manejo clínico de acuerdo al objetivo óptimo de los parámetros lipídicos	44
Tabla 6. Clases de dislipemia primaria	45
Tabla 7. MiRNAs relacionados con la aterosclerosis.....	59
Tabla 8. Subestudios de la población SAFEHEART.	74
Tabla 9. Síntesis de cDNA y PCR en "array" de miRNAS.....	84
Tabla 10. Genes y mirnas analizados por sondas individuales.	85
Tabla 11. Síntesis de cDNA y PCR para genes y miRNAs por sondas individuales.	86
Tabla 12. Síntesis de cDNA y PCR en "array" de genes.....	87
Tabla 13. Bases de datos de predicción.....	89
Tabla 14. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas.	93

ABREVIACIONES

ABCA1	Transportador dependiente de la unión a ATP subfamilia A miembro 1
ABCG1	Transportador dependiente de la unión a ATP subfamilia G miembro 1
ACAT1	Acetil CoA: acetiltransferasa 1
ACEH	Colesteril éster hidrolasa ácida
ADAR	Adenosina desaminasa que actúa sobre el RNA
agLDL	LDL agregada
Ago	Proteína argonauta
APAF-1	Factor 1 activador de peptidasa apoptótica
Apo	Apolipoproteína
BAX	Proteína X asociada a BCL2
BCA	Ácido bicinconínico
BCL2	Proteína 2 de linfoma de células B
Bid	Dominio de muerte agonista de interacción BH3
BSA	Albúmina de suero bovino
CC	Cristales de colesterol
CCL	Quimioquina motivo CC ligando
CCR	Quimioquina motivo CC receptor
CD	“Cluster” de diferenciación
cDNA	DNA complementario
CE	Ésteres de colesterol
CM	Quilomicrones
CpG	Citosina guanina enlazada por fosfato
CXCL	Quimioquina motivo CXC ligando
CXCR	Quimioquina motivo CXCR receptor
DAG	Diacilglicerol
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño

ABREVIACIONES

DD	Dominio de muerte
DGCR8	Proteína 8 de la región crítica de DiGeorge
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DR5	Receptor de muerte 5
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ER	Retículo endoplasmático
Exp5	Exportina-5
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas
FC	Colesterol libre
FH	Hipercolesterolemia familiar
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GTP/GDP	Guanosina trifosfato/Guanosina difosfato
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HMGCR	3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa
HMOX-1	Hemo oxigenasa 1
HSC	Célula madre hematopoyética
ICAM1	Molécula de adhesión intercelular 1
IFN	Interferón
IL	Interleucina
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia
IRF	Factor regulador de interferón
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLR	Receptor de la LDL
LFA1	Antígeno 1 asociado a la función del linfocito

LisoPC	Lisofosfatidilcolina
LLT	Terapia hipolipemiente
lncRNA	RNA no codificante largo
LPS	Lipopolisacárido
LRP	Proteína relacionada al receptor de la LDLR
LXR-RXR	Heterodímero receptor X hepático-receptor X retinoide
MCP-1	Proteína 1 quimioatrayente de monocitos
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófago
MDA	Ácido malondealdehído
miR	microRNA
mRNA	RNA mensajero
Nanog	“Homeobox” Nanog
NCEH	Neutral colesterol éster hidrolasa
ncRNA	RNA no codificante
nLDL	LDL nativa
NO	Óxido nítrico
NPC1L1	Proteína de Niemann-Pick C1L1
nt	Nucleótido
oxLDL	LDL oxidada
p53	Proteína de tumor p53
PBL	Leucocitos de sangre periférica
PBMN	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena polimerasa
PCSK9	Proteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9
PPAR	Receptor activado proliferador de peroxisomas

ABREVIACIONES

pre-miR	MicroRNA precursor
pri-miR	MicroRNA primario
PU.1	Pro-oncogén SPI1
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RUNX1	Factor de transcripción relacionado a RUNT1
SBREP-2	Proteína de unión al elemento regulador esterol 2
SDS	Dodecilsulfato de sodio
Sox2	Caja 2 relacionada con SRY
ssRNA	RNA de cadena sencilla
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
tBid	Bid truncado
TBX21	Factor de transcripción caja T 21
TLR	Receptor tipo “toll”
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
VCAM1	Molécula de adhesión celular vascular 1
VLA4	Antígeno muy tardío 4
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
VSMC	Células musculares lisas vasculares
WHHL	Conejo Watanabe con hiperlipidemia hereditaria

I. INTRODUCCION

1. Enfermedad cardiovascular

La enfermedad cardiovascular se refiere a todas las enfermedades del corazón y del sistema circulatorio, que dependiendo del área afectada muestran diferentes manifestaciones clínicas^{1,2}. Presenta un carácter multisistémico que frecuentemente afecta a varios lechos vasculares conocidos como:

Enfermedad coronaria: Es causada por problemas de irrigación sanguínea al músculo cardíaco. En consecuencia, conlleva a una menor disponibilidad de oxígeno (isquemia).

Enfermedad cerebrovascular: Es debida a la disrupción de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro, causada por la isquemia o rotura.

Enfermedad arterial periférica: Es causada por problemas de la irrigación vascular en los brazos y piernas.

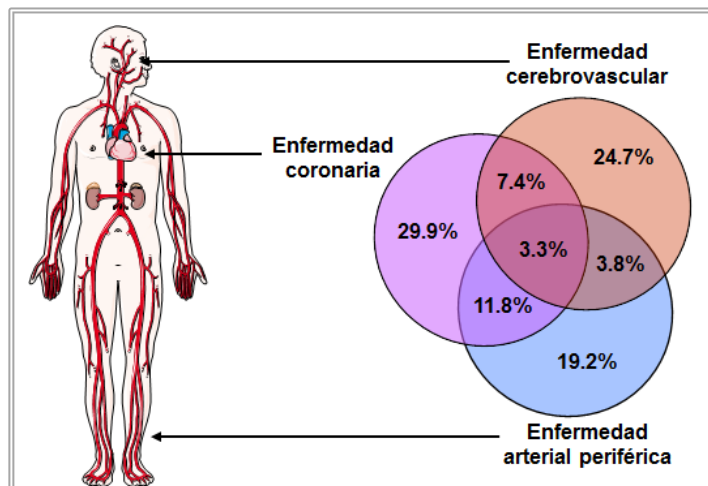


Figura 1. Presentación de las enfermedades cardiovasculares. Porcentaje de los principales eventos vasculares. Datos adquiridos y adaptados del comité directivo de CAPRIE².

Estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2012) mostraron que del total de 56 millones de muertes anuales a nivel mundial, 38 millones corresponden a las llamadas enfermedades no transmisibles. Estas son lideradas por las enfermedades cardiovasculares con 17,5 millones de muertes³, de las cuales aproximadamente el 52% se producen antes de los 70 años de edad, teniendo un efecto de muerte prematura sobre la población (**Figura 2**).

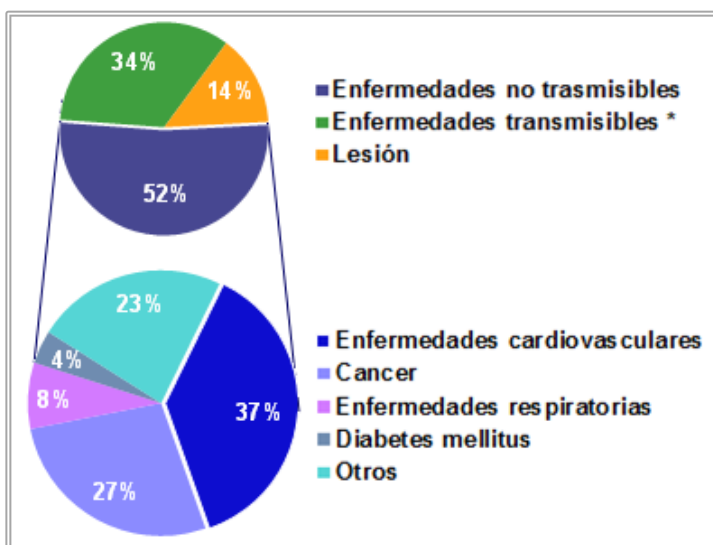


Figura 2. Muertes por enfermedades no transmisibles. Datos adquiridos y adaptados de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2012). * Incluye las de origen maternal, perinatal y nutricional.

Igualmente estudios publicados por la Sociedad Española de Cardiología (SEC, 2013), ponen en evidencia que las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de mortalidad en Galicia, Andalucía y Asturias, las áreas con mayor número de eventos. En cambio, en regiones como Canarias, Madrid y País Vasco tienen menor mortalidad cardiovascular. Se estima que para el 2020 el coste de esta patología será de 8,8 millones

de euros, con un gasto de 180 € por persona y una pérdida productiva de 2 millones de euros (SEC, 2013), representando un enorme coste sanitario y económico en la sociedad.

Tradicionalmente las enfermedades cardiovasculares han estado vinculadas solamente a la acumulación de lípidos en la pared arterial y el posterior bloqueo del flujo sanguíneo. Sin embargo, hoy en día es ampliamente aceptado que el desarrollo y progresión de la lesión aterosclerótica, deriva de una compleja interacción entre componentes celulares y moleculares de la sangre y pared arterial. Así, la pared arterial como órgano especializado, cumple una función importante en la respuesta a procesos inflamatorios⁴.

La respuesta inflamatoria es dada por el impacto de los factores de riesgo y la predisposición genética de las células endoteliales en las arterias. Esto causa la activación del sistema inmune incluyendo factores de transcripción, citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión. Por lo tanto, se crea un entorno que favorece la adhesión de los monocitos de la circulación periférica al endotelio. La infiltración de los monocitos en la íntima vascular, es un factor clave del desarrollo de la aterosclerosis, ya que producirá una cascada de procesos inflamatorios que conllevan finalmente a la rotura de placas inestables y el proceso trombótico.

2. Aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica, compleja y dinámica que afecta a las arterias de mediano y gran calibre. Esta enfermedad es la principal causa de enfermedad cardiovascular. El proceso de la aterosclerosis comienza en edad temprana y avanza de forma silente durante la adolescencia y la adultez, hasta que se observa

sus complicaciones clínicas⁵⁻⁷. La aterosclerosis se caracteriza por la pérdida de elasticidad de la capa íntima y media de la arteria.

La lesión o placa de ateroma está compuesta de lípidos, tejido fibromuscular, monocitos y macrófagos^{8,9}. La progresión de la lesión conlleva a la formación local de trombo y la oclusión de la arteria. La relación entre aterosclerosis y su complicación a un proceso trombótico, se conoce como el término aterotrombosis (**Figura 3**).

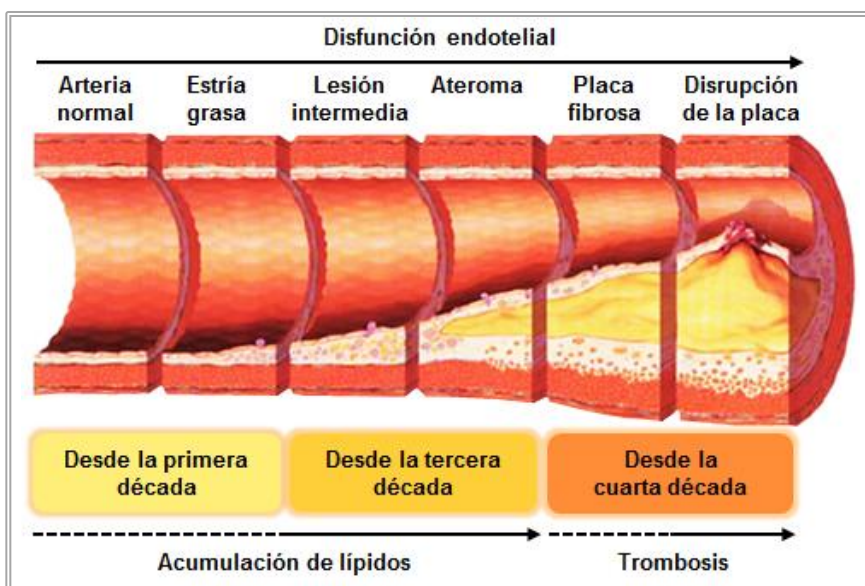


Figura 3. Progresión de la aterosclerosis en la población general. Imagen adquirida y adaptada⁶.

2.1. Lipoproteínas

Las lipoproteínas son macromoléculas que están formadas por una parte lipídica y otra proteica. Su función fisiológica es el empaquetamiento de los lípidos insolubles en el plasma, provenientes de la alimentación y

aquellos sintetizados por el organismo. El metabolismo de las lipoproteínas está relacionado con el desarrollo de la aterosclerosis¹⁰.

2.1.1. Composición

Las lipoproteínas están compuestas de un núcleo y una capa superficial. El núcleo está formado por ésteres de colesterol (CE) y triglicéridos. La capa superficial está compuesta de colesterol no esterificado, fosfolípidos y proteínas. La porción proteica está conformada principalmente por apolipoproteínas, que contienen regiones anfipáticas que les confiere una propiedad de unirse a los lípidos (**Figura 4**).

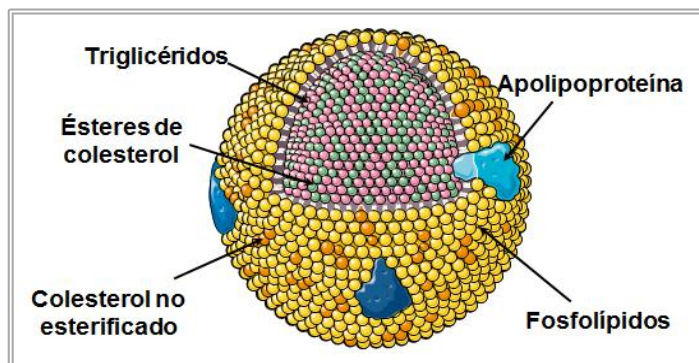


Figura 4. Estructura general de las lipoproteínas.

Las lipoproteínas presentan una composición dinámica con constantes cambios a nivel estructural y de composición. Las diferencias en sus propiedades fisicoquímicas como la densidad, se utilizan para su purificación del plasma¹¹. Las lipoproteínas en función de su contenido y proporción en lípidos y proteínas se clasifican como quilomicrones (CM),

lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), lipoproteína de densidad intermedia (ILD), lipoproteína de baja densidad (LDL) y lipoproteína de alta densidad (HDL), como se muestra en la **Figura 5**.

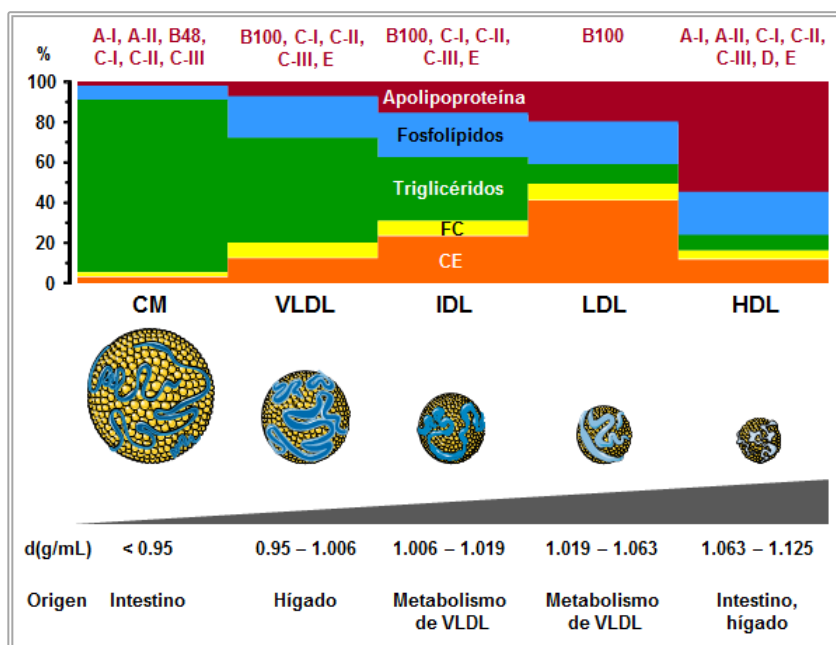


Figura 5. Composición de las lipoproteínas. FC: colesterol libre, CE: ésteres de colesterol. Imagen adquirida y adaptada¹¹.

2.1.2. Lipoproteínas de baja densidad (LDL)

La LDL es el producto del catabolismo de CM y VLDL. Esta lipoproteína lleva la mayoría del colesterol plasmático hacia los tejidos periféricos. La porción proteica está constituida por 95% de apolipoproteína B100 (apoB100)¹². Sin embargo, otras apolipoproteínas en menor porcentaje han sido reportadas como la apoE y apoC-III, que tiene una función importante en el metabolismo de la LDL y modula su aterogenicidad a pesar de su baja concentración¹³. La apoB100 contiene diferentes

dominios funcionales que sirven para la unión al receptor de la LDL (LDLR), para la interacción con las proteínas de la matriz extracelular (ECM) y varios sitios de unión para los proteoglicanos¹², que promueven su retención en el subendotelio vascular. En las lesiones ateroscleróticas, muchos de los depósitos lipídicos son derivados de la LDL plasmática. Por ello, la LDL es considerada la principal lipoproteína aterogénica¹⁰.

2.1.3. Modificación de la LDL

La infiltración y retención de la LDL al subendotelio vascular conlleva a modificaciones con características diferentes a nivel estructural y químico que la LDL nativa (nLDL)¹⁴⁻¹⁶. Las modificaciones de la LDL estudiadas en relación con la aterogenicidad son mostradas en la **Tabla 1**.

LDL modificada	Mecanismo	Efecto
agLDL	Principalmente por unión a proteoglicanos	Degradación del contenido lipídico y de ApoB100
oxLDL	ROS, lipooxigenasas Mieloperoxidasas, ácido hipocloroso	Degradación del contenido lipídico Degradación de ApoB100
acLDL	Generada <i>in vitro</i> por anhídrido acético	Modificación de ApoB100
gLDL	Reacción de la glucosa con la lipoproteína de la pared arterial	Modificación de ApoB100, fosfolípidos y susceptibilidad de oxidación
dLDL	Neuramidinasas, sialidasas y glucosidasas	Susceptibilidad de oxidación por ROS
cLDL	Mieloperoxidasa	Modificación de ApoB100 y susceptibilidad de oxidación
MDA-LDL	Lipoperoxidación por ROS	Degrada el contenido lipídico formando malondealdehído (MDA)
	MDA	Modificación de ApoB100

Tabla 1. LDL aterogénicas. agLDL: LDL agregada, oxLDL: LDL oxidada, acLDL: LDL acetilada, gLDL: LDL glicosilada, dLDL: LDL desialilada, cLDL: LDL carbamilada, MDA-LDL: LDL malondealdehído, ROS: especie reactiva de oxígeno, ApoB:100: apolipoproteína B100¹⁴⁻¹⁶.

LDL agregada (agLDL)

La forma agregada de la LDL es debida a las modificaciones que ocurren en la superficie de la lipoproteína, lo cual conlleva una inestabilidad e interacción y fusión con otras partículas de LDL¹⁷. Los proteoglicanos, tipo condroitín sulfato como el versican, son muy abundantes en la ECM de la íntima vascular aterogénica, tiene una elevada capacidad de retener y agregar lipoproteínas ricas en colesterol, como las LDL. La retención es dada por el grado de sulfatación y el número de cadenas de glucoaminoglicanos en los proteoglicanos¹⁸ (**Figura 6**).

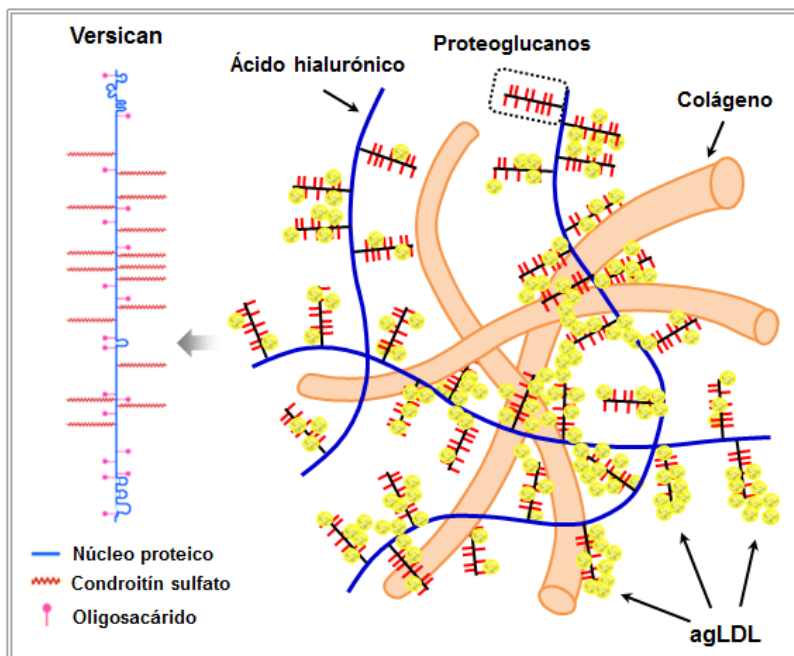


Figura 6. Agregación de la LDL por proteoglicanos.

Mecanismos proteolíticos y lipolíticos también han sido documentados de participar en la agregación de las lipoproteínas.

a) Modificaciones proteolíticas

En este proceso, la LDL se une a la heparina de los proteoglicanos, a los que también se unen proteasas como la quimasa y carboxilpeptidasa A. Estas enzimas degradan la apoB100 de la LDL, reorganizando la estructura superficial de la LDL con la translocación de algunos lípidos del núcleo lipoproteico a la superficie. En consecuencia, la LDL proteolizada aumenta su hidrofobicidad favoreciendo su agregación¹⁵.

b) Modificaciones lipolíticas

- **Esfingomielinasa.-** La esfingomielinasa hidroliza la esfingomielina de la LDL para producir moléculas de fosfocolina hidrosolubles, las cuales son liberadas, y moléculas de ceramida. La formación de dominios ricos en ceramida confiere hidrofobicidad y permiten la agregación de la LDL¹⁹.
- **Fosfolipasa A₂.-** Esta enzima cataliza la hidrólisis de los fosfolípidos de la LDL en ácidos grasos y lisofosfatidilcolina (lisoPC), acumulándose en la LDL y modificando sus propiedades fisicoquímicas. En presencia fisiológica de albumina, los ácidos grasos y algunos lisoPC son transferidos de la LDL a la albúmina. Así, la LDL resultante presenta una reorganización de su componente lipídico y un cambio conformacional de la apoB100, por lo tanto conlleva a su agregación^{19,20}.
- **Fosfolipasa C.-** La fosfolipasa C hidroliza el fosfolípido de la LDL en fosfocolina, que es liberada de la LDL, y diacilglicerol (DAG). El DAG reside en la superficie y el núcleo de la LDL. Los dominios hidrófobos formados por DAG promueven la agregación de la LDL²¹.

La modificación estructural de la LDL por agregación incrementa su capacidad aterogénica. De hecho, favorece el almacenamiento masivo intracelular de CE en células residentes vasculares, como las células musculares lisas vasculares (VSMC)²² y los macrófagos^{23,24} que se diferencian a células espumosas, componente celular característico de la íntima aterosclerótica en etapas tempranas de desarrollo de la lesión. La agLDL puede también generarse *in vitro* mediante un proceso de agitación²⁵.

2.2. Receptores de LDL

Los receptores de lipoproteínas considerados responsables de la captación de la LDL por las células en la pared vascular, pertenecen a la familia de los receptores “scavengers” y la familia receptores de LDL.

2.2.1. Familia de receptores “scavengers”

Los receptores “scavengers” originalmente fueron identificados por Brown y Goldstein, y definidos por su habilidad de unirse a las LDL modificada. De hecho, son implicadas como reguladores en la iniciación y progresión de la aterosclerosis.

Esta familia está compuesta por proteínas agrupadas en clases, que tienen una gran diversidad estructural²⁶. Además, tienen un amplio rango de ligandos endógenos²⁷ y exógenos²⁸ (**Tabla 2**).

Clase	Receptor scavenger	Ligandos				
		acLDL	oxLDL	LDL	HDL	VLDL
A	SR-A	+	+	-	-	-
	MARCO	+	+	-	-	-
B	SR-B	-	+	+	+	
	CD36	+	+	+	+	+
E	LOX-1	+	-	-	-	-
F	SRECI/II	+	+	-	-	-
G	SR-PSOX	-	+	-	-	-
H	FEEL-I/II	+	-	-	-	-

Tabla 2. Receptores “scavengers” y ligandos lipoproteicos. SR-A: receptor “scavenger” clase A, MARCO: receptor de macrófago con estructura de colágeno, SR-B: receptor “scavenger” clase B, CD36: “cluster” de diferenciación 36, LOX-1: receptor 1 para las LDL oxidadas homologa a lectina, SRECI/II: receptor “scavenger” I/II expresado por células endoteliales, SR-PSOX: receptor “scavenger” que se une a la fosfatidilserina, FEEL-I/II: receptor “scavenger” I/II que contiene dominios homólogos a fasciclina EGF y laminina EGF. Tabla adaptada²⁶.

2.2.2. Familia de receptores de LDL

La familia de receptores de LDL comprende un grupo de glicoproteicos transmembrana que son receptores endocíticos sobre la superficie celular, el cual internalizan a su ligando por degradación lisosomal²⁹. El LDLR es el miembro fundador de este grupo actuando solamente en el metabolismo de las lipoproteínas. Sin embargo, otros miembros tienen la capacidad de unirse a diferentes ligandos^{30,31} y en consecuencia participan en un amplio número de funciones biológicas que incluyen el metabolismo de los lípidos, ingreso de toxinas, activación de lisosomas y neurotransmisión³².

Otros miembros de esta familia son el receptor de la VLDL (VLDLR) y las proteínas relacionadas a receptores de LDL (LRP), que incluyen al LRP1, LRP2, LRP3, LRP4, LRP5, LRP6, LRP8, LRP10 y LRP11 lo cual estructuralmente son similares³³ y consisten de 5 unidades: 1) dominio de unión a ligando, con repeticiones ricas en cisteína tipo A distribuidas entre

2 y 11 “clusters”; 2) dominio homólogo al factor de crecimiento epidérmico (EGF), el cual consiste en repeticiones ricas en cisteína y repeticiones del dominio YWTD que está organizado como hélice β . Esta región está implicada en la disociación dependiente de pH en el complejo receptor-ligando^{30,31}; 3) repeticiones homólogas EGF que precede al segmento de contacto con la membrana, 4) dominio de anclaje transmembrana; 5) dominio citoplasmático con 1 a 3 motivos NPxY o PPPSP responsables de la traducción de señal intracelular^{31,32}. Además, los receptores LDLR, VLDLR y LRP8 tienen un dominio O-glucosídico en la parte externa de la célula y un extremo NPxY citoplasmático, a diferencia de ello el LRP5 y LRP6 carecen de este dominio y tiene un extremo citoplasmático PPPSP. LRP5 y LRP6, tienen el dominio YWTD ubicado de forma inversa, en comparación a los demás miembros de la familia LRP³⁴ (**Figura 7**).

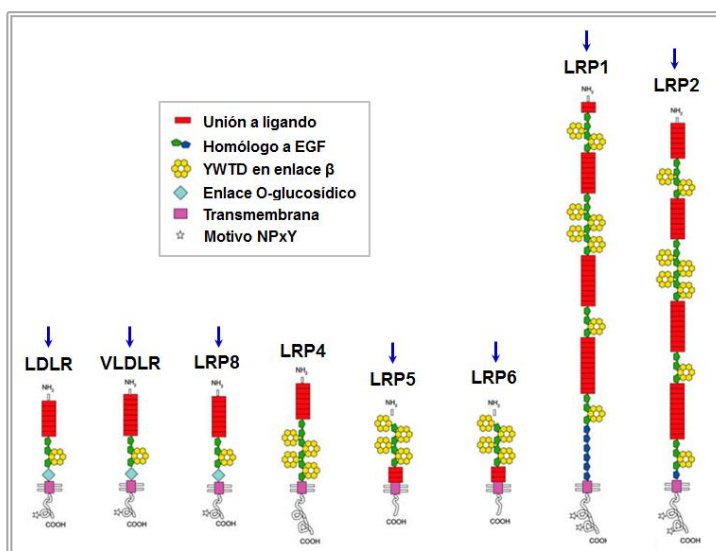


Figura 7. Miembros de la familia LRP. Los receptores relacionados con enfermedades cardiovasculares están señalados con una flecha azul. Imagen adquirida y adaptada³⁴.

2.3. Composición de la pared arterial

La pared arterial está formada por un tejido heterogéneo dinámico que contribuye a mantener la homeostasis vascular y la regulación de la respuesta al estrés o lesión, debido a sus características histológicas y bioquímicas³⁵.

Los componentes de la pared arterial varían en su proporción dependiendo del calibre de la misma y están distribuidos en 3 capas: íntima, media y adventicia (**ver Figura 8**), excepto en las arteriolas y los capilares³⁶.

Íntima: Es la capa que está en contacto al flujo sanguíneo, compuesta por el endotelio y subendotelio. El endotelio está formado por células endoteliales en monocapa que descansan sobre la lámina basal, seguida del subendotelio. El subendotelio alberga fibras elásticas, proteoglicanos y colágeno que limita con la lámina elástica interna.

Media: Es compuesta por VSMC, fibras de colágeno, fibras elásticas y proteoglicanos. Esta capa está limitada de la íntima y la adventicia por la lámina elástica interna y externa respectivamente.

Adventicia: Es la capa exterior de la arteria, compuesta principalmente por fibras de colágeno, fibroblastos, nervios (*vasa nervorum*) y pequeños vasos sanguíneos (*vasa vasorum*). El grosor de esta capa depende de la ubicación y el tipo del vaso sanguíneo.

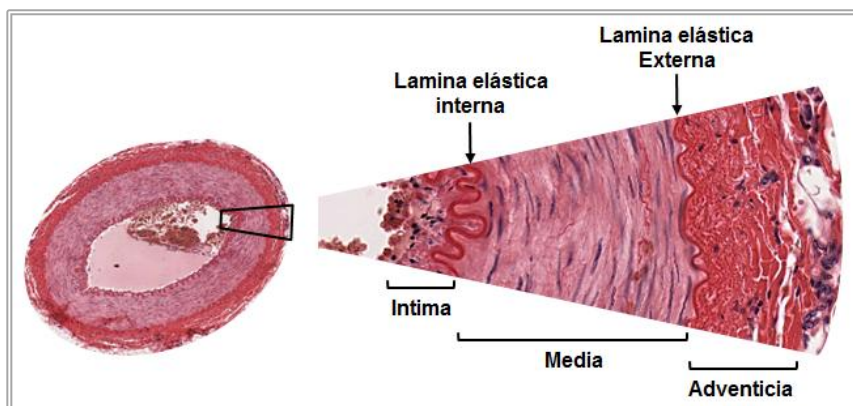


Figura 8. Estructura de la pared arterial. Imagen adquirida y adaptada de histology.medicine.umich.edu/resources/cardiovascular-system.

2.4. Evolución anatomopatológica de la aterosclerosis

Las lesiones ateroscleróticas se clasifican en base a su apariencia microscópica. Según la asociación americana del corazón (AHA), y de acuerdo a la clasificación propuesta por Stary y cols, las lesiones ateroscleróticas se agrupan en 8 tipos desde una mínima alteración en el tejido arterial, hasta las lesiones más complejas^{9,37} (**ver Tabla 3**).

Una característica histológica general de la lesión aterosclerótica es la desorganización estructural completa y el engrosamiento de la capa íntima. Los componentes celulares varían según el tipo de lesión y el tipo celular³⁸. Generalmente, las células espumosas son más numerosas que los macrófagos y estos más que los linfocitos. En las lesiones extendidas entre la capa media y adventicia, los monocitos, macrófagos y linfocitos son más numerosos que en la capa íntima; lo que se ha atribuido a una colonización alrededor del *vasa vasorum*³⁹. Los mastocitos son individualmente más numerosos en la capa adventicia, pero escasos en la capa íntima de las lesiones. Las células plasmáticas son poco frecuentes, y

la presencia de un proceso inflamatorio agudo por neutrófilos no es característica de la lesión aterosclerótica humana.

Nomenclatura		Característica histológica	Otros terminos	Aparición	Clínica
Lesión tipo	I	Lesión mínima	Lesión temprana	Desde la primera década de vida	Clínica silente
Lesión tipo	IIa	Estría grasa con tendencia a la progresión			
	IIb	Estría grasa con tendencia a ser estable			
Lesión tipo	III	Preateróma	Lesión intermedia	Desde la tercera década de vida	Clínica silente o manifiesta
Lesión tipo	IV	Ateroma	Lesión avanzada	Desde la cuarta década de vida	
Lesión tipo	V	Fibroateroma			
Lesión tipo	VI	Lesión complicada			
Lesión tipo	VII	Placa calcificada			
Lesión tipo	VIII	Placa fibrosa			

Tabla 3. Clasificación de la lesión aterosclerótica. Datos adquiridos y adaptados^{37,38}.

2.5. Fisiopatología de la aterosclerosis

2.5.1. Formación de la lesión inicial

El endotelio además de su función en el intercambio de sustancias desde la sangre al tejido vascular y el control del tono vascular; presenta propiedades antiaterogénicas o antitrombóticas en condiciones fisiológicas normales⁴⁰. Sin embargo, en presencia de factores de riesgo, el endotelio adquiere una disfuncionalidad que conlleva a un ambiente proaterogénico. Esta es mediada por la capacidad de sintetizar y liberar óxido nítrico (NO).

El NO evita la agregación plaquetaria, adhesión e infiltración de leucocitos. Una menor biodisponibilidad de NO está asociada a la disminución de actividad de la NO sintetasa⁴⁰. Esta disminución puede producirse como consecuencia de la exposición crónica de las células endoteliales a concentraciones aterogénicas de nLDL⁴¹ o de la LDL modificada⁴². Concentraciones elevadas de LDL conlleva a cambios en la permeabilidad del endotelio, como consecuencia de la alteración de las uniones *gap* que regulan procesos de vasodilatación dependientes de NO⁴³ (Figura 9).

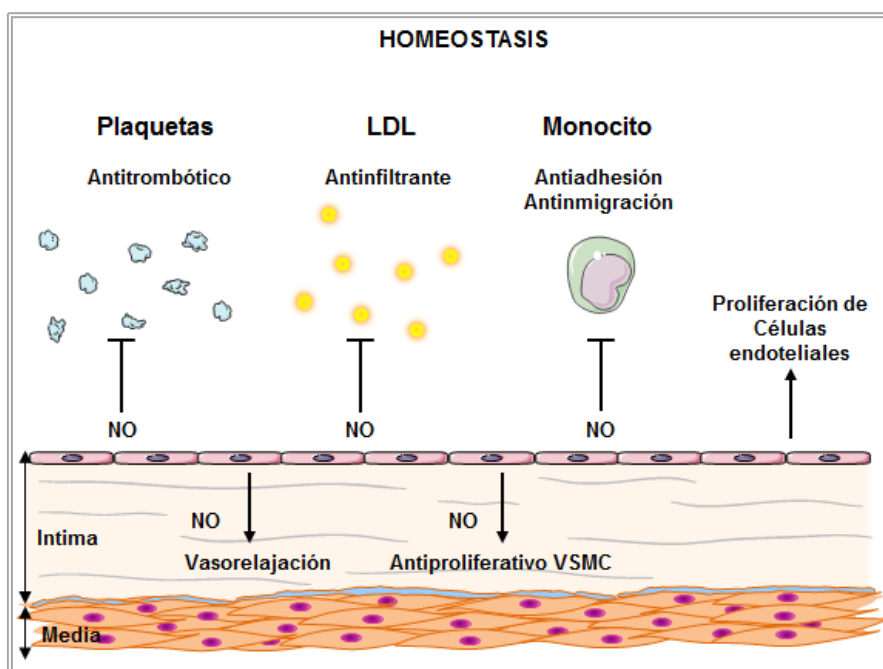


Figura 9. Integridad endotelial. NO: óxido nítrico, VSMC: Células musculares lisas vasculares. Imagen adquirida y adaptada⁴⁰.

Debido a la alteración en la permeabilidad vascular, hay una acumulación subendotelial de LDL así como un aumento de monocitos y linfocitos T

que producen lo que se conoce como estría grasa, característica de la lesión inicial.

La acumulación de LDL en la pared arterial está favorecida por su retención en el espacio subendotelial especialmente debido a la unión a proteoglicanos²⁵, lo que proporciona cambios estructurales y aumento de propiedades inflamatorias (aterogénicos). La LDL oxidada (oxLDL) modula la proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1), que promueve el reclutamiento del monocito y el factor estimulante de colonias de macrófago (M-CSF) que favorece la diferenciación de monocito a macrófago. Además, la LDL modificada promueve el aumento de la expresión de receptores “scavengers”, que participan en la captación de grandes cantidades de lípidos que conlleva la diferenciación del macrófago a célula espumosa⁴⁴. La presencia de la LDL y las continuas interacciones entre células endoteliales, monocitos y linfocitos T, liberan citoquinas y moléculas reguladoras para la progresión de la lesión aterosclerótica.

2.5.2. Progresión de la lesión

Las VSMC localizadas están normalmente en la capa media. Durante la progresión de la lesión su migración de la capa media a la capa íntima se asocia a cambios en su perfil fenotípico, de forma que las VSMC adquieren una elevada capacidad de síntesis de colágeno, elastina y una variedad de proteoglicanos componentes de la ECM, que forman una cubierta fibrosa alrededor del núcleo lipídico⁴⁵. El aumento de esta cubierta dará como resultado un estrechamiento progresivo del lumen vascular. Además, las VSMC son capaces de internalizar la LDL, especialmente en su forma agregada a través del LRP1⁴⁶. Así también, el macrófago capta la agLDL mediante el LRP1⁴⁷ y LRP5⁴⁸.

De esta manera los macrófagos y VSMC contribuyen a la población de células espumosas. El estrés metabólico generado por el contenido del colesterol celular no regulado, hace que estas células adquieran fenotipo patológico y sufran necrosis y liberen su contenido lipídico al espacio extracelular. Los lípidos extracelulares y el debris celular forman el llamado núcleo necrótico^{5,49}.

2.5.3. Lesiones avanzadas y complicación

La continuación del desarrollo de la placa aterosclerótica, es dada por la pérdida de capacidad de sintetizar colágeno por parte de la VSMC y una mayor degradación de la ECM por metaloproteasas y cisteína proteasas, que son la clave en la formación de una capa fibrosa delgada. Esto sumado a un elevado contenido lipídico intra y extracelular, producción de radicales libres, factores de coagulación, moléculas vasoactivas y una mayor apoptosis celular, aumenta la probabilidad de fragilidad y susceptibilidad de la lesión de sufrir una rotura⁵⁰. De hecho, la vulnerabilidad de la placa se ha asociado a la presencia de moléculas inflamatorias como la interleucina-1 β (IL-1 β), factor de necrosis tumoral- α (TNF α) y el interferón- γ (IFN γ)⁵¹.

En consecuencia el contenido del núcleo necrótico es liberado y expuesto a la circulación periférica. El factor tisular es el principal desencadenante de la formación de la trombina y del coagulo de fibrina. El trombo formado puede interrumpir el flujo sanguíneo local o embolizar y alojarse distalmente en las arterias⁵². En cambio, las lesiones estables son caracterizadas por un bajo contenido lipídico y una gruesa capa fibrosa.

Por lo tanto, la LDL desempeña una función importante en la aterogénesis. La LDL induce la alteración de las propiedades

antitrombóticas y contráctiles del endotelio vascular. Así como, la disminución del NO y la activación de vías de señalización proinflamatorias en aquellos componentes celulares derivados de la sangre periférica, y de los residentes de la pared vascular. La propiedad aterogénica de la LDL es potenciada por las modificaciones al infiltrarse a la íntima arterial. Esta LDL intravascular facilita la formación de células espumosas, incrementando la probabilidad de rotura de la placa ateromatosa (**Figura 10**).

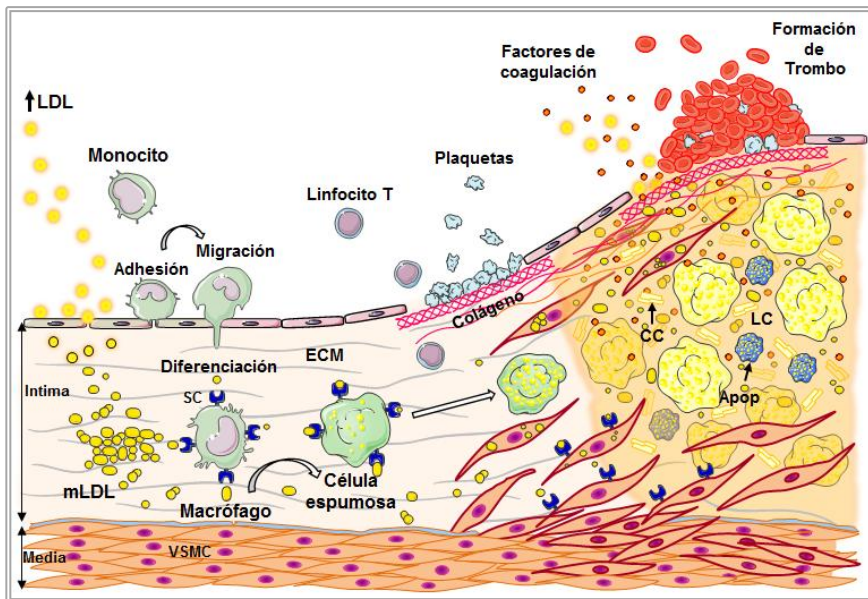


Figura 10. Evolución esquemática de la lesión ateroesclerótica. Los monocitos migran a la capa íntima, se diferencian a macrófago y fagocitan las LDL modificadas (mLDL), transformarse en célula espumosa. El estrés oxidativo conlleva a la apoptosis (Apop). VSMC: Células musculares lisas vasculares, ECM: matriz extracelular. LC: núcleo lipídico, SC: receptores "scavengers", CC: cristales de colesterol. Imagen adquirida y adaptada⁴⁰.

3. Inmunidad innata

3.1. Monocito

Los monocitos son originados a partir de un precursor mieloide en la médula ósea, el cual liberado a la circulación sanguínea periférica, circula aproximadamente durante 3 días y migra hacia los tejidos⁵³, donde los monocitos se diferencian en diferentes tipos de macrófagos⁵⁴. Inicialmente, los monocitos fueron identificados por su morfología y por técnicas citoquímicas (esterasa específica de monocito). Sin embargo, la citometría de flujo identifica a este linaje celular por presentar los antígenos de superficie “cluster” de diferenciación 14 (CD14) y “cluster” de diferenciación 16 (CD16)⁵⁵.

3.1.1. Subtipos por expresión de CD14 y CD16

CD14

El CD14 fue el primer marcador identificado para el monocito y macrófago⁵⁶, con una expresión aproximada de 110,000 moléculas/monocito, lo que ha llevado a su utilización en la identificación de esta célula⁵⁷, y se ha asociado a un amplio rango funciones⁵⁸⁻⁶². Sin embargo, se conoce especialmente por su función como receptor del lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas^{63,64}.

CD14 es una glicoproteína que forma un homodímero con múltiples zonas ricas en leucina y unida a la membrana celular por un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI), que al no ser transmembrana no puede transferir señales por sí mismo^{65,66}. Por lo cual, el CD14 se asocia con otros correceptores como es el caso del receptor tipo “toll” 4 (TLR4),

induciendo como consecuencia la síntesis y liberación de moléculas proinflamatorias^{67,68} (**Figura 11**).

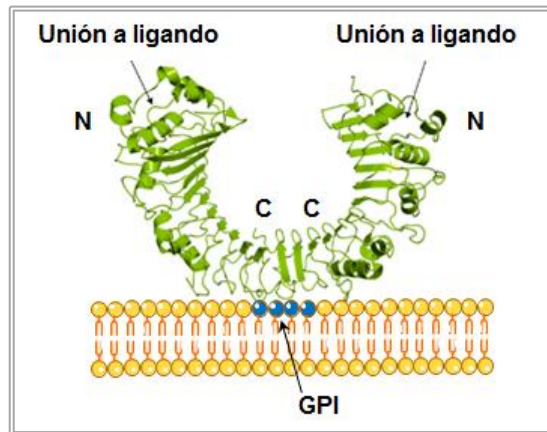


Figura 11. Receptor CD14. Se observa 2 sitios de unión a ligando y su anclaje a la membrana celular por GPI (glicosilfosfatidilinositol). N: extremo N-terminal, C: extremo C-terminal. Imagen adquirida y adaptada⁶⁶.

CD16

El CD16 es una glicoproteína que sirve como receptor de baja afinidad para unir la porción constante de la IgG, que confiere a la célula su capacidad ozonizadora. CD16 es una proteína transmembrana que se expresa en el monocito, macrófago y células NK. Este receptor consiste en una subunidad α que se une a la IgG y que se empareja con 2 cadenas γ que contienen un motivo inmunoreceptor de activación basado en tirosina (ITAM), con una función importante en los procesos de señalización mediados por el receptor^{69,70}. Los efectos funcionales inducidos por el CD16 incluyen activación de genes, producción de citoquinas, quimioquinas, citotoxicidad mediada por anticuerpo, degranulación celular y fagocitosis⁷¹ (**Figura 12**).

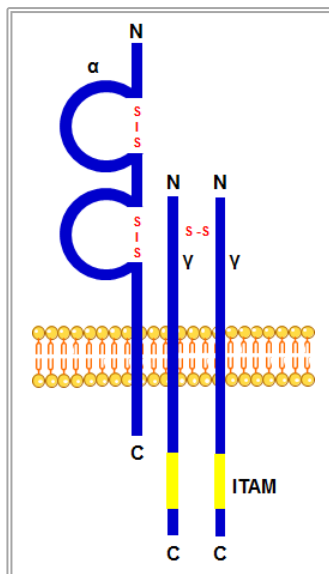


Figura 12. Receptor CD16. Presencia de 2 cadenas α y γ . ITAM: motivo inmunoreceptor de activación basado en tirosina, S-S: puente disulfuro. Imagen adquirida y adaptada⁷⁰.

Según la capacidad de expresión de CD14 y CD16, los monocitos se distribuyen en 3 subtipos o subpoblaciones. Los monocitos clásicos que presentan una alta expresión de CD14 y ausencia del CD16 ($CD14^{bright}CD16^{-}$), monocitos intermedios con expresión de CD16 ($CD14^{bright}CD16^{+}$) y los monocitos no clásicos con una baja expresión del CD14 ($CD14^{dim}CD16^{+}$)⁷².

Aproximadamente el 95% de monocitos humanos circulantes tienen una ausencia de CD16 en la superficie celular⁷³. Estudios con el homólogo del $CD16^{+}$ humano en el ratón, describen la migración de estas células relacionadas con la renovación de macrófagos residentes en tejidos no inflamatorios⁷⁴. Esta conducta es llamada de patrullaje, lo cual se arrastra a lo largo de la superficie vascular. Por el contrario, $CD16^{-}$ tiene un desplazamiento de rodaje debido a su menor afinidad de adhesión⁷⁵.

Los monocitos CD16⁺ se han asociado a un nivel de maduración mayor que los monocitos CD16⁻, debido a la similitud de patrones de expresión de superficie con los macrófagos residentes en tejido^{76,77}, y una mayor capacidad de adhesión al endotelio. La actividad fagocitaria también está incrementada en monocitos CD16⁺, respecto a aquellos con ausencia de CD16 en la superficie celular⁷⁸. Algunos autores sugieren que los conocidos CD16⁺ tienen un incremento en la actividad de presentar antígenos, debido a una alta expresión de HLA-DR⁵⁵. De hecho, los macrófagos en estadios tempranos de la lesión aterosclerótica tiene una alta expresión de CD16 y una disminución en la expresión del CD14⁷⁹.

3.1.2. Quimiotaxis, infiltración vascular

En la aterosclerosis, los monocitos son reclutados en regiones proclives al desarrollo de la lesión. Esto sucede por la activación o disfunción del endotelio, como consecuencia de la fuerza hemodinámica en combinación con factores de riesgo aterogénicos como la hiperlipemia. Esta activación favorece la quimiotaxis, adhesión y migración de los monocitos circulantes al espacio intravascular^{80,81}.

La expresión de MCP-1, interleucina-8 (IL-8), integrinas y selectinas en la superficie de las células endoteliales es aumentada por la LDL. Estas moléculas están reguladas por diferentes genes que son orquestados por NF-κB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas)⁴⁰. La inmovilización que ejerce endotelio sobre el monocito depende de la quimioquina CCL5 (motivo CC ligando 5), CXCL1 (motivo CXC ligando 1) y de la P-selectina. Para que esta adhesión sea firme, la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM1) y la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM1) deben expresarse en la superficie endotelial y unirse con las integrinas VLA4 (antígeno muy

tardío 4) y LFA1 (antígeno 1 asociado a la función del linfocito) del monocito. La migración del monocito al espacio subendotelial se realiza mediante la acción de diferentes quimioquinas producidas por los componentes celulares de la pared vascular, implicados en la aterosclerosis^{82,83}.

La migración del monocito está influenciada no solo por señales quimioatrayentes si no por el control de las señales quimiorepulsivas. Moléculas esenciales para el control de la migración neuronal han sido asociadas a la activación, diferenciación y regulación de la adhesión en los leucocitos⁸⁴⁻⁸⁶. De estas moléculas, miembros de la familia netrin, semaforin y efrin son expresados sobre la célula endotelial bajo condiciones que promueven o protegen de la aterosclerosis⁸⁷. Netrin-1 y semaforin3A, se expresan en el endotelio de las arterias coronarias e inhiben la migración directa los monocitos humanos causada por las quimioquinas. Sin embargo, su disponibilidad disminuye por efecto de factores proaterogénicos. Por el contrario, efrinB2 aumenta su expresión e incrementa la migración leucocitaria en ausencia adicional de quimioquinas^{83,87}.

Por lo tanto, la hiperlipemia y los mecanismos de interacción entre monocito - endotelio conllevan a la regulación de adhesión y migración, como uno de los eventos importantes en el desarrollo de la lesión aterosclerótica (**Figura 13**).

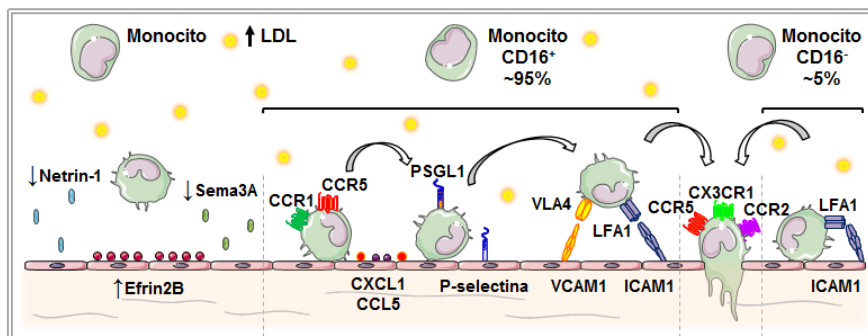


Figura 13. Reclutamiento del monocito. Sema3A: semaforina3A, CCR1: receptor quimioquina CC tipo 1, CCR2: receptor quimioquina CC tipo 2, CCR5: receptor quimioquina CC tipo 5, CCL5: quimioquina CC ligando 5, CXCL1: quimioquina CXC ligando 1, CX3CR1: receptor quimioquina CX3C tipo 1, PSGL1: glicoproteína p-selectina ligando 1, ICAM1: molécula de adhesión intercelular 1, VCAM1: molécula de adhesión celular vascular 1, LFA1: antígeno 1 asociado a la función del linfocito y VLA4: antígeno muy tardío 4. Imagen adquirida y adaptada⁸³.

3.1.3. Apoptosis celular

El monocito/macrófago cumple una amplia variedad de funciones que incluyen la regulación de la respuesta inmune, fagocitosis, reparación y remodelación de los tejidos⁸⁸. Sin embargo, estos procesos requieren de la maduración y diferenciación a macrófago cuando migran a los tejidos periféricos, lo que implica cambios químicos y fenotípicos de la célula^{89,90}, como la disminución del CD14⁹¹. En esta diferenciación, la integridad funcional y la capacidad de supervivencia del monocito son importantes en un ambiente inflamatorio rico en mediadores citotóxicos y especies reactivas de radicales libres. Numerosos estudios se han centrado en la apoptosis de monocitos de sangre periférica en cultivos, suplementados con suero, factores de crecimiento, productos bacterianos o citoquinas proinflamatorias⁹²⁻⁹⁵. Hasta ahora, sin embargo, los procesos apoptóticos inducidos por la LDL en el monocito han sido poco documentados. Por ello, el interés de investigar el efecto de la LDL

relacionada con la apoptosis o la supervivencia celular, como factor aterogénico vinculado a la diferenciación del monocito a macrófago. La apoptosis o muerte celular programada es un proceso ordenado en que la célula se autodestruye ante estímulos intracelulares o extracelulares⁹⁶⁻⁹⁸.

Vía extrínseca

La vía extrínseca es mediada por receptores de muerte que incluyen el receptor de muerte 5 (DR5)⁹⁹. La activación del receptor de muerte permite el reclutamiento de proteínas adaptadoras como FADD (dominio de muerte asociado a Fas), el cual recluta procaspasa-8 formando el DISC (complejo de señalización inductor de muerte). En las células con alta densidad de receptores de muerte y/o procaspasa-8, el DISC induce la activación de procaspasa-8 a caspasa-8, siendo suficiente para amplificar la señal en la activación de la procaspasa-3 a caspasa-3. Así, el proceso de apoptosis es irreversible. La caspasa-3 es responsable de cortar substratos que actúan sobre el DNA¹⁰⁰ y la gelsolina, proteína reguladora de la actina,¹⁰¹ que es fragmentada con la consecuente alteración del citoesqueleto y de la morfología celular (**ver Figura 14**).

Vía intrínseca

Si la señal del receptor de muerte no es suficiente para generar la cascada de señalización de las caspasas, puede ocurrir una activación de la vía intrínseca. El vínculo entre vía la vía intrínseca y la extrínseca, esta mediado por la mitocondria y se produce cuando Bid (dominio de muerte agonista de interacción BH3) es cortado por la caspasa-8 para producir Bid truncado (tBid). La translocación de tBid a la mitocondria promueve la liberación de citocromo C y otros factores apoptóticos al citoplasma por medio de BAX (proteína X asociada a BCL2) y BAK (proteína asesina antagonista de BCL2). El citocromo C actúa como cofactor de APAF-1 (factor 1 activador de peptidasa apoptótica) y recluta procaspasa-9,

formando el apoptosoma que genera caspasa-9. La caspasa-9 inicia la activación irreversible de la caspasa-3¹⁰².

Debido a la importancia de marcadores que permitan determinar si una célula está comprometida en ingresar a un proceso apoptótico, varios autores han investigado la expresión de BAX y BCL2 (proteína 2 de linfoma de células B), como efectores de mecanismos promotores y supresores respectivamente de la apoptosis¹⁰³⁻¹⁰⁵. El cociente aumentado BAX/BCL2 define la mayor sensibilidad del monocito en responder a una señal apoptótica en comparación a aquel monocito con un nivel de cociente menor (**ver Figura 14**).

Anoikis

Una forma específica de apoptosis es la anoikis, proceso que se produce como consecuencia de la pérdida de interacción célula-célula o célula-ECM¹⁰⁶. El mecanismo de la anoikis no es completamente conocido. Sin embargo, la permeabilización de la membrana externa mitocondrial por BAX y la activación de los receptores de muerte con la consecuente activación de la caspasa-8, cumplen una función importante en este proceso^{107,108}. La anoikis fue inicialmente estudiada en células cancerígenas, debido a que la metástasis es el resultado de la resistencia a la anoikis cuando las células pierden su localización. Laguinge y cols, describieron la participación de TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF) y los receptores de muerte en este proceso¹⁰⁹. De hecho, DR5 está incrementado en un estudio con células neoplásicas, donde el proceso de anoikis es dependiente de la caspasa-8¹¹⁰.

El receptor DR5 es una proteína de membrana tipo I que pertenece a la superfamilia de receptores de TNF. TRAIL, ligando de DR5, es una proteína de membrana tipo II que pertenece a la familia de citoquinas de TNF. Además, su dominio extracelular puede ser proteolíticamente

cortado de la superficie celular por metaloproteasas, y así formar una molécula soluble¹¹¹.

El DR5 es expresado en una variedad de células y tejidos¹¹². La activación es realizada mediante el homotrímero de TRAIL con 3 receptores DR5, como sucede en la mayoría de los miembros de la familia TNF^{113,114}. DR5 contiene un dominio de muerte (DD) carboxi-terminal citoplasmático que posibilita el reclutamiento de proteínas que contengan DD para forman el DISC, que inicia la señal de activación de las caspasas¹¹⁵. (**ver Figura 14**).

Integrinas

La adhesión del monocito al endotelio a través de las integrinas es la respuesta molecular ante un proceso inflamatorio, y su regulación es importante para la migración a través de la ECM¹¹⁶. Además, la función de la ECM como supresor a la anoikis ha sido bien establecido y en ella participan varias integrinas involucradas en la supervivencia celular^{117,118}.

Las integrinas son heterodímeros transmembrana formados por subunidades $\alpha\beta$. Existen 18 subunidades α y 8 subunidades β en humanos asociados no covalentemente para formar 24 combinaciones distintas con ligandos específicos diferentes. Además, algunas subunidades α y β presentan modificaciones post-transcripcionales o post-traduccionales en su extremo citoplasmático, proporcionado a las integrinas una versatilidad adicional en sus funciones¹¹⁹⁻¹²¹. De acuerdo a sus principales funciones se agrupan en integrinas de adhesión célula-célula, vasculares y de célula-ECM. Aquellas integrinas con subunidad $\beta 1$ comúnmente forman parte de la mayoría de receptores para los componentes de la ECM^{119,120}. Algunas integrinas como $\alpha 3\beta 1$ ¹²², $\alpha 6\beta 1$ y $\alpha 6\beta 4A$ son relevantes en la resistencia a anoikis, en células diferenciadas^{123,124}. De hecho, CD49c (la subunidad $\alpha 3$ de la integrina) se encuentra diferencialmente expresada en macrófagos

derivados de monocitos humanos¹²⁵. La interacción entre integrinas y la ECM regula la formación del citoesqueleto de actina, proceso relevante para la movilidad de la célula (**Figura 14**).

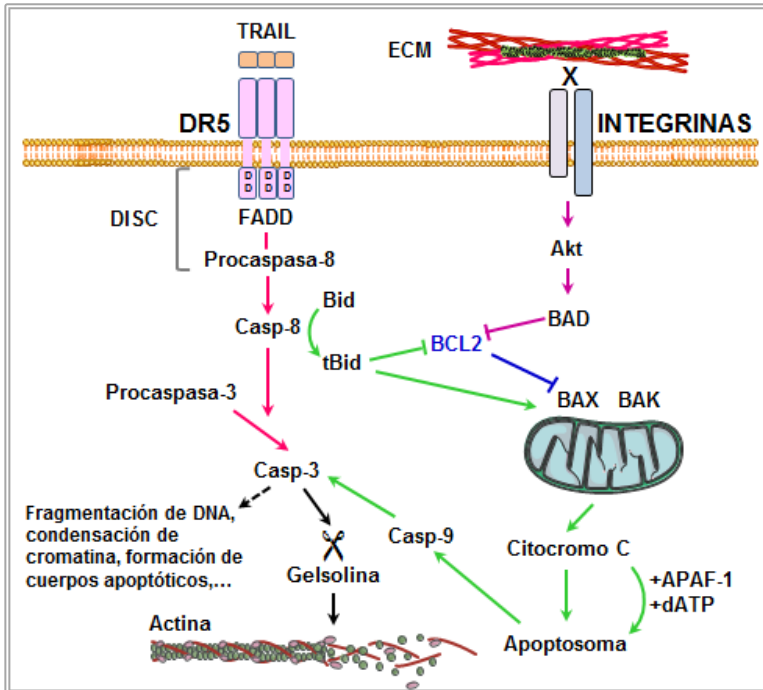


Figura 14. Regulación de la apoptosis. La vías de activación están señaladas por los siguientes colores: Rojo: vía extrínseca, Verde: vía intrínseca, Morado: señal relacionada con la adherencia, Azul: molécula antiapoptótica. TRAIL: ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF, DR5: receptor de muerte 5, FADD: dominio de muerte asociado a Fas, DISC: complejo de señalización inductor de muerte, Bid: dominio de muerte agonista de interacción BH3, tBid: Bid truncado, BCL2: proteína 2 de linfoma de células B, AKT: llamada protein quinasa B, BAD: agonista asociado a BCL2 de muerte celular, BAX: proteína X asociada a BCL2, BAK: proteína asesina antagonista de BCL2, APAF-1: factor 1 activador de peptidasa apoptótica, dATP: desoxiadenosina trifosfato¹⁰⁰.

3.2. Macrófago

La diferenciación de monocito a macrófago en el espacio subendotelial está regulada y dirigida por un amplio número de señales complejas. Estudios *in vitro* han tratado de explicar la participación en el proceso de factores de crecimiento, factores de diferenciación e incluso lipoproteínas con diferentes tipos de modificación.

3.2.1. Captación de lipoproteínas

Los macrófagos internalizan las lipoproteínas que contienen apoB a través del LDLR. Sin embargo, el LDLR muestra una regulación negativa durante la diferenciación a célula espumosa, debido al aumento intracelular de colesterol. Sugiriendo que las LDL son captadas también por receptores diferentes al LDLR.

Los Receptores “scavengers” que expresados en los macrófagos, tienen la capacidad de reconocer y procesar la LDL modificada para promover la diferenciación a célula espumosa¹²⁶. La regulación de los “scavengers” no está sujeta al contenido de colesterol intracelular, a diferencia del LDLR¹²⁷ (**ver Figura 15**).

La agLDL promueven la formación de células espumosas por la acumulación masiva de colesterol en el citoplasma¹²⁸. Algunos autores señalan un mecanismo alternativo de internalización de agLDL llamado patocitosis, que consiste en la captación de grandes cantidades de agLDL por el macrófago mediante la formación de vesículas^{129,130}.

Inicialmente, la formación de células espumosas por nLDL fue descartada, debido a que muchos estudios de captación de nLDL fueron realizados en concentraciones de saturación para los receptores. Sin

embargo, estudios posteriores han descrito que la captación de nLDL por pinocitosis a concentraciones de hiperlipemia resulta en la diferenciación a células espumosas¹³¹.

En los últimos años, nuestro grupo ha demostrado que las agLDL son captadas e internalizadas por el LRP5⁴⁸ y LRP1¹³², miembros de la familia LRP. El LRP1 es expresado en muchos tejidos y de forma abundante en el hígado y cerebro³². El aumento de su expresión está relacionado con diferentes funciones implicadas en la acumulación de lípidos intracelulares¹³²⁻¹³⁴. La deficiencia del LRP1 conlleva al aumento de apoptosis en el macrófagos¹³⁵ y la migración de monocitos a las lesiones ateroscleróticas^{135,136}.

El receptor LRP5 tiene una participación en diferentes patologías. Alteraciones en su expresión pueden asociarse a la susceptibilidad de la resistencia a la insulina, debido a que 2 marcadores asociados con la diabetes tipo 1 están localizados en el gen LRP5^{137,138}. Las mutaciones que implican una ganancia o pérdida de funciones del LRP5 se han asociado a enfermedades óseas^{139,140}. La relación entre la función del LRP5 y el metabolismo de los lípidos surgió a partir de identificar su función como receptor de la apoE, apolipoproteína que es importante en la lipoproteínas como CM, IDL y VLDL¹⁴¹. Modelos animales de hiperlipemia genética, como el conejo watanave (WHHL), presentan una mayor expresión hepática de LRP5 que los conejos normales, sugiriendo su participación en la regulación del colesterol *in vivo*¹⁴¹. Nuestro grupo ha descrito que la ausencia del receptor *Lrp5*^{-/-} se asocia a un aumento en el contenido lipídico en la pared vascular en ratones. Hay que resaltar que este efecto es más evidente cuando los ratones deficientes en *Lrp5* reciben una dieta rica en colesterol, respecto a controles alimentados con una dieta normocolesterolémica¹⁴². Estudios *in vitro*, ponen en evidencia que el LRP5 es un receptor relevante en la internalización de colesterol a partir

de agLDL en el macrófago humano⁴⁸. Variaciones genéticas como el polimorfismo A1330V del LRP5 se ha descrito que conlleva a una pérdida de su función y se asocia a niveles elevados de colesterol^{143,144}. La conservación del LRP5 y LRP6 son 70% idénticamente parálogos. Sin embargo, la actividad del extremo citoplasmático del LRP6 es más fuerte que el LRP5 para activar la vía del Wnt¹⁴⁵. Mutaciones del LRP6 es asociado a altos niveles de LDL como riesgo metabólico de padecer enfermedad cardiovascular temprana¹⁴⁶.

A otros miembros de la familia LRP se les atribuye también una importancia clínica. Así, LRP2 se ha descrito que regula el metabolismo del HDL¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Mutaciones en LRP8 incrementa el riesgo de infarto al miocardio prematuro^{150,151} y el LRP11 como un potencial biomarcador en la predicción de la aterosclerosis en un estudio poblacional¹⁵²⁻¹⁵⁴.

3.2.2. Metabolismo celular del colesterol

Hidrólisis y esterificación

Los esteres de colesterol derivados de las lipoproteínas internalizadas son hidrolizados a nivel de lisosomas por la ACEH (colesteril éster hidrolasa ácida) a colesterol libre (FC) y un ácido graso. El FC es liberado al citoplasma y es transportado a la membrana celular. La disponibilidad del FC es regulada para que su concentración no afecte la permeabilidad y fluidez de la membrana celular.

El exceso de FC es exportado por la membrana celular (transporte reverso del colesterol). Cuando el contenido de FC excede al que es exportado, el FC es enviado al retículo endoplasmático (ER), donde inhibe la señalización SBREP-2 (proteína de unión al elemento regulador estero 2) a fin de disminuir la síntesis de LDLR y la producción de colesterol

endógeno a partir de HMGCR (3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa)¹⁵⁵. El FC es esterificado por ACAT1 (acetil CoA: acetiltransferasa 1) y sus productos son acumulados en el citoplasma celular como depósitos insolubles que favorecen la formación de células espumosas¹⁵⁶. Los CE son hidrolizados por NCEH (neutral colesterol éster hidrolasa) en presencia de algún aceptor extracelular y se obtiene nuevamente FC, estructura química adecuada para la exportación de colesterol⁸³. Por lo tanto, el ciclo de esterificación e hidrólisis resulta el balance dinámico del tránsito del colesterol. La carga lipídica observada en los macrófagos como característica de la aterosclerosis es el resultado de alteraciones en este mecanismo regulador del contenido de colesterol **(ver Figura 15)**.

Defecto en el tránsito del colesterol

El acumulo de CE es bastante inerte, en comparación al de FC que tiene un efecto toxico. Un aumento de FC enriquece la membrana del ER afectando la esterificación del colesterol por ACAT1. El aumento de FC favorece el aumento del colesterol de la membrana celular potenciando la activación de receptores inflamatorios, ubicados en las balsas lipídicas como los receptores TLR4 y factores de transcripción como NF- κ B¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. De esta forma aunque eflujo del colesterol puede verse comprometido, la respuesta inflamatoria es amplificada. Una prolongada activación del metabolismo del colesterol puede afectar a la viabilidad celular e inducir apoptosis debido al estrés del ER⁸³ **(ver Figura 15)**.

La actividad fagocitaria del macrófago requiere tener una intacta regulación entre la esterificación y el eflujo del colesterol. Esto faculta al macrófago digerir los lípidos contenidos de las células apoptóticas. Una disregulación del metabolismo del colesterol afecta esta digestión, lo cual

conlleva a una necrosis y liberación de los componentes intracelulares que forman parte del núcleo necrótico¹⁶⁰.

Eflujo del colesterol

Varios transportadores facilitan el eflujo de los lípidos en las células espumosas. Aunque en ellas se ha descrito también una difusión pasiva¹⁶¹. Uno de los mecanismos transportadores está mediado por ABCA1 (transportador dependiente de la unión a ATP subfamilia A miembro 1) y ABCG1 (transportador dependiente de la unión a ATP subfamilia G miembro 1).

ABCA1 promueve el transporte de FC a partículas de HDL nacientes. Por el contrario, ABCG1 transporta el FC a partículas de HDL maduras¹⁶¹. Además, el FC derivado de la degradación del CE por la fusión del autofagosoma y lisosoma, también son exportados vía ABCA1¹⁶². Ambos transportadores ABCA1 y ABCG1, son incrementados transcripcionalmente en respuesta a un contenido de FC por el LXR-RXR (heterodímero receptor X hepático-receptor X retinoide), que además tiene efectos antiinflamatorios¹⁶³ (**ver Figura 15**).

3.2.3. Activación de la inmune innata

La inflamación tiene una función esencial en la iniciación, desarrollo y desestabilización de la placa aterosclerótica, siendo el macrófago la célula inflamatoria más abundante, en la inmunidad innata.

Recientemente, se ha cambiado el paradigma que la inmunidad innata no presenta características de memoria. Debido a que hay evidencias de una reprogramación epigenética que altera la expresión génica, ante una reexposición¹⁶⁴. Se ha demostrado que la hipercolesterolemia estimula la

monocitosis y que este vínculo puede ocurrir ya en la médula ósea, donde el incremento de colesterol en la membrana de la célula madre hematopoyética (HSC) conlleva al incremento de receptores de interleucina-3 (IL-3), interleucina-5 (IL-5) y M-CSF¹⁶⁵.

Estudios realizados por Van Kampen y cols, ratones *Ldlr*^{-/-} con trasplante de médula ósea de ratones alimentados con una dieta rica en colesterol, mostraron un incremento de células progenitoras mieloides, en comparación a aquellos que recibieron el trasplante de médula de ratones con dieta normal. Los progenitores mieloides mostraron hipometilación en las regiones CpG de los genes PU.1 y el factor regulador de interferón 8 (IRF8), importantes para la regulación de la proliferación de monocitos y la diferenciación a macrófago¹⁶⁶. Además, la médula ósea hipercolesterolémica promueve el incremento de la expresión de ciclinas y la pérdida de quiescencia de las células progenitoras hematopoyéticas¹⁶⁵. Por lo tanto, estos hallazgos ponen de manifiesto una nueva causalidad entre la hipercolesterolemia, las células progenitoras hematopoyéticas y la susceptibilidad a la aterosclerosis¹⁶⁷.

La respuesta inflamatoria no solo está relacionada con desregulación del metabolismo del colesterol, sino por los ligandos que se acumulan en el ateroma. Las células del sistema inmunitario innato detectan las señales de daño tisular y de inflamación, conocidos como patrones moleculares asociados a daño (DAMP), lo que favorece la secreción de interleucinas proaterogénicas que a su vez promueven la inflamación en la pared arterial¹⁶⁸. Esto es realizado por un complejo multiproteico denominado inflamosoma, que involucra la activación de caspasas inflamatorias, como la caspasa-1¹⁶⁹.

Los cristales de colesterol (CC) son localizados en los espacios extracelulares del ateroma. Aunque los CC se han asociado normalmente

con las lesiones avanzadas, estos sea han identificado también en macrófagos de lesiones tempranas en modelo animal *ApoE^{-/-}*¹⁷⁰. La internalización de CC promueve la desestabilización del lisosoma y liberación de especies reactivas de oxígeno y/o proteasas al citoplasma que estimulan una producción y secreción de IL-1 β , vía inflammasoma^{170,171}. Además, la acumulación del colesterol intracelular de las células espumosas puede convertirse en CC y activar el inflammasoma¹⁷². Este evento inflamatorio nos indica que la acumulación temprana de colesterol mínimamente modificado funciona como una señal de activación, describiendo una nueva vía por la cual el colesterol puede inducir una respuesta inflamatoria temprana en el proceso de aterogénesis^{170,173}.

La acumulación de CE en las células espumosas mediada por CD36 y TLR4-TLR6, activa el NF- κ B que conlleva la expresión de quimioquinas para el reclutamiento de los monocitos¹⁷⁴. Por lo tanto, niveles elevados de LDL promueven a una respuesta inflamatoria¹⁷⁵, lo cual soporta la hipótesis lípido-inflamatoria para el entendimiento del desarrollo de la lesión aterosclerótica, en lugar de caracterizar la aterosclerosis como un proceso lipídico o un proceso inflamatorio de forma independiente¹⁷⁶ (**Figura 15**). Estudios realizados en esta Tesis ayudan a entender los procesos moleculares implicados por la internalización de agLDL en macrófagos de pacientes con alto riesgo de desarrollar aterosclerosis prematura, como es la población con hipercolesterolemia familiar.

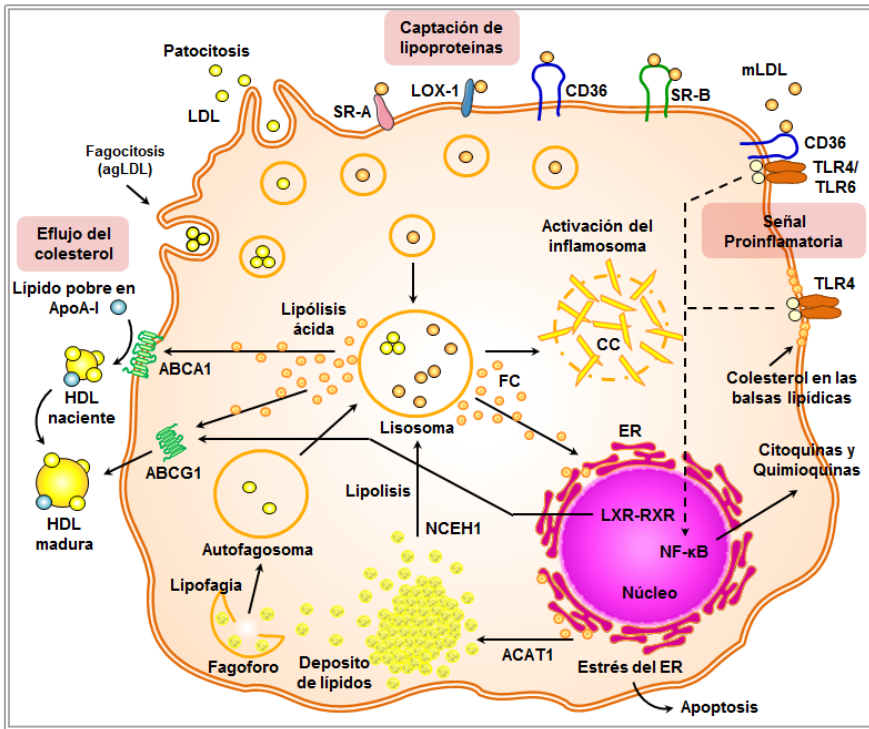


Figura 15. Captación de lipoproteínas, eflujo del colesterol por el macrófago. SR-A: receptor “scavenger” clase A, LOX-1: receptor 1 para las LDL oxidadas homologa a lectina, CD36: “cluster” de diferenciación 36, SR-B: receptor “scavenger” clase B, mLDL: LDL modificada, TLR4: receptor tipo “toll” 4, TLR6: receptor tipo “toll” 6, ABCA1: transportador dependiente de la unión a ATP subfamilia A miembro 1, ABCG1: transportador dependiente de la unión a ATP subfamilia G miembro 1, NCEH: neutral colesterol éster hidrolasa, ACAT1: acetil CoA: acetiltransferasa 1, LXR-RXR: heterodímero receptor X hepático-receptor X retinoide, NF-κB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, ER: retículo endoplasmático, CC: cristales de colesterol, FC: colesterol libre. Imagen adquirida y adaptada⁸³.

3.2.4. Polarización del macrófago

Como consecuencia del proceso de activación, los macrófagos son polarizados en varios fenotipos en las lesiones ateroscleróticas. El fenotipo M1 secreta citoquinas proinflamatorias y especies de oxígeno reactivas que conducen a un incremento del estrés en el ateroma¹⁷⁷.

Promueve la inflamación de la placa y está concentrado en zonas lipídicas de la lesión. Entre las moléculas diferenciales de este fenotipo, M1 expresa menos CD163, hemo oxigenasa 1(HMOX-1)¹⁷⁸ y LRP5¹⁷⁹ que el fenotipo M2. Los macrófagos M1 pueden estar asociados a la formación del núcleo necrótico, debido que es propenso a desarrollar la diferenciación a célula espumosa que conlleva a una apoptosis celular y liberación de su contenido¹⁸⁰. Por el contrario, el fenotipo M2 se localiza principalmente en zonas de menor inflamación. De hecho, las placas de aterosclerosis que muestran una regresión de la aterosclerosis, inducida por fármacos hipolipemiantes o por incremento de la HDL en modelos murinos, promueven un aumento de macrófagos M2^{181,182}. Este fenotipo es menos susceptible en diferenciarse a células espumosas y presenta un incremento de la regulación de genes involucrados en la fagocitosis. Por ello, tienen una incrementada actividad fagocitaria para el aclaramiento del debris celular y de células apoptóticas¹⁸³.

El fenotipo M4, con transcriptoma distinto a M1 y M2, presenta una menor expresión de CD163 y de receptores “scavengers” relacionados con la captación de LDL modificada¹⁸⁴. En estudios de lesiones caracterizados por fosfolípidos oxidados en ratones *Ldlr*^{-/-}, se ha identificado un novel fenotipo de nominado Mox. Se caracteriza por una alta expresión de HMOX-1. En experimentos *in vitro* en macrófagos derivados de médula ósea expuestos a fosfolípidos oxidados se polarizan en un fenotipo distinto de M1 y M2¹⁸⁵.

En lesiones ateroscleróticas avanzadas, la hemoglobina derivada de la hemorragia, polariza el macrófago a un fenotipo especializado con alta expresión de CD163¹⁸⁶. El CD163 es un conocido marcador que caracteriza el fenotipo M2, está relacionado con procesos antiinflamatorios^{187,188}. Es expresado únicamente en el linaje monocito-macrófago^{189,190}. El receptor CD163 consiste de una corta región

citoplasmática, un segmento transmembrana y 9 dominios extracelulares¹⁹¹. Su función más conocida es la captación de hemoglobina. La hemoglobina se libera en forma de 2 dímeros $\alpha\beta$, cual son capturados por la proteína haptoglobina plasmática formando un complejo¹⁹². Este complejo es internalizado por el CD163 y degradado por HMOX-1¹⁸⁶, una potente enzima antiinflamatoria y antioxidante¹⁹³. Los productos de esta degradación son metabolitos antiinflamatorios como interleucina-10 (IL-10)¹⁹³, biliverdina¹⁹⁴, monóxido de carbono¹⁹⁵ y hierro libre¹⁹⁶. La ausencia o poca expresión del CD163 en macrófagos de lesiones ateroscleróticas hemorrágicas humanas es asociado a un aumento del estrés oxidativo¹⁸⁶.

4. Factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular

Son las condiciones que promueven la posibilidad de que un individuo desarrolle una enfermedad cardiovascular como consecuencia de las interacciones genéticas o ambientales. Los factores de riesgo se clasifican en modificables y no modificables (WHO, 2011), siendo la dislipemia el factor de riesgo relevante en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares. Además, el efecto de los factores de riesgo está influenciado por su participación conjunta, así como su patogenia específica sobre el lecho vascular (**Tabla 4**).

Factores de riesgo de Enfermedad cardiovascular		
Modificables	Dislipemia	Niveles anormales de lípidos, hipercolesterolemia (LDL)
	Hipertensión	Disfunción endotelial, inflamación subclínica
	Diabetes	Predisposición a la obesidad
	Consumo de tabaco	Disfunción endotelial, dislipemia, alteración en la coagulación
	Obesidad	Dislipemia, inflamación subclínica, disfunción endotelial
	Sedentarismo	Aumento de BMI, hipertensión, dislipemia y CRP
	Consumo de alcohol	> de 2 bebidas alcohólicas al día. Hipertensión
	Medicación	Terápia hormonal
	Dieta no saludable	Alto consumo de grasas saturadas. Dislipemia
No modificables	Edad	Mayores de 55 años
	Género	Mayormente en hombres que en mujeres premenopausicas
	Historia familiar	Predisposición genética
	Etnia	Alto riesgo en africanos y asiáticos

Tabla 4. Clasificación de los factores de riesgo. BMI: índice de masa corporal, CRP: proteína C reactiva.

4.1. Dislipemia

La dislipemia se refiere a una concentración anormal de lípidos en la sangre. Niveles elevados de LDL conllevan al desarrollo de la aterosclerosis, mientras que altos niveles de HDL favorecen la reducción en el riesgo de padecer alguna enfermedad cardiovascular. Así, niveles incrementados de LDL y colesterol total y niveles bajos de HDL

incrementan el riesgo de aterosclerosis. Por ello, la LDL es considerada como el objetivo terapéutico para la reducción del colesterol plasmático.

Existen diferentes guías internacionales que describen los niveles óptimos de lípidos en el plasma a fin de controlar el riesgo cardiovascular. Entre ellas “The National Cholesterol Education Program–Adult Treatment Panel III (NCEP/ATPIII)” es ampliamente utilizada (**ver Tabla 5**).

Recientemente, la sociedad americana de cardiología (American College of Cardiology, ACC) y la AHA (American Heart Association) en colaboración con el NHLBI (National Heart, Lung, and Blood Institute) han diseñado nuevas pautas para la prevención de enfermedades cardiovasculares y el manejo del incremento de colesterol plasmático. Sin embargo, su diferencia respecto a la anterior guía es la recomendación de estatinas más agresivas, basándose en la implementación de un nuevo algoritmo de predicción de riesgo¹⁹⁷.

La guía diseñada por la sociedad europea de cardiología (European Society of Cardiology, ESC) muestra similitudes y diferencias con las guías americanas en la clasificación de los riesgos cardiovasculares y del apropiado uso de medicamentos. Sin embargo ambas guías, la americana y la europea están de acuerdo en la prevención de la progresión de la aterosclerosis y la disminución de la carga de la enfermedad durante el tiempo de vida. Respecto a los niveles de colesterol, ambas guías apoyan el objetivo de disminuir los niveles de LDL para los individuos en situación de riesgo, por ejemplo aquellos con un alto riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular deberían tener $<70\text{mg/dL}$ de LDL o $\geq 50\%$ de reducción de LDL (recomendación europea vs recomendación americana)¹⁹⁸.

Parámetro lipídico	Categoría de riesgo	Objetivo óptimo	Factor de riesgo
Colesterol total	General	<190 mg/dL	-
	Alto	<175 mg/dL	-
LDL	Bajo	<160 mg/dL	≤ 1RF
	Moderado	<130 mg/dL	≥ 2RF, FRS < 10%
	Moderado alto	<130 mg/dL	≥ 2RF, FRS 10-20%
	Alto	<100 mg/dL	≥ 2RF, FRS > 20%
	Muy alto	<70 mg/dL	CVD
Colesterol no LDL (TC-HDL)	Bajo	<190 mg/dL	≤ 1RF
	Moderado	<160 mg/dL	≥ 2RF, FRS < 10%
	Moderado alto	<160 mg/dL	≥ 2RF, FRS 10-20%
	Alto	<130 mg/dL	≥ 2RF, FRS > 20%
HDL	Hombre	<45 mg/dL	-
	Mujer	<55 mg/dL	-
Triglicéridos	-	<150 mg/dL	-
ApoB	Moderado	<90 mg/dL	DM
	Alto	<80 mg/dL	CVD/DM+≥ 1RF

Tabla 5. Guía de manejo clínico de acuerdo al objetivo óptimo de los parámetros lipídicos. Guía del NCEP/ATP III 2004. TC: Colesterol total, ApoB: Apolipoproteína B, CVD: enfermedad cardiovascular, DM: Diabetes mellitus, RF: Factor de riesgo, FRS: Puntación de riesgo Framingham.

4.1.1. Clasificación

Dislipemia primaria

Este término se refiere a las patologías que son consecuencia de un incremento de producción o un defecto en la captación de LDL y triglicéridos, como resultado de mutaciones monogénicas o múltiples¹⁹⁹ (ver **Tabla 6**).

Dislipemia secundaria

Comprende a aquellas dislipemias asociadas a una patología, al estilo de vida o efecto de fármacos. Estos incluyen hipotiroidismo, diabetes

mellitus, síndrome nefrótico, obesidad, alcoholismo, anabólicos esteroideos, estrógenos y consumo de tabaco como algunos ejemplos.

Clase	Alelo	Consecuencia de la mutación LDLR
I	Nulo	Deleciones grandes y deleciones en el promotor
II	Defectuoso para el transporte	La proteína codificada no adopta su estructura tridimensional
III	Defectuoso para la unión	Síntesis y ubicación celular normal, pero carece de capacidad de unión al LDL
IV	Defectuoso para la internalización	El receptor es incapaz de agruparse en vesículas recubiertas de clatrina
V	Defectuoso para el reciclado	El receptor no es liberado de la LDL en el endosoma

Tabla 6. Clases de dislipemia primaria. Tabla adquirida y adaptada¹⁹⁹.

4.1.2. Hipercolesterolemia familiar (FH)

La hipercolesterolemia familiar fue descrita hace más de 125 años, pero inicialmente debido a la característica visual de xantomas y xantelasmas fue considerada como una enfermedad dermatológica²⁰⁰. En 1938, Carl Müller, reconoció el vínculo entre xantomas de tendón, los niveles elevados de colesterol plasmático y las lesiones en las arterias coronarias²⁰¹.

Posteriormente Wilkinson y cols, relacionaron las características anteriores con una alta incidencia de aterosclerosis prematura y progresión a una enfermedad arterial coronaria, cerebral o periférica²⁰².

La característica hereditaria de esta enfermedad fue establecida por Khachadurian en 1964 mediante estudios de pedegree en una familia de libaneses²⁰³, que le llevaron a identificar la hipercolesterolemia familiar como una enfermedad monogénica autosómica dominante con efecto de

dosis. La frecuencia de homocigotos FH es 1/500 y de los heterocigotos 1/1,000,000 en poblaciones europeas con baja prevalencia de matrimonios consanguíneos²⁰⁴.

Base genética de la FH

Brown y Goldstein en 1986, identificaron el efecto genético de la FH con el descubrimiento del LDLR^{205,206}. Estos investigadores descubrieron que los fibroblastos de pacientes FH no disminuye la síntesis de colesterol, cuando son incubadas con suero o LDL. Sin embargo, la síntesis de colesterol disminuye cuando son expuestos a colesterol puro, lo que lleva a descubrir que la FH es el resultado de la falta de afinidad del LDLR para capturar la LDL^{205,206}. Posteriormente, se identificaron múltiples mutaciones del gen LDLR²⁰⁷, siendo útiles en la clínica de la FH²⁰⁸⁻²¹⁰. La FH comprende 3 grupos de mutaciones, las mutaciones del LDLR (más de 1700 mutaciones según The University College London Database)²¹¹, APOB²¹² y PCSK9 (proteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9)²¹³ (**ver Figura 16**). Debido a la mayor relevancia e impacto de las mutaciones LDLR con los estudios de FH²⁰⁴, se describe la siguiente clasificación:

- a) **Clase 1:** Deleciones que origina codón de parada o deleciones extensas. El gen presenta un tamaño anormal. Alelo nulo.
- b) **Clase 2:** El gen es traducido y la proteína codificada. Sin embargo, no adopta la forma tridimensional. El receptor es incapaz de abandonar el retículo endoplasmático o hacerlo de forma lenta. Alelo defectuoso en el plegamiento.
- c) **Clase 3:** La proteína es transportada a la membrana celular. Sin embargo, carece de afinidad y capacidad de unión a la LDL. Alelo defectuoso para la unión.

d) **Clase 4:** El receptor es incapaz de agruparse en vesículas recubiertas de clatrina, siendo no metabolizado. Alelo defectuoso para la internalización.

e) **Clase 5:** El receptor no es liberado de la LDL en el endosoma. El LDLR es degradado disminuyendo su concentración en la superficie celular. Alelo defectuoso para el reciclado.

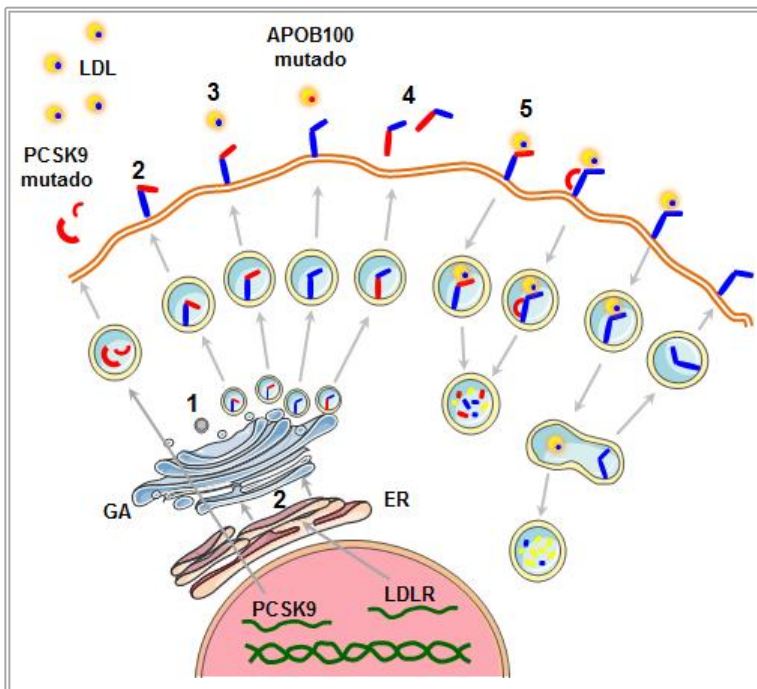


Figura 16. Mecanismo de las mutaciones en FH. Las mutaciones en LDL, PCSK9 y apoB100 están señaladas de color rojo. Los números del 1 al 5 corresponden a la clasificación de mutaciones del LDLR. Las mutaciones en apoB100 impiden la unión de la LDL al LDLR. Las mutaciones en PCSK9 aumentan la degradación del LDLR. GA: aparato de Golgi, ER: retículo endoplasmático.

Intervención farmacológica de las dislipemia primaria

a) **Estatinas:** Las estatinas tienen un efecto antiaterogénico debido a su capacidad de reducir la síntesis de colesterol²¹⁴. Estos compuestos son inhibidores de la HMGCR, enzima que convierte el mevalonato en precursor de colesterol. Su mecanismo de acción es la competición con el sustrato para el sitio activo de la enzima, lo que perjudica su función. La inhibición del mevalonato por las estatinas conlleva a efectos independientes de la reducción del colesterol, llamados efectos pleiotrópicos. Estos efectos se observan a nivel de la función endotelial, estabilización de la placa de ateroma, propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y reducción de mediadores de proliferación celular entre otros²¹⁵⁻²¹⁸. Muchos de estos efectos son atribuidos a la inhibición de la prenilación de proteínas por los intermediarios de la vía del mevalonato (Figura 17).

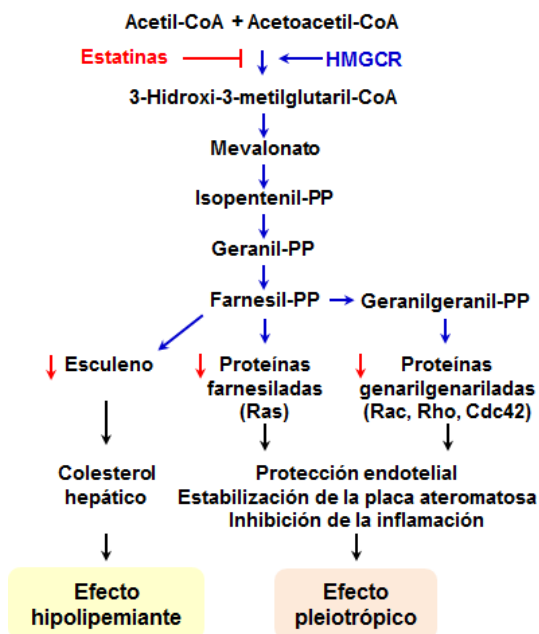


Figura 17. Efecto de las estatinas. Imagen adquirida y adaptada²¹⁸.

El tratamiento con estatinas es la elección general para reducir los riesgos de padecer enfermedades cardiovasculares asociadas al metabolismo defectuoso de los lípidos. Sin embargo, se ha descrito reacciones adversas del 10 a 20%²¹⁹, siendo los efectos secundarios más adversos la toxicidad hepática y muscular.

A pesar que las estatinas son los fármacos hipolipemiantes de primera elección, su uso individual no es suficiente para disminuir las concentraciones de LDL colesterol a niveles recomendados. Así que, las estatinas junto con otros agentes reguladores de lípidos pueden reducir los niveles de colesterol y de otras fracciones lipídicas.

b) Ezetimibe: Es un inhibidor selectivo de la absorción del colesterol a nivel intestinal. Actúa sobre el transportador de esterol NPC1L1 (proteína de Niemann-Pick C1L1). Su combinación con las estatinas resulta también en la reducción del colesterol hepático.


c) Fibratos: Son sustancias que activan al receptor nuclear denominado receptor activado proliferador de peroxisomas (PPAR), que aumenta la síntesis de lipoproteína lipasa que reduce la concentración de triglicéridos en sangre. Indicado en las dislipemias mixtas junto a las estatinas.

d) Secuestrantes de ácido biliar: Disminuye el colesterol intrahepático y regula la expresión de LDLR, incrementando la remoción de LDL de la circulación periférica. Sin embargo, a largo tiempo su eficacia es disminuida.

e) Niacina: Aumenta la HDL y ha sido usada tradicionalmente para la disminución LDL y triglicéridos.

5. RNA no codificante

El término RNA no codificante (ncRNA) es empleado para referirse al RNA que no traduce una proteína. Sin embargo, no significa que estos ncRNA no contengan información o realicen funciones biológicas. Cada vez hay una mayor evidencia de que la mayoría del genoma de los mamíferos y otros organismos complejos transcriben ncRNA, cuya función aun no es completamente conocida^{220,221}. Por el contrario, los genes que codifican las proteínas representan únicamente el 1.5% del genoma²²². Los ncRNA parecen estar comprometidos con el control de la regulación genética, incluyendo la regulación de la cromatina, transcripción, maduración del mRNA, traducción del mRNA y estabilidad de proteínas^{223,224} (**Figura 18**).



The diagram shows a blue circle representing the human genome. Inside the circle, a smaller blue circle is labeled 'RNA no codificante (ncRNA)'. Below the main circle, a red circle is labeled 'Traducción de mRNA'. An arrow points from the ncRNA circle towards the right, indicating its interaction with the translation process.

Tipo de ncRNA	Función/definición
ncRNA mediano y pequeño	miRNAs: Regulación post-transcripcional
	piRNAs: Silenciamiento de transposon en línea germinal
	endo-siRNAs: Regulación post-transcripcional
	snoRNAs: Modificación de RNA
	snRNAs: Maduración del pre-mRNA
	tRNA: Traducción
	H1 RNA: Procesamiento de pre-tRNA
	RMRP: Procesamiento de rRNA y mtRNA
	7SL RNA: Dirección del transito de proteínas
	TERC: Mantenimiento del extremo telomérico
	scaRNAs: Modificación de RNA
	rRNAs: Traducción
	Y RNA: Replicación de RNA y maduración de small RNA
	ncRNA largo
lincRNA: <i>RNA no codificante intergénico largo</i>	
NAT: <i>Transcrito anti-sentido natural</i>	
eRNA: <i>RNA asociado al potenciador</i>	
circRNA: <i>RNA circulantes</i>	
gsRNA: <i>RNA asociado al gen en sentido</i>	
pRNA: <i>RNA asociado al promotor</i>	

Figura 18. Clasificación del RNA humano. Imagen adquirida y adaptada²²¹.

5.1. RNA no codificante largo (lncRNA)

El termino lncRNA representa un grupo de ncRNA que tienen con una estructura semejante al mRNA, pero sin capacidad de codificar proteínas²²⁵. Su función se atribuye a su estructura modular, que les permiten interactuar con proteínas, DNA y RNA²²⁶. Recientemente se ha descrito una asociación entre lncRNA y miRNA²²⁷ (**ver Figura 19**).

LncRNA como precursores de miRNAs: Es el caso del miR-675 que está contenido en el exón 1 del lncRNA H19, y que funciona como regulador en la liberación del miRNA y su potente propiedad antiproliferativa^{228,229}.

Unión directa del lncRNA y miRNA: Estudios realizados en proteínas argonautas para identificar los sitios de unión de miRNAs en el genoma humano, encontraron los genes diana codificantes esperados. Sin embargo, varios lncRNA fueron dianas de miRNAs, siendo una característica inexplorada de interacción entre ambas moléculas²³⁰.

Competición del lncRNA y miRNA por los sitios de unión: Un ejemplo que describe esta interacción está presente en lncRNA BACE1 y el miR-485-5p. El incremento de expresión de lncRNA BACE1 bloquea la unión del miR-485-5p sobre el gen BACE1, resultando en la reducción de la represión traduccional por parte del miR-485-5p²³¹.

LncRNA con función de “esponja”: El lncRNA antisentido expresado PTENpg1, regula la expresión parcial de PTEN a través de su actividad de captación o “esponja” de miRNAs. El lncRNA-ROR también une miRNAs resultando en el incremento de regulación de los factores de transcripción que participan en el mantenimiento y diferenciación de la célula madre embrionaria^{232,233}.

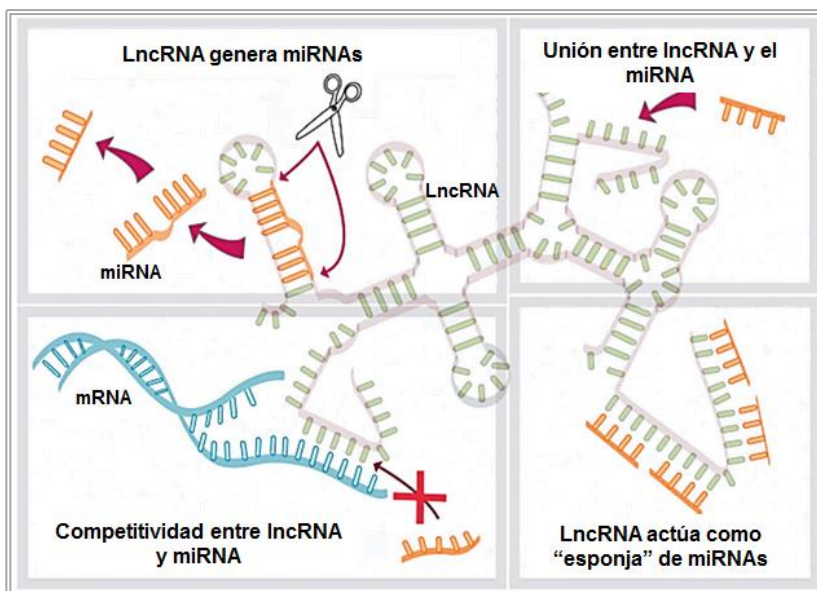


Figura 19. Interacción entre lncRNA y miRNA. Imagen adquirida y adaptada²²⁷

5.2. MiRNAs

Los miRNAs (microRNAs) son pequeñas moléculas ~22 nucleótidos de RNA endógeno no codificante que han sido descubiertos no solo en organismos multicelulares, sino también de manera diferencial en tejidos y células²³⁴. Mediante herramientas computacionales se estima que más de una tercera parte de los genes en el organismo humano están regulado por los miRNAs²³⁵. Por lo tanto, su disregulación se asocia a diversas enfermedades. Un reto de la investigación de los miRNAs es la predicción de unión a mRNA específicos (gen diana). En las células de mamíferos las uniones son parcialmente complementarias, un miRNA puede regular varias dianas genéticas y varios mRNAs pueden ser regulados por un miRNA. Su mecanismo de control es la inhibición de la traducción o el corte del mRNA con su consecuente degradación. Según la base de datos del miRBase v21 (<http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>),

hoy en día se han descrito 1881 miRNAs precursores (forma inmadura) y 2588 miRNAs maduros (forma activa).

5.2.1. Organización genómica del miRNA y biogénesis

Los miRNAs se generan a partir de moléculas de doble cadena con una estructura a modo de horquilla^{229,236}. Los genes codificantes de miRNAs están localizados en diferentes partes del genoma. El 80% de ellos se encuentran en regiones intrónicas y el resto se distribuye en zonas exónicas e intergénicas²³⁷. Aproximadamente la mitad de los miRNAs conforman familias, ya que comparten una secuencia de nucleótidos conocida como “seed”²³⁸.

Otros miRNAs están agrupados como “Clusters” por su localización en la misma región del genoma²³⁷. Sin embargo, no todos los miembros de la familia son expresados al mismo nivel, lo que indica una regulación post-transcripcional de los miRNAs²³⁹⁻²⁴¹ (**Figura 20**). Los miRNAs están filogénicamente bien conservados en animales bilaterales, por lo cual indica una función importante en la evolución animal²⁴².

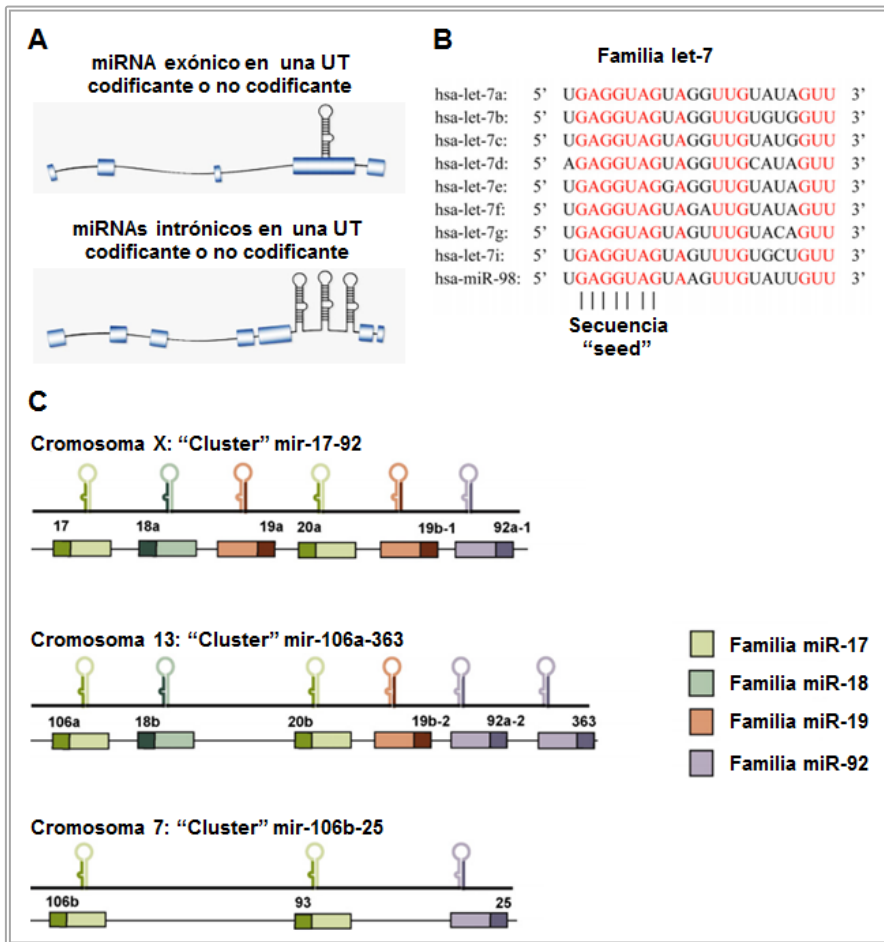


Figura 20. Regiones y tipo de agrupación de los miRNAs. (A) Localización de los miRNAs, (B) MiRNAs en familia por la secuencia "seed". (C) MiRNAs en "cluster" con diferentes familias. UT: unidad transcripcional. Imagen adquirida y adaptada^{238,241}.

Biogénesis

La mayoría de los genes de miRNAs están transcritos por la RNA polimerasa II. Estos transcritos (pri-miR) son similares a los RNA codificantes de proteínas (mRNA). Es decir, presentan un extremo 3' poliadenilado y un capuchón en el extremo 5' de 7-metil guanilato²⁴³,

teniendo varias Kb de longitud²⁴⁴. Contienen regiones estándares conocidas como tallo, bucle y región ssRNA (RNA de cadena sencilla), que conforman la estructura en horquilla. La región ssRNA y del tallo son reconocidas por DGCR8 por sus dominios de unión. Después de la unión del miRNA y DGCR8, se produce un corte catalizado por Drosha (actividad ribonucleasa III, RNAsa)²⁴⁵. DGCR8 y Drosha forman el complejo microprocesador, que se encuentra en el núcleo. Otra enzima que participa en la maduración del miRNA por corte es Dicer (**Figura 21**).

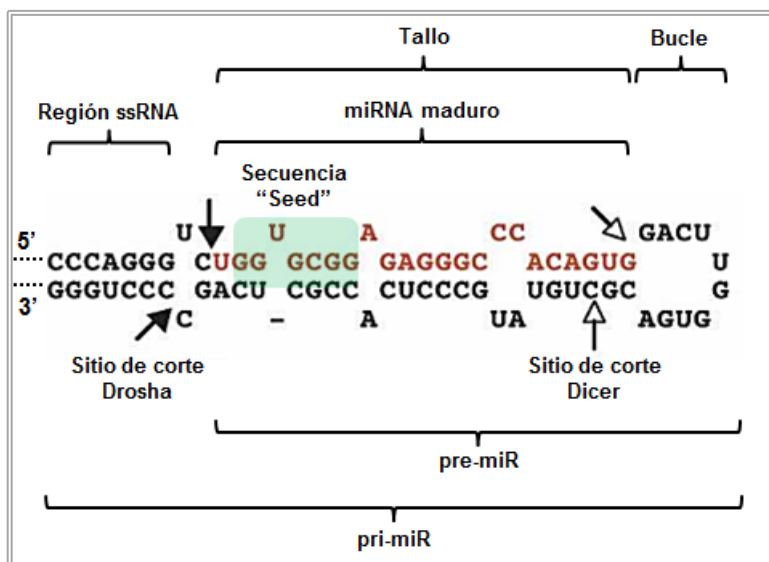


Figura 21. Regiones de la estructura secundaria del pri-miR. Imagen adquirida y adaptada²²⁹.

Después de la acción del complejo microprocesador al pri-miR; se genera una horquilla de 60 - 70 nucleótidos llamado pre-miR. Esta estructura posee 2 nucleótidos colgantes en el extremo 3' y un grupo fosfato en el extremo 5', siendo característico de los RNA procesados por RNAsas. El

pre-miR es exportado del núcleo al citoplasma por la Exp5 (Exportina-5)²⁴⁶. En el citoplasma, a través de un proceso mediado por GTP/GDP, el pre-miR es liberado de la Exp5 y es reconocido por Dicer (actividad ribonucleasa III, RNAsa), mediante su extremo 3' y corta las secuencias de nucleótidos cerca del bucle. Este corte elimina la horquilla del miRNA y genera una molécula dúplex de ~22 nt²⁴⁷.

La proteína de la familia Argonauta (Ago) que forma parte del RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA) se une a una cadena del dúplex, lo cual es el miRNA maduro (cadena guía), y la otra cadena (cadena pasajera o miRNA*) es degradada. La elección de la cadena se debe a la estabilidad termodinámica relativa, aunque esto no se cumple para todos los miRNAs. Es decir, aquella cadena relativamente inestable en el extremo 5', normalmente es la que se mantiene^{236,248} (**ver Figura 22**).

La biogénesis de los miRNAs también está sujeta a procesos de regulación, pudiendo ocurrir en 3 niveles:

En la transcripción.- Factores de transcripción como Sox2 y Nanog regulan los promotores de los genes miRNAs, siendo estos preferentemente expresados en células embrionarias²⁴⁹. El p53 activa la familia miR-34 que induce la detención del ciclo celular durante el estrés celular²⁵⁰.

Por modificación molecular.- Las proteínas ADAR desaminan la adenina y la transforman en inosina. De hecho, la modificación del pri-miR-142 puede interferir con la actividad de Drosha-DGCR8 para la expresión de sus formas maduras²⁵¹.

En el procesamiento de Drosha - Dicer.- Un ejemplo es el lin-28 y let-7. Donde la unión de lin-28 al bucle del pri-miR-let-7 impide su procesamiento por Drosha²⁵², así como por Dicer²⁵³.

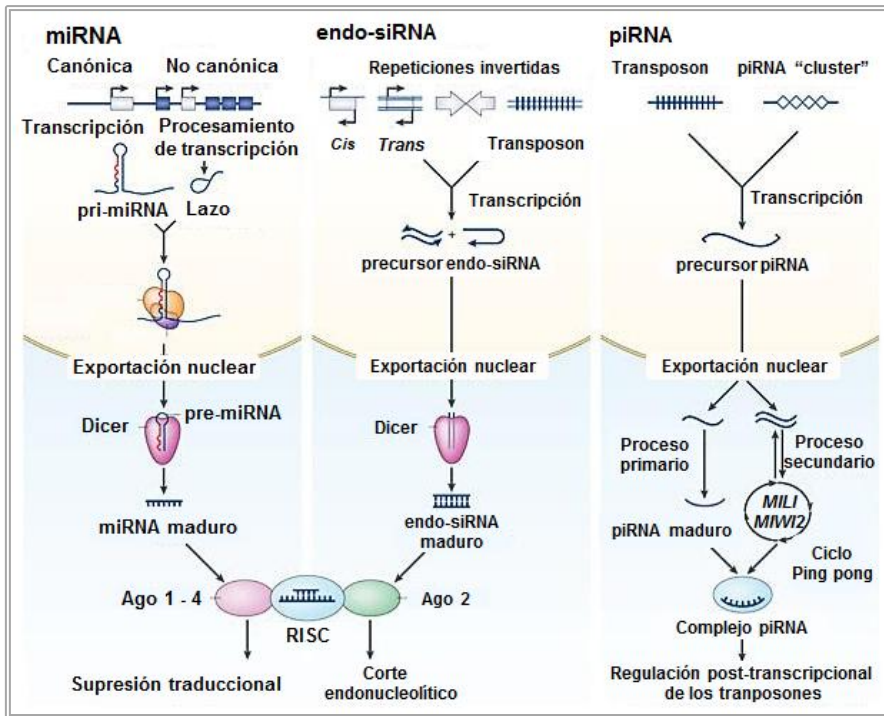


Figura 22. Biogénesis de los miRNAs vs otros RNAs pequeños. Imagen adquirida y adaptada²⁴⁸.

5.2.2. Mecanismo de regulación

EL mecanismo de regulación, tras la unión del miRNA con su mRNA específico, causa la represión de la traducción o la degradación del gen^{254,255} (ver Figura 23). Sin embargo, la represión de la traducción depende de varios factores como los siguientes:

Grado de complementariedad.- Si la complementariedad entre miRNA y mRNA es alta, el mRNA es cortado y degradado. Si la complementariedad no es suficiente para inducir la degradación del gen, se produce una represión de la traducción proteica.

Tipo de proteína Ago.- Las proteínas miembros de la familia Ago están asociadas a los miRNAs mediante RISC. El Ago2, se cree que es el responsable de la actividad de corte del mRNA. En cambio, los otros miembros se relacionan con una función predominantemente represora²⁵⁶.

Número de posibilidades de unión al target gene.- El mRNA diana puede contener varios sitios de unión para el mismo o diferentes miRNAs. Esto implica que múltiples sitios de unión trabajan independientemente²⁵⁷.

Lugar de unión del miRNA.- Un amplio número de evidencias indican que el miRNA se une a la región 3'UTR del mRNA. Sin embargo, recientemente se ha identificado diferentes sitios de unión, tanto en la región 5'UTR²⁵⁸, como en la región codificante²⁵⁹ o en la región promotora de los genes²⁶⁰.

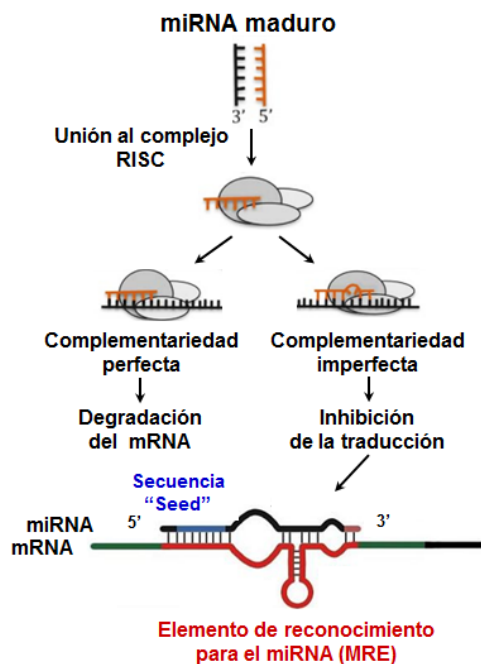


Figura 23. Regulación de los microRNAs. Imagen adquirida y adaptada²⁵⁵.

5.2.3. MiRNAs en la patología vascular

El entendimiento de las vías moleculares en los últimos años, ha demostrado que el emergente campo de los miRNAs es importante en la regulación de los procesos patofisiológicos involucrados en la aterosclerosis²⁶¹⁻²⁶³ (**Tabla 7**). Sin embargo, su potencial uso en el diagnóstico, pronóstico o respuesta en la terapéutica cardiovascular aún está en discusión²⁶⁴.

Muestra o Tipo celular/proceso		Expresión alterada del miRNA
Plasma/suero	Enfermedad cardiovascular	miR-126/-133a/-145/-155/-17/-208a/-92a
Monocito	Diferenciación a macrófago	miR-9/-17/-20a/-106a/-146a/-155/-222/-424/-503/-106/-21
Macrófago	Activación	miR-146a/-146b/-147/-155
	Inflamación	miR-342-5p/-9/-147
	Ingesta de lípidos	miR-155
	Cambio de fenotipo	miR-33/-155/-223/-27a
	Proaterogénico	miR-125a-5p/-150
	Formación de célula espumosa	miR-33/-125a/-146a/-155
	Apoptosis	miR-15a/-16/-155
Linfocito T	Diferenciación	miR-125b/-146a/-150/-155/-17~92 "cluster"/-182/-29/-326
Célula endotelial	Adhesión	miR-126/-27/-10a/-17-3p/-21/-155/-181b/-221/-222
	Migración	miR-21/-150/-155/-200a/-218/-320
	Inflamación	miR-10/-125a/-125b-5p/-126-5p/-132/-155/-663/-17-3p/-31/-92a/-221/-222/-712/-181b/-143/-145
	Proaterogénico	miR-21/-217/-365/-200/-210
Célula muscular lisa	Proliferación	miR-21/-130a/-146a/-221/-222/-26/-133/-143/-145/-208/-let-7d/-let-7g/-132/-126
	Cambio de fenotipo	let-7d/-1/-100/-10a/133/-143/-145/-146a/-155/-204/-208/-21/-221/-24/-26a/-31
	Proaterogénico	miR-26a/-29/-24/208
Plaquetas	Enfermedad cardiovascular	miR-340*/-624*

Tabla 7. MiRNAs relacionados con la aterosclerosis. Tabla adquirida y adaptada²⁶¹⁻²⁶³.

6. Aspectos pendientes de resolver

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte a nivel mundial con un impacto negativo, tanto en salud como a nivel socio-económico. La aterosclerosis, enfermedad crónica lípido-inflamatoria, conlleva al desarrollo de enfermedades cardiovasculares que se presentan en forma prematura en sujetos con hipercolesterolemia familiar (FH). Esta enfermedad genética se caracteriza por altas concentraciones de colesterol, principalmente por LDL que junto a otros factores de riesgo conllevan a una activación del monocito, modificando su fenotipo y potenciando su actividad inflamatoria y proaterogénica. Los monocitos y macrófagos son componentes celulares relevantes en el sistema de inmunidad innata y juegan una función preponderante en el inicio, progresión y complicación de las lesiones. A pesar de los avances en el conocimiento de la fisiopatología de la aterosclerosis, existen muchos aspectos en la interacción lípido-inmunidad innata-inflamación que quedan sin resolver.

La LDL infiltrada en la pared vascular sufre modificaciones que aumentan su aterogenicidad, son captadas por los macrófagos y potencian la respuesta inflamatoria de éstos. Estudios previos de nuestro grupo demuestran la importancia de los receptores LRP, específicamente LRP1 y LRP5, en la internalización de lípidos por células musculares lisas y macrófagos residentes en la íntima arterial y su transformación en células espumosas, características de las lesiones ateroscleróticas humanas. Hasta el momento se desconoce, sin embargo, el papel de los receptores LRP en relación al fenotipo y capacidad de internalizar lípidos en macrófagos de pacientes FH, con una función disminuida del receptor LDLR.

Estudios recientes sugieren que el sistema de inmunidad innata, de forma similar a la inmunidad adquirida, es capaz de desarrollar una memoria a

largo plazo. En este sentido se ha propuesto que estímulos proaterogénicos como hipercolesterolemia podrían inducir señales en las células de inmunidad innata como es el caso de monocitos y macrófagos que se mantendrían tras revertirse el estímulo aterogénico que las originó. Nuestro grupo ha descrito recientemente que los pacientes FH, aun estando en tratamiento hipolipemiente, presentan niveles de micropartículas circulantes derivadas de la fracción monocitaria, con marcadores de activación celular. Queda, sin embargo, por responder si macrófagos derivados de estas células, en condiciones *in vitro*, en ausencia del estímulo hipercolesterolémico mantienen el perfil inflamatorio y si este depende del tiempo de exposición a condiciones patológicas.

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

El estado de inflamación persistente presente en las lesiones arterioscleróticas viene condicionado por el acúmulo de LDL en el espacio subendotelial y su posterior modificación. La infiltración de monocitos en la íntima arterial y su diferenciación a macrófago es a su vez dependiente de los niveles de LDL. Por su parte, el macrófago es el componente del sistema de inmunidad innata más relevante en la placa aterosclerótica, habiéndose asociado su fenotipo y función al contenido lipídico de la misma.

La hipercolesterolemia familiar, se caracteriza por niveles elevados de LDL consecuencia de una disfunción del receptor LDLR y está asociada al desarrollo prematuro de la aterosclerosis y un riesgo elevado de patología cardiovascular. LRP1 y LRP5, miembros de la familia de receptores LDL, están ampliamente presentes en lesiones ateroscleróticas y contribuyen a la internalización de lípidos por el macrófago y su transformación en célula espumosa. Evidencias recientes sugieren que la interacción lípido-inflamación puede ser un factor determinante en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas tempranas en pacientes FH.

La **hipótesis** de esta tesis se basa en 3 aspectos complementarios: (1) las LDL afectan el fenotipo del monocito y su interacción con el entorno extracelular condicionando con ello su capacidad de diferenciación a macrófago. (2) Los receptores LRP1 y LRP5 participan en la internalización de lípidos en macrófagos FH y contribuyen al fenotipo inflamatorio de estas células. (3) Los macrófagos en pacientes FH desarrollan una respuesta inflamatoria mantenida en el tiempo que favorece el desarrollo de lesiones ateroscleróticas

En base a esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Investigar el efecto de niveles patológicos de LDL sobre el fenotipo y capacidad de diferenciación del monocito, determinando la implicación de anoikis y su vía de señalización en este proceso.
2. Analizar el perfil de expresión de proteínas relacionadas al receptor de LDL (LRPs) en leucocitos circulantes y macrófagos derivados de monocitos en pacientes FH, en relación con su fenotipo y función.
3. Caracterizar el perfil de expresión diferencial de genes inflamatorios y su regulación postranscripcional mediada por miRNAs en macrófagos de pacientes FH, determinando su relación con el tiempo de exposición a hipercolesterolemia como factores de riesgo aterogénico

III. MATERIALES Y METODOS

1. Diseño experimental

El trabajo de investigación de la presente tesis refiere a componentes celulares de la inmunidad innata, principalmente monocito y macrófago, efectuado en sujetos sanos y sujetos con diagnóstico genético de hipercolesterolemia familiar.

Los estudios se han realizado en la fracción de células sanguíneas circulantes (PBL), así como en monocitos tras su aislamiento y en macrófagos derivados de los monocitos de la sangre, como se muestra en la **Figura 24**. Además, como prueba de concepto se ha utilizado un modelo hipercolesterolémico en ratón con genotipo normal y deficiente en *Lrp5*.

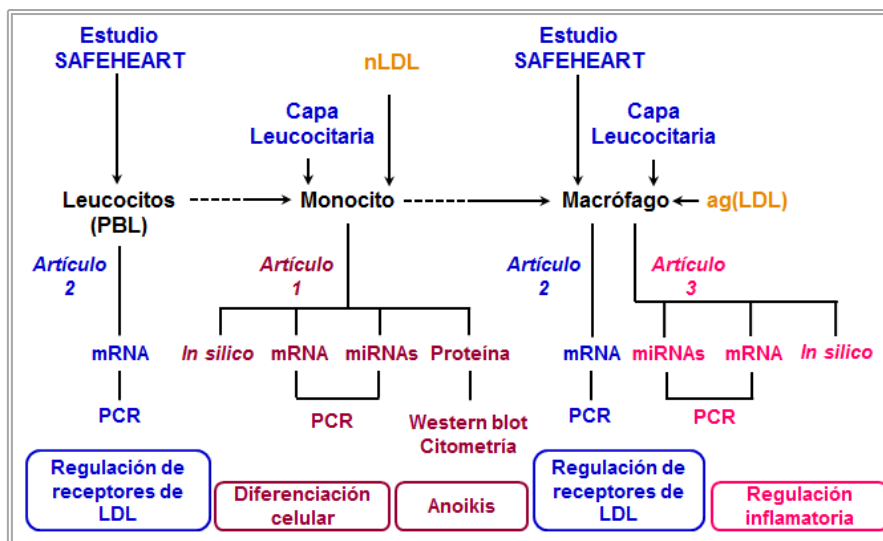


Figura 24. Esquema del diseño experimental en humanos. LDL: Lipoproteína de baja densidad, PCR: reacción en cadena polimerasa. Las células de la capa leucocitaria fueron procedentes de donantes sanos del Banco de sangre y tejidos de Barcelona.

2. Población de estudio

La población de estudio incluye: **a)** Sujetos con diagnóstico de FH, heterocigotos para las mutaciones del gen LDLR (grupo FH), sin mutación en genes APOB o PCSK9. **b)** Sujetos sin mutación para el gen LDLR con o sin hipercolesterolemia secundaria (grupo control).

Pacientes FH y controles refieren a un subgrupo (N=205) de la Cohorte Española de hipercolesterolemia familiar, SAFEHEART (SpAnish Familial hypErcHolEsterolaemia cohoRt STudy).

SAFEHEART es un estudio abierto de cohorte prospectivo y multicéntrico, donde el diagnóstico de la FH está molecularmente bien definido por las mutaciones en LDLR²⁶⁵. Las características de la cohorte y de las variables antropométricas, bioquímicas y clínicas fueron ampliamente documentadas en el momento de la inclusión²⁶⁵.

El estudio SAFEHEART está aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica de la Fundación Jiménez Díaz (CEIC-FJD) [protocol's number: 01/09], y realizado siguiendo las prácticas clínicas definidas por la Declaración de Helsinki para estudios que emplean humanos. Previamente a la inclusión, todos los participantes han firmado el consentimiento tras ser informados en detalle sobre los objetivos y procedimientos del estudio.

El trabajo de investigación se ha dividido en 3 subestudios con objetivos complementarios y que refieren a 3 subgrupos poblacionales independientes de la cohorte SAFEHEART.

Los subestudios 1 y 2: Realizado con el fin de determinar el perfil de expresión de receptores lipídicos en la fracción PBL en pacientes con hipercolesterolemia familiar, en comparación con sujetos que no

presentan mutaciones en el LDLR, aparentemente sanos o con individuos con hipercolesterolemia secundaria (*Artículo 2*).

El subestudio 3: Se ha tenido como objetivo definir el perfil de expresión de los receptores lipídicos, así como el patrón diferencial de miRNAs y potenciales genes diana, identificado por análisis *in silico* en macrófagos derivados de monocitos en individuos de la cohorte SAFEHEART, comparando sujetos con y sin hipercolesterolemia familiar (*Artículo 2 y 3*).

De todos los sujetos del estudio se dispuso de información sobre las variables antropométricas y clínicas recogidas en el momento de inclusión a través de formularios estándares y una visita personal con investigadores clínicos especialistas, que participan en el estudio SAFEHEART. Las variables bioquímicas se determinaron en suero en el laboratorio de análisis de referencia^{266,267}, a partir de sangre colectada en el momento de la inclusión. Los grupos de comparación incluidos en esta tesis se resumen en la **Figura 25**.

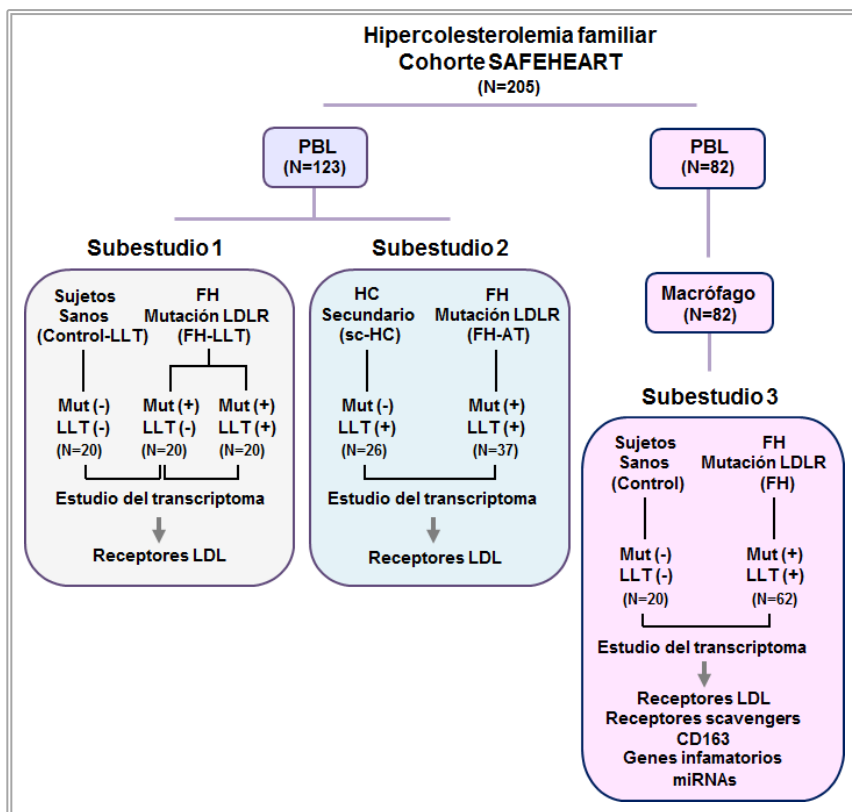


Figura 25. Diseño de los subestudios de población SAFEHEART. FH: hipercolesterolemia familiar, sc-HC: hipercolesterolemia secundaria; Mut (+): con mutación en LDLR, Mut (-): sin mutación en LDLR; LLT (+): con tratamiento hipolipemiante; LLT (-): sin tratamiento hipolipemiante.

Subestudio 1: La fracción de PBL obtenida de pacientes FH con o sin tratamiento hipolipemiante (LLT) (grupo FH-LLT⁺ o grupo FH-LLT⁻, N=20 cada grupo). Se caracteriza con valores de LDL entre 180-300mg/dL. El grupo control está formado por sujetos sanos no tratados con LLT (grupo control-LLT⁻, N=20), que presentaron niveles de LDL de 80 a 110 mg/dL (Artículo2).

Subestudio 2: PBL de pacientes FH con aterosclerosis subclínica confirmada por resonancia magnética²⁶⁶ (FH-AT, N=37) y de un grupo control con hipercolesterolemia secundaria (sc-HC, N=26) (*Artículo2*).

Subestudio 3: Pacientes FH tratados con tratamiento hipolipemiante (LLT) (grupo FH, N=62), de los cuales el 100% presentaban niveles de LDL en el rango patológico a pesar del tratamiento (120-300mg/dL). EL grupo FH se dividió en 2 subgrupos de acuerdo a la severidad de la mutación del LDLR (N=40, FH no null; N=22, FH null), como control se utilizó un grupo de sujetos de la cohorte SAFEHEART con valores de LDL entre 97 a 145mg/dL (N=20, de los cuales 9 se encontraban en LLT) (*Artículo2 y 3*).

Las principales características clínicas de los individuos controles y FH incluidos en los 3 subestudios, se presentan en la **Tabla 8**.

	Sub-1	Sub-2	Sub-3
Control	Control-LLT N=20	sc-HC N=26	Control N=20
Edad (años, media ± SEM)	35 ± 2	56 ± 3	47 ± 3
Hombre/Mujer, N	10/10	10/16	11/9
Índice de masa corporal (Kg/m ² , media ± SEM)	23.3 ± 0.9	28.2 ± 1.3	25.6 ± 1.1
Cociente cintura-altura (media ± SEM)	0.5 ± 0.3	0.57 ± 0.2	0.53 ± 0.02
Factores de riesgo, N (%)			
Diabetes mellitus	0 (0%)	2 (8%)	0 (0%)
Hipertensión	0 (0%)	5 (19%)	1 (5%)
Obesidad (BMI>30)	1 (5%)	10 (38%)	4 (20%)
Consumo de tabaco, N (%)	5 (25%)	7 (27%)	8 (40%)
Tratamiento hipolipemiante, N (%)			
Estatinas	0 (0%)	26 (100%)	9 (45%)
Ezetimibe	0 (0%)	2 (8%)	0 (0%)
Periodo con estatinas (años, media ± SEM)	0 (0%)	12 ± 1	3 ± 1
Datos clínicos (media ± SEM)			
Colesterol total (mg/dL)	167.9 ± 4.2	212.5 ± 7.5	188.3 ± 4.6
LDL-colesterol (mg/dL)	92.7 ± 3.4	136.2 ± 6.8	117.6 ± 4
HDL-colesterol (mg/dL)	60.1 ± 4.3	56.4 ± 2.8	47.2 ± 2.6
No HDL-colesterol (mg/dL)	107.8 ± 3.3	156 ± 7.2	141.1 ± 4
Cociente TC/HDL-colesterol	2.8 ± 0.1	3.9 ± 0.2	4.2 ± 0.2
Triglicéridos (mg/dL)	75.1 ± 8.1	99.2 ± 9.5	135.9 ± 23.6
Proteína C reactiva (mg/dL)	1.7 ± 0.4	3.1 ± 0.9	2.1 ± 0.4
Glucosa (mg/dL)	82.4 ± 2.4	92.3 ± 3.8	80.2 ± 2.4

Hipercolesterolemia familiar	FH-LLT+ N=20	FH-LLT- N=20	FH-AT N=37	FH N=62
Edad (años, media \pm SEM)	37 \pm 2	34 \pm 1	44 \pm 2	46 \pm 2
Hombre/Mujer, N	10/10	10/10	19/18	31/31
Índice de masa corporal (Kg/m ² , media \pm SEM)	24.7 \pm 1.1	24.6 \pm 0.9	26 \pm 0.7	26.9 \pm 0.7
Cociente cintura-altura (media \pm SEM)	0.48 \pm 0.2	0.47 \pm 0.1	0.50 \pm 0.01	0.56 \pm 0.01
Factores de riesgo, N (%)				
Diabetes mellitus	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (4.8%)
Hipertensión	0 (0%)	0 (0%)	4 (11%)	6 (9.7%)
Obesidad (BMI>30)	3 (30%)	2 (10%)	3 (8%)	13 (21%)
Consumo de tabaco, N (%)	9 (45%)	9 (45%)	13 (35%)	19 (30.6%)
Tratamiento hipolipemiante, N (%)				
Estatinas	20 (100%)	0 (0%)	37 (100%)	62 (100%)
Ezetimibe	0 (0%)	0 (0%)	13 (35%)	2 (1.2%)
Periodo con estatinas (años, media \pm SEM)	15 \pm 1	0	11 \pm 1	15 \pm 1
Datos clínicos (media \pm SEM)				
Colesterol total (mg/dL)	296.9 \pm 7.5	302.9 \pm 6.4	232.9 \pm 12.6	243.6 \pm 7.4
LDL-colesterol (mg/dL)	222.7 \pm 6	231.3 \pm 6.9	160.1 \pm 10.7	176.7 \pm 6.8
HDL-colesterol (mg/dL)	55.9 \pm 3.4	53.6 \pm 2.4	49.6 \pm 2.1	49 \pm 1.3
No HDL-colesterol (mg/dL)	240.9 \pm 7.1	249.3 \pm 6.4	182 \pm 12.2	195 \pm 7.4
Cociente TC/HDL-colesterol	5.6 \pm 0.3	5.9 \pm 0.3	4.9 \pm 0.3	5.2 \pm 0.2
Triglicéridos (mg/dL)	90.5 \pm 10.1	87.2 \pm 8.6	39 \pm 6.4	89.3 \pm 6.5
Proteína C reactiva (mg/dL)	2.8 \pm 0.9	1.6 \pm 0.3	2.9 \pm 0.6	1.5 \pm 0.2
Glucosa (mg/dL)	77.9 \pm 2.1	79.1 \pm 1.9	87.4 \pm 3.2	81.4 \pm 1.7

Tabla 8. Subestudios de la población SAFEHEART. BMI: índice de masa corporal, TC: colesterol total, Sub-1: subestudio 1, Sub-2: subestudio 2, Sub-3: subestudio 3, SEM: error estándar de la media.

2.1. Variables clínicas

La información sobre las variables bioquímicas y genéticas de los grupos de pacientes FH y controles, se extrajo de la base de datos de la cohorte SAFEHEART. Esta información se utilizó tanto para la caracterización de los grupos de estudio, como para el análisis de resultados. En el trabajo de esta tesis se refiere a los siguientes datos:

a) Análisis bioquímico: Se ha incluido incluye los niveles de colesterol total (TC), triglicéridos (TG), HDL, LDL (Formula de Friedewald²⁶⁸, LDL = TC - HDL - TG/5), proteína C reactiva (CRP) y glucosa medidas mediante métodos estándares de laboratorio.

b) Análisis genético para el diagnóstico de la FH: La información sobre la presencia o no de mutaciones y tipo específico fue obtenida mediante “microarray” de DNA (LIPOchip, progenika) a partir de muestras sanguíneas tomadas con EDTA²⁶⁹.

La predicción de las mutaciones del LDLR que conllevan a un daño en la integridad de la proteína se denomina nulas (Null). El resto de las mutaciones fueron agrupadas como No nulas (No null).

2.2. Obtención de la muestra sanguínea

Las muestras de sangre se extrajeron a través de la vena cubital, sin torniquete usando una aguja calibre 20G.

a) Para la obtención de la fracción de células mononucleares de la sangre (PBMN): Se utilizó el sistema Vacutainer CPT (BD), que contiene heparina de sodio como anticoagulante y un medio de separación celular, compuesto de gel y una solución de Ficoll-hypaque.

La fracción de PBMN se obtuvo tras una centrifugación de 1.500 a 1.800 rpm (15min), tras su obtención. Seguidamente, la fracción PBMN se sembró en placas de cultivo con la finalidad de aislar los monocitos, que posteriormente se dejaron diferenciar a macrófagos (*Artículo 2 y 3*).

b) Para la obtención del RNA de la fracción PBL: La sangre fue colectada en tubos PAXgeneTM (PreAnalytix, Qiagen/BD). Estos tubos contienen un aditivo que estabiliza el RNA reduciendo su degradación y eliminando la inducción génica (*Artículo 2*).

3. Preparación de Lipoproteínas

3.1. Aislamiento de LDL

Las LDL humanas utilizadas para los experimentos *in vitro*, se obtuvieron a partir de una mezcla de plasma de 100 muestras de donantes sanos del Banco de sangre y tejidos de Barcelona. EL método utilizado fue descrito por Havel y cols²⁷⁰, este consiste en ultracentrifugaciones secuenciales para separar las fracciones de lipoproteínas de acuerdo a su densidad específica (LDL: 1,019 – 1,063g/ml), en un gradiente de bromuro de potasio (KBr) seguido de diálisis. Una vez preparadas las LDLs se mantuvieron protegidas de la luz a 4°C hasta su uso dentro de los 7 días de su preparación.

3.2. Cuantificación y pureza de la LDL

La concentración de la fracción LDL aislada se determinó a través del contenido de proteína mediante el método del ácido bicinconínico (BCA kit, Thermofisher) y la pureza se evalúa por electroforesis en agarosa (SAS-MX Lipo-kit, Helena Biosciences). La presencia de contaminación bacteriana fue excluida por el análisis de endotoxinas (Limulus amoebocyte lysate test, BioWhittaker). Todas las preparaciones de LDL antes y después del período de incubación fueron analizados para determinar la potencial presencia de modificaciones oxidativas, mediante la medición de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), según el método descrito por Ohkawa y cols²⁷¹. Los resultados fueron comparados a una curva estándar de calibración preparada con ácido malonaldehído (MDA). Los niveles de TBARS fueron <2.5nmol MDA/mg LDL proteína.

El control positivo fue la LDL oxidada por 10mmol/L CuSO₄, teniendo valores de TBARS >60nmol MDA/mg LDL proteína.

3.3. Obtención de agLDL

La LDL se agregaron *in vitro* mecánicamente, mediante la agitación intensa en vortex durante 4 min a partir de una muestras de 1mg/mL en Solución tampón salina (PBS), como se ha descrito en nuestro grupo²⁷². Las formas agregadas y no agregadas de LDL se separaron por centrifugación a 10.000g durante 10 min a temperatura ambiente. El precipitado de la agLDL se resuspendió en PBS en la concentración final de 1mg/mL. La agLDL obtenida *in vitro* mediante este proceso, se han probado anteriormente que son similares a las obtenidas por efecto de proteoglicanos^{25,272} (**Figura 26**) (*Artículo 2 y 3*).

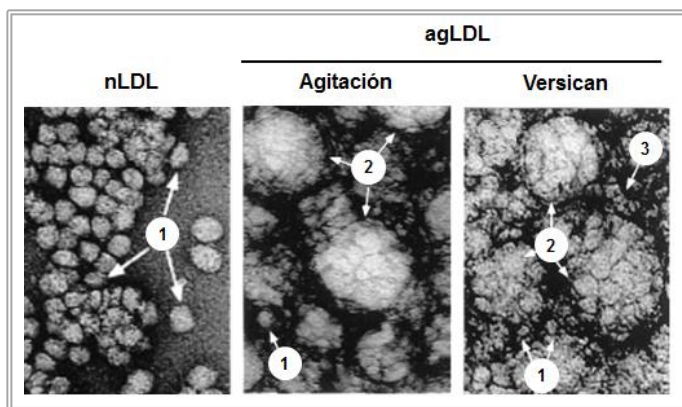


Figura 26. Microscopia electrónica de la LDL. nLDL (LDL nativa) vs agLDL (LDL agregada). Monómeros de LDL (1) y las formas agregadas que incluyen las fusionadas (2) y las propias agregadas (3). Imagen adquirida y adaptada²⁵.

4. Cultivo celulares

4.1. Aislamiento de monocitos humanos y diferenciación a macrófago

La fracción PBMN se obtuvo a partir de capas de leucocitos totales de muestras provenientes del Banco de sangre y tejidos de Barcelona. El procedimiento se basa en la centrifugación en gradiente diferencial de densidad en Ficoll-hypaque (GE-Healthcare, $d=1.078\text{g/ml}$), según el método de Bøyum^{273,274}. La fracción de PBMN se separa del resto de células tras una centrifugación de centrifugar a 300g durante 60 min sin freno. Las células mononucleares se obtienen a partir de la banda central blanca del gradiente. Las células se lavaron exhaustivamente en PBS. Luego se resuspendieron en medio de cultivo y cuantificaron con el contador Coulter (Beckman). En cada caso se sembró suspensiones de PBMN que contengan 2×10^6 monocitos, en placas de cultivo (BD) e incubados a 24 horas a 37°C en atmosfera húmeda con 5%CO₂. A fin de obtener las células adheridas que corresponde a la fracción monocítica (**Figura 27 A**) (*Artículo 1, 2 y 3*). Para la diferenciación a macrófago, los monocitos aislados fueron incubados durante 7 días en medio de cultivo²⁷⁵, reemplazando el medio de cultivo cada 48 horas (**Figura 27 A**) (*Artículo 1, 2 y 3*).

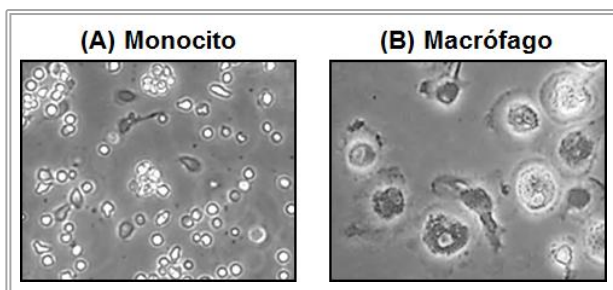


Figura 27. Citomorfología del monocito y macrófago. Imágenes por microscopía en contraste de fase.

4.2. Medio de cultivo celular

El medio de cultivo utilizado contiene RPMI-1640 glutamax suplementado con 100U/mL de penicilina/estreptomicina, 10mM de tampón hepes, 2mM de L-glutamina (Gibco) y 10% (vol:vol) de suero humano del grupo sanguíneo AB (Lonza). Para la obtención de células quiescentes se empleó el mismo medio de cultivo, pero con un contenido de 0.5% de suero humano AB (medio mínimo HS).

4.3. Tratamiento con LDL

Para estudiar el efecto de las LDL en las primeras fases de diferenciación de monocito a macrófago (MOMAC), las células fueron expuestas a concentraciones aterogénicas de LDL nativas (nLDL, 1.80mg/mL), durante periodos de 24 horas (**Figura 28**). De forma breve, las células se incubaron 24 horas (2^{do} día) en medio mínimo HS para llevarlos a un estadio de quiescencia. Tras este periodo, los monocitos fueron incubados en presencia o ausencia de nLDL durante 24 horas (3^{er} día de diferenciación, D3) y 48 horas (4^{to} día de diferenciación, D4). Finalmente, los cultivos celulares fueron lavados con PBS y procesados para los análisis de mRNA, miRNAs, proteínas y tinción de lípidos (*Artículo 1*).

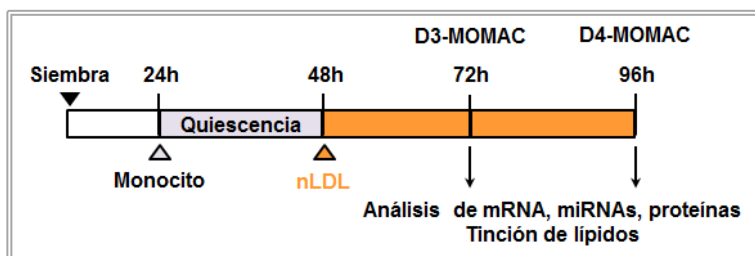


Figura 28. Esquema del tratamiento con nLDL.

4.4. Tratamiento con agLDL

Los macrófagos derivados de monocitos humanos, tras 7 días de diferenciación en cultivo, fueron incubados con medio mínimo HS por 24 horas para obtener células quiescentes y otras 24 horas en presencia o ausencia de agLDL (100 μ g/mL)^{47,48}. Tras este período las células fueron procesadas para el análisis de mRNA, miRNAs y tinción de lípidos (Figura 29) (Artículo 2 y 3).

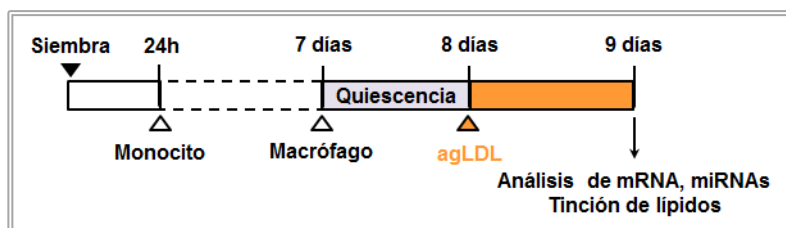


Figura 29. Esquema del tratamiento con agLDL.

4.5. Respuesta inflamatoria

Monocitos y macrófagos después de 24 horas y 7 días fueron tratados con lipopolisacárido bacteriano (LPS, 1 μ g/mL) durante 24 horas, respectivamente. El procedimiento fue el mismo que el utilizado para la nLDL y la agLDL (*ver apartado 4.3 y 4.4*). Los monocitos estimulados con LPS fueron utilizados como control de funcionalidad después de las 48 horas de incubación con el medio mínimo HS (*Artículo 1*). Los macrófagos fueron estimulados por 24 horas para la identificación de miRNAs inflamatorios (*Artículo 3*).

4.6. Análisis funcional

Los macrófagos derivados de monocitos humanos fueron las células empleadas en este análisis.

a) Incremento de expresión del miRNA: Las células fueron transfectadas con agomiR-505-3p (MSY0002876, Qiagen) o control negativo agomiR (agomiR-NC; 1027280, Qiagen). NC es químicamente sintetizado como el agomiR y no presenta homología con algún gen conocido de mamífero.

Los macrófagos se lavaron con PBS, luego incubados en medio mínimo HS con agomiR-505-3p o NC, cada uno a 15nM y HiPerFect transfection reagent (Qiagen) por 24 horas, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente, el medio fue removido para seguir el tratamiento con 100µg/mL de agLDL en medio HS. La transfección fue estable durante 48 horas (*Artículo 3*).

b) Silenciamiento de expresión génica: En este procedimiento similar al anterior, los macrófagos fueron transfectados con siRNA-LRP5 (s8293, Ambion) o control negativo siRNA (4390843, Ambion), cada uno a 100nM, y HiPerFect transfection reagent (Qiagen) por 24 horas. Al término, el medio fue removido y las células fueron tratadas con agLDL (*Artículo 2*).

4.7. Tinción de lípidos

Las inclusiones lipídicas celulares fueron observadas mediante el uso de una combinación de colorantes sudanes [0.5% sudan III and 0.5% sudan IV en 70° alcohol-acetona (v/v); Tinción de Herxheimer], que produce una coloración progresiva. El procedimiento consiste en fijar las células en la

placa de cultivo con formaldehído al 4%, lavar con agua destilada, deshidratar con alcohol de 50° y 70°, teñir con Herxheimer, hidratar con alcohol de 70° y 50° y un lavado con agua destilada. Finalmente, la coloración rojiza evidencia la presencia de inclusiones lipídicas en las células (**Figura 30**) (*Artículo 1, 2 y 3*).

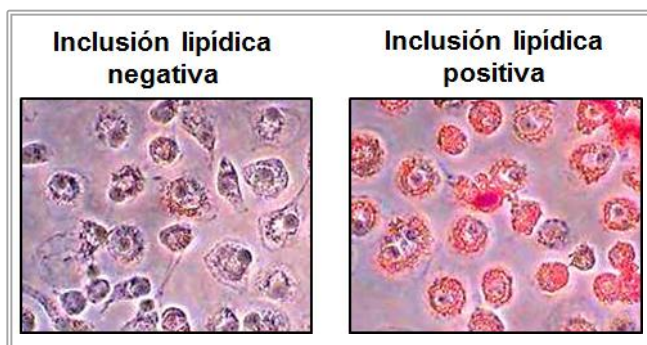


Figura 30. Presencia de lípido intracelular. Cultivo de macrófago derivado de monocito humano estimulado con agLDL por 24 horas. Observado mediante un microscopio invertido.

5. Análisis de RNA

5.1 Extracción y cuantificación

La extracción de RNA total se realizó con 3 ensayos comerciales diferentes dependiendo del tipo de muestras. La extracción por el método de mirVana (Ambion), se utilizó para la obtención de mRNA y miRNAs a partir de células obtenidas en cultivos. Los tubos PAXgene™ (PreAnalytix, Qiagen/BD) fueron usados para la extracción de RNA de leucocitos totales de sangre periférica (PBL). El ensayo NucleoSpin miRNA Plasma (Macherey-Nagel) fue utilizado para la extracción de miRNAs de la LDL aislada.

La determinación de la concentración y la pureza del mRNA se midieron con un Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific), considerando una pureza para el valor del cociente 260/280 entre 1.8 y 2. La integridad de la extracción del RNA total, se determinó mediante la amplificación de ITGAM (Hs00355885_m1).

5.2 PCR a tiempo real

Se utilizó la PCR en tiempo real en lugar de la PCR convencional para los análisis de expresión de genes y miRNAs, ya que posibilita la detección de amplificaciones con mayor sensibilidad y un amplio rango de detección.

a) PCR mediante el uso de sondas TaqMan

Los estudios de los perfiles de expresión de los miRNAs se realizaron mediante un “array”, basado en un soporte en placa que permite analizar un elevado número de miRNAs simultáneamente. El análisis fue mediante el low-density TaqMan® Array Human MicroRNA A Card v2.0 (Applied Biosystems). Contiene, 377 sondas representativas de los miRNAs ampliamente caracterizados en miRBase (Base de datos en la anotación de los miRNAs). Además, se incluye 3 endógenos (U6, RNU48 y RN44) y 1 control negativo (ath-miR-159a) que no amplifica en muestras humanas (*Artículo 1 y 3*).

La obtención del cDNA se realizó a partir de 0,5µg de RNA de las muestras, sin previa pre-amplificación, según las condiciones mostradas en la siguiente **Tabla 11**.

Síntesis de cDNA			Amplificación por PCR		
Componentes		Vol (µL)	Componentes		Vol (µL)
Sondas Megaplex RT (10X)		0,8	TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG, 2X		450
dNTPs con dTTP (100 mM)		0,2	Muestra de cDNA		6
Transcriptasa reversa (50 U/µL)		1,5	Agua libre de nucleasas		444
Tampón RT (10X)		0,8	Total		900
MgCl ₂ (25 mM)		0,9			
Inhibidor de RNAsa (20 U/µL)		0,1			
Agua libre de nucleasas		0,2			
Muestra de RNA (0,5µg)		3			
Total		3			
Condiciones			Condiciones		
	Temperatura	Tiempo		Temperatura	Tiempo
40 ciclos	16°C	2 min	Mantener	50°C	2 min
	42°C	1 min	Mantener	94,5°C	10 min
	50°C	1 sec	40 ciclos	97°C	30 sec
Mantener	85°C	5 min		59,7°C	1 min
Mantener	4°C	∞			

Tabla 9. Síntesis de cDNA y PCR en "array" de miRNAs. Los volúmenes (Vol) mostrados corresponde por cada muestra.

Además del análisis de expresión de miRNAs mediante “arrays”, se realizó análisis de PCR mediante sondas individuales. Las sondas fueron empleadas para la validación de miRNAs y genes, seleccionados en estudios de perfil diferencial y de estudios dirigidos (**Tabla 10**).

Artículo	Estudio	Gen - miRNA	Código
1	Apoptosis (Anoikis)	DR5	Hs00366278_m1
		BAX	Hs00180269_m1
		BCL2	Hs00608023_m1
	Diferenciación celular, resistencia a Anoikis	CD49c	Hs00233722_m1
		Diferenciación celular, tipo de monocito	CD14
	Regulación de miRNAs por la LDL en concentración aterogénica	miR-126-3p	002228
		miR-126-5p	000451
		miR-223	002295
		miR-361-3p	002116
		miR-767-5p	001993

2	Regulación de receptores LRP's por la agLDL	LRP5	Hs00182031_m1; Mm01227476_m1
		LRP6	Hs00233945_m1; Mm00999795_m1
		LRP1	Hs00233856_m1; Mm00464608_m1
	Regulación por el contenido de colesterol	LDLR	Hs01092524_m1; Mm01177349_m1
		HMGCR	Hs00168352_m1; Mm01282499_m1
	Regulación de receptores scavengers por la agLDL	CD36	Hs01567185_m1
		MARCO	Hs00198935_m1
CD163		Hs00174705_m1	
3	Regulación de miRNAs inflamatorios en el estudio FH	miR-505-3p	002089
		miR-95	000433
		miR-483-5p	002338
		miR-187	001193
		miR-146a	000468
		miR-486-3p	002093
	Regulación de genes inflamatorios en el estudio FH	CCR3	Hs00266213_s1
		CCR4	Hs00747615_s1
		CXCR1	Hs01921207_s1
		TGFB1	Hs00998133_m1
		IL2	Hs00174114_m1
		RUNX1	Hs00231079_m1

Tabla 10. Genes y miRNAs analizados por sondas individuales. Las sondas son de Applied Biosystems

Se realizó una síntesis de cDNA a partir de 10ng de RNA para miRNAs y 0,5µg de RNA para genes, siguiendo las condiciones mostradas en la siguiente **Tabla 11**.

miRNAs		Genes	
Síntesis de cDNA		Síntesis de cDNA	
Componentes	Vol (µL)	Componentes	Vol (µL)
dNTPs (100mM)	0,15	Tampón RT (10X)	1,0
Transcriptasa reversa (50 U/µL)	1,00	Transcriptasa reversa (50 U/µL)	0,5
Tampón RT (10X)	1,50	dNTPs (100mM)	0,4
Inhibidor de RNAsa	0,19	Sondas aleatorias	1,0
Agua libre de nucleasas	4,16	Muestra de RNA (0,5µg) +	7,1
* Total (5µL por cada muestra)	7,00	Agua libre de nucleasas (7,1 ul)	
* Muestra de RNA (10ng)	3,50	Total	10
* Sonda TaqMan específica	1,50		
*Total	10		

Condiciones		
	Temperatura	Tiempo
Mantener	16°C	30 min
Mantener	42°C	30 min
Mantener	85°C	5 mim
Mantener	4°C	∞
Amplificación por PCR		
Componentes	Vol (μL)	
TaqMan 2x universal PCR Mmix	5.0	
Agua libre de nucleasas	3,7	
Sonda TaqMan específica (20x)	0,5	
Muestra de cDNA	0,8	
Total	10	
Condiciones		
	Temperatura	Tiempo
Mantener	95°C	10 min
40 ciclos	95°C	15 sec
	60°C	60 sec

Condiciones		
	Temperatura	Tiempo
Mantener	25°C	10 min
Mantener	37°C	120 min
Mantener	85°C	5 mim
Mantener	4°C	∞
Amplificación por PCR		
Componentes	Vol (μL)	
TaqMan 2x universal PCR Mmix	10	
Agua libre de nucleasas	8	
Sonda TaqMan específica (20x)	1	
Muestra de cDNA	1	
Total	20	
Condiciones		
	Temperatura	Tiempo
Mantener	95°C	10 min
40 ciclos	95°C	15 sec
	60°C	60 sec

Tabla 11. Síntesis de cDNA y PCR para genes y miRNAs por sondas individuales.

b) PCR mediante el uso de intercalantes de DNA

El análisis del perfil de expresión de los genes inflamatorios se realizó mediante una placa de 96 pocillos (RT² Profiler PCR Array, PAHS-077Z, SA Biosciences). Este “array” de genes contiene 84 sondas, 5 endógenos (ACTB, B2M, GAPDH, *HPRT1* y RPLP0), un control de DNA genómico humano, 3 controles de transcripción reversa y 3 controles positivos de PCR (*Artículo 3*).

La obtención del cDNA fue obtenido a partir de 0.5μg de RNA de las muestras, siguiendo la condiciones mostradas en la siguiente **Tabla 12**.

Eliminación del DNA genómico		Amplificación por PCR		
Componentes	Vol (µL)	Componentes	Vol (µL)	
Muestra de RNA (0.5µg)	6	2xRT2 Green Mastermix	1350	
Tampón GE	2	Muestra de cDNA	102	
Agua libre de nucleasas	2	Agua libre de nucleasas	1248	
Total	10	Total	2700	
Incubar 5 min a 42°C		Condiciones		
Incubar 1 min en hielo				
Síntesis de cDNA		Temperatura	Tiempo	
Componentes	Vol (µL)	Mantener	95°C	10 min
Tampón BC3 5X	4	40 ciclos	95°C	15 sec
Control P2	1		60°C	1 mim
RE3 reverse transcriptase Mix	2	Mantener	95°C	1 mim
Agua libre de nucleasas	3	Mantener	65°C	2 mim
Total	10	Mantener	95°C	15 sec
Incubar 15 min a 42°C (volumen total = 20 µL)				
Incubar 5 min a 95°C				
Añadir 91 µL de agua libre de nucleasa				

Tabla 12. Síntesis de cDNA y PCR en "array" de genes.

5.3. Análisis de datos generados mediante PCR a tiempo real

Los datos obtenidos del lector Applied Biosystems 7900HT fueron cuantificados en base a la comparación del Ciclo umbral (Ct), usando los programas SDS 2.4 y el RQ Manager 1.2.1. Los valores Ct se normalizaron con el endógeno RNU48 (001006) en miRNAs y en el caso de los genes con PIK3C2A (Hs00153223_m1) o B2M (Hs.534255). En ambos casos se usó el método estandarizado del $2^{-\Delta Ct}$, obtenido del programa DataAsist v3.0.1. Aquellos valores Ct \geq de 32 fueron considerados por debajo del nivel de detección. La casa comercial (Applied Biosystems) asegura unas altas eficiencias en las sondas y por lo tanto no es necesario que se hagan curvas patrón para conocer la eficiencia, sino se sospechaba de una posible concentración elevada de inhibidores o una mayor degradación de los ácidos nucleicos debido a la naturaleza de la muestra.

6. Métodos *in silico* en el análisis de miRNAs y genes diana

6.1. Anotación de los miRNAs

Actualmente, la anotación de los miRNAs se realiza mediante el secuenciación de fragmentos cortos de RNA (<50 nt). Esta tecnología genera gran cantidad de lecturas, que se analizan mediante diferentes algoritmos computacionales (miRDeep²⁷⁶, miRDeep2²⁷⁷, miRDeep*²⁷⁸ y miRanalyzer²⁷⁹). El procedimiento se inicia con el mapeo de las lecturas de precursores conocidos de miRNAs y el análisis de la región genómica donde las lecturas se alinean. Seguidamente, la lectura se extiende por 20bp en una dirección y 70bp en otra dirección, definiendo su potencial locus. En base a métodos estadísticos se evalúa si la secuencia forma una horquilla^{276,280}. En la predicción de nuevos miRNAs se utilizan características adicionales como el conteaje de lecturas, la energía libre y el tamaño de la horquilla²⁷⁹ (**Figura 32**).

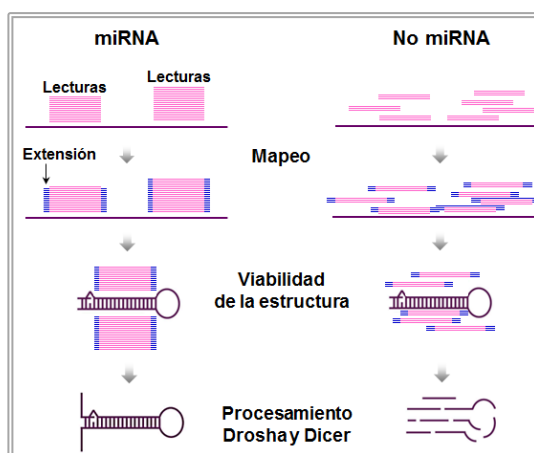


Figura 31. Proceso para la anotación del miRNA. Imagen adquirida y adaptada²⁸⁰

6.2. Herramientas computacionales

Las herramientas computacionales son Bases de datos que tienen sus propios criterios y algoritmos de predicción para la unión del miRNA al mRNA específico. En la siguiente **Tabla 13** se muestran las bases de datos consultadas para el desarrollo del *Artículo 1 y 3*. Las bases de datos fueron empleadas en combinación, con la finalidad de aprovechar sus distintos algoritmos de búsqueda, aumentando con ello la posibilidad de encontrar los potenciales genes diana para el miRNA.

Base de datos	Criterio de predicción	Artículo
TargetScan (a)	Evalúa la cantidad y calidad de los sitios complementarios del mRNA con el emparejamiento conservado a la región 5' del miRNA.	1
miRbase (b)	Provee evidencia de la anotación de los miRNAs	1
RNAhybrid (c)	Calcula la mínima energía libre para hibridación entre un RNA largo y corto. Es una herramienta útil como predicción de unión miRNA-mRNA	1
miRmap (d)	Combina las características, termodinámicas, evolutivas, probabilísticas y de secuencias entre la unión del miRNA y el mRNA	1 y 3
IPA (e)	Muestra las uniones entre miRNA y mRNA experimentalmente demostrados o con alta o moderada predicción	1 y 3
PACCMITCDS (f)	Muestra las uniones potenciales del miRNA en secuencias codificantes del mRNA considerando la conservación evolutiva, accesibilidad y predicción	3
PACCMIT3UTR (f)	Muestra las uniones potenciales del miRNA al extremo 3' del mRNA considerando la conservación evolutiva, accesibilidad y predicción	
miRwalk 5UTR (g)	Combina la información de 12 programas de predicción y compara los sitios de unión del miRNA con el extremo 5' del mRNA	3
miRwalk CD (g)	Combina la información de 12 programas de predicción y compara los sitios de unión del miRNA con la región codificante del mRNA	
miRwalk 3UTR (g)	Combina la información de 12 programas de predicción y compara los sitios de unión del miRNA con el extremo 3' del mRNA	

Tabla 13. Bases de datos de predicción. (a) <http://www.targetscan.org/>, (b) <http://www.mirbase.org/>, (c) <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>, (d) <http://mirmap.ezlab.org/>, (e) <http://www.ingenuity.com/products/ipa>, (f) <http://pacmit.epfl.ch/>, (g) <http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>

6.3. Diseño del análisis *in silico*

La identificación de genes diana para los miRNAs es uno de los grandes retos en la comprensión de la regulación post-transcripcional. Actualmente, existen varias herramientas bioinformáticas con diferentes algoritmos de búsqueda. En la presente tesis el criterio seguido y las herramientas utilizadas se muestran en la **Figura 32**.

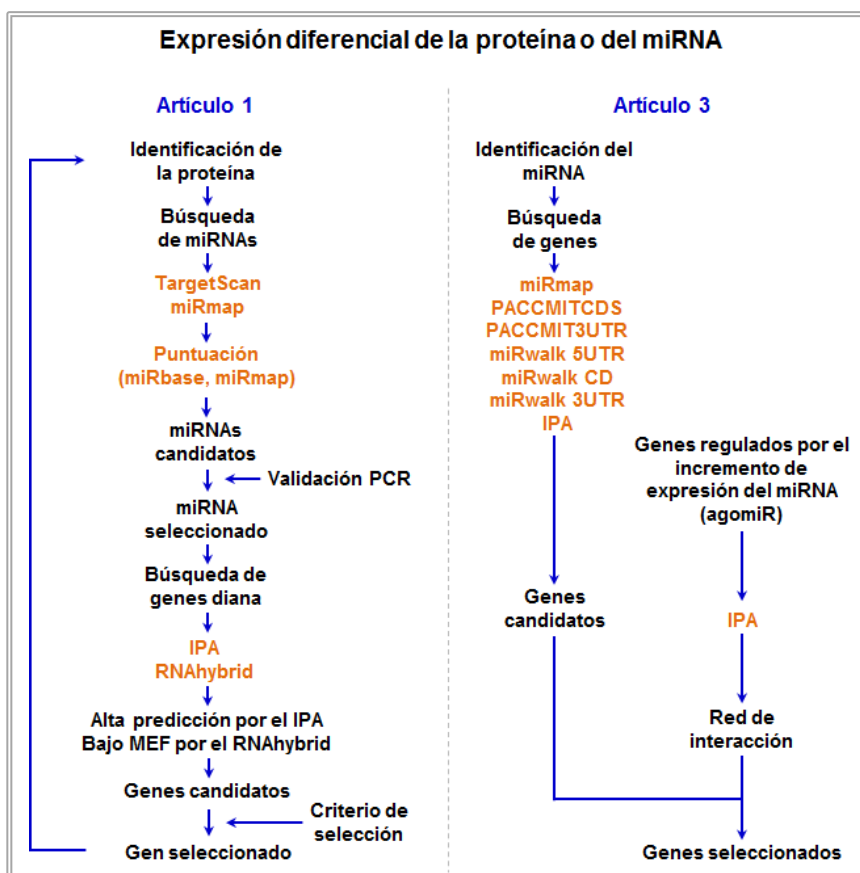


Figura 32. Esquema del diseño del *in silico*. Las herramientas computacionales utilizadas están señaladas de color marrón. Se muestra el criterio empleado para el Artículo 1 y el Artículo 3.

a) Predicción de miRNAs para su mRNA específico: El mRNA es seleccionado previamente de acuerdo a su expresión diferencial con los niveles de proteína. Se identificó los posibles miRNAs que regulan el mRNA, mediante el uso de 2 bases de datos, TargetScan y miRmap. Se utilizaron únicamente los candidatos predichos que coincidieron con las 2 bases de datos. Se seleccionaron aquellos miRNAs que debido a sus características estructurales tiene mayor probabilidad de interacción y viabilidad (*Artículo 1*).

b) Predicción de genes diana para su miRNA específico: Los posibles genes diana regulados por el miRNA se identificaron mediante el uso del IPA y RNAHybrid. El programa RNAHybrid, calculó la mínima energía libre (MEF) requerida en la interacción miRNA-mRNA, parámetro que determina las interacciones más favorables. De forma que el valor MEF negativo significa la energía necesaria para desestabilizar la unión miRNA con el mRNA. Por lo tanto, mientras más negativo sea el valor MEF, mayor es la accesibilidad del miRNA de unirse a la secuencia diana del mRNA (*Artículo 1*).

Otro diseño para encontrar potenciales genes diana para un determinado miRNA fue mediante el uso de base de datos como miRmap, PACCMITCDS, PACCMIT3UTR, miRwalk 5UTR, miRwalk CD, miRwalk 3UTR e IPA. Este diseño tuvo como finalidad ampliar el perfil de genes candidatos que participan en una red de interacción (*Artículo 3*).

c) Funciones celulares y redes de interacción: Después de obtener los posibles genes dianas o miRNAs candidatos correspondientes a los experimentos diferenciales *in vitro*. Se analizó su participación en funciones celulares, mediante el uso del programa IPA (*Artículo 1 y 3*).

La red de activación de genes se realiza mediante el predictor de actividad molecular (MAP), una herramienta del IPA. El análisis por MAP predice

el tipo de interacción entre los genes. Así también, las consecuencias de estas interacciones, como el incremento o disminución de expresión (Figura 33) (Artículo 3).

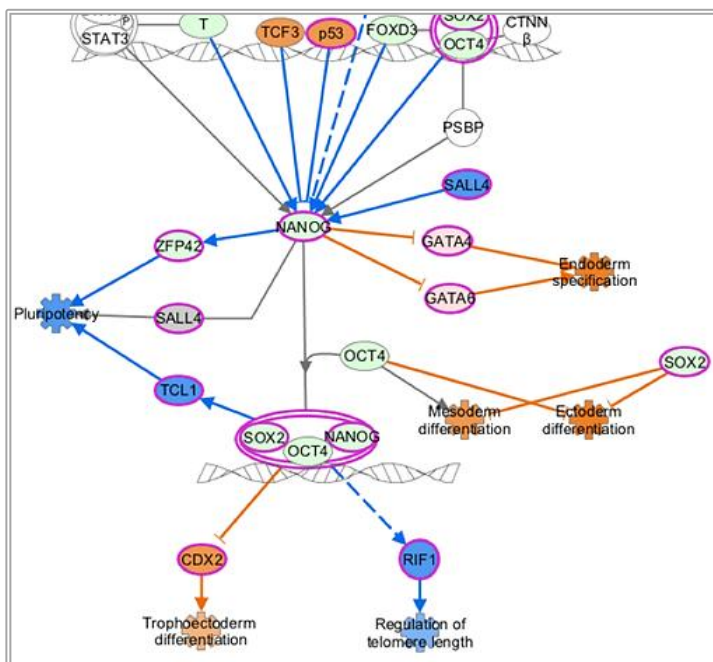


Figura 33. Red obtenida mediante el IPA. Ejemplo representativo de interacción y predicción de los genes. La intensidad de color azul es la predicción de una expresión o actividad disminuya, contrariamente a lo que sucede con la intensidad de color naranja. La intensidad de color verde es el resultado de la poca expresión del experimental. Imagen adquirida y adaptada de <http://www.ingenuity.com/products/ipa/ipa-summer-release-2014>.

7. Análisis de proteínas

7.1 Extracción y cuantificación de proteínas

La extracción proteica se efectuó por lisis de las células en tampón RIPA (50mM Tris HCl pH 8; 150mM NaCl; 1% NP-40; 0.5% deoxicolato de

sodio; 0.1% SDS), suplementado con inhibidores de proteasa (Complete, EDTA-free, Roche, 11873580001) y mantenidas en hielo. La fragmentación celular se facilitó pasando la muestra repetidamente a través de una aguja de 20G. Todas las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm (4°C) y los sobrenadantes se alicuotaron y mantuvieron a -80°C hasta su análisis. La concentración proteica se determinó por el método del ácido bicinónico (BCA kit, Thermofisher) mediante la reacción de Biuret por colorimetría a 562nm (*Artículo 1*).

7.2 Western blot

El contenido de proteínas específicas en los extractos celulares se determinó mediante el ensayo semicuantitativo de western blot, que se basa en la separación de proteínas por su movilidad electroforética e identificación por anticuerpos específicos (**Tabla 14**).

Estudio	Anticuerpo	Especie	Dilución	Referencia
Apoptosis(Anoikis)	DR5	Policlonal de conejo	1:2000	ab16942, Merk Millipore
	TRAIL	Policlonal de conejo	1:1000	ab42121, Abcam
	Caspasa-3	Policlonal de pollo	1:2000	ab136290, Abcam
	Caspasa-8	Policlonal de conejo	1:2000	ab25901, Abcam
Diferenciación celular	CD14	Policlonal de cabra	1:1000	sc-6998, Santa cruz
Diferenciación celular	CD49c	Policlonal de cabra	1:1000	sc-6592, Santa cruz
Candidatos regulados por miR-126-3p	VEGFA	Policlonal de conejo	1:500	ABS82, Merk Millipore
	ADAM9	Policlonal de conejo	1:5000	AB2959, Merk Millipore

Tabla 14. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas.

De forma breve, 25 µg de proteína total, resuspendida en tampón de carga (0.25M Tris pH 6.8, 8% SDS, 40% glicerol, 0.02% azul de bromofenol con 400mM mercaptoethanol), se somete a electroforesis

monodimensional de geles de poliacrilamida SDS en 2 fases (fase concentradora a 4% y fase separadora a 10% de poliacrilamida). Las proteínas separadas en el gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa por un sistema de transferencia húmedo o semi-seco (BioRad). La eficacia de la transferencia a la membrana fue confirmada por la coloración de Ponceau (0.2% colorante de Ponceau, 1% ácido acético). La membrana fue bloqueada con 3% BSA (albúmina de suero bovino) o 5% leche desnatada en tanmpón TBS-Tween (0.1M NaCl, 10mM Tris base, pH 7.4, 0.05% Tween 20), para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario e incubado con la dilución adecuada del anticuerpo primario. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (Dako) y su detección es por la señal quimioluminiscente generada por el reactivo SuperSignal (Thermo Scientific). Esta señal es captada por el sistema ChemiDoc™ XRS y el programa Image Lab (BioRad). La lectura quimioluminiscente de las proteínas fue normalizada con la β -actina (dilución 1:24000; Abcam, ab8226) (*Artículo 1*).

8. Análisis estadístico

Los resultados están representados como la media \pm SEM (error estándar del promedio) o como la mediana y rango intercuartil (IQR) con el número de experimentos mostrados en cada caso. Las diferencias estadísticas entre tratamientos o grupos fueron analizados usando pruebas paramétricas como t-Student, análisis de varianza (ANOVA) de un factor o 2 factores, seguido por LSD de Fisher para grupos diferentes. En las pruebas no paramétricas se utilizaron Chi-cuadrado, Wilcoxon, la U de Mann Whitney o Kruskal Wallis. Además, Post hoc de Bonferroni fue utilizado para evaluar las diferencias intergrupales. Las asociaciones entre variables continuas fueron estudiadas mediante la correlación de

Spearman. Una $p \leq 0.05$ fue considerada significativa. En el estudio poblacional, el tamaño mínimo de la muestra requerida fue calculado de acuerdo a Noordzij y cols²⁸¹. La prueba de distribución normal fue realizada usando el método de Shapiro-Wilks. Los valores extremos fueron excluidos por el criterio de Chauvenet. Los métodos estadísticos fueron analizados mediante el uso del programa Statview 5.0.1 (Abacus concepts, USA) y SPSS versión 21.0.0.

9. Métodos adicionales

Estos métodos están detallados en los *Artículos* (Sección resultados):

- Análisis por citometría de flujo (*Artículo 1*)
- Modelo murino de hipercolesterolemia (*Artículo 2*)
- Inmunohistoquímica en tejido aórtico de ratón (*Artículo 2*)
- Determinación de colesterol libre y esterificado (*Artículo 2*)
- Cromatografía en capa fina (*Artículo 2*)

IV. RESULTADOS

Los artículos que han sido publicados o están en proceso de publicación y son resultado de esta tesis son los siguientes:

1) LDL accelerates monocyte to macrophage differentiation: Effects on adhesion and anoikis.

R. Escate, T. Padro, L. Badimon.

Atherosclerosis. 2016;246:177-86.

doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.01.002. PMID: 26800307

FI: 3.942

2) Macrophages of genetically characterized familial hypercholesterolemia patients show upregulation of LDL-receptor related proteins.

R. Escate, T. Padró, M. Borrell-Pagès, R. Suades, R. Aledo, P. Mata, L. Badimon.

Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2016;20(10):1-13.

doi: 10.1111/jcmm.12993

FI: 4.938

3) Epigenetic regulation of macrophages of genetically characterized familial hypercholesterolemia patients sustain a pro-inflammatory phenotype despite long-term lipid lowering treatment.

Escate R, Mata P, Padró T, Badimon L.

Pendiente de presentación

Artículo 1

LDL accelerates monocyte to macrophage differentiation: Effects on adhesion and anoikis

Autores: R. Escate, T. Padro, L. Badimon

Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC), IIB-Sant Pau,
Barcelona, España.

Revista: Atherosclerosis. 2016;246:177-86

Factor de impacto: 3.942

RESUMEN

La LDL estimula cambios en el fenotipo, la adhesión y disminución de los efectores apoptóticos de la anoikis, durante la diferenciación temprana de monocito a macrófago.

Altos niveles de LDL animan el desarrollo de la aterosclerosis, enfermedad inflamatoria crónica con la participación de la inmunidad innata. Los monocitos son reclutados al endotelio disfuncional inducido por los efectos de la LDL, iniciando su diferenciación. El objetivo de este estudio es investigar los efectos de la LDL en concentraciones aterogénicas en el temprano estadio de diferenciación de monocitos a macrófagos. Los experimentos se han realizado en un cultivo de monocitos humanos tratados o no con LDL en concentración aterogénica (1.80 mg/mL) de 24 a 48 horas y en macrófagos derivados de monocitos

RESULTADOS

humanos después de 7 días de diferenciación. El efecto de la LDL indujo una mayor expresión de CD14^{dim}CD16⁺, CD49c, miR-126-3p y una citomorfología parecida al macrófago. Además, de una disminución de CD14, de CD163 en los monocitos CD14^{dim}CD16⁺, DR5, Caspasa-8 y caspasa-3. Mediante análisis in silico. El miR-126-3p es un potente candidato en la regulación del DR5.

Estos resultados indican que la LDL estimula la expresión de moléculas de adhesión y la disminución de efectores apoptóticos, regulando la anoikis y la supervivencia celular en el estadio temprano del macrófago.



Contents lists available at ScienceDirect

Atherosclerosis

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

LDL accelerates monocyte to macrophage differentiation: Effects on adhesion and anoikis

R. Escate^{a,1}, T. Padro^{a,1}, L. Badimon^{a,b,*}^a Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC), IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain^b Cardiovascular Research Chair, UAB, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 13 August 2015
Received in revised form
22 December 2015
Accepted 2 January 2016
Available online 5 January 2016

Keywords:
Atherosclerosis
Monocyte
Integrins
microRNAs
Anoikis

ABSTRACT

Background and aims: High LDL triggers dyslipidemia and atherosclerosis, a chronic inflammatory disease with participation of the innate immunity system. Monocytes are recruited to areas of LDL-induced endothelial damage and initiate differentiation. This study was aimed to investigate the effects of LDL on the early transitional stages of monocyte differentiation into macrophages.

Methods: Blood monocytes, isolated from healthy donors by their adhesion properties, were exposed to native-LDL (1.80 mg/mL) for 48-h. Monocyte phenotype was assessed at transcript and miRNA levels by real-time PCR. Protein-expression was determined by western-blot and flow-cytometry.

Results: CD14 time-dependently decreased in adhered monocytes, reaching a >4fold decrease at transcript- and protein-levels after 7-days in culture when cells were already differentiated into macrophages. At 4-days differentiation, monocytes exposed to LDL reduced CD14-transcription >1.5fold in mRNA ($p = 0.002$) and 34% CD14-protein ($p = 0.039$), whereas increased in CD16-expression ($p = 0.019$). Besides, LDL induced a significant increase in integrin CD49c ($\alpha 3$ -subunit) at mRNA (>2fold, $p = 0.008$) and protein (>3fold, $p = 0.045$) level and a decrease in the apoptosis-effectors CASP8 and CASP3 ($p = 0.002$ and $p = 0.035$, respectively) as well as in the precursor form of the death-receptor DR5 ($p = 0.045$) without affecting its mRNA-expression level, suggesting a LDL-dependent post-transcriptional regulation of DR5. *In silico* prediction analysis indicated miR-126-3p as a candidate to regulate DR5-expression and miR-126-3p was shown affected by LDL reaching a significant increase ($p = 0.033$). **Conclusions:** In differentiating human monocytes, LDL stimulates expression of cell-adhesion molecules and downregulates apoptosis-effectors, regulating anoikis and survival programs in the early stage macrophages.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Atherosclerosis is a complex dynamic disease characterized by lipid infiltration and chronic inflammation of the vessel wall. Elevated levels of proatherogenic plasma lipoproteins, mainly low density lipoproteins (LDL), deliver cholesterol to the vessel wall and trigger a pro-inflammatory reaction [1–4]. The infiltration of monocytes into the arterial intima and their differentiation into vessel resident macrophages are acknowledged as hallmarks for the development of atherosclerosis [5]. Monocyte chemotaxis is attributed to endothelial damage, caused by local and systemic

triggers such as shear stress or inflammation processes that may be exacerbated by the presence of high circulating LDL levels. Thus, high levels of LDL have been shown to increase monocyte binding to endothelial cells [6]. Native plasma LDL, but not oxidized LDL, upregulates CCR2 expression and enhance the monocyte chemotactic response to MCP-1 [7]. Recent studies have also shown an immune-stimulating role of LDL during atherogenesis [8], [9]. Among inflammatory molecules expressed by vascular cells, integrins (heterodimeric $\alpha\beta$ transmembrane receptors) play a critical role in regulating the adhesion of monocytes on endothelial cells (EC), and on their migration through the extracellular matrix (ECM) to the site of inflammation [10].

The alternative to cell adhesion success is anoikis, an apoptotic process specifically due to the loss of cell-to-cell interaction and cell-to-ECM anchorage [11]. Most cells in the human body require integrin mediated adhesion to avoid anchorage-dependent

* Corresponding author. Cardiovascular Research Center, c/Sant Antoni M^o Claret 167, 08025 Barcelona, Spain.

E-mail address: lbadimon@csic-iccc.org (L. Badimon).

¹ Both authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.01.002>

0021-9150/© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

apoptosis. Among the various integrins subunits, the $\alpha 3$ -integrin (CD49c) has been associated to the suppression of anoikis in differentiated cells [12]. Cells derived from bone marrow, such as monocytes, do not express this integrin subtype, whereas CD49c is highly expressed in differentiated monocyte-derived macrophage [13]. Moreover, overexpression of some members of the β -subunit of the integrin-family have been reported in cells of the macrophage lineage exposed *in vitro* to cholesterol oxidation products [14].

Up to now, however, the overall effects of atherogenic levels of native LDL on the balance adhesion/anoikis during monocyte-to-macrophage differentiation have not been investigated.

Death receptor 5 (DR5), a membrane coreceptor for TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), is involved in apoptosis signaling through the DR5-death domain (DD) [15]. Signaling leads to procaspase-8 (p-CASP8) and procaspase-3 (p-CASP3) activation [16]. Caspases cleave gelsolin and disrupt adhesion, leading to anoikis [17,18]. Previous studies in human carcinoma cell lines strongly support a role for DR5 in anoikis. However, the relevance of its soluble-ligand TRAIL in this process is uncertain [19]. To this respect, recent studies suggest that microRNAs and DR5 are involved in cancer cell apoptosis [20]. MicroRNAs (miRNAs) are a class of small noncoding RNAs that regulate target gene expression by translational repression and mRNA cleavage [21].

In the present study, we investigated the relevance of atherogenic LDL levels, similar to those found in human hypercholesterolemic plasma, in regulating monocyte-to-macrophage differentiation. Our results suggest that LDL enhances cell adhesion by increasing integrin-dependent mechanisms and reducing anoikis related signaling in human monocytes at early stages of differentiation into macrophages.

2. Materials and methods

2.1. Isolation of human monocyte

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from leukocytes-rich buffy coats from healthy donors (Barcelona Blood Bank) by centrifugation on a Ficoll-Hypaque gradient (GE-Healthcare) [22]. Based on cell counts of each individual buffy coat, PBMC were plated on 6-well polystyrene plates (Becton Dickinson) to obtain a cellular density of 2×10^6 monocyte/mL after incubation for 24 h in RPMI-1640-glutamax supplemented with 100 U/mL penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamine, and 10 mM Hepes buffer (Gibco) and containing 10% (vol:vol) human serum (group AB blood, Lonza). Thereafter, non-adherent cells were removed by gently washing and adherent monocytes incubated for further 24 h in RPMI-medium with 0.5% HS (minimal HS media) to obtain quiescent cells. For the experiments, monocytes were incubated in minimal-HS medium with/without 1.80 mg/mL native LDL (control- and LDL-groups, respectively) for up 48 h. Then, cells were washed with phosphate-buffer (PBS) and collected for either RNA or protein extraction.

2.2. LDL sample preparation and purity control

LDL (density 1.019–1.063 g/mL) were prepared by ultracentrifugation from pooled plasma-EDTA of normocholesterolemic volunteers [23]. LDL-protein concentration was determined using the bicinchoninic acid (BCA)-method (Pierce) and LDL purity assessed by agarose-gel electrophoresis (SAS-MX Lipo-kit, Helena Biosciences). LDL-preparations were tested to exclude presence of endotoxin (Limulus amoebocyte lysate test, BioWhittaker) and potential bacterial contamination that could derive in confounding results and this has proved to be negative in all cases. LDL used in

the experiments were less than 48 h old.

LDL-oxidation in all LDL preparations and during co-incubation with monocyte was excluded by assessing thiobarbituric-acid-reactive substances (TBARS) formation, according Ohkawa et al [24], with slight modifications. Samples were incubated with 0.5 ml 20% Trichloroacetic acid and 0.5 ml of 1% thiobarbituric acid at 100 °C for 15 min. Thereafter, samples were cooled on ice and the absorbance was measured at 532 nm. A calibration curve was prepared with malondialdehyde (MDA) as standard. RPMI-1640-glutamax medium (with phenol red) containing 1.80 mg/mL LDL did not show any increase in TBARS-level (<2.5 nmol/mg LDL-protein) through a 48 h-period at 37°C, independently of the absence or presence of human monocytes. In contrast, oxidized LDL, obtained by *in vitro* incubation of the same LDL preparation with 10 mmol/L CuSO_4 at 37 °C for 3 h, gave >60 nmol MDA/mg LDL-protein.

LDL-composition in neutral lipids (cholesterylester, triglyceride and free cholesterol fractions) of the LDL preparations was determined by thin layer chromatography in the LDL preparations. [25] Levels of cholesteryl-esters (CE), triglycerides (TG) and free-cholesterol (FC), quantified by densitometry against a standard curve (including cholesterol-palmitate, triglycerides and cholesterol) were as follow: CE: 96.0 ± 136 $\mu\text{g}/\text{mg}$ LDL-protein; TG: 96.8 ± 11.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ LDL-protein; FC: 116.1 ± 111.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ LDL-protein.

2.3. Flow cytometry analysis

Monocytes were detached using 0.53 mM EDTA/PBS and suspended in PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA), blocking protein that was present in all washing steps as well as in the incubation periods either with the specific antibodies or the corresponding isotypes non-specific mouse IgGs. Fluorescein-isothiocyanate-Annexin V (Annexin V-FITC, BD) and Propidium iodide (PI, BD) were used to differentiate apoptotic (Annexin V-FITC positive, PI negative) from necrotic (Annexin V-FITC positive, propidium iodide positive) cells [26]. The monocyte-phenotype was characterized using a PerCP-conjugated mouse monoclonal anti-human CD14 (clone 47-3D6, Immunostep, dilution 1:5 from the original solution), FITC-conjugated mouse monoclonal anti-CD16 (clone 3G8, Immunotools, dilution 1:10 from the provided reagent) and a PE/Dazzle™594-conjugated mouse monoclonal anti-human CD163 (clone GHI/61, Biolegend, dilution 1:20 from reagent). Isotype non-specific mouse IgGs were used as background controls (clone eBM2a, eBioscience; clone PPV-06, Immunotools; clone MOPC-21, Biologend with the same final concentrations that the corresponding antibodies). Samples were incubated 30 min (room temperature, dark conditions) and analyzed on a Beckman Coulter Epics XL flow-cytometer. For each sample, 1×10^4 events were acquired and data analyzed with the Expo 32 software. Monocyte cells were gated according to their forward- and side-scatter profiles and then defined by the CD14, CD16 and CD163 labelling (Supplementary Fig. 1). Mean fluorescence intensity (MFI) \pm SEM for the specific antibodies and their isotype non-specific IgGs out of at least three experiments were as following: CD14: 85.08 ± 10.8 vs 10.4 ± 2.56 ; CD16: 13.03 ± 4.04 vs 4.54 ± 2.34 ; CD163: 37.49 ± 1.40 vs 3.6 ± 0.95 .

2.4. Protein extraction and western blotting analysis

Monocyte-extracts were prepared in RIPA-buffer supplemented with a protease-inhibitor cocktail (Complete, EDTA-free, Roche). Samples were homogenized, incubated on ice (30 min) and passed through a 20G gauge needle to facilitate cell breaking-up. Residual cell fragments were discarded by centrifugation (10 min, 10000 rpm, 4 °C). Supernatants were stored at -80 °C until

analysis. Protein concentrations were determined with the BCA-assay (Thermo Scientific).

Western blot analysis was made with 25 μ g protein as previously described [27]. For protein detection the following primary antibodies were used: rabbit-polyclonal anti-DR5 (dilution 1:2000; Merck-Millipore, ab16942), goat-polyclonal anti-CD14 (dilution 1:1000; Santa-Cruz, sc-6998), rabbit-polyclonal anti-TRAIL (dilution 1:1000; Abcam, ab42121), goat-polyclonal anti-CD49c (dilution 1:1000, Santa-Cruz, sc-6592), chicken-polyclonal anti-caspase-3 (dilution 1:2000; Abcam, ab136290), rabbit-polyclonal anti-caspase-8 (dilution 1:2000; Abcam, ab25901), rabbit-polyclonal VEGFA (dilution 1/500; Merck-Millipore, ABS82), rabbit-polyclonal ADAM9 (dilution 1/5000; Merck-Millipore, AB2959), and mouse-monoclonal anti- β -actin (dilution 1:24000; Abcam, ab8226), protein-bands were visualized by chemiluminescence (Supersignal, Pierce) and quantified with a ChemiDocTM XRS system using the Image Lab software (Bio-Rad). Results were expressed in arbitrary units. Equal amount of loaded protein was verified by Ponceau-staining and normalized by the β -actin detection levels.

2.5. Real time PCR analysis

Gene expression was analyzed by Taqman real Time-PCR amplification with gene-specific primers (Applied Biosystems) for DR5 (Hs00366278_m1), CD49c (Hs00233722_m1), CD14 (Hs00169122_g1), BAX (Hs00180269_m1) and BCL2 (Hs00608023_m1) Triplicated (genes) and duplicated (miRNAs) readings were taken and the average calculated. Relative expression was calculated as $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Total RNA was extracted with the mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion) and LDL-associated miRNA were obtained with the NucleoSpin miRNA Plasma kit (Macherey–Nagel), according to manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed with the High Capacity cDNA Reverse-Transcription Kit (Applied Biosystems) and Taqman real time-PCR amplification. Human miRNAs expression was measured using an array micro fluidic card v2.0 type-A (Taqman-technology), according to the manufacturer's instruction (Applied Biosystems). The array focuses on highly characterized microRNAs [28]. Thus, the array contains 377 microRNAs, 3 endogenous (RNU6, RNU48 and RNU44) and 1 negative control (ath-miR-159a) that does not amplify in human samples. Only miRNAs with expression levels below 32 cycles were accepted. RNU48 (001006) and PIK3C2A (Hs00153223_m1) were used as endogenous internal controls to normalize the expression levels of miRNAs and genes, respectively. PIK3C2A was proved in preliminary studies that remained unchanged during the differentiation from monocyte to macrophage and under incubation with LDL and with LPS. (data not shown). In addition, miR-223 [29] (002295) was used to normalize LDL-associated miRNA expression. Data were analyzed by SDS 2.4, RQ Manager 1.2.1 and DataAssits v3.0.1 software.

2.6. In silico analysis

Potential interactions between miRNAs and genes were defined using TargetScan, miRmap, miRbase and RNAhybrid (Bielefeld University Bioinformatics Server) as computational prediction tools and the Ingenuity Pathway Analysis software (IPA, Ingenuity Systems) (Supplementary Table 1). TargetScan, miRmap and miRbase algorithms were used for predicting miRNA for binding to defined target genes. filter tool was used to identify target-. Furthermore, RNAhybrid was used for calculating the accessibility of miRNAs for gene binding sites, using minimum free energy (MFE). Candidates genes were selected by comparison of MFE values [30]. The

sequences miRNA and gene binding site were obtained from TargetScan. Besides, the IPA Core Analysis tool was used to describe the roles and the functionality of the genes.

2.7. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM (standard error of the mean) except when indicated. Statistical differences between groups were analyzed using the Statview 5.01 (Abacus concepts, USA) program, by the parametric paired Student's t-test or the non-parametric paired-Wilcoxon test. A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Effect of LDL on cell morphology and viability at early stages of human monocyte to macrophage differentiation

Cell morphology and viability were analyzed in cultured buffy-coat derived monocytes during the early stage of differentiation into macrophages (MOMAC-cells). By phase-contrast microscopy, adhered monocytes mostly depicted a round shape within 24–48 h period after seeding (day-1 = D1 and day-2 = D2). During the following 48 h (days 3–4: D3 and D4), monocytes were incubated with minimal-HS medium with/without LDL and turned into a heterogeneous cell population. There was a time-dependent increase of cells with elongated appearance (spindle-shape) in the control (CTRL-MOMAC) group. In contrast, cells with round-shape, bigger size, and enhanced cytoplasm-to-nucleus ratio were more evident in the LDL-group (LDL-MOMAC; Supplementary Fig. 2). In the LDL-group, after 48 h LDL-D4-MOMAC cells were strongly positive (>90%) for intracellular lipids, as shown by the Heixemeier staining, whereas none of the control non-treated cells had positive staining (Supplementary Fig. 3).

To determine whether differences in monocyte morphology were associated with changes in cell viability, flow cytometry analysis for double labelling with propidium iodide (PI) and annexin V was performed. As show in Supplementary Fig. 4A, the pattern of annexin V and PI labelling did not significantly differ between control cells and those exposed to LDL over 48 h period (CTR-D4-MOMAC vs LDL-D4-MOMAC). Supporting this finding, the ratio between BAX mRNA and BCL2 mRNA, genes involved in the intrinsic apoptotic pathway, was not significantly affected in human adhered monocytes exposed to LDL for a time period of 24 neither of 48 h when compared to the control group (Supplementary Fig. 4B; compare CTR-MOMAC- and LDL-MOMAC-groups).

3.2. Cells with CD14^{dim}CD16⁺ labelling increase in human monocytes exposed to atherogenic concentrations of LDL

To better characterize the effect of LDL on monocyte-to-macrophage differentiation dynamics, CD14 transcript and protein levels were determined by real-time PCR and western blot, respectively (Fig. 1A and B), early stages (D3-MOMAC- and D4-MOMAC) of monocyte differentiation. Fig. 1A provides evidence that CD14 is highly expressed in overnight-cultured monocytes (MO) whereas macrophages (MAC) derived from *in vitro*-monocyte differentiation (7 days) depicted >4fold less CD14 mRNA expression and protein. The decrease in CD14mRNA and protein level (Fig. 1A and B, respectively) was time-dependent in monocyte during differentiation into macrophage. This decrease was significantly more evident in cells exposed to LDL both in D3-MOMAC and D4-MOMAC (24 and 48 h LDL-incubation, respectively). Thus, at day 4 (D4), mRNA CD14 level in LDL-monocyte had

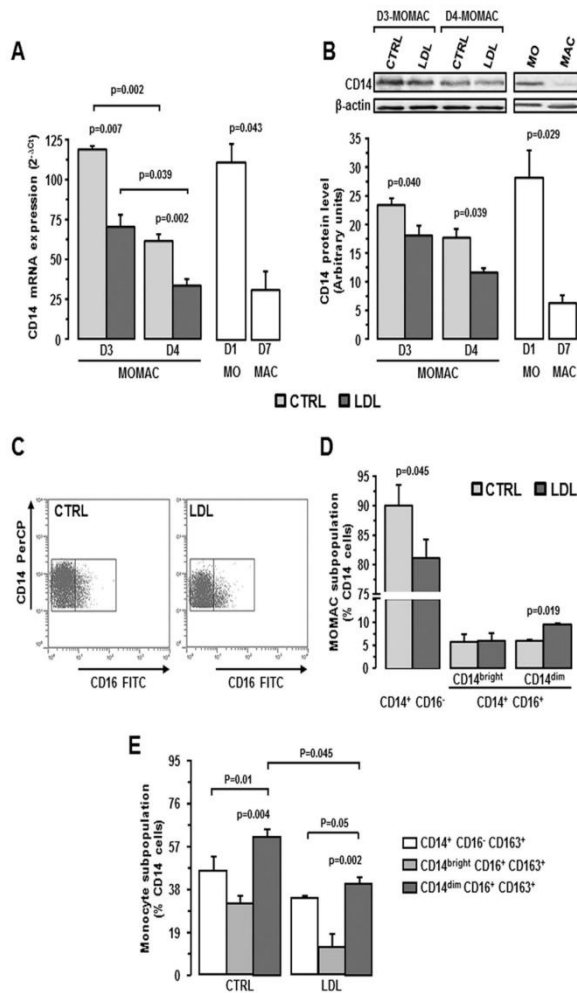


Fig. 1. Effect of LDL on markers of cell-differentiation in human monocytes. CD14-transcripts (A) and CD14-protein (B) levels during *in vitro* differentiation of monocytes into macrophages (empty bars). MO: cells D1 after seeding; MAC: day 7 in culture. Filled bars: cells at day 3 (D3-MOMAC) and day 4 (D4-MOMAC), incubated without (light grey) or with (dark grey) 1.80 mg/mL LDL for 24 h and 48 h, respectively. (C) Representative flow-cytometry dot-plot for CD14- and CD16-labelling in control- and LDL-MOMAC at day 4. (D) Percentage of D4-MOMAC subpopulations. (E) CD163-labelling in MOMAC subpopulation at day 4 in percentage. Bars represent mean \pm SEM of 3–5 independent donors in duplicates. Only p-values < 0.05 are shown.

already been reduced to the level in mature macrophages, whereas this decrease was not evident in absence of LDL, suggesting a premature macrophage-like phenotype in those cells exposed to LDL.

By flow cytometry analysis, different monocyte populations were identified by their expression of CD14 (a part of the lipopolysaccharide receptor), and of the Fc γ III receptor CD16 (Fig. 1C). In accordance with the proposed nomenclature [31,32], the dominant monocyte species was the CD14⁺CD16⁻ that constitute 90 \pm 3.5% of all monocytes in the control-group and 81 \pm 3.3% in the

group (p = 0.045). In contrast, within monocytes expressing CD16, those expressing CD14 antigen at a lower level (CD14^{dim}) were significantly increased in cells exposed over 48 h to LDL (Fig. 1D). In addition, LDL leads to an increase in the cellular complexity of the monocytes, as determined by the side- and forward-scatter analysis (Supplementary Fig. 5).

The M2-macrophage phenotype marker CD163 (scavenger receptor cysteine-rich family) [33] was detected in >90% of 9-days *in vitro* differentiated-macrophages (data not shown) and in 46% of the D4-MOMAC cells, at day 4 of differentiation into macrophage.

The percentage of cells positive for CD163 was significantly higher for those CD14^{dim}CD16⁺ than among cells expressing CD14 at higher intensity (CD14⁺CD16⁻ or CD14^{bright}CD16⁺) (Fig. 1E). CD163 labelling was reduced in cells exposed to LDL compared to the control-group (CONTROL-MOMAC: 60.8 ± 3.2 vs LDL-MOMAC: 40.3 ± 2.3; p = 0.044). When the different phenotypes were considered, the decrease was especially evident in the subpopulation CD14^{dim}CD16⁺ (Fig. 1E).

3.3. Effects of LDL on CD49c and DR5 expression levels in human monocytes at an early differentiation stage

To investigate the mechanisms by which LDL increase differentiation of MO to a MAC-like phenotype, we analyzed gene expression and protein levels of CD49c and DR5, membrane associated proteins involved in the regulation of cell attachment and anoikis [19]. CD49c mRNA expression was significantly increased in monocytes exposed to atherogenic concentrations of LDL for 24- and 48-h during the early stage of differentiation into macrophages (D3-MOMAC and D4-MOMAC) compared to cells incubated in the absence of LDL (control group, Fig. 2A) for the same time-periods. Similarly, CD49c protein, identified by western blot as a single band of 135 kDa, showed 3-fold increase in its expression level after 48 h exposition to LDL compared to the control group. The mRNA and protein levels of CD49c in the D4-MOMAC treated with LDL did not differ significantly from those in mature macrophages, after 7 days differentiation (Fig. 2A and B).

Western blot analysis for the tumor necrosis factor receptor DR5 depicted two bands of 48 kDa and 40 kDa, identified as the precursor (pre-DR5) and mature (m-DR5) forms that differentiate by the presence of 55 amino acids at N-terminal peptide [34,35]. Levels of pre-DR5 were significantly decreased after 24 and 48 h exposition to LDL (Fig. 3A) and a similar pattern was found when the ratio between precursor and mature forms was calculated (Fig. 3B). In contrast, the presence of LDL induced the opposite effect on the DR5 mRNA expression (Fig. 3C), suggesting a LDL induced post-transcriptional regulation. TRAIL expression levels did not show significant changes in monocytes exposed to LDL (Fig. 3D).

3.4. Identification of miRNA target binding sites for DR5 by in silico analysis

By in silico analysis, using the TargetScan and miRmap software, we identified 341 potential binding sites for miRNAs on the 3'UTR of DR5 mRNA. Thereafter, using the miRmap score (probability of binding between microRNA and gene) and the miRbase score (Probability that microRNA exists according to reading of deep sequencing), the 6 top miRNA (miR-361-3p, miR-508-5p, miR-125a-5p, miR-126, miR 133a, miR 767-5p) were selected (Fig. 4A).

3.5. miRNAs expression pattern in human monocytes exposed to LDL and enrichment analysis of validated targets for candidate miRNAs

To characterize the pattern of miRNAs expressed in human monocytes and identify those significantly affected by atherogenic concentrations LDL, we performed a RT-PCR based array (microfluidic card) with RNA samples obtained from human buffy-coat derived monocytes cultured for 24 h in the presence or absence of 1.80 mg/mL LDL. Seventy five miRNAs were consistently expressed in the human monocytes (listed in Supplementary Fig. 6A). Thirteen miRNAs were differentially expressed in MOMAC cells exposed to LDL compared to the control group. From them, 10 miRNAs were upregulated (>1.5fold), 1 miRNA was 2.2fold downregulated (Supplementary Fig. 6B) and miR-18a and miR-138 were only present in control- and LDL-monocytes, respectively. Among the miRNAs differentially expressed in LDL-monocytes, miR-126 was the only one included in the top list of miRNA with binding capacity for DR5 (see Fig. 4A). Therefore, this miRNA was selected for further validation studies. Analysis by real time PCR, with specific primers for the 3p- and 5p-strands, revealed a selective effect of LDL to induce overexpression of the miR-126-3p. A lower effect was observed with miR-126-5p only in the D3-LDL-MOMAC group (Fig. 4B). To exclude that the increase of miR-126-3p in monocytes exposed to LDL could be carried by LDL particle, we analyzed miR-126-3p in the used LDL preparations and proved that it was under the detection level in all the analyzed LDL preparations (data not shown).

To further verify the predicted value of DR5 as target for miR-

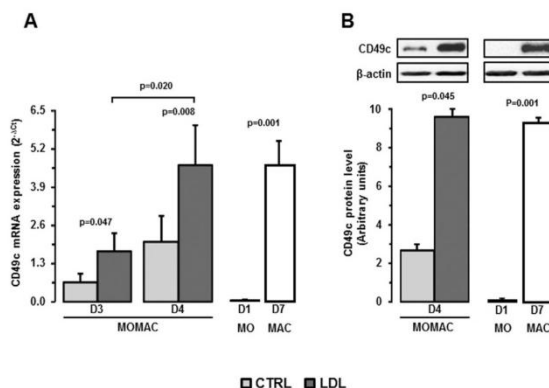


Fig. 2. LDL increase expression of CD49c at transcript and protein level. (A) Real-time-PCR quantification of mRNA-expression and (B) western blot analysis for protein level of CD49c (α3-subunit of the integrin family) in cells, incubated without (light grey) or with (dark grey) 1.80 mg/mL LDL for 24–48 h (D3-MOMAC and D4-MOMAC). MO: cells D1 after seeding; MAC: day 7 in culture. Bars represent mean ± SEM of 4 independent donors in duplicates.

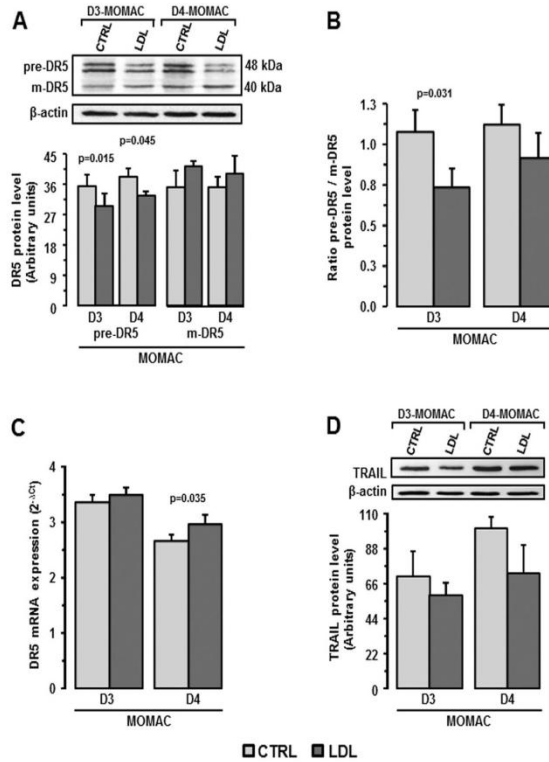


Fig. 3. LDL induce a decrease in the precursor form of the death-receptor DR5 without affecting its mRNA-expression level. Cell-extracts of MOMAC-cells, treated as described in Fig. 1, were analyzed for (A–C) DR5 and (D) its ligand TRAIL at protein (A,B,D) and mRNA (C) level. In (A), DR5 precursor (pre-DR5) and mature (m-DR5) are shown. Note that pre-DR5 was downregulated whereas m-DR5 was not significantly affected after incubation with LDL. (B) Ratio pre-DR5/m-DR5 according to protein levels obtained by western blot analysis (C) mRNA-levels obtained by real-time-PCR. Bars represent mean \pm SEM of 4 independent donors in duplicates. Only p-values < 0.05 are shown.

126-3p, we performed *in silico* analysis using the IPA microRNA target filter as searching tool and calculating the minimum hybridization free energy (MFE) values (RNAhybrid, Bielefeld University Bioinformatics Server) of the duplex miRNA:mRNA to screen optimized miR-126-3p:mRNA interactions. As shown in [Supplementary Table 2](#), eleven candidate genes with MFE values below the median value of all initially predicted candidates were selected [median MFE: -20.8 kcal/mol]. Cell death and survival was identified as the most representative cellular function involving the 11 predicted genes regulated by miR-126-3p (Result obtained by IPA-Core Analysis, $p = 0.0000141$), cell function that had DR5 as the best represented gene among the selected 11 targets (DR5 score: 25, VEGFA score: 19. Score for the other 9 target genes were less than 4). VEGFA protein levels decreased at early stages of monocyte differentiation in the presence of native LDL, although changes vs the control group only achieved statistical significance at day 3 (D3-MOMAC) ([Supplementary Fig. 7A](#)). ADAM9, that scored much lower in the *in silico* analysis, did not show any consistent change during monocyte differentiation in the presence of LDL, suggesting that

ADAM9 post-transcriptional regulation is not mediated through the miR-126 3p ([Supplementary Fig. 7B](#)).

Two of the miRNAs (miR-361-3p, miR-767-5p) included in the top-6 group defined by *in silico* analysis were not analyzed in the microfluidic card. Therefore, we carried out quantitative RT-PCR for these two miRNAs and found that miR-767-5p was below detection level in human monocytes. On the contrary, miR-361-3p level was low but consistently expressed in monocytes. Levels miR-361-3p were slightly increased in the LDL-D3-MOMAC group, but the difference with the control group was lost at 48 h ([Supplementary Fig. 6C](#)).

3.6. LDL targets caspase-3 and caspase-8 in monocytes at early stages to macrophage differentiation

Several studies have provided evidence that caspases are essential to monocyte differentiation into macrophages. Therefore, here, we analyzed caspase-8 (CASP8) and caspase-3 (CASP3) expression levels in monocytes exposed to LDL during the early

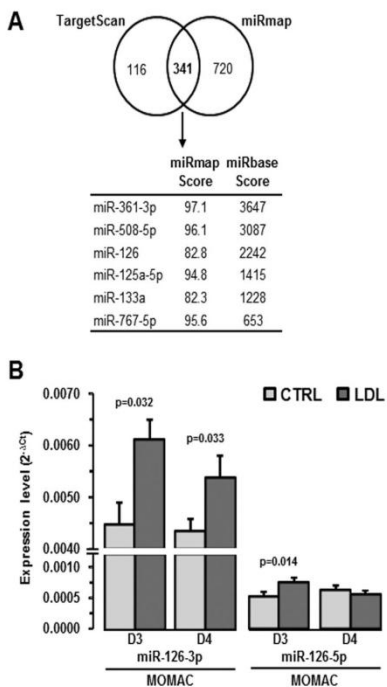


Fig. 4. miRNA target binding sites for DR5 by *in silico* analysis. (A) Venn diagram: 341 potential binding sites for miRNAs on DR5 mRNA were identified by TargetScan and miRmap software. Top 6 miRNAs are listed. miRmap score refers to the probability of binding between miRNA and DR5 mRNA according to the miRmap database. miRBase score indicates level of confidence to miRBase entries based on the pattern of mapped reads. (B) miR-126-3p and miR-126-5p in human monocytes treated as described for Fig. 1. Bars represent mean \pm SEM of 4 independent donors in triplicates. Only p-values < 0.05 are shown.

stage of differentiation to macrophages (D3- and D4-MOMAC groups; Fig. 5). By western blot analysis, CASP8 was detected as 2 bands of 55 kDa and 18 kDa that refer to the pro-caspase and the active cleaved-form, respectively. The active cleaved CASP8 form exceeded in 2fold the level of the pro-caspase form in monocytes, independently of the presence of LDL (Fig. 5A). The presence of atherogenic concentrations LDL significantly reduced CASP8 protein, both as pro-form and active-cleaved-protein, without significantly affecting the ratio between both forms.

Differing from CASP8, only the pro-enzyme of CASP3 (32 kDa) was detected in human monocytes after 48–96 h in culture. The 20-kDa intermediary CASP3 and the fully active 17-kDa forms were not detected, neither in the absence nor in the presence of LDL. Levels of pro-CASP3 were significantly decreased in cell exposed to LDL, independently of the time-interval (24 or 48 h) (Fig. 5B).

4. Discussion

Hyperlipidemia and inflammation represent two major pillars in the pathophysiology of atherosclerosis [5] and monocyte to macrophage differentiation plays a major role in the initiation and

progression of the atherosclerotic lesions from a stable to an unstable state. Therefore, a better understanding of the fundamental molecular mechanisms and downstream assessment of inflammatory pathways behind the monocyte-to-macrophage differentiation may aid in the identification of new therapeutic strategies addressing inflammation as a primary target.

In the current study, we have investigated the effect of high LDL-cholesterol levels, defined according American and European Guidelines [36,37], in the process of monocyte to macrophage differentiation. With this aim, LDL were isolated of plasma obtained from normocholesterolemic subjects and used within 48 h after preparation to exclude *in vitro* changes due to storage. Thus, based on cell culture studies, we report that native LDL, at atherogenic concentrations (representative of those found in the plasma of hypercholesterolemic patients) contribute to shorten the time to differentiation of human adhered monocytes into macrophage-like cells. LDL-induced changes refer both to the cell-morphology and the expression level of the CD14. This membrane-anchored glycoprotein that functions as a marker of the monocyte-phenotype [38] was significantly decreased in monocytes exposed to atherogenic levels of LDL when compared to non-exposed controls.

Circulating monocytes can be divided into three distinct subtypes according to their surface expression of CD14 and CD16 [31]. In a germinal study [39], Rothe et al. reported an inverse correlation between high density lipoprotein (HDL)-cholesterol levels and the population size of CD16⁺ monocytes in hypercholesterolemic patients, while total cholesterol and triglycerides were positively correlated with the CD16⁺ monocyte population. Furthermore, Krychtiuk et al., in a recent study published this year [40], describe that small dense LDL serum levels are positively associated with an increase of the CD14^{dim}CD16⁺ and a decrease of the CD14⁺CD16⁻ monocyte-subpopulations in patients with stable coronary artery disease.

Here, using a mechanistic approach, we expand these previous results derived from clinical studies and provide evidence that atherogenic levels of LDL, in their native form, directly affect the monocyte phenotype turning CD14⁺CD16⁻ cells into CD14^{dim}CD16⁺. Thus, our results together with those from other groups, strongly suggest a new link between lipid metabolism dysregulation, innate immunity and atherosclerosis. Supporting this hypothesis, CD16⁺ monocytes have shown to correlate with intima media thickness in a study over 600 apparently healthy adults [41] and CD14⁺CD16⁺ monocytes correlate with coronary plaque vulnerability in patients with stable angina pectoris [42]. It is also to note that CD14^{dim}CD16⁺ monocytes exhibit pro-inflammatory and pro-atherosclerotic activity as reported in a population of elderly human subjects in which activated monocytes depicted an increased interaction with endothelium and had higher expression of chemokine receptors [43].

It is known that early stages of human atherosclerosis inflammatory lesions are populated by macrophages with elevated expression of CD16 along with low CD14 expression [44]. The surface expression pattern seen on CD16⁺ monocytes in our study resemble the CD16/CD14 expression level typically found in tissue macrophage, suggesting CD16⁺ monocytes as a more mature phenotype [45]. It is interesting, that monocytes exposed to LDL during differentiation into macrophages lose surface expression of the scavenger receptor cysteine-rich protein CD163, which might relate to lower response to hemoglobin and hemoglobin-haptoglobin (Hb-Hp) complexes, downregulation of the heme-oxygenase-1 (HMOX-1) expression, and decreased atherosclerosis protection [46].

A defining feature of differentiated tissue macrophages, in comparison to monocytes, is their resistance to constitutive apoptosis [47]. Cell apoptosis implicates an increasing complexity

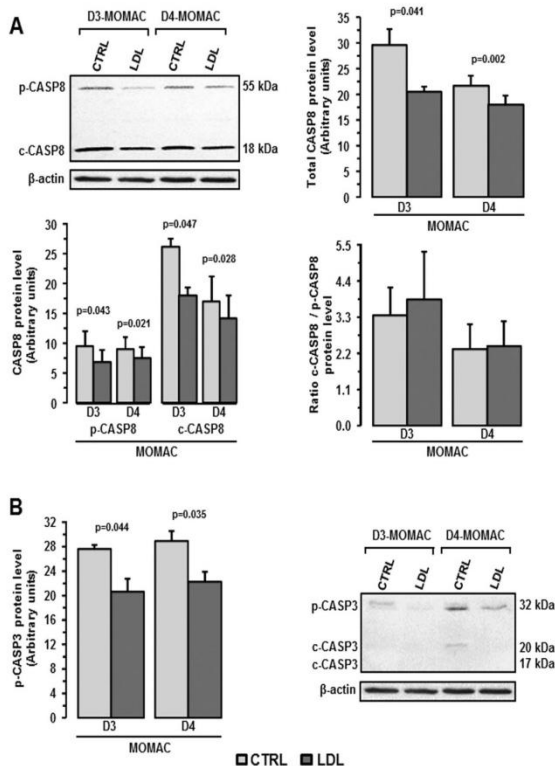


Fig. 5. Effect of LDL on CASP8 and CASP3 protein levels. Cell-extracts of human monocytes, treated as described in Fig. 1, analyzed by western blot for the apoptosis-effectors (A) CASP8 and (B) CASP3. Two bands for CASP8, the pro-enzyme (p-CASP8) and the cleaved active form (c-CASP8) are shown in panel A. LDL induced significant decrease in both CASP8 without affecting the p-CASP8/c-CASP8 ratio. (B) The pro-enzyme for CASP3 (p-CASP3) was consistently detected. Traces of 20 kDa-CASP3 form were detected in LDL-treated monocytes. Cleaved active CASP3 (c-CASP3) was not detected in any of the analyzed samples. Bars represent mean \pm SEM of 4 independent donors. Note that only p-values < 0.05 are shown.

of players and signalling pathways which regulate not only the decision-making process of dying, but also the execution of cell death proper. The same complex nature applies to anoikis, a form of caspase-dependent apoptosis that is largely regulated by integrin-mediated cell-extracellular matrix (ECM) interactions. In our study, the ratio between genes as BAX and BCL-2 [48], involved in the intrinsic apoptotic pathway, derived from mitochondrial effects, did not change significantly after exposition to LDL, supporting the finding that cell viability (Annexin-V binding) was not compromised in these cells upon the LDL-atherogenic stimulus. Beyond the intrinsic pathway, cell-apoptosis is also triggered extracellularly through activation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptors as DR5 [49] that activate the death-inducing proteolytic enzyme CASP8 [50,51]. LDL did not significantly affect TRAIL levels in monocytes. However, LDL induce a decrease in the precursor form of its receptor DR5, effect that seems to occur by acting at the protein translation level rather than by reduction of DR5 mRNA expression. To this respect, our results strongly support a role for miR126-3p in the regulation of the DR5 protein level.

Performing an *in silico* prediction analysis, this miRNA was depicted as the best candidate to regulate DR5 expression at post-transcriptional level. Interestingly, through a miRNA expression array and a specific RT-PCR assay, the expression of miR126-3p was found to be significantly increased over the time in monocytes exposed to LDL. In accordance to our results, miR-126 has been associated with high levels of LDL in plasma from patients with risk factors for coronary artery disease [52]. DR5 has been directly involved in anoikis in human colorectal carcinoma cells, in a process mediated by CASP8 and CASP3 [19]. Thus, the decrease in CASP8 and CASP3 in differentiating monocyte exposed to hypercholesterolemic environment strongly suggest that LDL affects cell-detachment induced apoptosis by inducing effects on the caspase-cascade through the extrinsic pathway that is mediated by components of the tumor necrosis factor receptors (TNFR) superfamily. Cell-detachment induced apoptosis is directly dependent on integrins that regulate cellular adhesion and transmit relevant signals for cell survival [53]. To this respect, a recent study in human intestinal epithelial cells showed that suppression of anoikis

implicates differentiation by state-selective repertoires of integrins, which in turn results into anoinitis regulation through a process dependent on the cell-differentiation stage [12]. In the present study, we have shown that together with the decrease in anoinitis effectors, exposition of adhered monocytes to atherogenic levels of LDL induced >2fold increase in the mRNA expression levels of the adhesion molecule CD49c, $\alpha 3$ -subunit of the integrin family, this effect being even more obvious at protein level. Previous studies have reported CD49c as a protein highly expressed in differentiated macrophages but with low or not detection in freshly isolated monocyte [13]. Cell adhesion to ECM plays a crucial role in monocyte differentiation into macrophage-like cells. Attachment of cells to ECM-proteins is mediated predominantly by members of the integrin family [54], being the $\alpha 3$ -integrin (CD49c) subunit specifically associated with the monocyte to macrophage differentiation process, in contrast to other integrins of the alpha- and beta-subunits that have comparable expression in monocyte-derived-macrophage and -dendritic-cells [13]. The fact that monocyte-derived dendritic cells do not express CD49c [13], strongly supports the finding that exposure of monocyte to LDL accelerates their differentiation to a macrophage-like phenotype.

LDL form a heterogeneous family with particles that vary in size and density, and this heterogeneity is being investigated regarding metabolic behavior and physiopathological properties. In the present study we have concentrated in normal LDL particles. Further studies with LDL from hypercholesterolemic patients may provide important additional information.

In conclusion, the present study demonstrates that atherogenic levels LDL facilitate monocyte to macrophage differentiation through a process that involves the enhanced expression of the adhesion protein alpha-3 integrin and downregulation of proteins directly involved in cell-detachment induced apoptosis, suggesting a relevant role of LDL in the link between lipids, innate immunity and atherosclerosis. Further studies should provide a greater understanding of these processes during evolution of the lesions and their transformation into macrophage-rich vulnerable plaques.

Financial support

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness [SAF2013-42962-R to L.B.], Institute of Health Carlos III- ISCIII [FIS PI13/02850 to T.P./"Red de Investigación Cardiovascular" RIC-RD12/0042/0027 to L.B.] and FEDER "Una Manera de Hacer Europa". We thank Fundación Jesus Serra, Barcelona, for their continuous support. RE is a recipient of a pre-doctoral grant from the "Investigación Cardiovascular Foundation" (2010-2012) and ICCC (2012-2015).

Acknowledgments

Authors are indebted to Dr Javier Crespo for his help in flow cytometry analysis and to Montse Gomez-Pardo for the technical assistance during the study.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.01.002>.

References

[1] R. Ross, Atherosclerosis—an inflammatory disease, *N. Engl. J. Med.* 340 (2) (1999) 115–126.
 [2] D. Behrendt, P. Ganz, Endothelial function. From vascular biology to clinical applications, *Am. J. Cardiol.* 90 (10c) (2002) 40L–48L.
 [3] P. Libby, P.M. Ridker, A. Maseri, Inflammation and atherosclerosis, *Circulation*

105 (9) (2002) 1135–1143.
 [4] R. Altman, Risk factors in coronary atherosclerosis athero-inflammation: the meeting point, *Thromb. J.* 1 (1) (2003) 4.
 [5] L. Badimon, T. Padró, G. Vilahur, Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease, *Eur. Heart J. Acute Cardiovasc. Care* 1 (1) (2012) 60–74.
 [6] K.A. Pritchard, R.R. Tota, J.H. Lin, et al., Native low density lipoprotein. Endothelial cell recruitment of mononuclear cells, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 11 (5) (1991) 1175–1181.
 [7] K.H. Han, R.K. Tangirala, S.R. Green, O. Quehenberger, Chemokine receptor CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis in human monocytes. A regulatory role for plasma LDL, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18 (12) (1998) 1983–1991.
 [8] D.M. Smalley, J.H.-C. Lin, M.L. Curtis, Y. Kobari, M.B. Stemberman, K.A. Pritchard, Native LDL increases endothelial cell adhesiveness by inducing intercellular adhesion molecule 1, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16 (4) (1996) 585–590.
 [9] C.V. Serrano, A.E. Pesaro, J.A. de Lemos, et al., Native LDL-cholesterol mediated monocyte adhesion molecule overexpression is blocked by simvastatin, *Cardiovasc. Drugs Ther.* 23 (3) (2009) 215–220.
 [10] C. Margadant, H.N. Monsuur, J.C. Norman, A. Sonnenberg, Mechanisms of integrin activation and trafficking, *Curr. Opin. Cell Biol.* 23 (5) (2011) 607–614.
 [11] A.P. Gilmore, Anoinitis, *Cell Death Differ.* 12 (Suppl. 2) (2005) 1473–1477.
 [12] M. Beauséjour, S. Thibodeau, M.-J. Demers, et al., Suppression of anoinitis in human intestinal epithelial cells: differentiation state-selective roles of $\alpha 2 \beta 1$, $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha 5 \beta 1$, and $\alpha 6 \beta 4$ integrins, *BMC Cell Biol.* 14 (2013) 53.
 [13] C. Ammon, S.P. Meyer, L. Schwarzfischer, S.W. Krause, R. Andreesen, M. Kreuz, Comparative analysis of integrin expression on monocyte-derived macrophages and monocyte-derived dendritic cells, *Immunology* 100 (3) (2000) 364–369.
 [14] S. Garguilo, P. Gamba, G. Testa, et al., Molecular signaling involved in oxysterol-induced $\beta 3$ -integrin over-expression in human macrophages, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (11) (2012) 14278–14293.
 [15] S.S. Cha, B.J. Sung, Y.A. Kim, et al., Crystal structure of TRAIL-DR5 complex identifies a critical role of the unique frame insertion in conferring recognition specificity, *J. Biol. Chem.* 275 (40) (2000) 31171–31177.
 [16] S. Elmore, Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicol. Pathol.* 35 (4) (2007) 495–516.
 [17] S. Kothakota, T. Azuma, C. Reinhardt, et al., Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis, *Science* 278 (5336) (1997) 294–298.
 [18] S. Kamaoka, H. Kusano, H. Fujita, et al., A cloning method for caspase substrates that uses the yeast two-hybrid system: cloning of the antiapoptotic gene gelsolin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (15) (1998) 8532–8537.
 [19] L.M. Lagueigne, R.N. Samara, W. Wang, et al., DR5 receptor mediates anoinitis in human colorectal carcinoma cell lines, *Cancer Res.* 68 (3) (2008) 909–917.
 [20] V. Haselmann, A. Kurz, U. Bertsch, et al., Nuclear death receptor TRAIL-R2 inhibits maturation of let-7 and promotes proliferation of pancreatic and other tumor cells, *Gastroenterology* 146 (1) (2014) 278–290.
 [21] P. Alexiou, T. Vergoulis, M. Gleditsch, et al., miRGen 2.0: a database of microRNA genomic information and regulation, *Nucleic Acids Res.* 38 (Database issue) (2010) D137–D141.
 [22] M. Borrell-Pagés, J.C. Romero, L. Badimon, LRP5 negatively regulates differentiation of monocytes through abrogation of Wnt signalling, *J. Cell. Mol. Med.* 18 (2) (2014) 314–325.
 [23] R.J. Havel, H.A. Eder, J.H. Bragdon, The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum, *J. Clin. Investig.* 34 (9) (1955) 1345–1353.
 [24] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.* 95 (2) (1979) 351–358.
 [25] R. Cal, J. Castellano, E. Revuelta-López, et al., Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates hypoxia-induced very low density lipoprotein-cholesterol ester uptake and accumulation in cardiomyocytes, *Cardiovasc. Res.* 94 (3) (2012) 469–479.
 [26] M. Cornelissen, J. Philippé, S. De Sitter, L. De Ridder, Annexin V expression in apoptotic peripheral blood lymphocytes: an electron microscopic evaluation, *Apoptosis* 7 (1) (2002) 41–47.
 [27] T. Padró, E. Peña, M. García-Arguinzonis, V. Lorente-Cortés, L. Badimon, Low-density lipoproteins impair migration of human coronary vascular smooth muscle cells and induce changes in the proteomic profile of myosin light chain, *Cardiovasc. Res.* 77 (1) (2008) 211–220.
 [28] S. Griffiths-Jones, H.K. Saini, S. van Dongen, A.J. Enright, miRBase: tools for microRNA genomics, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) D154–D158.
 [29] J. Wagner, M. Riwanoto, C. Besler, et al., Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33 (6) (2013) 1392–1400.
 [30] J. Krüger, M. Rehmsmeier, RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) W451–W454.
 [31] L. Ziegler-Heitbrock, P. Ancuta, S. Crowe, et al., Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood, *Blood* 116 (16) (2010) e74–80.
 [32] M. Tanaka, J. Honda, Y. Imamura, K. Shiraiishi, K. Tanaka, K. Ozumi, Surface phenotype analysis of CD16+ monocytes from leukapheresis collections for peripheral blood progenitors, *Clin. Exp. Immunol.* 116 (1) (1999) 57–61.
 [33] C.A. Gleissner, I. Shaked, C. Erbel, D. Bückler, H.A. Katus, K. Ley, CXCL4 downregulates the atheroprotective hemoglobin receptor CD163 in human

- macrophages, *Circ. Res.* 106 (1) (2010) 203–211.
- [34] H. Walczak, M.A. Degli-Esposti, R.S. Johnson, et al., TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL, *EMBO J.* 16 (17) (1997) 5386–5397.
- [35] M.-S. Lee, R.P. Cheria, E.K. Lentz, D. Leyva-Illades, V.L. Tesh, Signaling through C/EBP homologous protein and death receptor 5 and calpain activation differentially regulate THP-1 cell maturation-dependent apoptosis induced by Shiga toxin type 1, *Infect. Immun.* 78 (8) (2010) 3378–3391.
- [36] R.J. Lipsy, Effective management of patients with dyslipidemia, *Am. J. Manag. Care* 9 (2 Suppl) (2003) S39–S58.
- [37] J. Perik, G. De Backer, H. Gohlke, et al., European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012)“ the fifth joint task force of the european society of cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur. Heart J.* 33 (13) (2012) 1635–1701.
- [38] H.W. Ziegler-Heitbrock, R.J. Ulevitch, CD14: cell surface receptor and differentiation marker, *Immunol. Today* 14 (3) (1993) 121–125.
- [39] G. Rothe, H. Gabriel, E. Kovacs, et al., Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16 (12) (1996) 1437–1447.
- [40] K.A. Krychtiuk, S.P. Kastl, S. Pfaffenberger, et al., Association of small dense LDL serum levels and circulating monocyte subsets in stable coronary artery disease, *PLoS One* 10 (4) (2015) e0123367.
- [41] K.S. Rogacev, C. Ulrich, L. Blömer, et al., Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis, *Eur. Heart J.* 31 (3) (2010) 369–376.
- [42] M. Kashiwagi, T. Imanishi, H. Tsujioka, et al., Association of monocyte subsets with vulnerability characteristics of coronary plaques as assessed by 64-slice multidetector computed tomography in patients with stable angina pectoris, *Atherosclerosis* 212 (1) (2010) 171–176.
- [43] A. Merino, P. Buendia, A. Martín-Malo, P. Ajama, R. Ramirez, J. Carracedo, Senescent CD14+CD16+ monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity, *J. Immunol.* 186 (3) (2011) 1809–1815.
- [44] T. Häkkinen, K. Karkola, S. Ylä-Herttua, Macrophages, smooth muscle cells, endothelial cells, and T-cells express CD40 and CD40L in fatty streaks and more advanced human atherosclerotic lesions. Colocalization with epitopes of oxidized low-density lipoprotein, scavenger receptor, and CD16 (Fc gammaRIII), *Virchows Arch.* 437 (4) (2000) 396–405.
- [45] L. Ziegler-Heitbrock, The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation, *J. Leukoc. Biol.* 81 (3) (2007) 584–592.
- [46] C.A. Schaefer, G. Schoedon, A. Imhof, M.O. Kurrer, D.J. Schaefer, Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin, *Circ. Res.* 99 (9) (2006) 943–950.
- [47] D.H. Munn, A.C. Beall, D. Song, R.W. Wrenn, D.C. Throckmorton, Activation-induced apoptosis in human macrophages: developmental regulation of a novel cell death pathway by macrophage colony-stimulating factor and interferon gamma, *J. Exp. Med.* 181 (1) (1995) 127–136.
- [48] J.M. Adams, S. Cory, The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival, *Science* 281 (5381) (1998) 1322–1326.
- [49] C.C. Valley, A.K. Lewis, D.J. Mudaliar, et al., Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces death receptor 5 networks that are highly organized, *J. Biol. Chem.* 287 (25) (2012) 21265–21278.
- [50] N.S. Wilson, V. Dixit, A. Ashkenazi, Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks, *Nat. Immunol.* 10 (4) (2009) 348–355.
- [51] T.M. Baetu, J. Hiscott, On the TRAIL to apoptosis, *Cytokine Growth Factor Rev.* 13 (3) (2002) 199–207.
- [52] X. Sun, M. Zhang, A. Sanagawa, et al., Circulating microRNA-126 in patients with coronary artery disease: correlation with LDL cholesterol, *Thromb. J.* 10 (1) (2012) 16.
- [53] D.G. Stupack, D.A. Cheresh, Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival, *J. Cell Sci.* 115 (Pt 19) (2002) 3729–3738.
- [54] M.E. Hemler, VIA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes, *Annu. Rev. Immunol.* 8 (1990) 365–400.

Supplementary Content

LDL ACCELERATES MONOCYTE TO MACROPHAGE DIFFERENTIATION: EFFECTS ON ADHESION AND ANOIKIS

Escate R (1)*, Padro T (1)*, Badimon L**

(1) Both authors contributed equally to this work

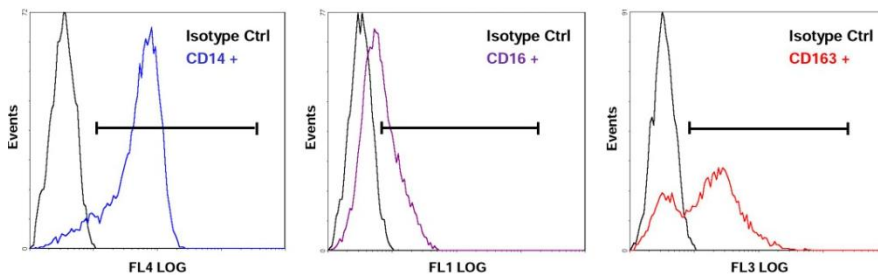
* Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC), IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain;

Cardiovascular Research Chair, UAB, Barcelona, Spain

Address for correspondence:

Prof. Lina Badimon
Cardiovascular Research Center,
c/Sant Antoni M^a Claret 167, 08025 Barcelona, Spain.
Phone: +34.935565880.
Fax: +34.935565559.
E-mail: lbadimon@csic-iccc.org

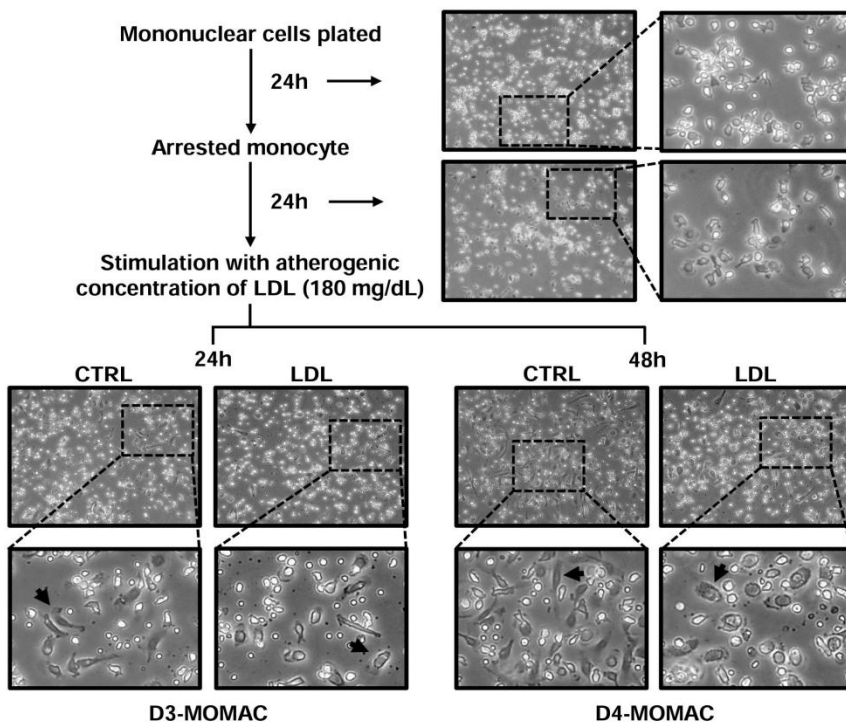
Escate R, Padro T, Badimon L



Supplementary Figure 1. Representative histograms for CD14⁺, CD16⁺ and CD163⁺ cells and their respective isotype non-specific IgGs

Representative flow cytometry shows the surface expression of CD14⁺, CD16⁺ and CD163⁺ on early stage of monocyte differentiation into macrophage (D4-MOMAC) *versus* the isotype control antibodies.

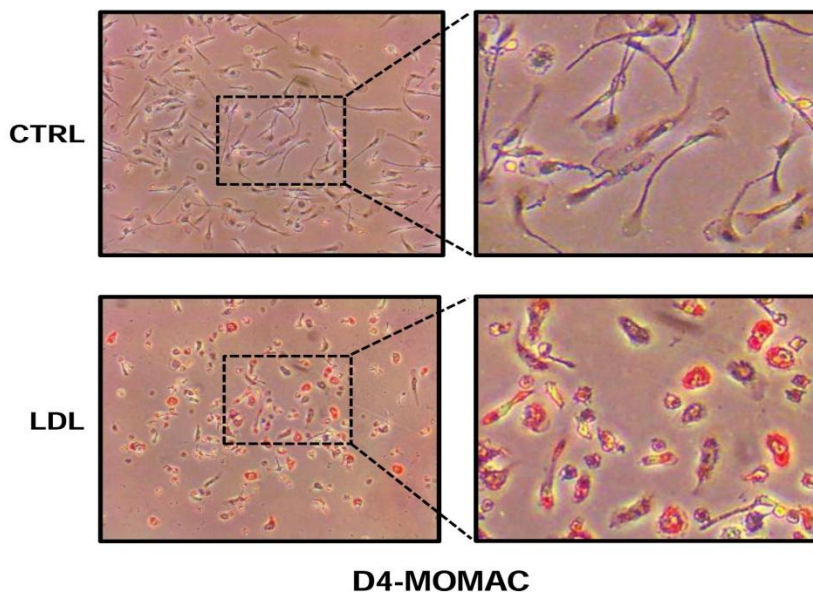
Escate R, Padro T, Badimon L



Supplementary Figure 2. Effect of LDL on cytomorphology in human monocytes

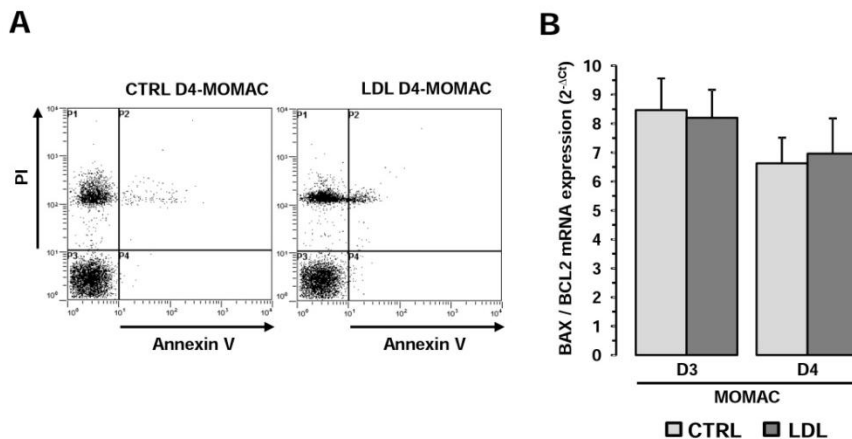
Cellular characteristics in *in vitro* differentiation of monocyte into macrophage in the presence or absence of 180mg/dL LDL. Black arrows show differential characteristics after 24 (D3-MOMAC) and 48 (D4-MOMAC) hours incubation with LDL between CTRL- and LDL-groups. Images are representative of 3 to 5 independent donors in duplicates and were taken by a phase contrast microscopy (Leica DMIRE2) magnification x200.

Escate R, Padro T, Badimon L



Supplementary Figure 3. Uptake of LDL in human monocytes (D4-MOMAC)
Herxheimer's fat staining in early stage of monocyte differentiation into macrophage at 48 (D4-MOMAC) hours of exposure of LDL (1.80mg/mL). The uptake of LDL shows a positive red staining in the cytoplasm of LDL-D4-MOMAC compared to CTRL-D4-MOMAC cells. Images are representative of 5 independent donors in duplicates and were taken by a Moticam10 camera.

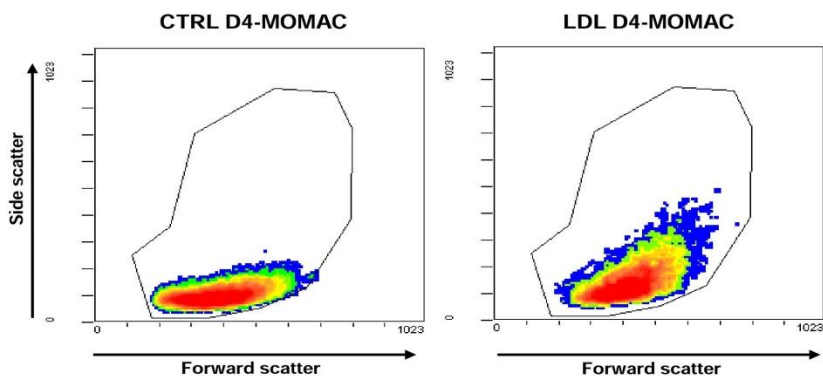
Escate R, Padro T, Badimon I



Supplementary Figure 4. Effect of LDL on cell survival in early stage monocyte differentiation

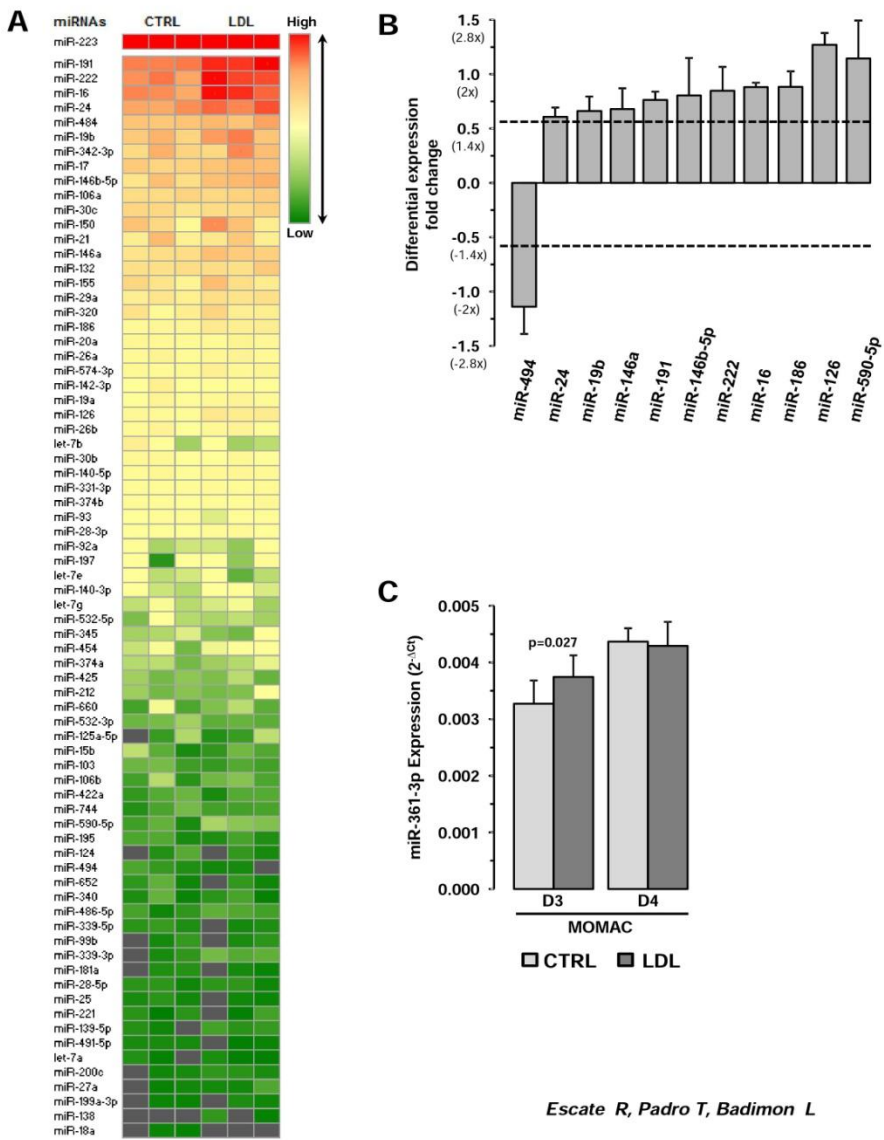
(A) Representative dot plot shows PI (Propidium Iodide) vs. AnnexinV-FITC staining in monocyte incubated without (CTRL) and with LDL for 48 hours, analyzed by cytometry analysis. Monocytes were grouped as P1 (late apoptotic or necrotic cells), P2 (intermediate apoptosis), P3 (Viable cells) and P4 (early stage of apoptosis). **(B)** Values of the ratio BAX/BCL2 according to mRNA expression level obtained by Real-time-PCR quantification was not significantly affected after incubation at 24 and 48 hours. Bars represent mean \pm SEM of 4 independent donors in duplicates.

Escate R, Padro T, Badimon L



Supplementary Figure 5. Flow cytometry Analysis: Effect of LDL on cell complexity
Representative gating to identify the cell complexity of D4-MOMAC cells incubated without and with LDL. The complexity was sized on forward and side scatter in the flow cytometry analysis in 4 independent donors.

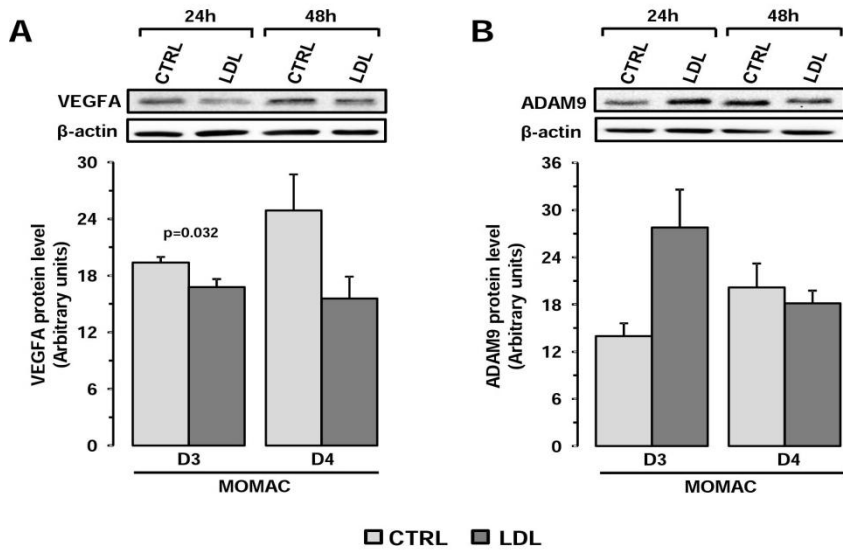
Escate R, Padro T, Badimon L



Supplementary Figure 6. miRNA expression profile

(A) Heat Map (n=3 independent individuals) for miRNAs expression obtained with a array micro fluidic card in CTRL- and LDL-MOMAC cells. Real-time-PCR quantification results. Each column is an independent experiment and each row corresponds to a single miRNA probe. Colour indicates the expression level in $2^{-\Delta Ct}$ (Red: high expression; Green: low expression; Gray: not expressed). **(B)** Expression levels are presented as \log_2 (LDL/CTRL). Therefore, miRNAs with log values -0.5, -1 and -1.5 are downregulated 1.4-, 2- and 2.8-fold respectively; and miRNAs with log values 0.5, 1 and 1.5 are up-regulated 1.4-, 2- and 2.8-fold respectively for 11 miRNAs in >1.5-fold in atherogenic concentration of LDL. **(C)** PCR quantification of miR-361-3p in monocytes without and with LDL at 24 and 48 hours, the bars represent mean \pm SEM of 4 independent donors in triplicates. Note that only p-values <0.05 are shown.

Escate R, Padro T, Badimon L



Supplementary Figure 7. Effects of LDL on the expression levels of VEGFA and ADAM-9 in MOMAC cells.

Cell-extracts of human monocyte were analysed by western blot for **(A)** VEGFA and **(B)** ADAM9. Consistent bands were detected (VEGFA: ~55kDa; ADAM9: 72kDa).. Bars represent mean±SEM of 4 independent experiments. Only p-values <0.05 are shown.

Escate R, Padro T, Badimon L

Supplementary Table 1. Tools for *in silico* analysis

Database	Links
TargetScan	http://www.targetscan.org/
miRmap	http://mirmap.ezlab.org/
miRbase	http://www.mirbase.org/
RNAhybrid	http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/
IPA (Ingenuity Pathway Analysis)	http://www.ingenuity.com/products/ipa

Database used in *in silico* analysis for predicting miR-126-3p for binding to DR5 mRNA and identify DR5 mRNA as the best gene candidate for miR-126-3p.

Escate R, Padro T, Badimon L

Supplementary Table 2. Potential targets for miR-126-3p by *in silico* prediction analysis

	Cell death and survival	Cell-to-Cell signaling and interaction	Cellular movement	Cellular development	Inflammatory response	Total score	MFE Values
VEGFA	19	19	32	21	4	95	-21.5
DR5	25	3	0	3	2	33	-23.2
ADAM9	0	9	6	0	3	18	-21.0
GNA13	4	3	4	1	4	16	-22.5
CRK	0	0	6	2	0	8	-24.5
LRP6	4	1	0	2	0	7	-20.9
PIK3R2	2	0	2	0	0	4	-23.6
RNF165	0	0	0	0	0	0	-21.8
SLC7A5	0	0	0	0	0	0	-23.0
TOM1	0	0	0	0	0	0	-21.5
ZNF219	0	0	0	0	0	0	-20.8
p-value	<0.00002	<0.00005	<0.0001	<0.0005	<0.001		

Potential genes were identified by microRNA target filter from IPA (Ingenuity pathway analysis) and RNAhybrid (Bielefeld University Bioinformatics Server) for miR-126-3p. The target genes are related with cellular functions for atherosclerosis by p-value according to score. Cellular death and survival was more significant cell function and DR5 was more representative. Minimum free energy (MFE) values were obtained by RNAhybrid.

Escate R, Padro T, Badimon L

Artículo 2

Macrophages of genetically characterized familial hypercholesterolaemia patients show up-regulation of LDL-receptor-related proteins

Autores: Rafael Escate, Teresa Padró, María Borell-Pagès, Rosa Suades, Rosa Aledo, Pedro Mata, Lina Badimon

Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC), IIB-Sant Pau, Barcelona, España.

Revista: Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2016;20(10):1-13.

Factor de impacto: 4.938

RESUMEN

En nuestro estudio poblacional en pacientes con hipercolesterolemia familiar (FH), El LRP5 es incrementado en leucocitos totales (PBL), así como en macrófagos expuestos a LDL agregada, siendo evidente en aquellos pacientes FH con los valores más bajos de LDLR y asociándose con una disminuida capacidad ateroprotectora.

La FH es el principal factor de riesgo para la enfermedad coronaria prematura, debido a la exposición severa a largo plazo de niveles altos de LDL plasmático. Esto anima a su infiltración vascular y modificación por agregación, conllevando a la activación de la inmunidad innata y el desarrollo de la aterosclerosis. El objetivo de este estudio es investigar la

expresión de LDLR y LRP5 en PBL y macrófagos derivados de monocitos (MACs) de pacientes jóvenes heterocigotos a la FH. La expresión de LRP5 y LRP6 son incrementados en PBL de pacientes FH respecto a sujetos sanos o con hipercolesterolemia secundaria (sc-HC). LRP1 no tiene cambios de expresión respecto a los sujetos sc-HC. En MACs, LRP5 y LRP1 no se diferenciaron en condiciones basales para sujetos controles y pacientes FH. Sin embargo, solo el LRP5 tiene una expresión diferencial por exposición a la agLDL en el grupo FH. Esta exposición disminuye la expresión de CD163, receptor relacionado con propiedades antiinflamatorias o ateroprotectoras. Además, el mayor incremento de expresión del LRP5 por la agLDL está asociado a una baja expresión de LDLR.

Estos resultados muestran por primera vez que el LRP5, receptor activo de internalización lipídica, está incrementado en las células de la inmunidad innata de pacientes jóvenes con FH. Además, el contenido lipídico sensibiliza al macrófago al estrés inflamatorio, debido a la disminución del CD163. Ambos mecanismos quizás tengan un efecto sinérgico sobre el comienzo de la aterosclerosis prematura en los pacientes FH.

Macrophages of genetically characterized familial hypercholesterolaemia patients show up-regulation of LDL-receptor-related proteins

Rafael Escate ^a, Teresa Padro ^a, Maria Borrell-Pages ^a, Rosa Suades ^a, Rosa Aledo ^a, Pedro Mata ^c, Lina Badimon ^{a, b, *}

^a Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC), IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain

^b Cardiovascular Research Chair, UAB, Barcelona, Spain

^c Foundation Jimenez Diaz, Madrid, Spain

Received: June 10, 2016; Accepted: August 18, 2016

Abstract

Familial hypercholesterolaemia (FH) is a major risk for premature coronary heart disease due to severe long-life exposure to high LDL levels. Accumulation of LDL in the vascular wall triggers atherosclerosis with activation of the innate immunity system. Here, we have investigated (i) gene expression of *LDLR* and LRP5 in peripheral blood cells (PBLs) and in differentiated macrophages of young FH-patients; and (ii) whether macrophage from FH patients have a differential response when exposed to high levels of atherogenic LDL. PBLs in young heterozygous genetically characterized FH patients have higher expression of *LRP5* and *LRP6* than age-matched healthy controls or patients with secondary hypercholesterolaemia. *LRP1* levels were similar among groups. In monocyte-derived macrophages (MACs), *LRP5* and *LRP1* transcript levels did not differ between FHs and controls in resting conditions, but when exposed to agLDL, FH-MAC showed a highly significant up-regulation of *LRP5*, while *LRP1* was unaffected. PBL and MAC cells from FH patients had significantly lower *LDLR* expression than control cells, independently of the lipid-lowering therapy. Furthermore, exposure of FH-MAC to agLDL resulted in a reduced expression of *CD163*, scavenger receptor with anti-inflammatory and atheroprotective properties. In summary, our results show for first time that LRPs, active lipid-internalizing receptors, are up-regulated in innate immunity cells of young FH patients that have functional LDLR mutations. Additionally, their reduced *CD163* expression indicates less atheroprotection. Both mechanisms may play a synergic effect on the onset of premature atherosclerosis in FH patients.

Keywords: atherosclerosis • macrophages • familial hypercholesterolaemia • LRPs • CD163

Introduction

Familial hypercholesterolaemia (FH) is an inherited disorder characterized by high concentration of plasma low-density lipoprotein (LDL) cholesterol levels, as result of mutations in the LDL receptor (LDLR) that impair liver LDL clearance [1, 2], and less frequently by genetic defects in the apolipoprotein B-100 (Apo B) or the protease PCSK9 [3]. High LDL-cholesterol (LDL-c) levels lead to deposits of cholesterol in the arterial wall and promote atherosclerosis and the risk of premature coronary heart disease (CHD) [4]. LDLR mutations include null or defective functions for ligand-binding, transport, internalization and recycling [5, 6]. Thus, LDLR mutations are a causal factor for atherosclerosis and the development of cardiovascular disease [7–9].

The atherosclerotic process, initiated by the accumulation of lipids particularly LDL in the subendothelial space, proceeds with activation of local inflammation and the innate immunity response [10]. LDL retention by extracellular matrix proteoglycans favours its modification to form aggregates (agLDL) [11, 12]. AgLDL is a potent inducer of massive intracellular cholesteryl ester (CE) accumulation in macrophages (foam cells) [13–16]. Indeed, macrophages are the main innate immunity cellular component of atherosclerotic plaques, leading to the proinflammatory response [17, 18]. In atherosclerotic plaques, there are at least two distinct subtypes of macrophages (M1 and M2) [19]; the M2-macrophage phenotype is characterized by a high cell surface expression of CD163 [20], a scavenger receptor associated to oxidative stress resistance [21].

Several receptors have been shown to participate in the uptake of modified LDL by human macrophages including the LDL-receptor-

doi: 10.1111/jcmm.12993

*Correspondence to: Prof. Lina BADIMON
E-mail: lbadimon@csic-iccc.org

© 2016 The Authors.

Journal of Cellular and Molecular Medicine published by John Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

related proteins LRP5 [22] and LRP1 [16] and scavenger receptors such as CD36 [23, 24] and MARCO [25].

Intracellular free cholesterol (FC) accumulation triggers a decrease in cholesterol synthesis by 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGCR) and in LDLR expression [26, 27] by inhibiting the sterol-regulatory element binding pathway (SREBP) [28]. FC undergoes re-esterification to cholesteryl fatty acids esters (the 'foam' of foam cells) by acyl-CoA:cholesterol ester transferase (ACAT) [29].

Our group has shown that LRP5 is involved in monocyte differentiation into macrophage [30] and is up-regulated in macrophages exposed to agLDL [22]. *In vivo* analyses in *Lrp5*^{-/-} mice fed a hypercholesterolaemic (HC) diet showed that LRP5 deficiency increases the development of aortic atherosclerotic lesions, suggesting an atheroprotective role for LRP5 [31, 32]. LRP5 belongs to the LDL receptor superfamily and shares common motifs including LDLR type A repeats, EGF-like domains and transmembrane anchors. Interestingly, we have shown that LRP1, another member of this family, is involved in agLDL smooth muscle cell uptake leading to an increase intracellular CE accumulation [33, 34] and alteration in the phenotype and functional capacity [35].

Because LDLR is down-regulated due to the excessive cholesterol, lipid-loaded cells in the plaque need to uptake cholesterol through additional receptors in order to internalize cholesterol and contribute to plaque progression. FH patients, with mutations in the LDLR gene affecting its function and life-long exposure to high LDL levels, are at high cardiovascular risk (HCVR) and develop premature coronary artery disease [36]. We have previously reported that FH patients have a significant activation of the leucocyte-cell lineage with increased levels of circulating cell-derived microparticles of monocyte origin containing activation markers [37] which might directly contribute to exacerbate a proinflammatory condition both in blood and the vessel wall, facilitating the cellular crosstalk and delivery of paracrine molecular effectors between cells.

Here, we have investigated the expression profile of the LDL-receptor-related proteins (LRPs) in peripheral blood leucocytes and monocyte-derived macrophages of FH patients and their relation with their phenotype and function (lipid intake).

Materials and methods

Population study and experimental design

In this study, we investigated 205 individuals of the Familial Hypercholesterolaemia SAFEHEART Cohort [38], distributed in three independent substudies consisting of 60, 63 and 82 individuals, respectively, as shown in Figure S1. SAFEHEART is an open, multicentre, long-term prospective cohort study including patients with clinical and genetic diagnosis of heterozygous FH [39, 40] and relatives with negative genetic testing for FH, without or with secondary hypercholesterolaemia. Baseline characteristics of the cohort population have been previously described [38]. Information on sociodemographic, clinical and lipid-lowering treatment (LLT) data was obtained at the inclusion in the cohort

registry. All FH patients in the study had LDL-c levels within the pathological range (>150 mg/dl). Patients included in substudy 1 were under 40 years of age and with very high fasting LDL-c plasma concentrations according to international guidelines [41]. LDL-c levels were 227 ± 4.6 mg/dl in substudy 1; 160 ± 10.7 mg/dl in substudy 2 and 176 ± 6.8 mg/dl in substudy 3. A similar pattern was observed for total cholesterol (TC) that was significantly higher in patients of substudy 1 compared to those in substudies 2 and 3. On the contrary, plasma HDL cholesterol and triglyceride were within the normal range in all the groups included in the study (Tables S1–S3), independently of the genetic diagnostic for FH and of treatment with lipid-lowering therapies. As shown in Figure S1, two substudies were focused on peripheral blood leucocytes (PBL) and the third substudy aimed at analysing macrophages derived from isolated monocytes (MACs) obtained from blood of FH patients and non-FH controls. The PBLs used in substudies 1 and 2 and macrophages in the substudy 3 were always obtained from single different patients.

Neither the FH nor control groups included patients with pregnancy, sepsis or infections and with history of cancer or suspected cardiovascular events. The results of the study are presented in accordance with STROBE guidelines, and the study was approved by the Local Ethics Committee of the 'Investigación Clínica Fundación Jiménez Díaz (CEIC-FJD)' (protocol number: 01/09) and was conducted according to the Declaration of Helsinki, and a written informed consent was obtained from all participants prior to the study.

Studies in PBL: substudies 1 and 2

Substudy 1: A young cohort (mean age: 35 years old) of 60 individuals was investigated. FH patients were distributed in two groups ($N = 20$ in each group). A healthy control group was included for comparative purposes ($N = 20$). Each one of the groups included 10 men and 10 women. Baseline characteristics (Table S1) show that the groups were matched by age, gender and other demography parameters. Briefly, FH groups consisted in patients with or without lipid-lowering treatment (FH-LLT⁺, $N = 20$; FH-LLT⁻ group, $N = 20$), but with very high LDL-c levels in plasma (>180 mg/dl). The FH-LLT⁺ group included FH cases randomly chosen among those with a stable lipid-lowering treatment (LLT⁺) of at least 1 year before inclusion, according to clinical guidelines [40, 42]. FH-LLT⁻ referred to FH patients who did not receive any lipid-lowering treatment over the same time period, but matched for LDL-c levels similar to those from the FH-LLT⁺ group. Individuals in the control LLT⁻ group ($N = 20$) did not have LDLR mutations and their LDL-c level was in the normal range (below 115 mg/dl). Except for total cholesterol (TC) and LDL-c, the FH and control groups did not differ in other lipid parameters, such as HDL cholesterol (HDL-c) or triglycerides.

Substudy 2: A subgroup of FH patients (FH-AT; $N = 37$) with sub-clinical carotid and aortic atherosclerotic lesions previously evidenced by magnetic resonance imaging (MRI) [36, 43] and a subgroup of control patients (non-FH) with secondary hypercholesterolaemia (sc-HC; $N = 26$) were investigated. Sociodemographic and clinical characteristics of the FH-AT and sc-HC groups are summarized in Table S2. All patients in the FH-AT and sc-HC groups received lipid-lowering treatment (statins) according to guidelines. The groups did not differ in the levels of TC, LDL-c and HDL-c, but the ratio TC/HDL-c was higher in the FH-AT group than in patients with secondary hypercholesterolaemia. In contrast, triglycerides plasma levels and the percentage of individuals with obesity were significantly lower in the FH-AT subgroup.

Monocyte-derived macrophages (MACs): substudy 3

MACs were obtained from an independent subgroup of 62 FH patients (31 men and 31 women) and 20 control individuals (11 men and 9 women) from the SAFEHEART Cohort. Mean age of the control and FH groups at inclusion was of 46.5 years. FH patients were characterized by LDL-c levels between 120 and 300 mg/dl and control individuals had LDL-c levels ranging from 97 to 145 mg/dl (Table S3). Freshly isolated monocytes were differentiated into MACs as described below.

Blood collection and sampling

Blood samples were withdrawn from the cubital vein without tourniquet using a 20-gauge needle after 10–14 hrs of fasting. For the obtention of peripheral blood mononuclear cells (PBMC), blood samples were collected with a BD Vacutainer CPT System (Becton Dickinson) containing sodium heparin as anticoagulant and a ficoll-hypaque solution for cell separation. Within 2 hrs of collection, blood samples were centrifuged at 1500–1800 rcf (relative centrifugal force) and PBMC were obtained by differential density gradient, as described by the providers. PBL-derived RNA was directly obtained from blood samples collected in PAXgene tubes and processed according to manufacturer's instructions. For biochemical and DNA analysis, blood samples were collected without anticoagulant or in EDTA-containing tubes [37]. All serum and plasma samples were processed identically within 60 min. After extraction, aliquoted and frozen at -80°C , until required for analysis. DNA was obtained from blood cells according standard procedures, using a commercial kit (QiAmp Blood DNA Mini Kit, Qiagen, Germany) [44].

Biochemical and genotyping analysis

Enzymatic methods were used to measure serum total cholesterol (TC), triglycerides (TG) and HDL-c. LDL-c was calculated by Friedewald formula ($\text{LDL} = \text{TC} - \text{HDL} - \text{TG}/5$); C-reactive protein (CRP) and glucose were quantified by standard laboratory methods, as previously described [45]. Molecular genetic diagnosis of FH was made using a DNA microarray (LIPochip, Progenika Biopharma; Derio, Vizcaya, Spain) [46] and capillary sequencing by multiplex PCR conditions and sequence reactions [47, 48]. Negative samples for the DNA array or sequencing were also analysed for large deletions or insertions using an adapted quantitative fluorescent multiplex PCR methodology.

Primary cultures of human macrophages (MAC)

PBMC obtained by Vacutainer CPT System were suspended in RPMI-1640-glutamax culture media supplemented with 10% (vol:vol) human serum (group AB blood, Lonza; Basel, Switzerland), 100 U/ml penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamine, 10 mM Hepes buffer (Gibco; Thermo Fisher Scientific corporation; Waltham, MA, USA) (HS-media) and plated on 6-well polystyrene plates (Becton Dickinson: Franklin Lakes, NJ, USA), to obtain a cellular density of 2×10^6 monocyte/ml, as previously described [49]. After incubation for 24 hrs, non-adherent cells were removed by gently washing and adherent monocytes were allowed to differentiate into macrophages (MAC) for 7 days [50] changing the media every 48 hrs. Thereafter, cells were incubated for further 24 hrs in RPMI medium with 0.5% HS (minimal HS media). MACs were

incubated in minimal-HS medium with/without 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ agLDL, for 24 hrs according to previous studies of our group [16, 22]. Cells were then washed with phosphate buffer (PBS) and collected for RNA extraction. In specific subsets of experiments, LRP5 expression in human MAC was silenced with a commercial siRNA (Silencer[®] siRNA ID No: s8293, Ambion; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific corporation; Waltham, MA, USA). Briefly, human macrophages obtained from buffy coats were transfected with HiPerfect Transfection Reagent (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. After 24 hrs, cells underwent the specified treatments and were collected. Silencer Selective negative control siRNA (Ambion) was used as a control and did not exert any effect on LRP5 mRNA expression.

LDL sample preparation and modification

LDL (density 1.019–1.063 g/ml) was prepared by ultracentrifugation from pooled plasma-EDTA of normocholesterolemic volunteers [51]. LDL-protein concentration was determined using the bicinchoninic acid (BCA) method (Pierce Chemical Company; Thermo Fisher Scientific corporation; Waltham, MA, USA) and LDL purity assessed by agarose-gel electrophoresis (SAS-MX Lipo-kit, Helena Biosciences; Gateshead, UK). LDL preparations were tested to exclude the presence of endotoxin (Limulus amoebocyte lysate test, BioWhittaker; Walkersville, MD, USA) and proved to be negative in all cases. LDL used in the experiments was less than 48 hrs old. AgLDL were generated by vortexing LDL (1 mg/ml) according to the method previously described by Guyton *et al.* [52] and as previously performed by our group [33]. This method has shown to produce similar LDL aggregation as LDL versican incubation [53]. In all experiments, LDL oxidation (before and after aggregation) was excluded by assessing thiobarbituric-acid-reactive substances (TBARS) formation, according Ohkawa *et al.* [54] with slight modifications [49].

Macrophage lipid staining

Human macrophages, treated with/without 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ agLDL in culture, were washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde. Thereafter, cells were progressively dehydrated with alcohol and stained with Hexheimer's solution and Mayer's haematoxylin. Images were obtained with an inverted microscopy ECLIPSE TS100 (Nikon; Tokyo, Japan) with $\times 300$ magnification.

For quantification of lipid internalization, human macrophages incubated with/without agLDL were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.5% Tween and incubated in blocking buffer (3% bovine serum albumin in PBS) before adding 5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ medium of Dil (30 mg/ml in DMSO, Sigma-Aldrich) for 1 hr, washed and covered with Prolong Gold antifade reagent. Images of labelled cells were recorded on a Leica inverted confocal microscope (Leica TCS SP2-AOBS; Leica; Wetzlar, Germany) using the HCX PL APO 63x/1.2W Corr/0.17 CS objective. Images were acquired in a scan format of 1024×1024 pixels in a spatial data set (xyz) and processed with the Leica Standard Software TCS-AOBS.

Murine model

Homozygous wild-type C57BL/6 mice and *Lrp5*^{-/-} C57BL/6 mice were used in the study. *Lrp5*^{-/-} mice, a kind gift from Dr. Bart Williams [55],

were maintained in a C57BL/6 background. The animals housed in cages under controlled temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) on a 12 hrs light/dark cycle with food and water *ad libitum*. At 10 weeks of age, animals were divided into two groups to be fed with normal chow diet (NC) or with high-cholesterol diet (HC, TD.88137, Harland Labs, Indianapolis, IN, USA) for further 8 weeks (7 mice/group). Composition of lipid profile was analysed as previously described [32]. At the end of the treatment period, blood was obtained by cardiac puncture under terminal anaesthesia (1 mg/kg Medetomidine and 75 mg/kg Ketamine, ip), before surgical excision. Blood samples (400 μl) were collected in PAXgene tubes to extract blood-derived mRNA. Thereafter, aortas were dissected and carefully cleaned of adventitial tissue under a stereoscopy microscopy. All procedures fulfilled the criteria established by the 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals', and the study protocol was approved by the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau Animal Research Committee (IACC051/5422).

Real-time PCR analysis

Total RNA from human macrophages was extracted using the mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion). RNA extraction from PBL of human and mice samples was performed with the PAXgene blood RNA kit (PreAnalytiX, Qiagen/Becton Dickinson), according to manufacturer's instructions. RNA concentration was determined with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies; Thermo Fisher Scientific corporation; Waltham, MA, USA), and purity was checked by the A260/A280 ratio. Reverse transcription of genes was performed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit followed by Taqman real-time PCR amplification, according to the manufacturer's instruction (Applied Biosystems). Genes expression were analysed by specific primers (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) for LRP5 (Hs0182031_m1; Mm01227476_m1), LRP1 (Hs00233856_m1; Mm00464608_m1), LDLR (Hs01092524_m1; Mm01177349_m1), HMGCR (Hs00168352_m1; Mm01282499_m1), LRP6 (Hs00233945_m1; Mm00999795_m1), CD163 (Hs00174705_m1; Mm00474091_m1), CD36 (Hs01567185_m1) and MARCO (Hs00198935_m1). Samples were analysed in duplicates, and only mRNAs with expression levels below 32 cycles were accepted. PIK3C2A (Hs00153223_m1) and 18S-RNA (4333760F) were used as endogenous internal controls to normalize the mRNA expression levels for human [49] and mouse samples, respectively. Data were analysed by SDS2.4, RQ Manager 1.2.1 and DataAssits v3.0.1 software. (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA).

Immunohistochemistry

Serial sections (5 μm thick) of paraffin-embedded mouse aortas were placed on poly-L-lysine-coated slides, deparaffinized and treated with H_2O_2 for suppression of endogenous peroxidase activity. Immunohistochemical analysis was performed with the avidin-biotin immunoperoxidase technique, as previously described [56]. Samples were analysed for Apo B (rabbit-polyclonal anti-apolipoprotein B; dilution 1:100; Abcam, ab20737, Abcam; Cambridge, UK), LRP5 (rabbit-polyclonal anti-LRP5; dilution 1:50; Abcam, ab38311) and MAC387 that is a marker for tissue infiltrating monocytes [57, 58] [anti-Macrophage antibody (MAC387); dilution 1:100; Abcam, ab22506]. Images were captured and digitized using a Nikon Eclipse 80i microscope and a Retiga 1330i Fast camera. Controls without primary antibodies were run with each set of specimens and showed no labelling background.

Determination of free and esterified cholesterol content

siRNA-LRP5 and siRNA-random treated human MACs were incubated for 8 hrs with 100 or 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ agLDL. Cells were serially washed with PBS, PBS/1% BSA and PBS/1%BSA/heparin 100 U/ml and harvested into NaOH 0.1N. Lipid extraction and thin-layer chromatography were performed as previously described [59, 60]. The spots corresponding to free cholesterol (FC) and cholesteryl esters (CE) were quantified by densitometry against a standard curve of cholesterol and cholesterol palmitate, respectively, with the use of a computing densitometer (Molecular Dynamics; Sunnyvale, CA, USA).

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM (standard error of the mean), except when indicated. Minimal required sample size was calculated according Noordzij *et al.* [61]. A test for normality was performed using Shapiro-Wilk test. Outlier values were excluded by Chauvenet's criterion. The statistical significances between two groups were determined with Mann-Whitney U-test and multiple comparisons by Kruskal-Wallis test, and when significant, Bonferroni post hoc analysis was used to assess intergroup differences. Categorical variables (gender, risk factors and medication) were compared using a Chi-square analysis of frequencies. Strength of the association between continuous variables was calculated by Spearman's correlation coefficients. Statistical analysis was performed with Stat View 5.0.1 (Abacus concepts; Piscataway, NJ, USA) and SPSS Statistics Version 21.0.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). A $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Results

LRP expression levels in PBL from FH patients

To explore whether transcriptional levels of cell-membrane receptors involved in LDL uptake are affected in the PBL fraction of FH patients, we analysed mRNA-expression of *LRP1*, *LRP5*, *LDLR* and *HMGCR* by real-time PCR in the three groups of young individuals (control non-FH-LLT⁻, FH-LLT⁻ and FH-LLT⁺), with an average age of 35 years. As shown in Table 1, *LRP5* gene expression level was higher in FH-LLT⁻ patients compared with controls (control LLT⁻, $P = 0.040$). In contrast, controls and FH-LLT⁺ patients showed similar results. PBL from FH-LLT⁻ patients showed higher *LRP5* gene expression than those from the FH-LLT⁺ group ($P = 0.016$), although LDL-c levels did not differ significantly between FH-LLT⁺ and FH-LLT⁻ groups (groups matched for this variable). Similarly, PBL of FH-LLT⁻ patients showed an increased expression for *LRP1* ($P = 0.044$) when compared with FH-LLT⁺. Differences in LRP1 levels between FH-LLT⁻ and healthy controls did not achieve statistical significance. *LDLR* and *HMGCR* gene expression levels were significantly decreased in PBL from FH patients with respect to the healthy controls, independently of the lipid-lowering therapy (FH-LLT⁻: *LDLR*, $P = 0.043$ and

Table 1 Expression level of LDL receptors and HMGCR in peripheral blood leucocyte (PBL) of young FH patients and healthy matched controls

Genes	Control LLT ⁻	FH-LLT ⁻	FH-LLT ⁺
<i>LRP1</i>	78.7 ± 3.0	90.3 ± 5.8*	77.5 ± 3.5
<i>LRP5</i>	74.2 ± 2.3	82.4 ± 2.9* [†]	73.6 ± 2.9
<i>LDLR</i>	90 ± 4.1	77.1 ± 4.2*	75.3 ± 4.6*
<i>HMGCR</i>	11.7 ± 0.6	9.8 ± 0.5*	9.7 ± 0.6*

Gene expression levels in PBL. Control LLT⁻ versus FH-LLT⁺ and FH-LLT⁻ group. *N* = 20/group. Real-time PCR analysis normalized to *PIK3C2A* by calibration curve. Results are shown as mean ± SEM in relative units × 100.

**P* < 0.05 versus Control.

[†]*P* < 0.05 versus FH-LLT⁺.

HMGCR, *P* = 0.034; FH-LLT⁺: *LDLR*, *P* = 0.020 and *HMGCR*, *P* = 0.012).

In addition, levels of *LRP5*, but not *LRP1*, were significantly higher in FH patients (FH-AT group) than in non-FH patients (sc-HC) (Table 2). In addition, the FH-AT group had significantly higher *LRP6* levels compared with their hypercholesterolaemic non-FH controls. *LRP6* is a protein with high homology to *LRP5* and both receptors carry out redundant functions [62]. Overall, *LRP5* expression levels in PBL were significantly higher in FH patients (*N* = 77) than in the non-FH (*N* = 46) (86.8 ± 2.3 versus 78.8 ± 2.8, *P* = 0.019). Therefore, *LRP5*-dependent signalling pathways are increased in the leucocytes of patients with FH.

LRP5 expression levels and atherosclerotic burden in FH patients

Overexpression of *LRP5* is found in infiltrated macrophages of human advanced coronary atherosclerotic plaques [22], and *LRP1*-overexpression has been reported in atherosclerotic lesions both in animal models and human lesions [63–66]. Interestingly, in PBL of FH patients with atherosclerotic lesions (FH-AT), the expression level of transcripts for *LRP1*, *LRP5* and *LRP6* was similar in

Table 2 Expression level of low-density lipoprotein receptor-related protein in (PBL) in MRI characterized FH patients and hypercholesterolaemic non-FH matched controls

Genes	sc-HC	FH-AT
<i>LRP1</i>	72.7 ± 3.9	78.8 ± 3.2
<i>LRP5</i>	81.9 ± 4.4	95.1 ± 3.5*
<i>LRP6</i>	85.2 ± 5.0	109.5 ± 5.6*

Gene expression levels in PBL. sc-HC (*N* = 26) versus FH-AT (*N* = 37). Real-time PCR analysis normalized to *PIK3C2A* by calibration curve. Results are shown as mean ± SEM in relative units × 100.

**P* < 0.05 versus sc-HC.

patients with atherosclerotic burden in one or more arterial beds (Fig. S2).

LRP5 is up-regulated in monocyte-derived macrophages from FH patients after agLDL exposure

Next, we investigated if cell-membrane receptors participating in the uptake of LDL are differently expressed in macrophages from FH patients. To this aim, *LRP1*, *LRP5*, *LDLR* and *HMGCR* were analysed by real-time PCR in agLDL-loaded macrophages of control (healthy individuals, *N* = 20) and FH patient (*N* = 62). At baseline, expression levels of *LRP5* did not differ significantly between macrophages obtained from controls and FH patients (Fig. 1A); however, FH-MACs showed a significant increase in *LRP5* gene transcription when exposed to agLDL (1.63-fold increase; *P* < 0.001), an effect that was also found, although with lower intensity level, in control MACs (1.40-fold increase; *P* = 0.045). The induction of *LRP5* by agLDL was significantly higher in FH-MACs than in control MACs (1.35-fold, *P* = 0.049).

LRP1 transcription levels in human macrophages were much higher than those of *LRP5*, and they were minimally affected by exposure to 100 µg/ml agLDL. In FH-MACs, *LRP1* expression levels were slightly, but significantly, reduced from baseline value (7%, *P* = 0.032) in LDL-exposed cells (Fig. 1B). *LDLR* mRNA expression level in FH-MACs were 26% lower than in control MACs (*P* = 0.011). *LDLR* transcription level was further reduced in FH-MACs after exposure to agLDL (1.5-fold, *P* < 0.001) (Fig. 1C), effect that was not observed in macrophages from healthy individuals. Similarly, *HMGCR* mRNA expression level was significantly decreased in FH-MACs (1.56-fold, *P* < 0.001) after exposure to agLDL (Fig. 1D). In the presence of agLDL, transcription levels of both *LDLR* and *HMGCR* were significantly reduced in FH-MACs when compared with non-FH-MACs (45%, *P* = 0.023 and 40%, *P* = 0.009, respectively). To examine whether the FH background affected the response to agLDL of scavenger receptors, *MARCO* and *CD36*, as representative class A and class B scavengers associated with development of atherosclerotic lesions, were analysed. As shown in Figure 1E and F, neither control MACs nor FH-MACs showed statistically significant changes in *MARCO* and *CD36* mRNA-expression levels after 24-hr exposure to agLDL.

Lipid staining in macrophages of patients with FH

Internalization of 100 µg/ml agLDL was analysed in control MACs and FH-MACs by staining for total lipids. In control conditions, without agLDL loading, the lipid content was negligible in control MACs and had a low intensity stain in FH-MACs. In contrast, when agLDL was added to the medium, there was a strong lipid staining in both control and FH-MACs (Fig. 2A). These results show that FH-MACs retain the capability to internalize LDL, a process that in these cells

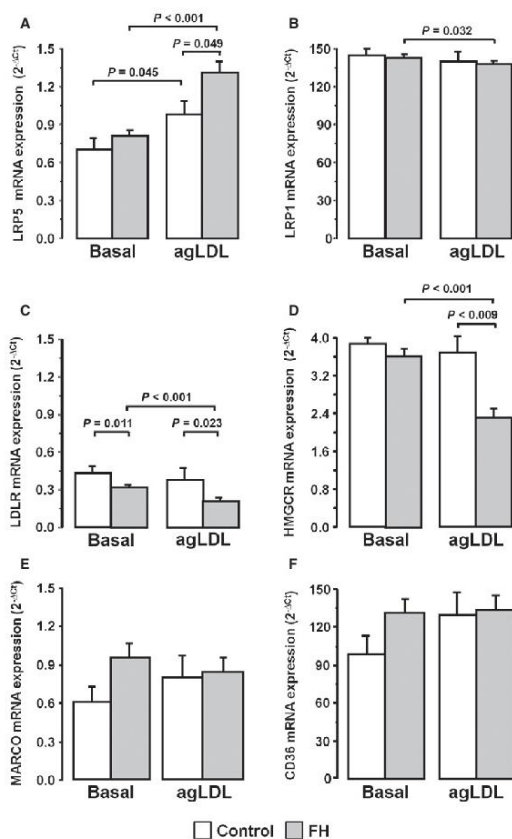


Fig. 1 Increased *LRP5* expression level in macrophages from control and FH patients. Macrophages were incubated with 100 µg/ml agLDL for 24 hrs. The gene expression of *LRP1* (A), *LRP5* (B), *LDLR* (C), *HMGCR* (D), *MARCO* (E) and *CD36* (F) in agLDL unloaded (Basal) and loaded macrophages (agLDL). Control group (white bars, N = 20) and FH patients (grey bars, N = 62). Bars represent mean ± SEM of expression level for both groups in duplicated. Only P values < 0.05 are shown.

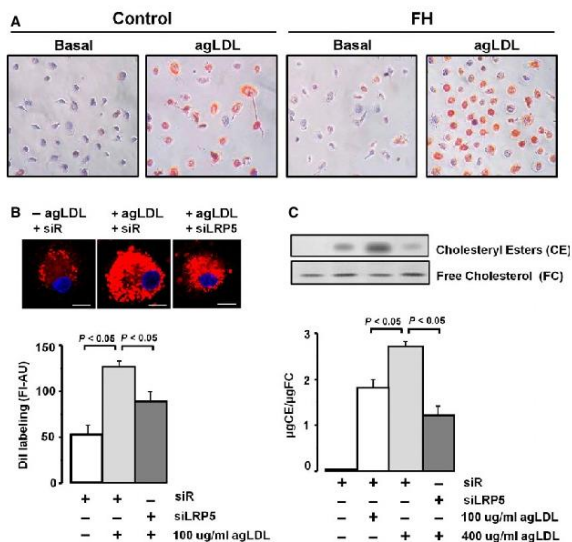
that have down-regulated expression of LDLR may be produced by overexpression of *LRP5*.

LRP5 silencing decreases CE accumulation after agLDL treatment in human macrophages

To prove that *LRP5* is involved in intracellular cholesterol accumulation, siRNA-*LRP5* and random siRNA-treated control MACs were incubated with agLDL and labelled with Dil. As shown in Figure 2B, cells exposed to agLDL showed a strong vesicular Dil labelling (fluorescence signal

>2-fold higher than without LDLs); however, the intensity of Dil labelling was significantly reduced in MACs with silenced *LRP5* expression indicating a reduced uptake of LDL in *LRP5*-silenced MACs (*P* < 0.05 versus controls). Analysis of intracellular esterified (CE) and free (FC) cholesterol by thin-layer chromatography (Fig. 2C) further demonstrated that silencing of *LRP5* interferes with lipid uptake in MACs. Thus, exposure of macrophages to agLDL induced a dose-dependent intracellular CE accumulation (100–400 µg/ml agLDL), whereas silencing *LRP5* expression significantly reduced CE internalization (*P* < 0.05 versus non-*LRP5* silenced cells) in MACs exposed to 400 µg/ml agLDL. In summary, *LRP5* internalizes cholesterol in human MACs.

Fig. 2 Internalization of agLDL in macrophages. **(A)** Lipid inclusion showed by red colour into macrophages from controls and FH patients, by Herxheimer's stain. Images are representative. **(B)** Confocal microscopy of LRP5-silenced human macrophages and treated with 100 µg/ml agLDL for 8 hrs, washed, fixed and stained with Dil. Fluorescence intensity was measured with the Leica Standard Software TCS-AOBS ($N = 28-32$ cells/condition). Bar: 10 µm. $N = 3$. **(C)** Human macrophages transfected to siRNA-Random (siR) or siRNA-LRP5 (siLRP5) were exposed to agLDL during 8 hrs. Macrophages were then exhaustively washed and harvested to measure intracellular cholesteryl esters (CE) and free cholesterol (FC) by thin-layer chromatography. Bar graph show quantitative values of CE relative to FC. $N = 3$.



AgLDL affects LRP5 expression in FH macrophages independently of LDLR expression

The heterogeneity of *LDLR* mutations among FH patients in the SAFE-HEART cohort and the predicted effects of the different mutations on *LDLR* functionality are listed in Table S4. Patients with mutations entailing a shift reading frame ($N = 10$) or mutations entailing an early stop codon leading to lack of protein ($N = 12$) were included in the FH-*LDLR*-null group (FH null; $N = 22$), whereas the FH-*LDLR*-non-null group consisted of patients (FH non-null; $N = 40$) with mutations on the promoter ($N = 4$), mutations entailing an amino acid change ($N = 15$), mutations with a splicing change ($N = 9$) and other mutations inducing the production of a mutated protein ($N = 12$). At baseline, FH non-null and FH null groups did not differ in the expression levels of the LRP5 (*LRP5*, *LRP1*) neither in the expression of scavenger receptors (*MARCO*, *CD36*) (Fig. S3). *LRP5* expression levels were increased 1.78-fold ($P < 0.001$) and 1.63-fold ($P = 0.023$) in MACs from non-null and null patients, respectively, in the presence of agLDL (Fig. S3A). The degree of the increase did not relate to the severity of the gene mutation (null versus non-null, $P = 0.446$). Interestingly, *LRP1* expression level was significantly reduced in lipid-loaded macrophages of FH non-null patients (91% of baseline value: $P = 0.012$), whereas this effect was not found in the FH null group (Fig. S3B). On the contrary, the transcriptional pattern of *MARCO* and *CD36* in response to agLDL did not differ significantly between the FH non-null and the FH null groups (Fig. S3C and D).

LRP5 is highly expressed in macrophages of FH patients with low LDLR levels

FH-MACs with *LDLR* gene expression below and above the median value as cut-off level (mRNA level [$2^{-\Delta\Delta C_t}$]; 0.112) showed different *LRP5* expression pattern in response to agLDL. As shown in Figure 3A, the increase in *LRP5* mRNA expression due to agLDL internalization was significantly more evident in those cells obtained from patients with lower *LDLR* levels. Contrarily, changes to baseline in *LRP1* gene expression after exposure of macrophage to agLDL did not relate to the *LDLR* levels (Fig. 3B). In addition, there was a negative correlation between *LRP5* and *LDLR* gene expression levels in lipid-loaded macrophages from FH patients (Fig. 3C), whereas no significant correlation was found between *LRP1* and *LDLR* mRNA expression levels (Fig. 3D). In summary, LRP5 seems to substitute LDLR in uptaking lipids in macrophages of FH patients.

CD163 expression is down-regulated in macrophages of FH patients

We have recently shown that *LRP5* expression in human macrophages associates with the patrolling/non-inflammatory CD16⁺ phenotype (M2-macrophages) [67]. Here, we investigated whether FH affects the expression of the scavenger receptor CD163, also associated to the M2-macrophage phenotype. *CD163* expression level did not show significant

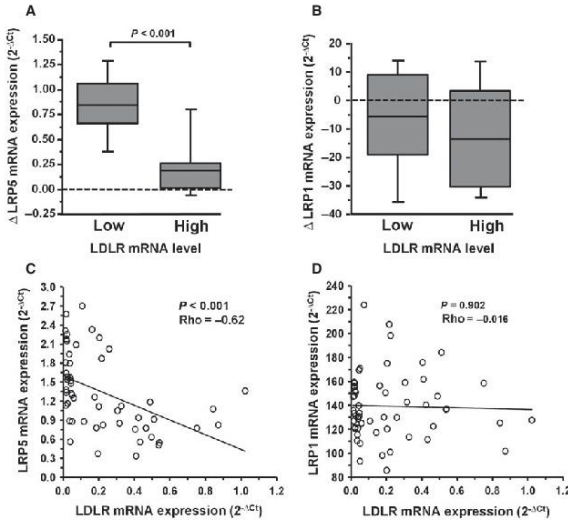


Fig. 3 Relationship between *LRP5* and *LDLR* in FH macrophage. Expression levels analysed by real-time PCR quantification for *LRP5*, *LRP1* and *LDLR* from Macrophages ($N = 62$) incubated with or without 100 $\mu\text{g/ml}$ agLDL for 24 hrs. The box plot was designed with increasing expression (Δ , agLDL – Basal) for *LRP5* (A) and *LRP1* (B). *LRP5* and *LRP1* expression levels associated with high or low values respect to the median for *LDLR* (0.112), as cut-off. Δ *LRP5* versus low *LDLR* values (median and IQR: 0.85 and 0.39; mean \pm SEM: 0.83 ± 0.08) and Δ *LRP5* expression level versus high *LDLR* values (median and IQR: 0.18 and 0.24; mean \pm SEM: 0.22 ± 0.08). Δ *LRP1* versus low *LDLR* levels (median and IQR: -5.77 and 28.08 ; mean \pm SEM: -6.89 ± 3.84) and Δ *LRP1* versus high *LDLR* values (median and IQR: -13.35 and 33.73 ; mean \pm SEM: -11.83 ± 3.79). IQR: Interquartile range. Correlation between *LRP5* versus *LDLR* (C) and *LRP1* versus *LDLR* (D). The P -values were obtained by Spearman's correlation (ρ). Gene expression was performed in duplicated. Only P values < 0.05 are shown.

changes in control MACs exposed to agLDL ($P = \text{NS}$), but it was significantly decreased in FH-MACs (11.29 ± 0.89 versus 14.51 ± 1.16 , $P = 0.030$). Furthermore, *CD163* showed a significantly lower expression in FH-MACs than in control MACs in the presence of agLDL (1.42-fold decrease, $P = 0.034$) (Fig. 4A). In FH patients, *CD163* transcription decreased in the most severe forms of *LDLR* mutation (% decrease FH null versus FH non-null: Basal, 38%, $P = 0.010$ and agLDL, 32%, $P = 0.022$). FH non-null patients showed a statistically significant decrease in *CD163* expression by exposing macrophages to agLDL (25% decrease, $P = 0.045$) (Fig. 4B). In summary, these results indicate that

macrophages of FH patients have less capacity to elicit *CD163*-mediated anti-inflammatory responses in the presence of high LDL levels.

***LRP5* expression is up-regulated in PBL of hypercholesterolaemic mice**

We have shown the increased expression of *LRP5* in PBLs of FH patients that have been exposed to a life-long exposure to high LDL levels due to mutations in the *LDLR* gene. Here, we induced

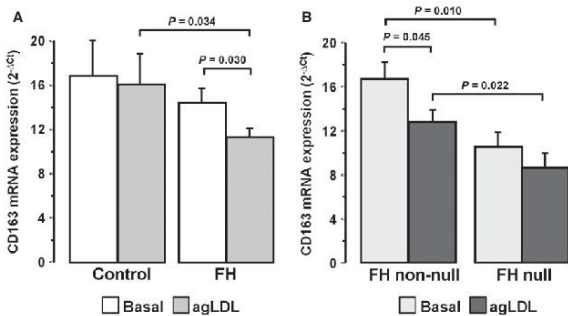
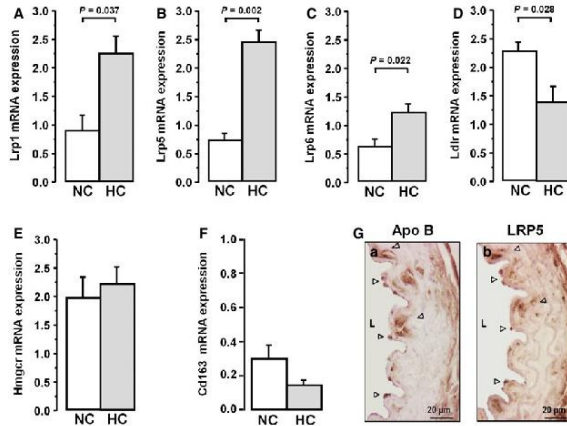


Fig. 4 Decreased *CD163* expression level in macrophages of FH patients. Differential expression level in lipid-loaded macrophages from controls ($N = 20$) and FH patients ($N = 62$) (A) and FH genotype: FH non-null ($N = 40$) and FH null ($N = 22$) (B). Bars represent mean \pm SEM of expression level in duplicated. Only $P < 0.05$ are shown.

Fig. 5 Hypercholesterolaemic effect on LRP5 in the murine model. Gene expression levels of *Lrp1* (A), *Lrp5* (B), *Lrp6* (C), *Ldlr* (D), *Hmgcr* (E) and *Cd163* (F) in PBL from mice fed a normocholesterolemic (NC) and a hypercholesterolaemic (HC) diet analysed by real-time PCR and normalized to 18S. Bars represent mean±SEM of expression level in duplicated. Only *P* values < 0.05 are shown. (G) Representative images of mice aortas (HC) labelled for Apolipoprotein B (Apo B) and LRP5. *N* = 7 mice/group. Arrow point shows the positive labelling. L: lumen.



hypercholesterolaemia in homozygous wild-type C57BL/6 mice (Wt) and in *Lrp5*^{-/-} C57BL/6 mice by feeding a cholesterol-rich diet. We analysed PBL-gene expression of *Lrp1*, *Lrp5*, *Lrp6*, *Ldlr*, *Hmgcr* and *Cd163*. Wt-mice fed a high-cholesterol diet (HC) for 8 weeks showed a significant but moderated increase in plasma TC respect to normocholesterolemic (NC) animals (Δ TC = 62.5 mg/dl, *P* < 0.005) [32]. Gene expression levels of LRPs were increased in PBL of HC mice (Fold change *Lrp1*: 2.0-fold, *P* = 0.037; *Lrp5*: 3.30-fold, *P* = 0.002, *Lrp6*: 2.0-fold; *P* = 0.022). High cholesterol levels induced down-regulation of *Ldlr* (*P* = 0.028), as expected, and *Hmgcr* gene expression levels were not significantly changed (Fig. 5A–E). In addition, PBLs in the HC group showed 2-fold decrease in the mean *Cd163*-expression level, although the difference with the NC-group did not achieve significance (Fig. 5F).

In contrast to Wt-mice, *Lrp5*^{-/-} animals showed a high increase in plasma TC after 8 weeks under hypercholesterolaemic diet when compared with NC- *Lrp5*^{-/-} mice (Δ TC = 140.0 mg/dl, *P* < 0.005) [32]. Besides, *Cd163* was significantly increased in LRP5-deficient (*Lrp5*^{-/-}) mice compared with the Wt in both normocholesterolemic and hypercholesterolaemic animals (>2-fold increase; *P* < 0.049; Fig. S4).

To determine if the increased *Lrp5* gene expression levels observed in cultured MACs were also observed *in vivo*, we performed immunohistochemistry analysis of mice aortas at the proximal side of the aortic arch, the area with the strongest staining for lipids using Oil-red-O (ORO) in the hypercholesterolaemic mice (data not shown). As shown in Figure 5G, Apo B infiltration was evident in the aorta of mice fed a hypercholesterolaemic diet (brown signals in Fig. 5G-a). Immunostaining for LRP5 in adjacent sections of the aorta depicted a similar positive distribution pattern, especially at the lumen side in areas underlying the endothelium with adhered monocytes (MAC387

positive cells), that were strongly positive for Apo B and LRP5 (compare Fig. 5G-a and b).

Discussion

Severe hypercholesterolaemia is a known causal factor for atherosclerosis and cardiovascular disease [68], caused by genetic defects in the catabolism of LDLs, leads patients to long-term exposure of high plasma cholesterol levels and consequently to high risk of presenting coronary heart disease and its clinical manifestation of myocardial infarction at young age.

Atherosclerosis is a chronic inflammatory process that involves LDL infiltration and activation of the innate immunity. It is characterized by the development of lipid-rich lesions in the arterial wall, in which monocyte-derived lipid-laden macrophages are frequently found. LRPs are present in human atherosclerotic lesions in association with VSMC and macrophages [16, 22, 69]. Here, we provide evidence that bloodstream PBL in young heterozygous FH patients with genetically characterized LDLR mutations have higher expression of *LRP5* than age-matched healthy controls or patients with secondary hypercholesterolaemia. This increase went along with an increase in its highly homologous receptor *LRP6*. Experimental studies in mice models selectively lacking either LRP5 or LRP6 suggest an overlapping of their biological roles [62]. Differences in the sensitivity to plasma LDL levels might account for the lower response of *LRP1* mRNA expression to the hypercholesterolaemic background in our heterozygous FH patients. This might explain the apparent discrepancy between our findings and those reported by Mosig *et al.* [70,

71] about the increasing expression of LRP1 in blood isolated monocytes of FH patients with high degree of disease severity (50% patients with a homozygous pattern). In this respect, gene transcription changes in PBL were more evident for *Lrp5* (~3-fold) than for *Lrp1* (2-fold) in our diet-induced hypercholesterolaemic mice model.

A key pathogenic event in the development of atherosclerosis is the retention of lipoprotein particles in the vessel wall where they are aggregated and anchored to proteoglycans of the sub-endothelial matrix [35, 72]. Macrophages attempt to clear the particles and become filled with esterified cholesterol droplets. We and others have demonstrated that LRP5 play a crucial role in the uptake of agLDL either in vascular smooth muscle cells or in macrophages [33, 73]. Moreover, our group has reported a higher efficacy of LRP5 than LRP1 for promoting CE accumulation in human macrophages [22] which was related to an early saturation of LRP1 lipid uptake activity. Here, expanding these previous findings, we provide evidence that the exposure of macrophages to agLDL for prolonged periods of time results in a transcriptional up-regulation of *LRP5* but not of *LRP1*, effect that was more evident in FH patients than in healthy individuals. It is interesting to note that the agLDL-induced up-regulation of *LRP5* was significantly larger in FH patients with lower *LDLR* expression levels, an effect that was not observed for *LRP1*.

The relevance of other LDL-binding receptors for the uptake of agLDL in macrophages has not yet been well defined. In this study, macrophage scavenger receptors as *MARCO* or *CD36* did not show any consistent changes at the transcriptional level in response to agLDL and to the level of intracellular CE, either in FH or in healthy volunteers. These findings strongly reinforce the relevance of LRP5 in maintaining the capacity of monocytes and macrophages to internalize LDL in FH patients and therefore promote lipid clearance from the arterial intima and eventually contributing to plaque formation when the pathways gets saturated. In line with these results, diet-induced hypercholesterolaemic mice showed a strong colocalization of Apo B and LRP5 positive signals within the arterial intima as well as in monocytes adhered to the vascular endothelium. The importance of LRP5 in agLDL internalization in human macrophages is supported by the finding that LRP5 silencing results in low intracellular lipid accumulation and a reduced CE content. However, the contribution of LRP5 to atherosclerosis is still not well defined and its function may depend on cell lineage. The contribution of LRP5 to cholesterol metabolism was previously suggested by the observation that *ApoE*^{-/-} *LRP5*^{-/-} mice have larger atherosclerotic lesions than their *ApoE*^{-/-} littermates [74]. Beyond its role in promoting lipid internalization, increased expression of LRP5 also induces the activation of canonical Wnt signalling [22, 31]. In macrophages, canonical Wnt signalling is thought to promote cell motility through a β -catenin-dependent mechanism [75]. Using a systems biology approach, Ramsey *et al.* reported the up-regulation of the canonical Wnt signalling downstream effector β -catenin within macrophage-rich regressing plaques in two mechanistically distinct lipid-lowering mouse models of plaque regression [76]. Supporting these finding in animal models, human *LRP5* genetic variants that impair Wnt/ β -catenin signalling have been associated with increased risk of carotid atherosclerosis [77] and early coronary artery disease [78] in humans, suggesting protective

and anti-atherogenic effects associated to canonical Wnt/ β -catenin signalling.

Blood monocytes recruited and infiltrated in the arterial intima differentiate into various subtypes of macrophages that are characterized by their surface epitopes and cell-membrane receptors. In a recent study, we have reported a significantly higher LRP5 expression in macrophages derived from CD14⁺CD16⁺ patrolling monocytes than in those derived from pro-inflammatory CD14⁺CD16⁻ monocytes [67]. We have also shown that a higher number of monocytes differentiate towards a CD16⁺ phenotype in the presence of native LDL [49]. Macrophages CD16⁺ are usually related to a mature M2-phenotype, also characterized for being positive for CD163 [20] a scavenger receptor of the haemoglobin-haptoglobin complex involved in haeme catabolism through a process mediated by regulation of the haeme oxygenase-1 (HMOX1) expression [79]. The presence of CD163 macrophages in human atherosclerotic lesions has been also associated with anti-inflammatory properties mediated through IL10 [21], and studies in mice *ApoE*^{-/-} models have associated plaque regression with the presence of M2 macrophage expressing CD163 [80–82]. Although differentiation of monocytes into macrophages is likely to be terminal, macrophages have the ability to switch phenotype and functional characteristics in response to external signals. It is interesting to note that macrophages derived from monocytes of FH patients have decreased expression of *CD163* when exposed to agLDL, an effect that was not evident in macrophages from healthy individuals, suggesting a lower HMOX1 mediated atheroprotective potential in FH. Indeed, FH patients carrying a null-mutation and therefore with a long-life exposure to high LDL levels and a severe atherogenic background were those with lower *CD163* levels, both in the absence and in the presence of agLDL. In accordance, monocytes exposed to native LDL in atherogenic concentration during differentiation into macrophages also lose surface expression of CD163 [49]. Moreover, inverse translation studies in mice also showed a trend to lower levels *Cd163*-PBL in diet induced mildly hypercholesterolaemic animals, and *Cd163*-expression was highly up-regulated in mice lacking *Lrp5*, suggesting a direct relationship between high *LRP5* and low *CD163* levels in macrophages of FH patients.

Taken in account the above results, we could hypothesize that higher levels LRP5 and lower levels of CD163 in arterial macrophages might account for the higher atherosclerotic burden in FH patients when compared with individuals within the same age interval and similar risk factors for atherosclerosis beyond the genetic diagnostic of FH [36].

In conclusion, our results show for first time that other members of the LDL receptor family such as LRP5 and LRP6 are highly active lipid internalization receptors in cells of the innate immunity system in FH patients. Macrophages derived from mononuclear cells that were formed and circulated in a niche of high LDL concentrations have down-regulated LDLR but retain the LDL internalization function. LRP5 and LRP6 are the receptors responsible for lipid internalization in FH macrophages. FH macrophages seem to present lower anti-inflammatory activity and less capacity of protection against LDL-mediated oxidative stress due to their lower content in the scavenger receptor CD163, contributing therefore to the premature development of atherosclerosis in these patients. Further studies are warranted to evidence the redundancy of lipid internalization/receptor function,

their co-adaptors and monocyte/macrophage polarization characteristics in FH patient's cells and their contribution to atherosclerotic vascular remodelling and progression.

Acknowledgements

Authors are indebted to Dr Oriol Juan and Dr Esther Peña for their help in immunohistochemistry and confocal microscopy and to Montse Gomez-Pardo for the technical assistance during the study. This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness [SAF2013-42962-R to L.B.], the Institute of Health Carlos III- ISCIII [FIS PI13/02850 to T.P./Red de Investigación Cardiovascular' RIC-RD12/0042/0027 to L.B.], the Spanish Society of Cardiology [SEC2015 to MB] and the FEDER 'Una Manera de Hacer Europa'. We thank Fundación Jesus Serra, Barcelona, for their continuous support. R.E. was a recipient of a pre-doctoral grant from the 'Investigación Cardiovascular Foundation'.

Author contributions

RE performed the research and statistical analyses of the study, interpreted the results and wrote the manuscript. TP assisted in designing the research study, performed statistical analysis, interpreted the results, wrote the manuscript and obtained funding. MB performed the LRP5 silencing experiments and the mice model studies and revised the manuscript. RS contributed to patient selection, statistical analysis and revised the manuscript. RA contributed to the research study and revised the manuscript. PM obtained the biological samples and clinical data of the FH and non-FH patient from the SAFEHEART cohort and revised the manuscript. LB designed the research study, interpreted the results, wrote the manuscript and obtained funding.

References

1. **Brown M, Goldstein J.** Expression of the familial hypercholesterolemia gene in heterozygotes: mechanism for a dominant disorder in man. *Science*. 1974; 85: 61-3.
2. **Goldstein JL, Brown MS.** Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem*. 1974; 249: 5153-62.
3. **Stef MA, Palacios L, Olano-Martin E, et al.** A DNA microarray for the detection of point mutations and copy number variation causing familial hypercholesterolemia in Europe. *J Mol Diagn*. 2013; 15: 362-72.
4. **Soutar AK, Naoumova RP.** Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007; 4: 214-25.
5. **Tolleshaug H, Goldstein JL, Schneider WJ, et al.** Posttranslational processing of the LDL receptor and its genetic disruption in familial hypercholesterolemia. *Cell*. 1982; 30: 715-24.
6. **Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, et al.** The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet*. 1990; 24: 133-70.
7. **Yamamoto A, Kamiya T, Yamamura T, et al.** Clinical features of familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis*. 1989; 9: 166-74.
8. **Gudnason V, Day IN, Humphries SE.** Effect on plasma lipid levels of different classes of mutations in the low-density lipoprotein receptor gene in patients with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb*. 1994; 14: 1717-22.
9. **Gaudet D, Vohl MC, Couture P, et al.** Contribution of receptor negative versus receptor defective mutations in the LDL-receptor gene to angiographically assessed coronary artery disease among young (25-49 years) versus middle-aged (50-64 years) men. *Atherosclerosis*. 1999; 143: 153-61.
10. **Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, et al.** The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (part I). *N Engl J Med*. 1992; 326: 242-50.
11. **Camejo G, Hurt-Camejo E, Wicklund O, et al.** Association of apoB lipoprotein with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis*. 1998; 139: 205-22.
12. **Williams KJ.** Arterial wall chondroitin sulfate proteoglycans: diverse molecules with distinct roles in lipoprotein retention and atherogenesis. *Curr Opin Lipidol*. 2001; 12: 477-87.
13. **Khoj JC, Miller E, McLoughlin P, et al.** Enhanced macrophage uptake of low density lipoprotein after self-aggregation. *Arteriosclerosis*. 1988; 8: 348-58.

Conflicts of interest

The authors confirm that there is no conflict of interest.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article:

Fig. S1 Schematic diagram representing the study design with 205 individuals of the SAFEHEART Cohort.

Fig. S2 LRP5 expression in PBL from FH-AT patients.

Fig. S3 mRNA expression levels of LRPs and scavenger receptors in macrophages of FH patients according their genetically characterized LDLR mutation.

Fig. S4 *Cd163* expression is up-regulated in PBLs of *Lrp5*^{-/-} mice.

Table S1 Clinical characteristics of control LLT⁻, FH-LLT⁺ and FH-LLT⁻.

Table S2 Clinical characteristics of sc-HC and FH-AT donors for studies on peripheral blood leucocytes (PBL).

Table S3 Clinical characteristics of control and FH donors for studies on monocyte differentiation to macrophage.

Table S4 FH genotypes according to location of LDLR mutation.

14. Zhang WY, Gaynor PM, Kruth HS. Aggregated low density lipoprotein induces and enters surface-connected compartments of human monocyte-macrophages. Uptake occurs independently of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem.* 1997; 272: 31700–6.
15. Buton X, Mamdouh Z, Ghosh R, et al. Unique cellular events occurring during the initial interaction of macrophages with matrix-retained or methylated aggregated low density lipoprotein (LDL). Prolonged cell-surface contact during which ldl-cholesteryl ester hydrolysis exceeds ldl protein de. *J Biol Chem.* 1999; 274: 32112–21.
16. Lorente-Cortés V, Royo T, Otero-Viñas M, et al. 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.
17. Libby P. Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art. *Am J Cardiol.* 2003; 91: 3A–6A.
18. Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 2255–64.
19. Bouhlef MA, Derudas B, Rigamonti E, et al. PPAR γ activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab.* 2007; 6: 137–43.
20. Edin S, Wikberg ML, Dahlin AM, et al. The distribution of macrophages with a M1 or M2 phenotype in relation to prognosis and the molecular characteristics of colorectal cancer. *PLoS ONE.* 2012; 7: e47045.
21. Boyle JJ, Harrington HA, Piper E, et al. Coronary intraplaque hemorrhage evokes a novel atheroprotective macrophage phenotype. *Am J Pathol.* 2009; 174: 1097–108.
22. Borrell-Pages M, Romero JC, Juan-Babot O, et al. Wnt pathway activation, cell migration, and lipid uptake is regulated by low-density lipoprotein receptor-related protein 5 in human macrophages. *Eur Heart J.* 2011; 32: 2841–50.
23. Kunjathoor VV. 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: 49982–8.
24. Endemann G, Stanton LW, Madden KS, et al. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1993; 268: 11811–6.
25. Chen Y, Sankala M, Ojala JRM, et al. A phage display screen and binding studies with acetylated low density lipoprotein provide evidence for the importance of the scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domain in the ligand-binding function of MARCO. *J Biol Chem.* 2006; 281: 12767–75.
26. Brown MS, Goldstein JL. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science.* 1976; 191: 150–4.
27. Brown MS, Goldstein JL. Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase activity and inhibition of growth of human fibroblasts by 7-ketocholesterol. *J Biol Chem.* 1974; 249: 7306–14.
28. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 1997; 89: 331–40.
29. Brown MS, Ho YK, Goldstein JL. The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. Continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters. *J Biol Chem.* 1980; 255: 9344–52.
30. Borrell-Pages M, Romero JC, Badimon L. LRP5 negatively regulates differentiation of monocytes through abrogation of Wnt signalling. *J Cell Mol Med.* 2014; 18: 314–25.
31. Borrell-Pages M, Romero JC, Badimon L. LRP5 deficiency down-regulates Wnt signalling and promotes aortic lipid infiltration in hypercholesterolaemic mice. *J Cell Mol Med.* 2015; 19: 770–7.
32. Borrell-Pages M, Romero JC, Badimon L. Cholesterol modulates LRP5 expression in the vessel wall. *Atherosclerosis.* 2014; 235: 363–70.
33. Lorente-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.
34. Lorente-Cortés V. 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.
35. Lugano R, Peña E, Casani L, et al. UPA promotes lipid-loaded vascular smooth muscle cell migration through LRP-1. *Cardiovasc Res.* 2013; 100: 262–71.
36. Caballero P, Alonso R, Rosado P, et al. Detection of subclinical atherosclerosis in familial hypercholesterolemia using non-invasive imaging modalities. *Atherosclerosis.* 2012; 222: 468–72.
37. Suades R, Padró T, Alonso R, et al. Circulating CD45⁺/CD3⁺ lymphocyte-derived microparticles map lipid-rich atherosclerotic plaques in familial hypercholesterolemia patients. *Thromb Haemost.* 2014; 111: 111–21.
38. Mata N, Rodrigo A, Badimón L, et al. Clinical characteristics and evaluation of LDL-cholesterol treatment of the Spanish Familial Hypercholesterolemia Longitudinal Cohort Study (SAFEHEART). *Lipids Health Dis.* 2011; 10: 94.
39. Gehi AK, Ali S, Na B, et al. Self-reported medication adherence and cardiovascular events in patients with stable coronary heart disease: the heart and soul study. *Arch Intern Med.* 2007; 167: 1798–803.
40. Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary: Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur Heart J.* 2007; 28: 2375–414.
41. Watts GF, Gidding S, Wierzbicki AS, et al. Integrated guidance on the care of familial hypercholesterolemia from the International FH Foundation. *J Clin Lipidol.* 2014; 8: 148–72.
42. Wierzbicki AS, Humphries SE, Minhas R. Familial hypercholesterolemia: summary of NICE guidance. *BMJ.* 2008; 337: a1095.
43. Kramer CM, Anderson JD. MRI of atherosclerosis: diagnosis and monitoring therapy. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2007; 5: 69–80.
44. Alonso R, Defese JC, Tejedor D, et al. Genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia using a DNA-array based platform. *Clin Biochem.* 2009; 42: 899–903.
45. Alonso R, Mata N, Castillo S, et al. Cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia: influence of low-density lipoprotein receptor mutation type and classic risk factors. *Atherosclerosis.* 2008; 200: 315–21.
46. Mozas P, Castillo S, Tejedor D, et al. Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in Spain: identification of 39 novel and 77 recurrent mutations in LDLR. *Hum Mutat.* 2004; 24: 187.
47. Tejedor D, Castillo S, Mozas P, et al. Reliable low-density DNA array based on allele-specific probes for detection of 118 mutations causing familial hypercholesterolemia. *Clin Chem.* 2005; 51: 1137–44.
48. Tejedor D, Castillo S, Mozas P, et al. Comparison of DNA array platform vs DNA sequencing as genetic diagnosis tools for familial hypercholesterolemia. *Clin Chem.* 2006; 52: 1971–2.
49. Escate R, Padró T, Badimon L. LDL accelerates monocyte to macrophage

differentiation: effects on adhesion and anoikis. *Atherosclerosis*. 2016; 246: 177-86.

50. Eligini S, Crisci M, Bono E, et al. Human monocyte-derived macrophages spontaneously differentiated *in vitro* show distinct phenotypes. *J Cell Physiol*. 2013; 228: 1464-72.

51. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest*. 1955; 34: 1345-53.

52. Guyton JR, Klomp KF, Mims MP. Altered ultrastructural morphology of self-aggregated low density lipoproteins: coalescence of lipid domains forming droplets and vesicles. *J Lipid Res*. 1991; 32: 953-62.

53. Lorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Hurt-Camejo E, et al. 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.

54. Ohkawa H, Ohishi H, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979; 95: 351-8.

55. Cui Y, Niziolek PJ, MacDonald BT, et al. Lrp5 functions in bone to regulate bone mass. *Nat Med*. 2011; 17: 684-91.

56. Lorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Borroze M, et al. Intracellular lipid accumulation, low-density lipoprotein receptor-related protein expression, and cell survival in vascular smooth muscle cells derived from normal and atherosclerotic human coronaries. *Eur J Clin Invest*. 2004; 34: 182-90.

57. Soulas C, Conerly C, Kim WK, et al. Recently infiltrating MAC387+ monocytes/macrophages: a third macrophage population involved in SIV and HIV encephalitic lesion formation. *Am J Pathol*. 2011; 178: 2121-35.

58. Huang R, Wu H, Liu Y, et al. Increase of infiltrating monocytes in the livers of patients with chronic liver diseases. *Discov Med*. 2016; 21: 25-33.

59. Lorente-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.

60. Asmis R, Lorente VC, Gey KF. Prevention of cholesteryl ester accumulation in P388D1 macrophage-like cells by increased cellular vitamin E depends on species of extracellular cholesterol. Conventional heterologous non-human cell cultures are poor models of human atherosclerotic foam c. *Eur J Biochem*. 1995; 233: 171-8.

61. Noordzij M, Dekker FW, Zoccali C, et al. Sample size calculations. *Nephron Clin Pract*. 2010; 118: c319-23.

62. Riddle RC, Diegel CR, Leslie JM, et al. Lrp5 and Lrp6 exert overlapping functions in osteoblasts during postnatal bone acquisition. *PLoS ONE*. 2013; 8: e63323.

63. Schulz S, Schagdarsurengin U, Greiser P, et al. The LDL receptor-related protein (LRP1/A2MR) and coronary atherosclerosis—novel genomic variants and functional consequences. *Hum Mutat*. 2002; 20: 404.

64. Lupu F, Heim D, Bachmann F, et al. Expression of LDL receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor in human normal and atherosclerotic arteries. *Arterioscler Thromb*. 1994; 14: 1438-44.

65. Daugherty A, Rateri DL. Presence of LDL receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptors in macrophages of atherosclerotic lesions from cholesterol-fed New Zealand and heterozygous Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arterioscler Thromb*. 1994; 14: 2017-24.

66. Lorente-Cortés V, Badimon L. LDL receptor-related protein and the vascular wall: implications for atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25: 497-504.

67. Borrell-Pages M, Romero JC, Crespo J, et al. LRP5 associates with specific subsets of macrophages: molecular and functional effects. *J Mol Cell Cardiol*. 2016; 90: 146-56.

68. Hazen SL. Neutrophils, hypercholesterolemia, and atherogenesis. *Circulation*. 2010; 122: 1786-8.

69. Borrell-Pages M, Carolina Romero J, Badimon L. LRP5 and plasma cholesterol levels modulate the canonical Wnt pathway in peripheral blood leukocytes. *Immunol Cell Biol*. 2015; 93: 653-61.

70. Mosig S, Rennert K, Krause S, et al. Different functions of monocyte subsets in familial hypercholesterolemia: potential function of CD14⁺ CD16⁺ monocytes in detoxification of oxidized LDL. *FASEB J*. 2009; 23: 866-74.

71. Mosig S, Rennert K, Büttner P, et al. Monocytes of patients with familial hypercholesterolemia show alterations in cholesterol metabolism. *BMC Med Genomics*. 2008; 1: 60.

72. Tabas I. Nonoxidative modifications of lipoproteins in atherogenesis. *Annu Rev Nutr*. 1999; 19: 123-39.

73. Patel M, Morrow J, Maxfield FR, et al. The cytoplasmic domain of the low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein, but not that of the LDL receptor, triggers phagocytosis. *J Biol Chem*. 2003; 278: 44799-807.

74. Magoori K, Kang MJ, Ito MR, et al. Severe hypercholesterolemia, impaired fat tolerance, and advanced atherosclerosis in mice lacking both low density lipoprotein receptor-related protein 5 and apolipoprotein E. *J Biol Chem*. 2003; 278: 11331-6.

75. Amini-Nik S, Cambridge E, Yu W, et al. β -Catenin-regulated myeloid cell adhesion and migration determine wound healing. *J Clin Invest*. 2014; 124: 2599-610.

76. Ramsey SA, Vengrenyuk Y, Menon P, et al. Epigenome-guided analysis of the transcriptome of plaque macrophages during atherosclerosis regression reveals activation of the Wnt signaling pathway. *PLoS Genet*. 2014; 10: e1004828.

77. Sarzani R, Salvi F, Bordicchia M, et al. Carotid artery atherosclerosis in hypertensive patients with a functional LDL receptor-related protein 6 gene variant. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2011; 21: 150-6.

78. Mani A, Radhakrishnan J, Wang H, et al. LRP6 mutation in a family with early coronary disease and metabolic risk factors. *Science*. 2007; 315: 1278-82.

79. Philippidis P, Mason JC, Evans BJ, et al. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses *in vitro*, in resolving skin blisters *in vivo*, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ Res*. 2004; 94: 119-26.

80. Llodrà J, Angelí V, Liu J, et al. Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 11779-84.

81. Feig JE, Rong JX, Shamir R, et al. HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 7166-71.

82. Feig JE, Parathath S, Rong JX, et al. Reversal of hyperlipidemia with a genetic switch favorably affects the content and inflammatory state of macrophages in atherosclerotic plaques. *Circulation*. 2011; 123: 989-98.

MACROPHAGES OF GENETICALLY CHARACTERIZED FAMILIAL
HYPERCHOLESTEROLEMIA PATIENTS SHOW UPREGULATION OF
LDL-RECEPTOR RELATED PROTEINS

Rafael Escate ^a, Teresa Padro ^a, Maria Borrell-Pages ^a, Rosa Suades ^a,
Rosa Aledo ^a, Pedro Mata ^c, Lina Badimon ^{a,b,*}

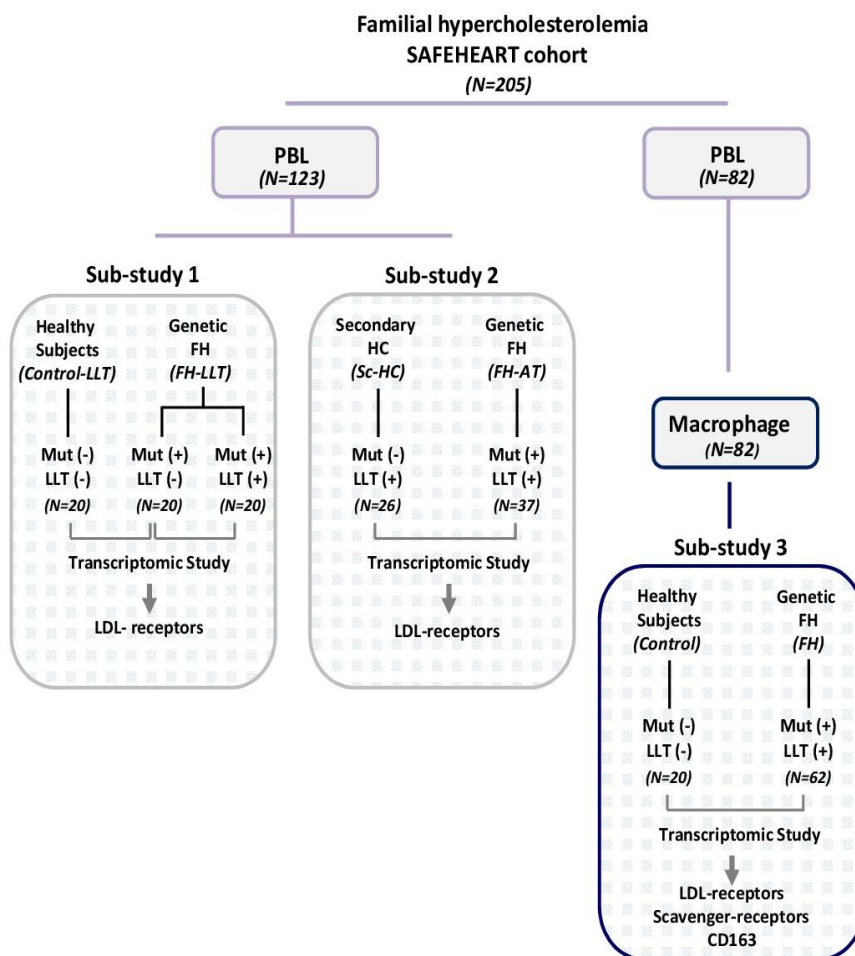
^a Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC), IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain;

^b Cardiovascular Research Chair, UAB, Barcelona, Spain

^c Foundation Jimenez Diaz, Madrid, Spain

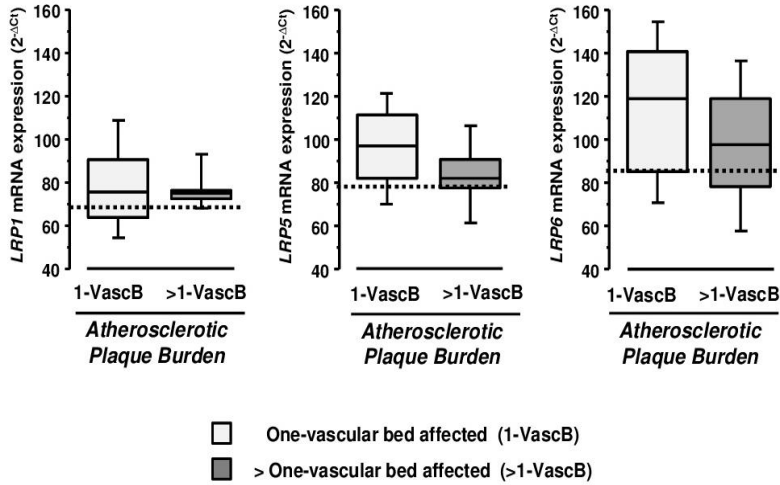
***Correspondence to:** Prof. Lina Badimon
Cardiovascular Research Center
Hospital de la Santa Creu I Sant Pau,
IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain.
Sant Antoni Maria Claret 167, 08025 Barcelona, Spain.
Phone: +34.935565880.
Fax: +34.935565559.
E-mail: lbadimon@csic-iccc.org

Supporting Information: 4 Supplementary Figures and 4 Supplementary Tables



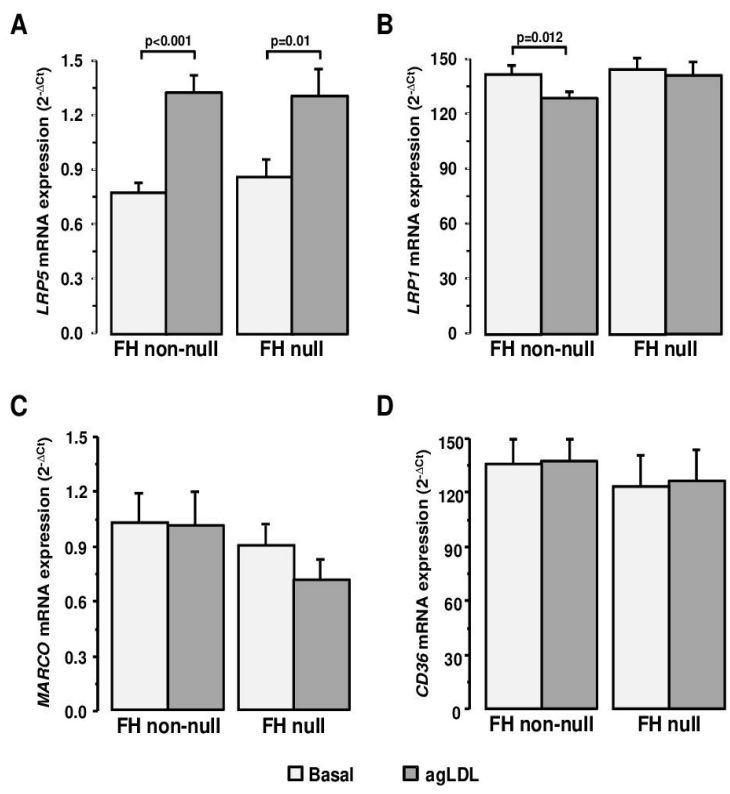
Supplementary Figure 1. Schematic diagram representing the study design with 205 subjects of the SAFEHEART Cohort

FH: Familial hypercholesterolemia; HC: hypercholesterolemia; Mut (+): With LDLR mutation, Mut (-): Without LDLR mutation; LLT (+): with lipid-lowering treatment; LLT (-): without lipid-lowering treatment. Secondary HC is shown in manuscript as sc-HC.



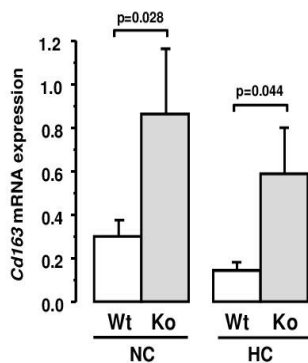
Supplementary Figure 2. LRP5 expression in PBL from FH-AT patients

Box and whisker plot of LRP1, LRP5 and LRP6 mRNA expression associated to atherosclerotic plaque burden in FH-patients. Horizontal dotted lines indicate median levels of mRNA expression ($2^{-\Delta Ct}$) of the control sc-HC group for LRP1 (68), LRP5 (79), and LRP6 (84). Thirty FH-AT patients only had one vascular bed affected (aortic or carotid) and 7 patients had atherosclerotic burden in the aortic and carotid beds. Values are given as median and interquartile range. Differences between groups are not statistically significant (U-Mann Whitney).



Supplementary Figure 3. mRNA expression levels of LRP5 and scavenger receptors in macrophages of FH-patients according their genetically characterized ldlr-mutation. Macrophage from LDLR-non-null (FH non-null, N=40) and LDLR-null (FH null, N=22) FH-patients were incubated with 100µg/mL agLDL for 24 hours. mRNA expression was quantified by real time PCR in sample duplicates. Bars represent mean±SEM. Only p-values <math><0.05</math> are shown.

Escate R et al



Supplementary Figure 4. *Cd163* expression is upregulated in PBLs of *Lrp5*^{-/-} mice.

Differential expression of *Cd163* in PBLs of wild type (Wt) and *Lrp5*^{-/-} (Ko) mice fed hypercholesterolemic (HC) and normocholesterolemic (NC) diet. Real-time PCR in duplicates and normalized to 18S (N= 7 mice/group). Bars represent mean±SEM. Only p-values <0.05 are shown.

Supplementary Table 1. Clinical characteristics of Control-LLT⁻, FH-LLT⁺ and FH-LLT⁻ donors for studies on peripheral blood leukocytes (PBL).

	Control-LLT ⁻ n=20	FH-LLT ⁺ n=20	FH-LLT ⁻ n=20	Statistics
Age (years, mean ± SEM)	35 ± 2	37 ± 2	34 ± 1	p=0.501
Male/Female, n	10/10	10/10	10/10	-
Body mass index (Kg/m ² , mean ± SEM)	23.3 ± 0.9	24.7 ± 1.1	24.6 ± 0.9	p=0.646
Waist to height ratio (mean ± SEM)	0.5 ± 0.3	0.48 ± 0.2	0.47 ± 0.1	p=0.973
Risk Factors, n(%)				
Diabetes mellitus	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-
Systemic hypertension	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-
Obesity (BMI>30)	1 (5%)	3 (30%)	2 (10%)	p=0.574
Current tobacco consumption	5 (25%)	9 (45%)	9 (45%)	p=0.324
Lipid-lowering therapy, n(%)				
Statins	0 (0%)	20 (100%)	0 (0%)	p<0.001
Ezetimibe	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Statin treatment time (years, mean ± SEM)	0	15 ± 1	0	p<0.001
Clinical data (mean ± SEM)				
Total cholesterol (mg/dL)	167.9 ± 4.2	296.9 ± 7.5 ^a	302.9 ± 6.4 ^a	p<0.001
LDL-cholesterol (mg/dL)	92.7 ± 3.4	222.7 ± 6 ^a	231.3 ± 6.9 ^a	p<0.001
HDL-cholesterol (mg/dL)	60.1 ± 4.3	55.9 ± 3.4	53.6 ± 2.4 ^a	p=0.749
Non-HDL-cholesterol (mg/dL)	107.8 ± 3.3	240.9 ± 7.1 ^a	249.3 ± 6.4 ^a	p<0.001
TC/HDL-cholesterol ratio	2.8 ± 0.1	5.6 ± 0.3 ^a	5.9 ± 0.3 ^a	p<0.001
Triglyceride (mg/dL)	75.1 ± 8.1	90.5 ± 10.1	87.2 ± 8.6	p=0.251
Hight-sensitive CRP (mg/dL)	1.7 ± 0.4	2.8 ± 0.9	1.6 ± 0.3	p=0.701
Fasting plasma glucose (mg/dL)	82.4 ± 2.4	77.9 ± 2.1	79.1 ± 1.9	p=0.385

Control-LLT⁻ group: healthy subjects without lipid-lowering therapy; FH-LLT⁺ and FH-LLT⁻ group: FH-patients with or without LLT; BMI: body mass index; LDL: low-density lipoprotein; HDL: high-density lipoprotein; TC: total cholesterol and CRP: C-reactive protein. ^a p-values respect to Control-LLT⁻ group.

Supplementary Table 2. Clinical characteristics of sc-HC and FH-AT donors for studies on peripheral blood leukocytes (PBL).

	sc-HC n=26	FH-AT n=37	Statistics
Age (years, mean ± SEM)	56 ± 3	44 ± 2	p=0.001
Male/Female, n	10/16	19/18	p=0.312
Body mass index (Kg/m ² , mean ± SEM)	28.2 ± 1.3	26 ± 0.7	p=0.138
Waist to height ratio (mean ± SEM)	0.57 ± 0.2	0.50 ± 0.01	p=0.004
Risk Factors, n(%)			
Diabetes mellitus	2 (8%)	0 (0%)	p=0.086
Systemic hypertension	5 (19%)	4 (11%)	p=0.347
Obesity (BMI>30)	10 (38%)	3 (8%)	p=0.003
Current tobacco consumption	7 (27%)	13 (35%)	p=0.491
Lipid-lowering therapy, n(%)			
Statins	26 (100%)	37 (100%)	-
Ezetimibe	2 (8%)	13 (35%)	p=0.012
Statin treatment time (years, mean ± SEM)	12 ± 1	11 ± 1	p=0.626
Clinical data (mean ± SEM)			
Total cholesterol (mg/dL)	212.5 ± 7.5	232.9 ± 12.6	p=0.418
LDL-cholesterol (mg/dL)	136.2 ± 6.8	160.1 ± 10.7	p=0.133
HDL-cholesterol (mg/dL)	56.4 ± 2.8	49.6 ± 2.1	p=0.077
Non-HDL-cholesterol (mg/dL)	156 ± 7.2	182 ± 12.2	p=0.176
TC/HDL-cholesterol ratio	3.9 ± 0.2	4.9 ± 0.3	p=0.036
Triglyceride (mg/dL)	99.2 ± 9.5	39 ± 6.4	p<0.001
Hight-sensitive CRP (mg/dL)	3.1 ± 0.9	2.9 ± 0.6	p=0.469
Fasting plasma glucose (mg/dL)	92.3 ± 3.8	87.4 ± 3.2	p=0.459

Sc-HC group: Subjects with secondary hypercholesterolemia and FH-AT group: FH-patients with atherosclerotic lesion analyzed with magnetic resonance image; BMI: body mass index; LDL: low-density lipoprotein; HDL: high-density lipoprotein; TC: total cholesterol and CRP: C-reactive protein.

Supplementary Table 3. Clinical characteristics of control and FH donors for studies on monocyte differentiation to macrophage.

	Control n=20	FH n=62	Statistics
Age (years, mean ± SEM)	47 ± 3	46 ± 2	p=0.888
Male/Female, n	11/9	31/31	p=0.697
Body mass index (Kg/m ² , mean ± SEM)	25.6 ± 1.1	26.9 ± 0.7	p=0.483
Waist to height ratio (mean ± SEM)	0.53 ± 0.02	0.56 ± 0.01	p=0.329
Risk Factors, n(%)			
Diabetes mellitus	0 (0%)	3 (4.8%)	p=0.316
Systemic hypertension	1 (5%)	6 (9.7%)	p=0.515
Obesity (BMI>30)	4 (20%)	13 (21%)	p=0.325
Current tobacco consumption	8 (40%)	19 (30.6%)	p=0.438
Lipid-lowering therapy, n(%)			
Statins	9 (45%)	62 (100%)	p<0.001
Ezetimibe	0 (0%)	2 (1.2%)	p=0.416
Statin treatment time (years, mean ± SEM)	3 ± 1	15 ± 1	p<0.001
Clinical data (mean ± SEM)			
Total cholesterol (mg/dL)	188.3 ± 4.6	243.6 ± 7.4	p<0.001
LDL-cholesterol (mg/dL)	117.6 ± 4	176.7 ± 6.8	p<0.001
HDL-cholesterol (mg/dL)	47.2 ± 2.6	49 ± 1.3	p=0.496
Non-HDL-cholesterol (mg/dL)	141.1 ± 4	195 ± 7.4	p<0.001
TC/HDL-cholesterol ratio	4.2 ± 0.2	5.2 ± 0.2	p=0.003
Triglyceride (mg/dL)	135.9 ± 23.6	89.3 ± 6.5	p=0.063
Hight-sensitive CRP (mg/dL)	2.1 ± 0.4	1.5 ± 0.2	p=0.457
Fasting plasma glucose (mg/dL)	80.2 ± 2.4	81.4 ± 1.7	p=0.756

Control group (C-MAC): healthy subjects with or without lipid-lowering therapy (LLT); FH group (FH-MAC): FH patients with LLT; BMI: body mass index; LDL: low-density lipoprotein; HDL: high-density lipoprotein; TC: total cholesterol and CRP: C-reactive protein.

Supplementary Table 4. FH genotypes according to location of LDLR mutation

FH group	Location	Predicted effect	N=62
null	Ex 15		
null	Ex 7	Shift reading frame	10
null	Ex 6		
null	Ex 4		
null	Ex 9	Stop codon	12
null	Ex 2		
non-null	Prom	Regulation of expression	4
non-null	Ex 17		
non-null	Ex 3		
non-null	Ex 4	Change amino acid	15
non-null	Ex 7		
non-null	Ex 14		
non-null	Ex 8		
non-null	Int 3		
non-null	Int 16	Splicing	9
non-null	Int 9		
non-null	Int 12		
non-null	Ex 3 + Int 3		
non-null	Ex 13	Others	12
non-null	Ex 11 + Ex 17		
non-null	Ex 16		

Stop codon and shift reading frame mutations were classified as FH null (N=22) while the other mutations were classified as FH non-null (N=40). Ex: exon; Int: intron; Prom: promoter; N: number of patients for each predicted effect of LDLR mutation.

Artículo 3

Chemokine receptors and miR-505-3p are differential expressed in macrophages of genetically characterized familial hypercholesterolemia patients.

Autores: Escate R, Badimon L, Padrò T

Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC), IIB-Sant Pau,
Barcelona, España.

Revista: Pendiente de presentación

RESUMEN

En macrófagos de pacientes con hipercolesterolemia familiar (FH) muestra un perfil inflamatorio por el aumento transcripcional de CCR3, CCR4, CXCR1 y una expresión disminuida del miR-505-3p, independientemente de la agLDL. Sin embargo, los receptores de quimioquinas son dependientes al tiempo de vida de exposición a niveles altos de LDL.

Los pacientes con FH tienen un amplio riesgo prematuro de padecer aterosclerosis y en consecuencia enfermedad cardiovascular. Niveles altos de colesterol plasmático y el proceso inflamatorio en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica, recientemente han sido descritos dentro del concepto memoria de la inmunidad innata. El objetivo de este estudio es investigar la respuesta inflamatoria de los macrófagos heterocigotos para

la mutación LDLR y su asociación al tiempo de exposición a niveles altos de colesterol LDL. Se emplea en el estudio un cultivo de macrófagos derivados de monocitos humanos en presencia y ausencia de agLDL. La expresión del miR-505-3p se incrementa en macrófagos de pacientes FH respecto a los sujetos sanos, independientemente de la presencia de agLDL. Mediante el incremento de expresión del miR-505-3p usando su correspondiente agomiR, se identifica su efecto regulador por la disminución de expresión *CCR3*, *CCR4* y *CXCR1*. Estos receptores de quimioquinas están incrementados en macrófagos de fenotipo FH y no fueron afectados por la exposición de la agLDL. Además, los receptores de quimioquinas no se relacionan con los niveles de LDL plasmático para individuos controles y pacientes FH. Sin embargo, están correlacionados directamente con la edad en el grupo FH, cuya significancia está en los pacientes de edad por encima de la mediana poblacional, lo cual no es observado en los sujetos controles.

Estos resultados muestran el perfil inflamatorio de los macrófagos FH, lo cual es dependiente de la edad del paciente por la exposición de niveles altos de LDL, a pesar del tiempo con terapia hipolipemiente

Epigenetic regulation of macrophages of genetically characterized familial hypercholesterolemia patients sustain a pro-inflammatory phenotype despite long-term lipid lowering treatment

Escate R ^{*}, Mata P[&], Padro T^{*1}, Badimon L ^{*#1}

^{*} Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC), IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain;

[#] Cardiovascular Research Chair, UAB, Barcelona, Spain

[&] Fundación para la Hipercolesterolemia Familiar

¹ Both authors have contributed equally

Address for correspondence:

Prof. Teresa Padro

Cardiovascular Research Center,

c/Sant Antoni M^a Claret 167, 08025 Barcelona, Spain.

Phone: +34 935565886.

Fax: +34.935565559.

E-mail: tpadro@csic-iccc.org

Manuscript word count:

Abstract word count:

Figures and Tables: 5 Figures + 4 Supplementary Figures + and 4 Supplementary Tables

ABSTRACT

AIMS: Patients with familial hypercholesterolemia (FH) are at high risk for premature atherosclerotic disease due to their life exposure to high LDLc levels. A large body of evidence indicates a link between LDLc, inflammation and atherosclerosis and recently the concept of innate immunity memory has been postulated. Here, we investigated the inflammatory response in macrophages of heterozygous FH patients (from the SAFEHEART Cohort) treated as per guidelines and its association with lifetime exposure to high LDLc levels.

METHODS AND RESULTS: Monocytes (Mo) from FH patients were isolated and differentiated into macrophages (FH-MACs). MAC from a group of non-FH subjects (co-MACs) from the same patient cohort, matched by age and gender, was used as control. MACs were also obtained from healthy donor blood (hd-MACs). Human miRNAs and inflammatory target genes were selected from transcriptional microarray analysis of hd-MAC stimulated with LPS (1 µg/mL) and validated by quantitative real time PCR in FH-MACs and co-MACs.

MiR-505-3p was significantly downregulated in FH-MAC with respect to co-MAC. By *in silico* analysis, we identified the chemokine receptors CCR3, CCR4 and CXCR1 as miR-505-3p target genes. These target genes were validated and found to be significantly higher at baseline in FH-MAC. However, *in vitro* agLDL loading did not affect their expression levels. Levels of chemokine receptors did not relate to plasma LDL at time of inclusion in the study neither in FH-MAC nor in co-MAC. However, chemokine receptor levels directly correlated with age in the FH-group, with significantly higher levels in patients above the median age of the entire study population. Age related effects were not evident in the control group.

CONCLUSIONS: our results show for first time that monocyte-derived macrophages from treated to guidelines FH-patients have an inflammatory phenotype characterized by increased levels of chemokine receptors CCR3, CCR4 and CXCR1 and downregulated levels of miR-505-3p. The effect is dependent on the age of the patient, suggesting a chronic inflammatory pattern in innate immunity cells that is related to epigenetic changes induced by lifetime exposure to high LDL.

INTRODUCTION

Atherosclerosis is widely recognized as a chronic inflammatory disorder of the arterial wall ultimately resulting in plaque rupture and adverse clinical events as myocardial infarction or sudden death^{1,2}. Up to now, however, the identification and characterization of the different actors that drive the persistent non-resolving inflammation in the arterial atherosclerotic intima and their relative importance remain unclear.

Monocyte-derived macrophages are the most abundant subset of innate immunity cells within the atherosclerotic lesions³ and play a critical role orchestrating the link between lipid accumulation in the subintimal compartment and the inflammatory response. Several studies have suggested an immune-stimulating role of low density lipoproteins (LDL) during atherogenesis^{4,5}. In this respect, we have demonstrated that LDL promote monocyte-to macrophage differentiation through a process involving enhanced expression of cell-adhesion molecules and downregulation of apoptosis-effectors⁶.

Patients with familial hypercholesterolemia (FH), an autosomal dominant disorder caused by mutations in the LDL receptor and its related genes are at high risk for premature atherosclerotic cardiovascular disease due to the chronic exposition to high LDL-cholesterol levels⁷. Studies using fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging have provided evidence that FH patients have noticeably increased arterial wall inflammation compared with healthy controls, whereas arterial inflammation is markedly reduced after lipoprotein apheresis in FH⁸. Furthermore, we have recently demonstrated that macrophages derived from mononuclear cells of FH patients, although presenting downregulated LDLR expression, retain the LDL internalization function evolving into lipid-loaded cells with less capacity of protection against atherogenic stimulus than those originated from non-FH monocyte⁹.

Chemokines are inflammatory cytokines that beyond their ability of controlling monocyte recruitment may exert nonchemotactic function during the different stages of atherosclerosis¹⁰ and as such have been proposed as potential therapeutic targets¹¹. Thus, chemokine receptors have been found to directly regulate lipid levels¹² and regulate macrophage foam cell formation¹³.

MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs of ~22 nucleotides that have recently emerged as a novel class of gene regulators at the post-transcriptional level^{14,15}.

MiRNAs may act directly on the target genes or indirectly, by first regulating transcription factors that in turn control gene expression. In this respect, miRNA appear to regulate chemokines primarily through an indirect regulation of pro- and anti-inflammatory transcription factors¹⁰, controlling therefore different molecular signaling pathways and cellular processes involved in atherosclerosis¹⁶⁻¹⁸.

Typically, the innate immunity responses cannot display a long-term activation. However, recent studies have shown an epigenetic reprogramming that alter gene expression upon a re-exposure¹⁹ and have suggested that innate immune training might also occur in a high cholesterol environment at cellular level and potentially within the arterial vessel wall²⁰. We have previously demonstrated that patients with life-long high LDL exposure have higher activation of endothelial and cells of the leukocyte lineage, even under current state-of-the art lipid lowering treatment²¹. Here, we have investigated the miRNA and inflammatory transcriptional profile in monocyte-derived macrophages of FH patients and their association with long-term exposition to high LDL-cholesterol levels.

MATERIALS AND METHODS:**Population study and experimental design**

The present study included 62 patients with genetic diagnosis of heterozygous FH and thus lifelong exposure to high LDL plasma levels and 20 non-FH subjects (controls) from the SAFEHEART cohort²²⁻²⁴. Control and FH groups were matched by age, gender, demographics and cardiovascular risk factors other than hypercholesterolemia. Sociodemographic data, lifestyle, medical and therapeutic data, current LLT and classical risk factors were obtained from all subjects. Sociodemographic data, lifestyle, medical and therapeutic data, current LLT and classical risk factors were obtained from all subjects. All FH-patients were receiving lipid-lowering treatment according to clinical guidelines^{24,25}, but none of them achieved therapeutic LDL targets according to guidelines. Thus, LDL level for the FH group was ranging from 120 to 300mg/dL and for controls between 97 and 145 mg/dL (**Supplementary Table 1**).

Compared to the controls, total cholesterol (TC), LDL, non-HDL and TC/HDL-cholesterol ratio were significantly higher in FH-group. Neither the FH- nor control-groups included patients with pregnancy, sepsis or infections and with history of cancer or suspected cardiovascular events. The study was approved by the Local Ethics Committee of the Investigación Clínica Fundación Jimenez Diaz (CEIC-FJD) [protocol's number: 01/09] and was conducted according to the Declaration of Helsinki and a written informed consent was obtained from all participants prior to the study.

Blood collection and sampling

Blood sample was withdrawn from the cubital vein without tourniquet using a 20-gauge-needle after 10-14 hours of fasting into Vacutainer CPT (Becton Dickinson) tubes, containing sodium heparin as anticoagulant and ficoll-hypaque as solution for separation of the peripheral blood mononuclear cell (PBMN) fraction. Briefly, blood samples were centrifuged at 1500 to 1800 rcf (relative centrifugal force) within the first 2 hours of blood collection and PBMN was obtained by differential density gradient, as described by the providers. Total PBMN were used to monocyte differentiation into macrophage. For biochemical and DNA analysis, blood samples were collected without anticoagulant or in EDTA-containing tubes²¹. All serum- and EDTA-samples were processed within 60 min after extraction, aliquoted and frozen at -80°C, until required

by analysis. DNA was obtained from blood cells according to standard method, using a commercial kit (QiAmp Blood DNA Mini Kit, Qiagen, Germany)²⁶.

Biochemical and genotyping analysis

Serum total cholesterol (TC), triglycerides (TG) and high-density lipoprotein (HDL-cholesterol) were measured by standardised enzymatic methods and serum LDL-c concentration was calculated using the Friedewald formula²⁷. C-reactive protein (CRP) and lipoprotein (a) levels were quantified by standard laboratory methods²⁸. Molecular genetic diagnosis of FH was made using a DNA-microarray (LIPOchip, Progenika)²⁹ and capillary sequencing by multiplex PCR conditions and sequence reactions^{30,31}. Negative samples for the DNA-microarray or sequencing were also analyzed for large deletions or insertions using an adapted quantitative fluorescent multiplex PCR methodology.

Primary culture of human macrophage

PBMN, obtained by Vacutainer CPT System Human (samples from SAFEHEART-Cohort) or isolated from leukocytes-rich buffy coats from healthy donors (Barcelona Blood Bank) by centrifugation on a Ficoll-Hypaque gradient (GE Helathcare)³², were suspended in RPMI-1640-glutamax culture media supplemented with 100U/mL penicillin/streptomycin, 2mM L-glutamine, 10mM Hepes buffer (Gibco) and containing 10% (vol:vol) human serum (blood group AB, Lonza) (HS-media). Based on cell counts of each individual sample, PBMN were plated on 6-well polystyrene plates (Becton Dickenson) to obtain a cellular density of 2×10^6 monocytes/mL, as previously described³². After incubation for 24 hours, non-adherent cells were removed by gently washing and adherent monocytes were allowed to differentiate into macrophages for 7 days (MAC)³³. Thereafter, the cells were incubated for further 24 hours in RPMI-medium with 0.5% HS (minimal HS-media) to obtain quiescent cells, before being treated for further 24 hours with/without 1 μ g/mL bacterial lipopolysaccharide or in the presence/ absence of 100 μ g/mL agLDL. At the end of the stimulation periods, cells were washed with phosphate-buffer saline (PBS) and collected for RNA extraction.

In specific subsets of experiments, miR-505-3p expression in human was overexpressed using HiPerFect as transfection reagent (Qiagen). Briefly, human macrophages obtained

from buffy coats were transfected by agomiR-505-3p (MSY0002876, Qiagen) or an Agomir negative control (agomiR-NC; 1027280, Qiagen) that was used as control for nonesequence-specific effects. For transfection, the cells were incubated in minimal-HS medium and treated with agomiR-505-3p (15nM) or agomiR-NC (15nM) for 24 hours and stimulated with 100µg/mL agLDL, as described above. The transfection was maintained for at least 48 hours, as shown in Supplementary Figure 2.

LDL isolation and modification

Human LDL (density 1.019-1.063g/mL) were purified from pooled plasma-EDTA of normocholesterolemic volunteers by ultracentrifugation³⁴ and agLDL were generated by vortexing LDL (1mg/mL), as described by Guyton *et al*³⁵ and as previously performed by our group³⁶. This method has shown to produce similar LDL-aggregation as LDL-versican incubation³⁷.

LDL-protein concentration was determined using the bicinchoninic acid (BCA)-method (Pierce) and LDL purity assessed by agarose-gel electrophoresis (SAS-MX Lipo-kit, Helena Biosciences). LDL-preparations were tested to exclude the presence of endotoxin (Limulus ameocyte lysate test, BioWhittaker) and proved to be negative in all cases. LDL used in the experiments were less than 48 hours old. In all experiments, LDL-oxidation was excluded by assessing thiobarbituric-acid-reactive substances (TBARS) formation before and after aggregation, according Ohkawa *et al*³⁸ with slight modifications⁶.

Real time PCR analysis

Total RNA of human macrophages was extracted using the mirVana miRNA isolation Kit (Ambion), as described by the providers. RNA concentration was determined by using NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies) and purity was checked by the A260/A280 ratio. Reverse transcription of miRNAs and genes were performed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit followed by Taqman real time-PCR technology, according to the manufacturer's instruction (Applied Biosystems).

The Taqman array microfluidic card v2.0 focuses on highly characterized miRNAs, excluding those miRNAs* sequences that are detected at very low levels and are likely

to be non-functional³⁹. Thus, the array contains 377 miRNAs, 3 endogenous (RNU6, RNU48 and RNU44) and 1 negative control (ath-miR-159a) that does not amplify in human samples. In addition, expression levels of selected miRNAs and genes were analysed by specific human primers for miR-486-3p (002093), miR-187 (001193), miR-483-5p (002338), miR-505-3p (002089), miR-95 (000433), miR-146a (000468), miR-155 (002623), CCR3 (Hs00266213_s1), CCR4 (Hs00747615_s1), CXCR1 (Hs01921207_s1), TGFBI (Hs00998133_m1), IL2 (Hs00174114_m1) and RUNX1 (Hs00231079_m1). Only miRNAs (analysed in triplicates) and genes (analysed in duplicates) with expression levels below 32 cycles were accepted. RNU48 (001006) and PIK3C2A (Hs00153223_m1) were used to normalize the expression levels of miRNAs and genes, respectively. Furthermore, the expression profile of genes mediating inflammatory processes was analyzed using a 96-well RT² Profiler PCR Array (PAHS-077Z, SABiosciences/Qiagen) according to manufacturer's protocol. Data were analysed by SDS 2.4, RQ Manager 1.2.1 and DataAssits v3.0.1 software (Applied Biosystems).

***In silico* analysis**

Potential target genes for miRNA were defined by using database as miRmap, PACCMITCDS, PACCMIT3UTR, miRwalk 5UTR, miRwalk CD, miRwalk 3UTR and the Ingenuity Pathway Analysis (IPA; <http://www.ingenuity.com/>). Target genes considered were those with high prediction to regulate to miRNA, according their search algorithms (**Supplementary Table 2**). IPA was used to identify potential functional networks and pathways. IPA Core Analysis was applied to the gene lists to identify direct and indirect interactions based on the IPA Knowledge Base, a repository of curated biological interactions and functional annotations based on existing literature

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM (standard error of the mean), except when indicated. Minimal required sample size was calculated according Noordzij, *et al*⁴⁰. A test for normality was performed using Shapiro-Wilks test. Outlier expressions were excluded by Chauvenet's criterion. Statistical differences between groups were analyzed by the parametric Student's t-test or the non-parametric U-Mann Whitney test.

Differences in categorical variables (gender, risk factors and medication) were defined by Chi-square analysis of frequencies. StatView software (Abacus Concepts) and SPSS Statistics Version 21.0.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) were used for statistical analysis, and a p-value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

MiRNA profile in human macrophages and response to inflammatory stimulus with LPS

To characterize the pattern of miRNAs expressed in macrophages and identify those with a significant response when cells were exposed to an inflammatory stimulus, we performed a RT-PCR based array (microfluidic card) in RNA samples obtained from healthy donor-MACs (hd-MAC) after 24 hours with/without 1 μ g/mL LPS.

Human macrophages consistently expressed 101 miRNAs from a total of 377 included in the microfluidic card. Ninety six miRNAs were detected in all cells, independently of the LPS stimulus. *In silico* with the IPA software these miRNAs preferably related to cell functions such as development, growth and proliferation, when indeed these cell functions were the most representative between the 25 miRNAs with higher expression level in human MAC (**Supplementary Figure 1**), whereas, only 2 miRNAs (miR-146a and miR-155) of the top-25 were significantly increased after incubation with LPS for 24 hours (miR-146a: 3.5fold, p=0.018; miR-155: 3.6fold, p=0.023). Four miRNAs (miR-187, miR-483-5p, miR-505-3p and miR-95) were under detection level in the microfluidic card with samples from unstimulated MAC, but consistently detected in all samples after LPS stimulation. In contrast, miR-486-3p was only detected in unstimulated MAC (See Supplementary Figure 1).

MiR-505-3p expression is downregulated in monocyte derived-macrophages from FH-patients

Next, we investigated whether those miRNAs that showed a response to the LPS-induced acute inflammation in human hd-MACs were differently expressed in macrophages from FH-patients. To this aim, miR-486-3p, miR-187, miR-505-3p, miR-95, miR-483-5p, miR-146a and miR-155 were individually analyzed by quantitative real-time PCR in monocyte-derived-macrophage from FH-patients (FH-MAC) and controls (co-MAC). As shown in **Figure 1**, expression levels of miR-505-3p were significantly reduced in macrophages obtained from FH-patients compared to co-MAC, both at baseline (p= 0.005) and in cells exposed to agLDL during 24 hours (p=0.002). In addition, FH-MACs had a significant trend to higher expression levels of miR-95 in

lipid loaded macrophages (1.25-fold, $p=0.029$), whereas not differences between macrophages obtained from controls and FH-patients were observed at baseline. MiR-146a and miR-155 had high transcription levels in FH-MAC as they had in co-MAC, independently of the absence/presence of agLDL and without showing any significant difference between groups. Similarly, expression levels of the miR-187, 483-5p and 486-3p did not differ between co- and FH-MAC, neither at baseline nor after being exposed to agLDL.

MiR-155 and miR-146 are well recognized for their inflammation-related roles⁴¹. In macrophages of control subjects, miR-505-3p was significantly upregulated in those cells with miR-155 and miR-146 levels above the median values (146.0 and 28.4 RU, respectively) of the entire study population. In contrast, miR-505-3p remained low in FH-MAC independently of the miR-155 and miR-146 levels (**Supplementary Figure 2**).

High levels miR-505-3p impair the expression of inflammatory genes in lipid loaded human macrophages

MiR-505 is low expressed in peripheral blood samples of patients with active ulcerative colitis, a major condition of chronic intestinal inflammation associated to a dysregulated immune response⁴².

To better understand the functional role of miR-505-3p in FH, we performed a subset of experiments in human MACs from healthy donors transfected with agomiR-505-3p or its agomiR negative control during 24 hours, before exposing the cells to agLDL (100 μ g/mL) for further 24 hours (**Supplementary Figure 3**).

Seventy-three out of 84 genes included in the microfluidic card (genes mediating inflammatory processes) were consistently expressed in human macrophages. Expression levels of 5 genes had a change >1.5-fold in macrophage overexpressing miR-505-3p (**Figure 2**). Thus, the chemokine receptors *CCR3*, *CCR4* and *CXCR1* were significantly downregulated (*CCR3*: 2.0fold, $p=0.005$; *CCR4*: 1.8fold, $p=0.039$; *CXCR1*: 1.61-fold, $p=0.024$), whereas the chemokines *CCL5* (C-C Motif Chemokine Ligand 5) and *CCL2* (C-C Motif Chemokine Ligand 2 or Monocyte Chemoattractant Protein 1) were upregulated 2.1-fold ($p=0.044$) and 1.6-fold ($p=0.047$) respectively. In addition, mRNA transcription levels of 10 further genes were slightly but significantly decreased (1.1-1.5fold, $p<0.05$) in human macrophages transfected with the Agomir

505-3p. These refer to genes related to cell membrane proteins (*ITGB2*) and membrane receptors (*TLR6*, *IL10RB*, *CD40*), receptor adaptor proteins (*TIRAP*, *TOLLIP*), soluble ligands (*LTB*, *CSF1*, *IL23A*), and transcription factors (*NFKB1*) (See Figure 2).

The IPA software was used to identify potential gene-gene interactions and predicts a functional network that might link those genes that were significantly down- / up-regulated in human macrophages in the presence of high levels of miR-505-3p.

NFKB1, the only transcription factor among the inflammatory genes regulated by miR-505-3p, had the strongest predictive power mediating down-/ up-regulation of upstream cell membrane receptors and soluble ligands (**Supplementary Figure 4**). In this respect, a down-regulated *NFKB1* expression, as induced by high miR-505-3p levels, was linked according to the results of the *in silico* analysis to decreased gene expression of the cell membrane receptors *ITGB2*, *CXCR1*, *TLR6*, *CD40* and *IL10RB* and the soluble ligands *IL23A*, *CSF1* and *LTB*. In addition, *CCL5* and *CCL2* were predicted to be up-regulated, supporting the experimental data obtained in the RT² Profiler PCR Array.

Using different algorithms and database (miRmap, PACCMITCDS, PACCMIT3UTR, miRwalk 5UTR, miRwalk CD, miRwalk 3UTR), we identified *EP300*, *HMGB1*, *EHF* and *BCL11B* as potential direct target genes of miR-505-3p (**List of potential target genes in Supplemental Table 3**). These were directly or indirectly linked with different components of the predicted network by IPA analysis (See Supplementary Figure 4). In contrast, genes such as *CCR3*, *CCR4*, *TOLLIP* and *TIRAP*, which were significantly downregulated in hd-MACs overexpressing miR-505-3p, were not linked to the predicted target genes neither to the other down- / up-regulated genes included within the functional network according the IPA analysis.

Chemokine receptors *CCR3*, *CCR4* and *CXCR1* are upregulated in FH-MAC and associate with the age subject in FH

We further investigated whether transcriptional levels of the top-three genes (chemokine receptors) differentially expressed in MAC of healthy donors treated with the agomiR-505-3p are affected in monocyte-derived macrophages from FH-patients. To this aim, we analyzed *CCR3*, *CCR4* and *CXCR1* by real-time PCR in co-MAC and FH-MAC under basal and lipid-loaded conditions.

The three chemokine receptors had a similar pattern of mRNA expression when compared FH- and control-groups. Thus, transcription levels of *CCR3*, *CCR4* and *CXCR1* were significantly higher in FH-MAC than in co-MAC, independently of the *in vitro* exposition to agLDL (**Figure 3**).

As shown in **Supplementary Table 4**, there was no correlation between plasma lipid levels and the expression levels of chemokine receptors, neither in FH- nor in co-MAC. On the contrary, mRNA levels of *CCR3*, *CCR4* and *CXCR1* in monocyte-derived macrophages significantly correlate with the age of the subject in the FH-group. In order to further test whether pro-inflammatory receptors had different expression levels depending on the years of exposition to high LDL levels, the results were analyzed according to median age of the entire study population (46 years old). As shown in **Figure 4**, monocyte-derived macrophages had significantly higher expression pattern of the chemokine receptors in FH-patients aged above 46 years old. However, age-dependent transcriptional changes were not seen in the non-FH control group (**Figures 4A-C**). LDL-cholesterol levels did not differ significantly between the age- groups, neither in FH-patients nor in control subjects (**Figure 4D**). Similarly no differences were found in hsPCR (**Figure 4E**) and Lp(a) (**Figure 4F**) levels. In addition, miR-505-3p expression correlates with the age of the patients of FH-group (<46 years old: 0.8 ± 0.04 vs >46 years old: 0.7 ± 0.01 ; $p=0.012$) that control subjects (<46 years old: 1.1 ± 0.1 vs >46 years old: 0.9 ± 0.1 ; $p=0.67$).

In silico analysis, using the different public algorithms and databases described in the methods section and the Ingenuity Pathway Analysis platform, predicts that transcriptional levels of *CCRA*, *CCR3* and *CXCR1* are upregulated by a decrease of miR-505-3p through an increased expression of *RUNX1* (Runt Related Transcription Factor 1), transcription factor that act by binding to the promoter and enhancer region of different genes. In addition, *TBX21* is a potential target gene to regulate *RUNX1* (**Figure 5A**). To proof this *in silico* prediction, we analyzed *RUNX1* by quantitative PCR, at baseline in the FH- and control groups and as shown in **Figure 5B**, *RUNX1* was significantly increased in FH-MAC compare to co-MAC (1.3fold, $p=0.014$).

DISCUSSION

Patients with heterozygous familial hypercholesterolemia (FH), usually caused by mutations in the gene encoding the LDL receptor, are characterized by increased serum levels of total cholesterol and LDL from birth onwards^{43,44}. FH-patients have increased rate of atherosclerosis progression and a high risk of myocardial infarction at young age, which has been largely related to their long term exposure to high plasma cholesterol levels^{45,46}. However, recent studies support the view that FH patients also are characterized by enhanced inflammation^{8,47,48}. This occurring despite long-term cholesterol lowering treatment⁴⁹. Up to now, the molecular effectors and mechanisms that drive a persistent inflammatory phenotype in FH are poorly characterized.

The link between LDL cholesterol, inflammation and atherosclerosis is supported by a large body of clinical and experimental evidence^{45,50}. In the present study, we provide for first time evidence that monocyte-derived macrophages of FH-patients retain after 7 days in culture a pro-inflammatory pattern, characterized by higher transcriptional levels of the chemokine receptors *CCR3*, *CCR4*, and *CXCR1* than those in age-matched non-FH controls. This coordinated increase in the chemokine receptor levels went a long with a lower expression of the miR-505-3p. Interactions between miRNAs and individual chemokines or chemokine receptors have been predicted *in silico* and experimentally validated in different studies¹⁰. Here, we have shown that human macrophages transfected with agomiR-505-3p had a downregulated expression of several key genes mediating inflammatory processes, the top-3 changes being the chemokine receptors *CCR3*, *CCR4*, and *CXCR1*. Supporting this finding, low miR-505 levels has been related to active ulcerative colitis, a major condition of chronic intestinal inflammation associated to a dysregulated immune response⁴². More recently, miRNA Illumina deep sequencing of serum samples from patients diagnosed with primary biliary cirrhosis has highlighted the down-regulated expression of miR-505-3p as clinical biomarker of this autoimmune disease³⁹.

In silico analysis depicted the transcription factor RUNX1 as the link between chemokine receptors *CCR3*, *CCR4* and *CXCR1* and miR-505-3p in a process mediated by *TBX21* also predicted target gene for miR-505-3p using different search algorithms and database. Supporting of these prediction results, monocyte-derived macrophages had increased RUNX1 mRNA levels compared to the non-FH controls. In agreement

with this finding Kong et al demonstrated the involvement of RUNX1 the in transcriptional regulation of the *CCR3* gene in Jurkat cells⁵¹.

The chemokine superfamily serves to coordinate a variety of immune system functions and is well known for its key role regulating leukocyte trafficking during inflammation⁵². Studies using mouse models with genetic alterations in the chemokine receptor system suggest that chemokines and their receptors are relevant players during different stages of atherosclerosis development^{52,53}. In human vessels, *CCR3* and its ligand eotaxin are overexpressed in atherosclerotic plaques, being the receptor *CCR3* mainly localized in macrophage-rich regions and eotaxin in vascular smooth muscle cells⁵⁴, which suggest that eotaxins (*CCL11*, *CCL24*, *CC126*) signalling through *CCR3* modulate macrophage function. Moreover, interleukin-8 receptors *CXCR1* and *CXCR2* are elevated in peripheral blood cells in obstructive coronary artery disease⁵⁵.

Over the last years has evolved the opinion that therapeutic interventions in form of chemokine receptors blockade may provide novel therapeutic strategies in cardiovascular disease. Clinical trials and experimental studies support the anti-inflammatory properties of statins⁵⁶. In this respect, simvastatin inhibits the expression of different chemokine receptors including *CCR4* at the mRNA level, *via* inhibition of the geranylgeranylpyrophosphate pathway, in isolated human endothelial cells and macrophages in *in vitro* studies⁵⁷. However, in the present study, macrophages of patients with FH retained a pro-inflammatory profile characterized by increased levels of *CCR3*, *CCR4* and *CXCR1* chemokine receptors despite long-term statin treatment (median of 15 years). Accordingly to our results, Holven *et al* reported increased expression of several TNF related genes in peripheral blood mononuclear cells isolated from statin-treated FH-patients⁵⁰.

Increased expression levels of *CCR3*, *CCR4* and *CXCR5* and downregulation of miR505-3p in macrophages did not correlate with the LDL plasma at the inclusion time, but interestingly the levels of chemokine receptors and miR505-3p were dependent on the age of the FH-subjects, with a consistent pro-inflammatory pattern in those above the median value of the entire population. It is relevant to note that this age-dependent pro-inflammatory pattern was not observed in macrophages of non-FH subjects, clearly suggesting a chronic inflammatory pattern of the monocyte-cell lineage related to lifetime exposition to high LDL levels in FH-patients.

The novel concept of trained innate immunity¹⁹ supports the view that monocyte may build an immunological memory consequence of long-lasting epigenetic reprogramming, leading to augmented pro-inflammatory response²⁰. Thus, it has been described that monocytes can adopt long-term pro-inflammatory phenotype after brief exposure to microbial products⁵⁸. In the context of hypercholesterolemia, the impact of cumulative risk exposure on susceptible tissues and vessels might strongly account for the higher susceptibility to premature atherosclerosis and cardiovascular events in FH. In this respect, we have recently reported that FH patients have a significant activation of the leukocyte-cell lineage with increased levels of circulating cell-derived microparticles of monocyte origin containing activation markers²¹. None of the FH-patients included in the study achieved the therapeutic LDL target level according to clinical guidelines⁵⁹. However, FH-age groups did not differ either in plasma LDL levels as they did not do in plasma hsPCR levels. The fact that the gold standard inflammatory marker, hsCRP, did not correlate with the pattern of chemokines receptors in macrophages in FH patients suggest that although systemic inflammatory can be regulated by the statin treatment, as seen in the Jupiter trial⁶⁰, local cell activation is not.

In conclusion, we show for first time that cells of the innate immunity system in FH patients have an inflammatory background characterized by increased levels of chemokine receptors CCR3, CCR4 and CXCR1 and downregulated levels of miR-505-3p, which is dependent on the life-time exposure of the patients to high LDL-cholesterol levels despite long-term aggressive lipid lowering therapy. Thus, our results suggest that novel therapeutic strategies beyond that of statins are needed to better protect heterozygous FH patients.

REFERENCES

1. Packard RRS, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: From vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin. Chem.* 2008. p. 24–38.
2. Hansson GK. Mechanisms of disease: inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;**352**:1685–1696.
3. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;**340**:115–126.
4. Behrendt D, Ganz P. Endothelial function. *Am J Cardiol* 2002;**90**:L40–L48.
5. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;**105**:1135–1143.
6. Escate R, Padro T, Badimon L. LDL accelerates monocyte to macrophage differentiation: Effects on adhesion and anoikis. *Atherosclerosis* 2016;**246**:177–186.
7. Soutar AK, Naoumova RP. Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007;**4**:214–225.
8. Wijk DF Van, Sjouke B, Figueroa A, Emami H, Valk FM Van Der, Macnabb MH, Hemphill LC, Schulte DM, Koopman MG, Lobatto ME, Verberne HJ, Fayad ZA, Kastelein JJP, Mulder WJM, Hovingh GK, Tawakol A, Stroes ESG. Nonpharmacological lipoprotein apheresis reduces arterial inflammation in familial hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol Journal of the American College of Cardiology*; 2014;**64**:1418–1426.
9. Escate R, Padro T, Borrell-Pages M, Suades R, Aledo R, Mata P, Badimon L. Macrophages of genetically characterized familial hypercholesterolaemia patients show up-regulation of LDL-receptor-related proteins. *J Cell Mol Med* 2016;**20**:1–13.
10. Hartmann P, Schober A, Weber C. Chemokines and microRNAs in atherosclerosis. *Cell Mol Life Sci* 2015;**72**:3253–3266.
11. Viola A, Luster AD. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008;**48**:171–197.
12. Li X, Zhu M, Penfold ME, Koenen RR, Thiemann A, Heyll K, Akhtar S, Koyadan S, Wu Z, Gremse F, Kiessling F, Zandvoort M Van, Schall TJ, Weber C, Schober A. Activation of CXCR7 limits atherosclerosis and improves hyperlipidemia by increasing cholesterol uptake in adipose tissue. *Circulation* 2014;**129**:1244–1253.
13. Rousselle A, Qadri F, Leukel L, Yilmaz R, Fontaine JF, Sihn G, Bader M, Ahluwalia A, Duchene J. CXCL5 limits macrophage foam cell formation in atherosclerosis. *J Clin Invest American Society for Clinical Investigation*; 2013;**123**:1343–1347.
14. Alexiou P, Vergoulis T, Gleditsch M, Prekas G, Dalamagas T, Megraw M, Grosse I, Sellis T, Hatzigeorgiou AG. miRGen 2.0: a database of microRNA genomic information and regulation. *Nucleic Acids Res* 2010;**38**:D137–41.
15. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;**116**:281–297.
16. Urbich C, Kuehbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases,

- inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2008;**79**:581–588.
17. Madrigal-Matute J, Rotllan N, Aranda JF, Fernández-Hernando C. MicroRNAs and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2013;**15**:322.
 18. Andreou I, Sun X, Stone PH, Edelman ER, Feinberg MW. miRNAs in atherosclerotic plaque initiation, progression, and rupture. *Trends Mol Med Elsevier*; 2015;**21**:307–318.
 19. Netea MG, Quintin J, Meer JWM Van Der. Trained immunity: A memory for innate host defense. *Cell Host Microbe*. Elsevier; 2011. p. 355–361.
 20. Bekkering S, Joosten L, Netea MG, Riksen NP. Trained innate immunity as a mechanistic link between sepsis and atherosclerosis. *Crit Care BioMed Central*; 2014;**18**:645.
 21. Suades R, Padró T, Alonso R, López-Miranda J, Mata P, Badimon L. Circulating CD45+/CD3+ lymphocyte-derived microparticles map lipid-rich atherosclerotic plaques in familial hypercholesterolaemia patients. *Thromb Haemost* 2014;**111**:111–121.
 22. Mata N, Rodrigo A, Badimón L, Padró T, Fuentes F, Muñiz O, Perez-Jiménez F, López-Miranda J, Díaz JL, Vidal JI, Barba A, Piedecausa M, Sanchez JF, Irigoyen L, Guallar E, Ordovas JM, Mata P. Clinical characteristics and evaluation of LDL-cholesterol treatment of the Spanish Familial Hypercholesterolemia Longitudinal Cohort Study (SAFEHEART). *Lipids Health Dis* 2011;**10**:94.
 23. Gehi AK, Ali S, Na B, Whooley MA. Self-reported medication adherence and cardiovascular events in patients with stable coronary heart disease: the heart and soul study. *Arch Intern Med* 2007;**167**:1798–1803.
 24. Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, Boysen G, Burell G, Cifkova R, Dallongeville J, Backer G De, Ebrahim S, Gjelsvik B, Herrmann-Lingen C, Hoes A, Humphries S, Knapton M, Perk J, Priori SG, Pyörälä K, Reiner Z, Ruilope L, Sans-Menendez S, Scholte op Reimer W, Weissberg P, Wood D, Yarnell J, Zamorano JL, Walma E, Fitzgerald T, Cooney MT, Dudina A. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary: Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (Constituted by r. *Eur Heart J* 2007;**28**:2375–2414.
 25. Wierzbicki AS, Humphries SE, Minhas R. Familial hypercholesterolaemia: summary of NICE guidance. *BMJ* 2008;**337**:a1095.
 26. Alonso R, Defesche JC, Tejedor D, Castillo S, Stef M, Mata N, Gomez-Enterria P, Martinez-Faedo C, Forga L, Mata P. Genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia using a DNA-array based platform. *Clin Biochem* 2009;**42**:899–903.
 27. Friedewald W, Levy R, Fredrickson D. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;**18**:499–502.
 28. Alonso R, Mata N, Castillo S, Fuentes F, Saenz P, Muñiz O, Galiana J, Figueras R, Diaz JL, Gomez-Enterria P, Mauri M, Piedecausa M, Irigoyen L, Aguado R, Mata P. Cardiovascular disease in familial hypercholesterolaemia: influence of low-density lipoprotein receptor mutation type and classic risk factors.

- Atherosclerosis* 2008;**200**:315–321.
29. Mozas P, Castillo S, Tejedor D, Reyes G, Alonso R, Franco M, Saenz P, Fuentes F, Almagro F, Mata P, Pocoví M. Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in Spain: identification of 39 novel and 77 recurrent mutations in LDLR. *Hum Mutat* 2004;**24**:187.
 30. Tejedor D, Castillo S, Mozas P, Jiménez E, López M, Tejedor MT, Artieda M, Alonso R, Mata P, Simón L, Martínez A, Pocoví M. Reliable low-density DNA array based on allele-specific probes for detection of 118 mutations causing familial hypercholesterolemia. *Clin Chem* 2005;**51**:1137–1144.
 31. Tejedor D, Castillo S, Mozas P, Jiménez E, López M, Tejedor MT, Artieda M, Alonso R, Mata P, Simón L, Martínez A, Pocoví M. Comparison of DNA array platform vs DNA sequencing as genetic diagnosis tools for familial hypercholesterolemia. *Clin Chem* 2006;**52**:1971–1972.
 32. Borrell-Pagès M, Romero JC, Badimon L. LRP5 negatively regulates differentiation of monocytes through abrogation of Wnt signalling. *J Cell Mol Med* 2014;**18**:314–325.
 33. Eligini S, Crisci M, Bono E, Songia P, Tremoli E, Colombo GI, Colli S. Human monocyte-derived macrophages spontaneously differentiated in vitro show distinct phenotypes. *J Cell Physiol* 2013;**228**:1464–1472.
 34. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955;**34**:1345–1353.
 35. Guyton JR, Klemp KF, Mims MP. Altered ultrastructural morphology of self-aggregated low density lipoproteins: coalescence of lipid domains forming droplets and vesicles. *J Lipid Res* 1991;**32**:953–962.
 36. 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**:1572–1579.
 37. 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**:387–393.
 38. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;**95**:351–358.
 39. Griffiths-Jones S, Saini HK, Dongen S van, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 2008;**36**:D154–158.
 40. Noordzij M, Dekker F, Zoccali C, Jager K. Sample size calculations. *Nephron Clin Pract* 2010;**118**:c319–c323.
 41. Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**:12481–12486.
 42. Wu F, Guo NJ, Tian H, Marohn M, Gearhart S, Bayless TM, Brant SR, Kwon JH. Peripheral blood MicroRNAs distinguish active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2011;**17**:241–250.
 43. Brown M, Goldstein J. Expression of the familial hypercholesterolemia gene in

- heterozygotes: mechanism for a dominant disorder in man. *Science* (80-) 1974;**85**:61–63.
44. Goldstein JL, Brown MS. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 1974;**249**:5153–5162.
 45. Badimon L, Padró T, Vilahur G. Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease. *Eur Hear journal Acute Cardiovasc care* SAGE Publications; 2012;**1**:60–74.
 46. Marais AD. Familial hypercholesterolaemia. *Clin Biochem Rev The Australian Association of Clinical Biochemists*; 2004;**25**:49–68.
 47. Holven KB, Myhre AM, Aukrust P, Hagve TA, Ose L, Nenseter MS. Patients with familial hypercholesterolaemia show enhanced spontaneous chemokine release from peripheral blood mononuclear cells ex vivo. *Eur Heart J* 2003;**24**:1756–1762.
 48. Narverud I, Ueland T, Nenseter MS, Retterstøl K, Telle-Hansen VH, Halvorsen B, Ose L, Aukrust P, Holven KB. Children with familial hypercholesterolemia are characterized by an inflammatory imbalance between the tumor necrosis factor α system and interleukin-10. *Atherosclerosis* 2011;**214**:163–168.
 49. Altman R. Risk factors in coronary atherosclerosis athero-inflammation: the meeting point. *Thromb J BioMed Central*; 2003;**1**:4.
 50. Holven KB, Narverud I, Lindvig HW, Halvorsen B, Langslet G, Nenseter MS, Ulven SM, Ose L, Aukrust P, Retterstøl K. Subjects with familial hypercholesterolemia are characterized by an inflammatory phenotype despite long-term intensive cholesterol lowering treatment. *Atherosclerosis* 2014;**233**:561–567.
 51. Kong S-K, Kim BS, Hwang SM, Lee HH, Chung IY. Roles of RUNX1 and PU.1 in CCR3 Transcription. *Immune Netw The Korean Association of Immunologists*; 2016;**16**:176–182.
 52. Messal M El, Beaudoux J-L, Drissi A, Giral P, Chater R, Bruckert E, Adlouni A, Chapman MJ. Elevated serum levels of proinflammatory cytokines and biomarkers of matrix remodeling in never-treated patients with familial hypercholesterolemia. *Clin Chim Acta* 2006;**366**:185–189.
 53. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998;**394**:894–897.
 54. Haley KJ, Lilly CM, Yang JH, Feng Y, Kennedy SP, Turi TG, Thompson JF, Sukhova GH, Libby P, Lee RT. Overexpression of eotaxin and the CCR3 receptor in human atherosclerosis: using genomic technology to identify a potential novel pathway of vascular inflammation. *Circulation* 2000;**102**:2185–2189.
 55. Leonard DA, Merhige ME, Williams BA, Greene RS. Elevated expression of the interleukin-8 receptors CXCR1 and CXCR2 in peripheral blood cells in obstructive coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 2011;**22**:491–496.
 56. Antonopoulos AS, Margaritis M, Lee R, Channon K, Antoniadis C. Statins as anti-inflammatory agents in atherogenesis: molecular mechanisms and lessons

--

- from the recent clinical trials. *Curr Pharm Des* 2012;**18**:1519–1530.
57. Veillard NR, Braunersreuther V, Arnaud C, Burger F, Pelli G, Steffens S, Mach F. Simvastatin modulates chemokine and chemokine receptor expression by geranylgeranyl isoprenoid pathway in human endothelial cells and macrophages. *Atherosclerosis* 2006;**188**:51–58.
 58. Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, Joosten LAB, Ifrim DC, Saeed S, Jacobs C, Loenhout J van, Jong D de, Stunnenberg HG, Xavier RJ, Meer JWM van der, Crevel R van, Netea MG. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;**109**:17537–17542.
 59. Catapano AL, Graham I, Backer G De, Wiklund O, Chapman MJ, Drexel H, Hoes AW, Jennings CS, Landmesser U, Pedersen TR, Reiner Ž, Riccardi G, Taskinen M-R, Tokgozoglu L, Verschuren WMM, Vlachopoulos C, Wood DA, Zamorano JL. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. *Eur Heart J* 2016;
 60. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH, Genest J, Gotto AM, Kastelein JJP, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ, JUPITER Study Group. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med* 2008;**359**:2195–2207.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. FH-phenotype effect induces a decrease of miR-505-3p expression

Differential expression was obtained by Real-time PCR in macrophage without (basal) or with (agLDL) 100µg/mL agLDL for 24 hours from control (N=20) and FH group (N=62). **(A)** Specifics inflammatory miRNAs from array study. **(B)** Differential expression of inflammatory miRNAs from array study. Bars represent mean±SEM of expression level in relative units x100 for both groups in triplicate. Only p-values <0.05 are shown.

Figure 2. AgomiR-505-3p effect on inflammatory genes in lipid loaded macrophage

The cells were transfected with agomiR-505-3p or NC (negative control) during 24 hours before stimulus with agLDL for 24 hours. By comparing, gene expression is shown in volcano plot. The X-axis represents \log_2 (fold change) and Y-axis represents $-\log_{10}$ (p-value). Threshold for gene expression is >50% down-regulated (> -0.58 , [$\log_2 (1/1.5)$]) and up-regulated (> 0.58 , [$\log_2 (1.5)$]). Threshold for statistical significance is >1.30 [$-\log_{10} (0.05)$]. Both thresholds are shown in grey line. The grey dotted line shows no change by the agomiR. B2M was used as endogenous for RT² Profiler PCR Arrays. The genes with a $-\log_{10}$ (p-value) >1.30 are identified by numbers in the table. Dots represent mean of 5 independent donors.

Figure 3. CCR3, CCR4 and CXCR1 expression in macrophage from FH-patients

Gene expression in macrophage without (basal) or with (agLDL) 100µg/mL agLDL for 24 hours from controls (N=20) and FH patients (N=62). Bars represent mean±SEM of expression level for both groups in duplicated. Only p-values <0.05 are shown.

Figure 4. *CCR3*, *CCR4* and *CXCR1* expression related with age

Gene expression in macrophage without (basal) agLDL from controls (N=20) and FH patients (N=62). (A, B and C) The chemokine receptor expression and (D) Plasma LDL cholesterol, (E) hs-CRP, (F) Lp(a) levels are associated with the median obtained by age from controls plus FH-patients (46 years old), as cut-off. Gene expressions were performed in duplicate. Bars represent mean \pm SEM of expression level for both groups. Only p-values <0.05 are shown.

Figure 5. *RUNX1* expression in macrophage from FH-patients

(A) By *in silico* analysis, interaction network is activated by overexpression of *CCR3*, *CCR4* and *CXCR1* (Red color). The high intensity of orange has a better predictive power to be up-regulated by *RUNX1*. *TSX21* is the potential target gene for miR-505-3p that regulating *RUNX1*. The molecules are localized by cell distribution. Line: Direct association. M: Membrane, C: Cytoplasm, N: Nucleus. (B) Gene expression of *RUNX1* in macrophage without agLDL from controls (N=20) and FH patients (N=62). Bars represent mean \pm SEM of expression level for both groups in duplicated.

Figure 1

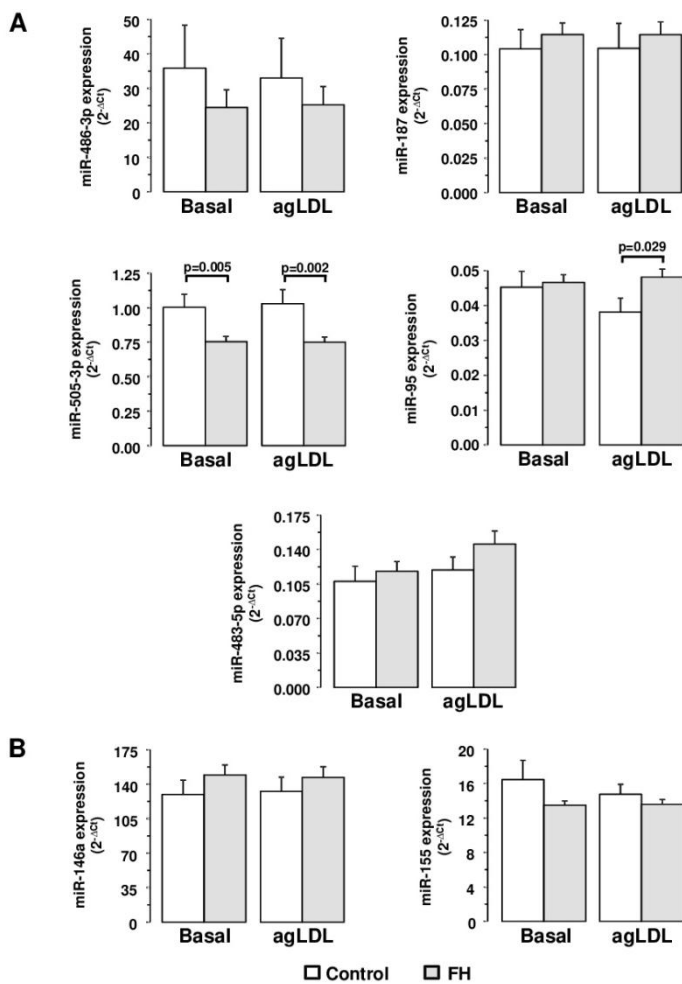
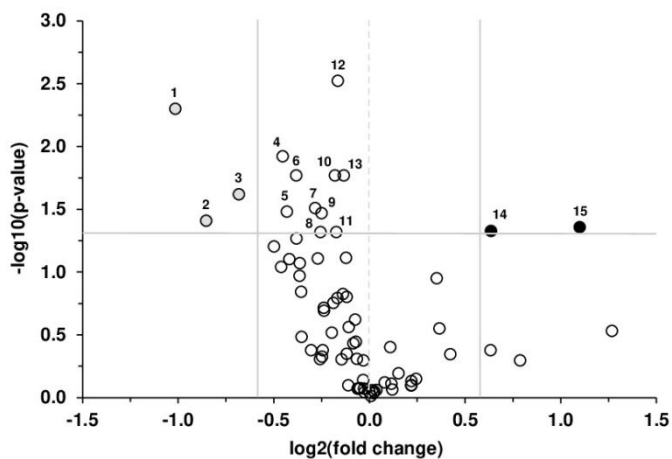


Figure 2



Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Genes	CCR3	CCR4	CXCR1	LTB	ITGB2	CSF1	TLR6	IL10RB	NFKB1	IL23A	CD40	TOLLIP	TIRAP	CCL2	CCL5
Fold	-2.021	-1.807	-1.605	-1.369	-1.348	-1.304	-1.217	-1.194	-1.189	-1.132	-1.127	-1.121	-1.097	1.553	2.141
p-value	0.005	0.039	0.024	0.012	0.033	0.017	0.031	0.048	0.034	0.017	0.048	0.003	0.017	0.047	0.044

Figure 3

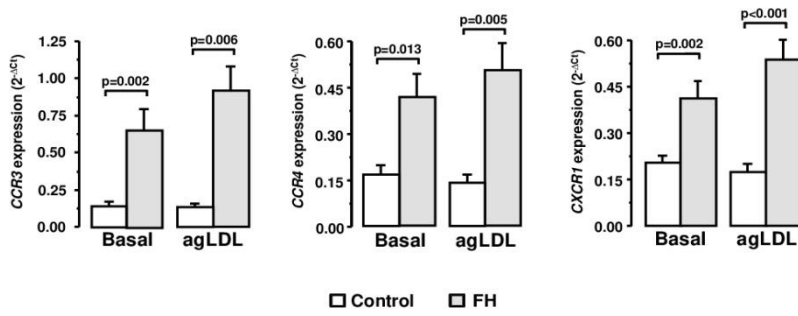


Figure 4

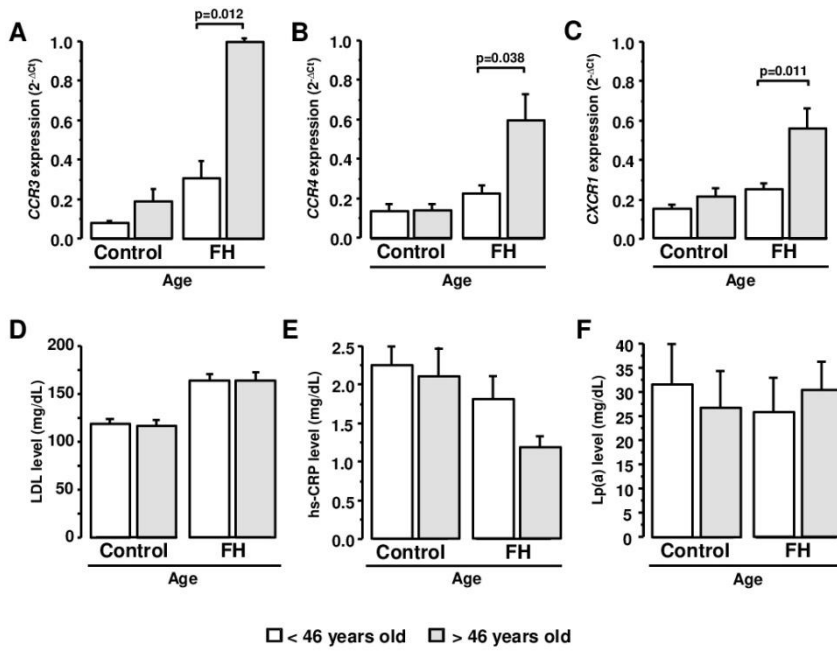
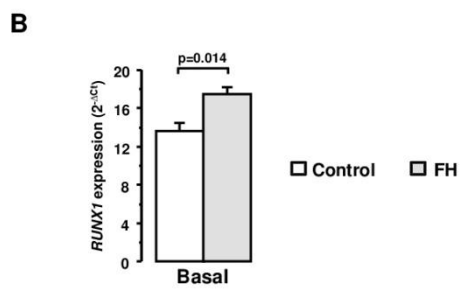
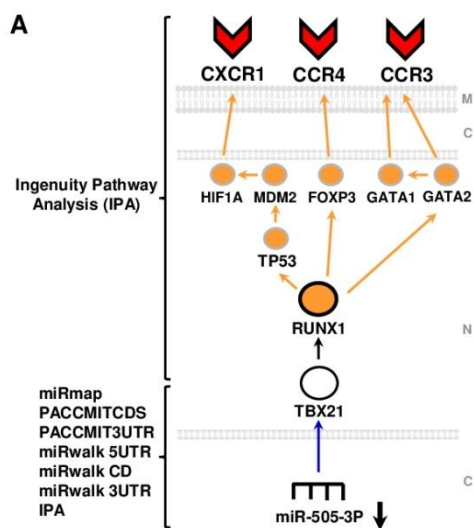


Figure 5



Supplementary Content

**Chemokine receptors and miR-505-3p are differential expressed in
macrophages of genetically characterized familial
hypercholesterolemia patients.**

Escate R *, Badimon L*[#], Padro T*

* Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC), IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain;

[#] Cardiovascular Research Chair, UAB, Barcelona, Spain

Address for correspondence:

Dr. Teresa Padró

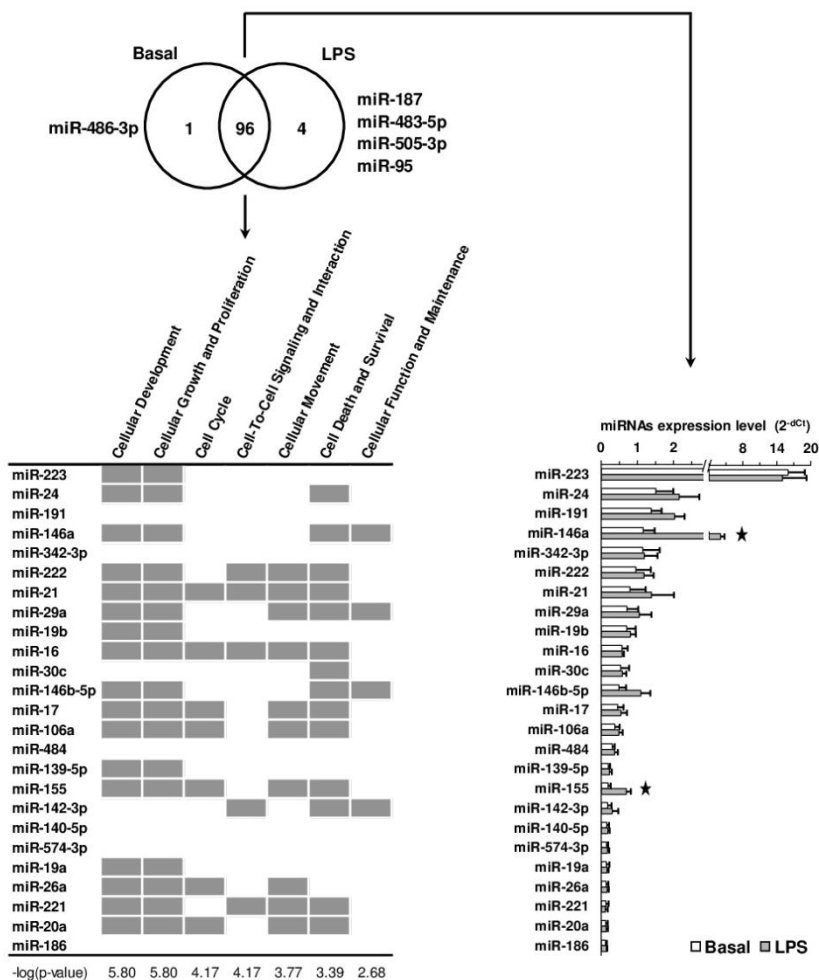
Cardiovascular Research Center,

c/Sant Antoni M^a Claret 167, 08025 Barcelona, Spain.

Phone: +34.935565886.

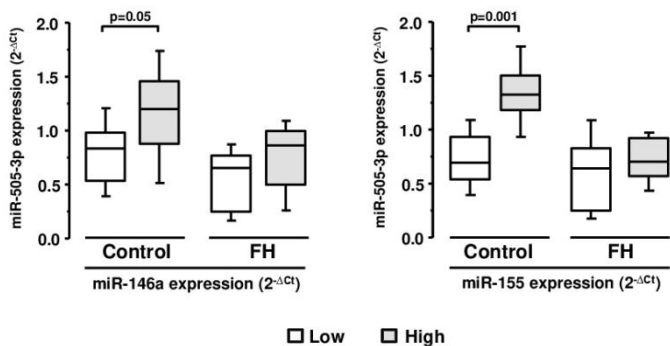
Fax: +34.935565559.

E-mail: tpadro@csic-iccc.org



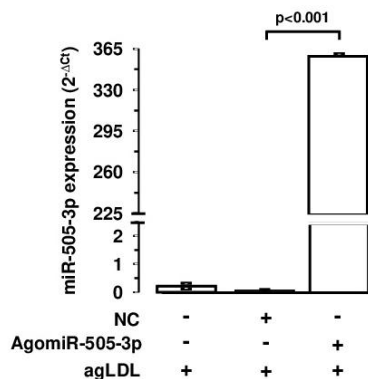
Supplementary Figure 1. MiRNA expression profile

MiRNA expression profile was obtained by array from human monocyte-derived macrophage without (Basal) or with LPS (1 μ g/mL) for 24 hours. Venn diagram shows the distribution of miRNAs. From 96 miRNAs expressed in presence and absence of LPS, the first twenty five are associated with the top seven cell function (Dark square). Bars represent mean \pm SEM of expression level from first twenty five miRNAs in 3 independent donors by triplicate. Only p-values <0.05 are shown.

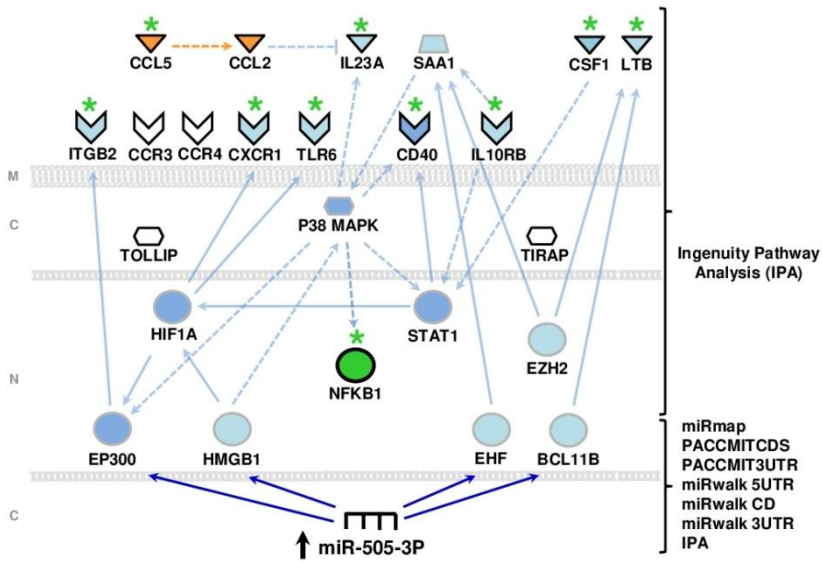


Supplementary Figure 2. Expression level of miR-505-3p associated with miR-146a and miR-155

The miRNAs expression corresponds to macrophages from controls and FH-patients in absence of 100µg/mL agLDL. MiR-505-3p expression levels are associated with high or low values respect to the median of entire study population for the expression of miR-146a (28.4) and miR-155 (146) in relative units x100, as cutt-off. MiRNA expressions were performed in triplicate. p-values <0.05 are shown.



Supplementary Figure 3. AgomiR-505-3p treatment in lipid loaded macrophage
 Macrophages of 5 independent donors are stimulated with agomiR-505-3p or NC (negative control) or none for 24 hours before adding 100µg/mL agLDL for 24 hours. Results are shown in mean±SEM. Only p-values <0.05 are shown.



Supplementary Figure 4. Inflammatory genes by NFKB1-dependent signaling

Decreased NFKB1 expression (green color) show a predictive effect for regulating the network activity. The high intensity of blue has a better predictive power to be down-regulated. In contrast, the high intensity of orange has a better predictive power to be up-regulated. Asterisks (green) denote genes regulated by NFKB1 within the network of inflammatory genes down-/up-regulated by miR-505-3p overexpression. EP300, HMGB1, EHF, and BCL11B are potential target genes of miR-505-3p. The molecules are localized by cell distribution. Whole line: Direct association. Dotted line: Indirect association. M: Membrane, C: Cytoplasm, N: Nucleus.

Supplementary Table 1. Clinical characteristics of healthy subjects (Control group) and FH patients (FH group) for studies on monocyte-derived of macrophage.

	Control <i>n</i> =20	FH <i>n</i> =62	Statistics
Age (years, mean, range)	47 ± 3	46 ± 2	p=0.888
Male/Female, <i>n</i>	11/9	31/31	p=0.697
Body mass index (Kg/m ² , mean, range)	25.6 ± 1.1	26.9 ± 0.7	p=0.483
Waist to height ratio (mean, range)	0.53 ± 0.02	0.56 ± 0.01	p=0.329
Risk factors for CVD, <i>n</i>(%)			
Diabetes mellitus	0 (0%)	3 (4.8%)	p=0.316
Hypertension	1 (5%)	6 (9.7%)	p=0.515
Obesity	4 (20%)	13 (21%)	p=0.325
Current tobacco consumption	8 (40%)	19 (30.6%)	p=0.438
Biochemical analysis (mean ± SEM)			
* Total cholesterol (mg/dL)	188.3 ± 4.6	243.6 ± 7.4	p<0.001
* LDL (mg/dL)	117.6 ± 4	176.7 ± 6.8	p<0.001
* HDL (mg/dL)	47.2 ± 2.6	49 ± 1.3	p=0.496
* Non-HDL (mg/dL)	141.1 ± 4	195 ± 7.4	p<0.001
* TC/HDL ratio	4.2 ± 0.2	5.2 ± 0.2	p=0.003
* Triglyceride (mg/dL)	135.9 ± 23.6	89.3 ± 6.5	p=0.063
* High-sensitive CRP (mg/dL)	2.1 ± 0.4	1.5 ± 0.2	p=0.457
* Lp(a) (mg/dL)	28.3 ± 7.9	28.4 ± 4.4	p=0.668
* Fasting plasma glucose (mg/dL)	80.2 ± 2.4	81.4 ± 1.7	p=0.756
Lipid-lowering therapy, <i>n</i>(%)			
Statins	9 (45%)	62 (100%)	p<0.001
Ezetimibe	0 (0%)	2 (1.2%)	p=0.416
Statin treatment time (years, mean, range)	3 ± 1	15 ± 1	p<0.001

Supplementary Table 1. Clinical characteristics of healthy subjects (Control group) and FH patients (FH group) for studies on monocyte-derived of macrophage.

Control group: healthy subjects with or without lipid-lowering therapy; FH group: FH patients; Obesity: Body mass index >30; LDL: low-density lipoprotein; HDL: high-density lipoprotein; TC: total cholesterol and CRP: C-reactive protein.

Database	Links
miRmap	http://mirmap.ezlab.org/
PACCMITCDS	
PACCMIT3UTR	http://pacmit.epfl.ch/
miRwalk 5UTR	
miRwalk CD	http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/
miRwalk 3UTR	
IPA (Ingenuity Pathway Analysis)	http://www.ingenuity.com/products/ipa

Supplementary Table 2. Tools for *in silico* analysis

Database used *in silico* analysis for predicting the best target genes for miR-505-3p and molecular interactions.

RESULTADOS

Database	Source	Target genes for binding to miR-505-3p
IPA		
PA CCMIT3UTR	3	CACNB4, DHX15, TMEM133
miRmap		
miRmap		
miRw alk 3UTR	1	UBL3
miRw alk 5UTR		
IPA		
miRmap	1	AMMECR1L
miRw alk 3UTR		
IPA		
PA CCMITCDS	1	ACOX1
miRw alk 3UTR		
IPA	28	CLMP, SUL1E1, NXN, SLC16A14, CCDC125, ABL2, VGLL3, TBX5, EIF3A, WDR35, ABAT, PGR, SEC63, CREBRF, AFF4, WDR37, SLC30A7, CBX5, C11orf84, DENND5B, SLC25A31, RBM43, PHLD82, MSANTD4, CTCF, ZNF445, HMGB1, FAM174B
miRmap		
PA CCMITCDS	6	DAB2, CDH13, ADAR, ALDH1B1, DMXL1, ATP2B1
miRw alk 3UTR		
PA CCMITCDS	3	RNF38, ABCO5, FREM2
miRw alk 3UTR		
IPA	3	RNF41, BA PI, DDX17
PA CCMITCDS		
IPA	14	SPTY2D1, TEX261, SLITRK4, USP32, MYCN, LRP1B, MYH10, CAP1, TSPAN33, NCK2, ANKRD40, MAGED1, C3orf170, GLCE
PA CCMIT3UTR		
IPA	1	AFB2
miRw alk CDS		
IPA		
miRw alk 3UTR	5	USP47, MAP3K3, MBS2, SAP25, FAM209B
miRmap	48	FRF40A, ACS33, PTN, KIAA1324L, KPNA4, ASXL3, PUM2, VKORC1L1, KLF7, ASCL4, PTPN11, RHOU, LHX4, GAN, MBNL1, SLC25A32, CYSLTR2, MGAT4C, WDR19, NPSA2, SNX30, SLC26A9, MYO10, TMED10, KLHDC5, ATFB, POC1B-GALNT4, PUF8, JAK3, GNPAT, CCDC144A, FLJ1, PTGS1, GPR68, ZNF705A, PCDH11X, RRP15, ZC3H12C, ZBTB39, DIS3, CRLF3, TRMT11, AMD1, NUDT21, PYURF, GALNT4, STT3B, C2CD4A
PA CCMITCDS	186	ANKS1A, SLMAP, TAGLN, DUSP12, LRRIC4, STOX1, MACF1, L3MBTL, PGP, MNAT1, EP300, MRPS35, CHD9, DSP, ASPM, SMARCD1, PIK3C2B, BBS9, PCDH21, C3orf63, HECTD1, PTPRZ1, ACTR10, RFWO2, FAM171B, ATAD2, TRPM6, SLC8A1, EPB41L2, BRG6, DDH1, PPP3CA, DYNC1L1L, LIG2, FBIN2, GHR, PTPRF, SEC24B, GTPBP4, FAM44A, EF4A1, KIAA1383, TTC28, MAGE2, MYCBP2, DHX38, ABCA1, SAVID13, NEL3, MASP2, KL, OR7D4, HTATIR2, PK3CB, PXDN, TRPM1, SLC12A6, EPBB2P, HSPA12B, ADAMTS16, MICAL2, NLGN1, FAT2, WDR32, GDI1, USP34, OR4C16, SBNP7, APLP2, CAPS2, ZNF318, TM2D2, C15orf39, PRX, RGS, PCDHGA8, GPR171, DCUN1D3, VPS41, MED14, PRKAA1, STAU1, PSDM4, FAT3, KONJ13, HCF1, AHNAK, SR1, DSOG3, JMJID1C, ELOVL7, ZFYV16, HSPH1, HUWE1, TUBA1, CA TSPEB, GPR112, RAB12, GABRB3, TBX21, O9orf126, RSPRY1, MED12L, DNAH8, MYBPC3, FBXO4, SLC9A7, RARGEF2, OR56B4, MLL3, CDH7, GLT25D2, NAT15, NT5C2, SFOCK3, FAM21B, MAP3B, NCK1, SCRNI1, LFL, TBC1D25, BRSK1, UNC13C, JHDM1D, OR2A14, STK32A, RAB15, HSD17B12, ASOC2, MLL2, ARFGF2, STSIA2, PLD5, DYX1C1, ASB5, DCHS1, FRKDC, ATP9A2, HEPACAM2, TOX, MTF2, WWP2, ZNF326, PRM2C, DNA2, ITF57, HERC3, GTP3C1, HHFL2, SCFD1, RAB18, ZNFX1, PF5K2B, KCTD3, XPOT, CSMD1, SLC4A7, SEC24A, VPS13C, UA PI, USP28, FBNI, MARK4, NRD1, FLIL, NPA2, COCH, RNF128, TNFR, CRB1, CHD1L, CDH20, RPRD2, CXorf38, CAPZB, MMP12, SEC22A, UBE2T, GPR61, CD109, UBE4A, FAM171A2, FER1L6, THSD7B, ENTPD5, RAPIGDS1
PA CCMIT3UTR	21	CYP26A1, GRB10, C10orf22, UBLCP1, O6orf174, TM6SF2, NTNG1, MTF1, TMPO, AZIN1, EYA1, C11orf17, TMTC4, KIAA1128, FAM160B2, CSNK2A2, FAM122B, NMT2, EPC1, CEP170L, MAGI1
miRw alk 3UTR	45	ERBB4, ZNF785, FT122, HC2, LYG1, NSMCE4A, ERG, A TXN10, POGF3, GRM8, GFSM1, KPNA2, ZNF43, MGAT4B, PAQR8, IFT140, CDC42BPA, KATNA1, GEMIN7, SLC17A3, ANKRD50, BANP, XRNI, SLC39A2, RBM6, SORBS2, LYNX1, DZANK1, FXN, CUTC, DND1, FOXPI1, C14orf159, MPP2, XKRX, CDC26, GDF1, KDM2B, CHTF18, STK33, FRMPD2, TBC1D3, ZNF383, GPR110, ZBED5
miRw alk CDS	43	DLG1, CACNA1D, COL9A1, C1S, COL11A2, ATP5O, ANXA3, ADRA2B, COL4A4, CLCN5, C3, CAD, AGL, ACAT2, CHD3, APOB, CDH2, CA2, C2, D2, CYLD, RUNX2, A CVR2A, ASP4, VCAN, CYP19A1, LYST, LRBA, CHUK, ATP6V1A, AP2B1, CDH6, CTNNA2, APC, DKC1, CSF1R, ARNTL, OSGIN2, CLTC, COL12A1, CCR7, CASP3, DHX9
miRw alk 3UTR	38	FRSMD9, HMG63, TDFP2, EPT1, CLN8, PFKFB2, PA X6, SOG2, OTUD4, SORT1, SLC2A3, SGT4, PIGR, MARK10, KAL1, TMEM170B, TCF4, ARS D, MARK9, LONRF2, NRF1, CDHR1, SIM1, ZFAND5, PH5, CNOT8, KIAA1244, PIGG, CD200, WDR26, STK38, C1orf116, AKT3, SAMD5, ERC1, FOXK1, PARR8, HDLBP
IPA	225	SAMD4A, KCNMA1, MYBL1, MEF2D, SLC10A7, BHF, CLSTN1, BTLA, NUCKS1, PRR23C, RPA4, IKZF2, CYTH1, MIER1, ADGRES, EPN2, PTPRE, H3F3A/H3F3B, ANAPC11, KIA A0408, FMR1, C5orf63, GTF2E1, FAM209A, KIAA2022, SLC31A1, USP6, FOXN3, SPI00, ARHGAP7, SH3TC2, CPEB2, LCLAT1, ENOX2, ZNF704, TENM4, INTS6, FOXK2, ZNF197, GMP, TIMM10, MED17, UBE3B, FAM192A, GEMIN8, CACNA1E, SKP1, PGRMC2, PAFAH1B1, ZNF385B, USP14, COL15A1, DNAJ4, ANKRD13C, CHD2, RBM24, CREB1, HNRNPDL, A DAT2, MYT1L, BNY2, TBR1, IFNG, SOGA3, KCJ-SCHIP1, ATOH8, SLC8A3, SCH2A, CHBK1, TSHZ3, ARFGF3, ARL13B, GNAT1, PEX3, MZT1, FAM76B, TMPPRS11E, FLEKHB2, HNRNPDM, C2orf72, DHDDS, CELF1, IGF1R, KLB, GTF3C4, IQSEC1, LBST, LRRRC1, EPHA5, PAFAH1B2, GLYR1, FSCB, SNRK, RGY, WDHD1, IRF6, OR51E1, MARCF5, SLC7A14, KCMF1, OTUD5, MD1, GABRG1, PI4K2C, HEY1, ESYT2, KRT17, FAM126B, ASH1L, ZOCHC24, NRIF3, VAPA, C7orf60, SOX6, KLF6, CADM1, SRT3, SCHP1, OPA1, COL4A6, FLRT3, FMN1, BRWD3, RBM53, MORF4L2, C2orf68, ZMYND11, CELF5, AKP1, MESS1, METTL4, IL1A, SLC2A4RG, CFAF44, TCF7L2, DENND4C, PSMB2, SAMD8, KIT, NCOA2, MAMLL3, CANX, FLEKHM3, RHPN2, HOOK1, GD4, ICA1L, EPS15, NOVVA1, FZD3, LGSN, EF2S2, SPATA13, BTBD9, C1orf52, TPM1, SEMA5A, RBM27, PGW, NRG2, IL11, RFX4, ARID4B, DNMI1L, DCAF7, KCNIP2, TMOD2, GRA4, MDM1, CSNK1D, PDSS2, CEP44, DCTN5, MAP2K4, TMEM263, PMP22, ELK3, TBP, GP08, NHEJ1, CYP46A1, TRPS1, BNC2, AMOT, PRKAG2, MCTP2, LDOC1, BCL11B, NRG1, GAB1, FBXO32, CSNK1A1, WNT7B, CCDC178, NDP, ZNF133, RNF138, ZNF675, SP4, ZNF292, RFTN2, ANO6, FUT10, MAPK11PL, ACTN2, BEND4, PND, COND3, STK17B, CLASP2, PTPN8, LRRFP1, GPR75, FKTN, ELOVL4, MED23, SAV1, UBE2QL1, SYAP1, SF1, FAM619B, BBX, ANGP22, CACNA2D3, SLC4A10

Supplementary Table 3. List of potential target for miR-505-3p

Genes predicted to be regulated post-transcriptionally by miR-505-3p distributed according to database

		Age		LDL (mg/dL)	
		Correlation	p-value	Correlation	p-value
Control	CCR3	0.35	0.21	0.18	0.53
	CCR4	-0.16	0.57	0.01	0.99
	CXCR1	0.2	0.48	-0.17	0.56
FH	CCR3	0.29	0.03	-0.07	0.59
	CCR4	0.27	0.04	-0.06	0.63
	CXCR1	0.3	0.02	-0.1	0.46

Supplementary Table 4. Multiple correlations between chemokine receptors, age and LDL levels from controls and FH-patients

Correlations between the expression level of the chemokine receptors and age for both groups.

V. DISCUSIÓN GLOBAL

La aterosclerosis, principal causa subyacente de enfermedad cardiovascular, es consecuencia de complejas interacciones autocrinas y paracrinas entre componentes celulares de la sangre y pared vascular, así como de componentes moleculares presentes en ambos compartimentos. Nuestro conocimiento sobre la aterosclerosis ha avanzado considerablemente y actualmente está ampliamente aceptado que el sistema inmunitario y los procesos inflamatorios tienen una función clave durante el desarrollo de la placa aterosclerótica. Sin embargo, desconocemos todavía muchos de los mecanismos moleculares y celulares que conllevan a un estado inflamatorio persistente en la íntima vascular durante el desarrollo de las lesiones.

Los monocitos y macrófagos son componentes celulares relevantes en el sistema de inmunidad innata y juegan una función preponderante en el inicio, progresión y complicación de las lesiones. Concentraciones elevadas de colesterol transportado por la fracción LDL tienen una función inmunoestimulante en la aterogénesis y promueven la quimiotaxis y adhesión de monocitos al endotelio disfuncional y su infiltración al espacio intravascular donde se diferencian a macrófago^{282,283}.

En el marco de esta Tesis Doctoral se han investigado los mecanismos celulares y moleculares regulados por concentraciones elevadas de LDL (rango patológico en el plasma hipercolesterolémico humano) en relación al proceso de diferenciación de monocito a macrófago (*Artículo 1*). En base a estudios en cultivos celulares se ha demostrado que niveles aterogénicos de LDL (180 mg/dL), en su forma nativa, estimula la diferenciación de monocito a macrófago, ocasionando cambios prematuros en su morfología celular así como en su perfil fenotípico, especialmente en lo que refiere al nivel de expresión CD14. Esta glicoproteína de membrana considerada como un marcador de monocito, debido al mayor número de moléculas expresadas en la superficie de

estas células⁵⁷. Los monocitos refieren de hecho a una población heterogénea, con características funcionales específicas para cada una de ellas. Cada subpoblación contribuye de forma distinta al proceso inflamatorio y persistente que se produce en la íntima arterial²⁸⁴ durante el desarrollo de la placa arteriosclerótica. Esta Tesis, mediante técnicas de citometría de flujo, se ha puesto en evidencia la disminución del nivel de expresión de células CD14⁺ y el incremento del subtipo CD14^{dim} CD16⁺ en monocitos expuestos a concentraciones aterogénicas de LDL durante los primeros estadios de diferenciación a macrófago. Este subtipo ha sido referenciado por exhibir propiedades inflamatorias y proaterogénicas debido a su capacidad de interactuar con el endotelio vascular y su tendencia a sobreexpresar receptores de quimioquinas²⁸⁵. Es además interesante destacar, que monocitos expuestos a LDL durante el proceso de diferenciación a macrófago, muestran una disminución del marcador de superficie CD163, siendo la disminución especialmente evidente en el fenotipo CD14^{dim} CD16⁺, lo que se asocia con una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo y menor capacidad ateroprotectora^{186,286}. Estos resultados sugieren que un perfil proaterogénico en el monocito/macrófago por efecto de elevadas concentraciones de LDL, se inicia desde las fases tempranas del proceso de diferenciación.

Los subtipos de monocitos con la expresión de CD16 en la superficie se han asociado al fenotipo de macrófagos tisulares⁷⁷. Así pues, junto a nuestros resultados del CD14, esto da soporte que la LDL estimula la diferenciación de monocito a macrófago. En estudios clínicos, la expresión de CD16 en monocitos de sujetos con hipercolesterolemia familiar se ha correlacionado con niveles bajos de HDL. Por el contrario, se ha descrito una correlación directa entre la presencia de monocitos con fenotipo CD16⁺ y los valores de colesterol total y triglicéridos, sugiriendo que los subtipos de monocitos ricos en CD16⁺ se asocian a perfiles

lipídicos proaterogénicos²⁸⁷. Por tanto, nuestros resultados junto con aquellos de otros autores, sugieren nuevas vías de interacción entre la disregulación del metabolismo lipídico, la inmunidad innata y la aterosclerosis.

Entre las diferentes células de inmunidad innata, la capacidad de resistencia a la apoptosis es una característica que diferencia al macrófago tisular del monocito²⁸⁸. La apoptosis celular implica una compleja trama de efectores y vías de señalización que regulan tanto el proceso que desencadena la muerte celular como el mecanismo efector que vehiculiza que esta se produzca.

Uno de los aspectos evaluados en el marco de esta Tesis fue determinar si niveles aterogénicos de LDL afectan a la capacidad de resistencia celular a la apoptosis durante la fase temprana de diferenciación de monocito a macrófago. En este sentido, nuestros resultados pusieron en evidencia que ni la expresión de BAX ni BCL2, marcadores altamente establecidos en el balance de señales pro y antiapoptóticas de la vía intrínseca^{289,290}, se ve afectada por los niveles de LDL. De forma similar, la integridad de la membrana celular determinada por el marcaje con anexina V - yoduro de propidio no sufre modificaciones significativas en presencia de niveles aterogénicos de LDL. Estos resultados sugieren que la viabilidad celular no está condicionada por niveles patológicos de LDL. Estos resultados, sin embargo, no permiten excluir posibles efectos mediados a través de la vía extrínseca, mecanismo por el cual las células adherentes pueden sufrir procesos de apoptosis debidos a una disminución de interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, lo que se conoce como anoikis.

El DR5, es uno de los receptores de muerte de la vía extrínseca que está involucrado directamente en la anoikis celular a través de moléculas como las caspasas CASP8 y CASP3¹¹⁰. El DR5 se encuentra en una forma

precursora (pre-DR5) y otra madura (m-DR5) que se diferencian entre ellas por la presencia de un péptido de 55 aminoácidos en su extremo N-terminal^{291,292}. La anoikis está además regulada por integrinas que median la interacción célula-célula y célula-matriz extracelular. Mediante esta Tesis se ha puesto en evidencia que las LDL inducen una disminución del contenido proteico de la forma precursora de DR5 en el monocito en fase de diferenciación, mientras que no producen ese efecto sobre el nivel de mRNA, lo que sugiere la idea de una regulación post-transcripcional del gen DR5 por efecto de la LDL.

Entre los posibles mecanismos implicados en procesos de regulación postranscripcional, los miRNAs, moléculas de RNA no codificante entre 20-25 bases de longitud, han emergido en los últimos años como represores específicos de expresión génica y por ello de regulación post-transcripcional. De hecho, se presume que más del 60% de los genes codificantes de proteínas en células humanas están regulados por miRNAs. Cada vez un mayor número de evidencias ponen de manifiesto que los miRNAs están relacionados con el proceso aterosclerótico, ya sea como posibles marcadores o como reguladores de los componentes celulares involucrados en el desarrollo de las lesiones^{293,294}. Análisis en *in silico* predicen el miR-126-3p como el mejor candidato implicado en regulación postranscripcional de DR5 y de hecho en monocitos humanos la expresión del miR-126-3p (miR-126) se incrementa sostenidamente por efecto de la LDL mientras que los niveles proteicos de pre-DR5 se hallan disminuidos. Confirmando los resultados de esta Tesis, el miR-126 se ha asociado con niveles plasmáticos elevados de LDL en individuos con factores de riesgo para la enfermedad aterocoronaria²⁹⁵. Por otro lado, el miR-126 se ha involucrado en la regulación de motilidad celular y de interacción célula-célula procesos de neovascularización²⁹⁶.

Las LDL inducen, además, una disminución en los niveles de caspasa 8 (CASP8) y de la forma precursora de caspasa 3 (CASP3). Estos resultados sugieren un aumento en la capacidad de resistencia a la anoikis durante la diferenciación del monocito a macrófago cuando se halla expuesto a concentraciones elevadas de LDL, proceso que ocurre en el subendotelio vascular durante las primeras fases de desarrollo de la lesión arteriosclerótica. Las integrinas, es otro de los componentes moleculares que condicionan directamente el proceso de anoikis, ya que regulan la adhesión celular al substrato subyacente y las interacciones célula-célula²⁹⁷. Dentro de la familia de integrinas, la $\alpha 3\beta 1$ es relevante por regular la resistencia a anoikis en células diferenciadas¹²². De hecho, la subunidad $\alpha 3$ (CD49c) no se detecta prácticamente en el monocito humano, mientras que se expresa de forma muy marcada en el macrófago generado tras varios días de diferenciación *in vitro*. El hecho de que el monocito, aún en una fase temprana de diferenciación presente ya niveles de CD49c similares al macrófago diferenciado da soporte a la opinión generada a partir del trabajo de esta Tesis de que las LDL estimulan la expresión de moléculas de adhesión celular y disminuyen los efectores de apoptosis, de forma que regulan anoikis en monocitos. Este efecto de las LDL se traduce en un aumento en la supervivencia celular del macrófago en etapas tempranas de diferenciación.

Hay que destacar que uno de los procesos clave en el inicio y la progresión de la lesión arteriosclerótica es la retención y acúmulo de LDL en el espacio subendotelial²⁹⁸. Debido a su interacción con los proteoglicanos y proteínas de la matriz extracelular que favorecen su modificación (agregación, glucosilación, proteólisis enzimáticas, oxidaciones, etc.), lo que incrementa su aterogenicidad¹⁴⁻¹⁶ y conlleva a la activación de procesos de inflamación local y de la respuesta de inmunidad innata, de la cual los principales componentes celulares a nivel de pared vascular son

monocitos y macrófagos^{160,299}. Las LDL modificadas por agregación (agLDL) son, además, potentes inductoras del acúmulo intracelular masivo de ésteres de colesterol en macrófagos, de modo que adquieren un fenotipo de célula espumosa^{47,128,300,301}, con una sobreexpresión de la respuesta inflamatoria^{160,299}.

Es conocido que el colesterol acumulado en las diferentes lesiones ateroscleróticas proviene en su mayoría de las partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL) circulantes. En zonas de la pared vascular con predisposición a las lesiones ateroscleróticas, con una permeabilidad aumentada, la hipercolesterolemia plasmática está asociada con un aumento de transcitosis de LDL a través del endotelio vascular y acumulación en el espacio subendotelial. A este respecto, los individuos que padecen hipercolesterolemia familiar (FH), patología debida mayoritariamente a un desorden genético en el receptor de las LDL (LDLR), se caracterizan por presentar niveles circulantes excesivamente elevados de LDL desde la infancia y una alta predisposición al desarrollo prematuro de la aterosclerosis y enfermedad cardiovascular²⁶⁶. De hecho, se han descrito manifestaciones clínicas cardiovasculares a edades tempranas, entre 25 y 40 años, en sujetos con FH³⁰². Hasta ahora, sin embargo, los factores celulares y moleculares asociados a tal riesgo no están bien caracterizados.

La internalización celular de LDL en el macrófago humano se ha asociado a la función de diferentes componentes de la “Familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad”, entre ellos LDLR, LRP1, LRP5 y LRP6^{47,48,146,303}. Molecularmente, estos receptores presentan dominios comunes. Sin embargo, sus niveles de expresión y su disponibilidad en la superficie celular están regulados de forma diferente dependiendo de los niveles de colesterol. Así, las LDL en su forma nativa son internalizadas

específicamente por el LDLR, receptor cuya expresión esta modulada negativamente por el contenido de colesterol intracelular³⁰⁴. Por el contrario, nuestro grupo ha demostrado que las formas agregadas de LDL son internalizadas mayoritariamente en el macrófago a través del LRP1 y LRP5⁴⁸.

En base a estos estudios previos, esta Tesis se planteó investigar el perfil de expresión de los diferentes componentes de la “Familia de receptores LDL” en macrófagos derivados de monocitos así como en la fracción de células leucocitarias circulante (PBL) de sujetos FH, expuestos de forma crónica a niveles elevados de LDL, relacionando los resultados con el fenotipo celular, capacidad de internalizar lípidos y su posible relevancia como condicionante del elevado riesgo de enfermedad coronaria prematura en esta población (*Artículo 2*).

El estudio ha puesto por primera vez en evidencia que la fracción PBL en sujetos FH jóvenes heterocigotos para mutaciones en el receptor LDLR, presentan niveles elevados de expresión de LRP5 en la fracción PBL de pacientes FH, comparado con sujetos control sanos o con pacientes con hipercolesterolemia secundaria (sc-HC). El LRP6, homólogo para el LRP5 y con un solapamiento en sus funciones³⁰⁵, también presenta un incremento en FH respecto a pacientes sc-HC. A diferencia de estos receptores, el LRP1 no muestra un patrón diferencial asociado a FH, lo que es consecuencia de una menor respuesta a los niveles de LDL plasmáticos. Esta menor sensibilidad del LRP1, podría explicar la aparente discrepancia con un estudio en pacientes con un alto grado de severidad para la FH (50% pacientes homocigotos) donde se observaron niveles incrementados de LRP1 en monocitos aislados^{78,306}. Corroborando los resultados con células humanas, estudios en modelo de ratón, muestran al *Lrp5* como el receptor con mayor respuesta en situaciones de hipercolesterolemia inducida por dieta.

De forma similar a lo observado en células circulantes, los macrófagos derivados de monocitos en pacientes FH presentan niveles de expresión de LRP5 más elevados que las células obtenidas de sujetos sanos. Este comportamiento que se manifiesta especialmente cuando las células se exponen a LDL agregadas no se observa para el receptor LRP1. Es interesante remarcar que el incremento de LRP5 en el macrófago-FH es mayor en aquellos pacientes que presentan niveles celulares de LDLR por debajo de la mediana de la población, efecto que una vez más no es evidente con el receptor LRP1.

A fin de descartar la relevancia de otros receptores en la internalización de LDL agregadas por el macrófago FH, analizamos CD36 y MARCO, receptores “scavengers” implicados en la captación de LDL modificadas. El hecho los individuos control y pacientes FH mostraron un perfil transcripcional similar en condiciones basales y en respuesta a la presencia de agLDL, esto refuerza el resultado de esta Tesis de que LRP5 es un receptor lipídico altamente activo en células inmunitarias en pacientes FH con mutaciones funcionales en el receptor LDL. Por ello se puede especular que el LRP5 promueve el aclaramiento de lípidos de la íntima arterial, contribuyendo eventualmente a la formación de la placa aterosclerótica, cuando la homeostasis del colesterol se encuentra saturada. Mediante técnicas de tinción de Herxheimer pusimos en evidencia el acúmulo intracelular de lípidos en macrófagos FH, en igual o mayor medida que en macrófagos control. De hecho, comparando con controles sanos, los macrófagos de pacientes FH presentan una menor expresión transcripcional de la proteína HMGCR, la cual está regulada negativamente por los niveles de colesterol intracelular^{127,306}.

Como prueba de concepto y a fin de corroborar la importancia del LRP5 en aterogénesis, se realizaron estudios en un modelo de ratón con hipercolesterolemia inducida por dieta. El análisis inmunohistoquímico de

la aorta mostró células con marcadores de macrófago y positivas para ApoB y LRP5 adheridas al endotelio vascular, sugiriendo al igual que ocurre en macrófagos humanos, una relación directa entre LRP5 y la internalización de lípidos. Estudios previos de nuestro grupo han puesto en evidencia que lesiones arterioscleróticas avanzadas humanas presentan un elevado contenido en LRP5 que se colocaliza con zonas ricas en macrófagos, identificadas mediante el marcador celular HAM56⁴⁸. Además, tanto en esta Tesis como en estudios anteriores⁴⁸ se ha demostrado mediante técnicas de silenciamiento la relevancia del LRP5 en la internalización de colesterol-LDL en el macrófago humano, y su mayor eficacia respecto al LRP1, lo que se ha atribuido una mejor capacidad de respuesta en condiciones de saturación lipídica⁴⁸.

Hasta ahora, sin embargo, la contribución del LRP5 en el proceso de aterosclerosis no está bien definida, pudiendo su función variar dependiendo del tipo celular donde se expresa. En modelos de ratón, animales deficientes para *Lrp5* y *ApoE* tiene mayores lesiones ateroscleróticas que aquellos únicamente *ApoE*^{-/-307}. Esta aparente controversia con nuestros resultados podría deberse a que la deficiencia de LRP5 impide la activación de la vía canónica de señalización por Wnt^{48,308}, la cual en macrófagos se asocia a motilidad celular a través de un mecanismo mediado por la beta-catenina³⁰⁹.

Los monocitos presentes en la íntima arterial pueden diferenciarse a macrófagos de varios subtipos, caracterizados por diferentes epítopes de superficie y receptores de membrana. Un estudio reciente de nuestro grupo ha puesto en evidencia niveles de LRP5 más elevados en macrófagos derivados de los monocitos CD14⁺CD16⁺, que en macrófagos derivados de monocitos proinflamatorios que carecen de CD16¹⁷⁹. Los macrófagos CD16⁺ usualmente se relacionan con el fenotipo M2, también caracterizado por presentar CD163³¹⁰, un receptor “scavenger”

involucrado en el catabolismo de la hemoglobina mediante del aumento de la expresión de HMOX1, lo que confiere protección frente a procesos de estrés oxidativo¹⁸⁶.

La presencia de CD163 en macrófagos de lesiones ateroscleróticas humanas está asociada con propiedades antiinflamatorias. Además, estudios en ratón *ApoE*^{-/-} relacionan la regresión de la placa aterosclerótica con la presencia de macrófagos CD163⁺. El macrófago, sin embargo, es una célula de elevada plasticidad, con un fenotipo y funciones que se adaptan en respuesta de las señales externas. Hay que destacar que los macrófagos de pacientes FH presentan una disminución significativa en la expresión de CD163 cuando se exponen a LDL agregadas, efecto que no se evidencia en individuos sanos. Por ello se sugiere una pérdida del efecto ateroprotector mediado por HMOX1 en el macrófago del paciente FH. De hecho, los pacientes con el fenotipo de FH más severo (FH nulos) y que por ello están expuestos a niveles más elevados de LDL, tienen una menor expresión transcripcional del CD163 en macrófagos. Este resultado corrobora además la disminución que hemos observado en la expresión de CD163, estadios tempranos diferenciación de monocito a macrófago en presencia de niveles aterogénicos de LDL (*Artículo 1*). De igual forma, la fracción PBL en ratón hipercolesterolémico presenta una tendencia a niveles más bajos de CD163, efecto que no se observa en animales deficientes para *Lrp5*. El aumento de LRP5 y disminución de CD163 en macrófagos FH podrían inducir de forma complementaria señales aterogénicas en el sistema de inmunidad innata, favoreciendo con ello el desarrollo prematuro de lesiones. La condición de hiperlipemia, como factor de riesgo aterogénico en la clínica del paciente FH ha sido estudiada ampliamente. Estudios de tomografía por emisión de positrones han proporcionado evidencia de que en los pacientes FH hay una mayor inflamación arterial en comparación a controles sanos. Esta inflamación

disminuye de forma muy aparente en pacientes sometidos a tratamiento de aféresis de lipoproteínas³¹¹.

Típicamente la respuesta de inmunidad innata no muestra una activación a largo plazo. Sin embargo, recientemente se ha sugerido el concepto de “memoria de inmunidad innata” que refiere al hecho de que las células de este sistema inmunitario pueden adoptar un fenotipo proinflamatorio persistente que se mantiene incluso después de haber cesado el estímulo que lo originó¹⁶⁴. Este comportamiento, descrito inicialmente en monocitos humanos expuestos *ex vivo* a diferentes microorganismos y derivados bacterianos^{312,313}, se ha relacionado también al proceso aterosclerótico. En este sentido se ha sugerido que la memoria de inmunidad innata puede inducirse también en presencia de niveles elevados de colesterol, bien sea en la pared arterial o en otros órganos como hígado y médula³¹⁴. En este sentido, trabajos recientes de nuestro grupo ponen en evidencia que pacientes FH, aun estando en tratamiento hipolipemiante según guías terapéuticas, presentan niveles de micropartículas circulantes derivadas de la fracción leucocitaria, con marcadores de activación celular³¹⁵, sugiriendo un proceso inflamatorio crónico en pacientes caracterizados por estar expuesto a niveles elevados de LDL desde la infancia y que podría contribuir al desarrollo prematuro de aterosclerosis. A pesar de que la importancia del proceso inflamatorio en aterosclerosis está ampliamente reconocido, existen todavía muchas incógnitas sobre los efectores y mecanismos moleculares involucrados. Por ello, como parte de esta Tesis Doctoral se ha caracterizado el perfil de miRNAs asociados a inflamación en macrófagos humanos derivados de monocitos, investigando, además, la importancia de los miRNAs candidatos y sus genes diana en macrófagos de pacientes FH, en relación a los niveles plasmáticos de LDL y el tiempo de exposición a las mismas (*Artículo 3*).

Mediante técnicas de PCR a tiempo real y utilizando un “array” que incluye 377 de los miRNAs mejor representados en célula humana, según la base de datos miRBase, se seleccionaron aquellos con una respuesta consistente frente al estímulo inflamatorio inducido por LPS. Entre ellos, el miR-505-3p mostró un comportamiento diferencial en macrófagos FH respecto a sujetos sin mutación en el gen LDLR y aparentemente sanos. Este comportamiento en FH se observa en células diferenciadas durante 7 días en condiciones *in vitro* y se mantiene tras su exposición a LDL modificadas por agregación durante un periodo de 24 horas. Resultado que apoya la hipótesis de que la célula de inmunidad innata en sujetos FH presenta características proinflamatorias que se mantienen tras cesar el estímulo desencadenante. Corroborando el estado proinflamatorio del macrófago-FH, se demostró que estas células presentan un aumento en la expresión transcripcional de los receptores de quimioquinas CCR3, CCR4 y CXCR1, modificación consistente con la disminución en el miR-505-3p que se observa en estas mismas células en comparación con los macrófagos control. De acuerdo con estos resultados, RUNX1, factor de transcripción identificado *in silico* como molécula reguladora del miR-505-3p en la expresión de CCR3, CCR4 y CXCR1, se encuentra también significativamente aumentada en macrófagos FH derivados de monocito tras 7 días de diferenciación *in vitro*.

La familia de quimioquinas refiere a un grupo de proteínas que coordinan diferentes funciones del sistema inmunitario y regulan procesos de migración de leucocitos en inflamación³¹⁶. En modelos murinos, la inhibición de las quimioquinas se asocia con la disminución de la carga aterosclerótica³¹⁷⁻³¹⁹. De hecho, CCR3 se expresa en lesiones ateroscleróticas humanas, en áreas con elevado contenido en macrófagos, mientras que su expresión es reducida en segmentos arteriales sin lesión³²⁰. Además, mediante técnicas de inmunohistoquímica se ha

observado la presencia de CCR3 en células musculares lisas y células mastoideas, componentes celulares del tejido vascular, relacionados con el desarrollo de la lesión³²⁰. CCR4 y su ligando CCL17 se encuentran presentes en lesiones avanzadas en modelo de ratón³²¹ y se ha descrito como diana terapéutica de tratamientos hipolipemiantes³²². La expresión de CCR4 tiene un efecto sobre el fenotipo del macrófago, influyendo en su actividad inflamatoria y respuesta fibrótica³²³.

Es interesante destacar que los niveles de expresión de receptores de quimioquinas y miR-505-3p en macrófagos FH no se ven afectados por la concentración plasmática de LDL en el momento de inclusión en el estudio. Por el contrario, están relacionados con la edad del paciente, encontrándose valores significativamente más elevados de CCR3, CCR4, y CXR1 y reducidos de miR-505-3p en el subgrupo con edad superior a la mediana de la población. Este efecto no se observa en el grupo control, lo que sugiere que los macrófagos de pacientes con mayor tiempo de exposición a niveles elevados de LDL tienen un perfil proinflamatorio más marcado, incluso estando en tratamiento hipolipemiante.

En resumen, los resultados de este trabajo contribuyen a conocer mejor componentes moleculares y mecanismos celulares que vinculan alteraciones del metabolismo lipídico con procesos inflamatorios derivados de células de inmunidad innata. Se demuestra que las LDL regulan la diferenciación de monocito a macrófago, células que en pacientes FH presentan una expresión aumentada del receptor LRP5, que se asocia a la internalización lipídica y en consecuencia a un perfil más aterogénico. Se pone, además, en evidencia que la exposición prolongada de células de inmunidad innata a un nicho hipercolesterolémico conlleva a un perfil proinflamatorio que se mantiene en el tiempo, en ausencia del estímulo lipídico.

VI. CONCLUSIONES

(1) La diferenciación de monocito a macrófago, en sus etapas iniciales, está estimulada por niveles aterogénicos de LDL.

- Las LDL inducen la expresión de moléculas de adhesión celular y disminuyen efectores apoptóticos de la vía del DR5 en monocitos en diferenciación, regulando la anoikis y procesos de supervivencia celular en macrófagos incipientes.
- El miR-126-3p, identificado *in silico* como regulador postranscripcional del DR5, se encuentra aumentado en monocitos expuestos a LDL durante la diferenciación a macrófago.
- Niveles aterogénicos de LDL favorecen la presencia de monocitos con fenotipo CD14^{dim}CD16⁺ y expresión reducida de CD163, receptor “scavenger” con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes.

(2) El receptor LRP5, involucrado en internalización de lípidos en células de inmunidad innata, se encuentra incrementado en pacientes con hipercolesterolemia familiar, caracterizados por mutaciones funcionales en el receptor LDLR.

- Leucocitos circulantes en pacientes FH jóvenes presentan mayor expresión de LRP5 que controles sanos emparejados por edad y sexo o pacientes con hipercolesterolemia secundaria.
- Macrófagos derivados de células mononucleares formadas y circulantes en un nicho de concentraciones elevadas de LDL, aunque presentan niveles disminuidos de LDLR, mantienen su función para internalizar lípidos.

- Los niveles de expresión transcripcional de LDLR y LRP5 correlacionan negativamente en macrófagos FH con elevada carga lipídica.
- La exposición de macrófagos de pacientes FH a LDL modificas por agregación lleva a una pérdida en la expresión del receptor CD163 comparado con sujetos control.

(3) Los macrófagos derivados de monocitos en pacientes FH, en tratamiento hipolipemiante según guías clínicas, presentan un fenotipo pro-inflamatorio caracterizado por un aumento en el perfil transcripcional de receptores de quimoquinas.

- El miR 505-3p, con respuesta a estímulos inflamatorios, se encuentra disminuido en macrófagos de pacientes FH, independientemente de la presencia de LDL.
- El fenotipo FH está asociado a un aumento transcripcional de los receptores de quimioquinas CCR3, CCR4, CXCR1, cuya expresión está regulada por miR 505-3p, según resultados de análisis *in silico*.
- Los niveles de expresión de receptores de quimioquinas y miR-505-3p en macrófago son dependientes de la edad en pacientes FH pero no en sujetos control, lo que sugiere un efecto asociado al tiempo de exposición a niveles elevados de LDL.

VII. PARTICIPACIÓN EN LOS ARTÍCULOS

La Prof. Lina Badimon y la Dra. Teresa Padró, como Directora y Codirectora de la tesis doctoral de Oscar Rafael Escate Chávez, certifican que la participación de la doctoranda en los artículos presentados en esta tesis ha sido la siguiente:

Artículo 1: Realizó los experimentos de las figuras (1, 2, 3, 4, 5), material suplementario (figura 2, 3, 4B, 6, 7; tabla 1 y 2) y participó en el diseño, interpretación, escritura y corrección del artículo.

Artículo 2: Realizó los experimentos de las tablas (1 y 2), figuras (1, 2A, 3, 4A y 4B), material suplementario (figura 1, 3; tabla 1, 2, 3 y 4) y participó en el diseño, interpretación, escritura y corrección del artículo.

Artículo 3: Realizó los experimentos de las figuras (1, 2, 3, 4 y 5) y material suplementario (figura 1, 2, 3 y 4; tabla 1, 2, 3 y 4) y participó en el diseño, interpretación, escritura y corrección del artículo.

Además, certifican que estas publicaciones no han sido incluidas en otra tesis doctoral.

Firmado,

Prof. Lina Badimon

Dra. Teresa Padró

VIII. BIOBLOGRAFÍA

1. Mackay, J. & Mensah, G. The Atlas of heart Disease and Stroke. *J. Hum. Hypertens.* **10**, 112 (2004).
2. Coccheri, S. Distribution of symptomatic atherothrombosis and influence of atherosclerotic disease on risk of secondary ischaemic events: Results from CAPRIE. *Eur Hear. J* **19**, 227 (1998).
3. World Health Organization. Global Health Estimates: Deaths by Cause, Age, Sex and Country, 2000-2012. Geneva, WHO, 2014.
4. Libby, P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**, 456S–460S (2006).
5. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **340**, 115–26 (1999).
6. Pepine, C. J. The effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial dysfunction: potential role in myocardial ischemia. *Am. J. Cardiol.* **82**, 23S–27S (1998).
7. Della Rocca, D. G. & Pepine, C. J. Endothelium as a predictor of adverse outcomes. *Clin. Cardiol.* **33**, 730–2 (2010).
8. Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233–41 (2000).
9. Stary, H. C. *et al.* A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis: A Report From the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* **92**, 1355–1374 (1995).
10. Badimon, J. J., Fuster, V., Chesebro, J. H. & Badimon, L. Coronary atherosclerosis. A multifactorial disease. *Circulation* **87**, II3-16 (1993).
11. Argüeso, R., Días, J., Rodríguez, A., Castro, M. & Diz-Lois, F. Lípidos , colesterol y lipoproteínas Lipids , cholesterol and lipoproteins. *Galicia Clínica / Soc. Galega Med. Interna* **72**, S7-17 (2011).
12. Segrest, J. P., Jones, M. K., De Loof, H. & Dashti, N. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J. Lipid Res.* **42**, 1346–67 (2001).
13. Bancells, C. *et al.* Proteomic analysis of electronegative low-density lipoprotein. *J. Lipid Res.* **51**, 3508–3515 (2010).
14. Orekhov, A. N., Bobryshev, Y. V., Sobenin, I. A., Melnichenko, A. A. & Chistiakov, D. A. Modified low density lipoprotein and lipoprotein-containing circulating immune complexes as diagnostic and prognostic biomarkers of atherosclerosis and type 1 diabetes macrovascular disease. *International Journal of Molecular*

- Sciences* **15**, 12807–12841 (2014).
15. Bhakdi, S. *et al.* On the pathogenesis of atherosclerosis: enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety. *J. Exp. Med.* **182**, 1959–1971 (1995).
 16. Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K. & Brown, M. S. 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.* **76**, 333–7 (1979).
 17. Öörni, K., Pentikäinen, M. O., Ala-Korpela, M. & Kovanen, P. T. Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions. *J. Lipid Res.* **41**, 1703–14 (2000).
 18. Camejo, G., Hurt-Camejo, E., Wicklund, O. & Bondjers, G. Association of apoB lipoprotein with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis* **139**, 205–222 (1998).
 19. Öörni, K., Hakala, J. K., Annala, A., Ala-Korpela, M. & Kovanen, P. T. Sphingomyelinase induces aggregation and fusion, but phospholipase A2 only aggregation, of low density lipoprotein (LDL) particles: Two distinct mechanisms leading to increased binding strength of LDL to human aortic proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **273**, 29127–29134 (1998).
 20. Gorshkova, I. N., Menschikowski, M. & Jaross, W. Alterations in the physicochemical characteristics of low and high density lipoproteins after lipolysis with phospholipase A2. A spin-label study. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **1300**, 103–113 (1996).
 21. Liu, H., Scraba, D. G. & Ryan, R. O. Prevention of phospholipase-C induced aggregation of low density lipoprotein by amphipathic apolipoproteins. *FEBS Lett.* **316**, 27–33 (1993).
 22. 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.* **18**, 738–46 (1998).
 23. Heinecke, J. W., Suits, A. G., Aviram, M. & Chait, A. Phagocytosis of lipase-aggregated low density lipoprotein promotes macrophage foam cell formation. Sequential morphological and biochemical events. *Arter. Thromb* **11**, 1643–1651 (1991).

24. Suits, A. G., Chait, A., Aviram, M. & Heinecke, J. W. Phagocytosis of aggregated lipoprotein by macrophages: low density lipoprotein receptor-dependent foam-cell formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 2713–7 (1989).
25. 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.* **22**, 387–93 (2002).
26. Stephen, S. L. *et al.* Scavenger receptors and their potential as therapeutic targets in the treatment of cardiovascular disease. *Int.J.Hypertens.* **2010**, 1–21 (2010).
27. Plüddemann, A., Neyen, C. & Gordon, S. Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods* **43**, 207–217 (2007).
28. Plüddemann, A., Mukhopadhyay, S. & Gordon, S. The interaction of macrophage receptors with bacterial ligands. *Expert Rev. Mol. Med.* **8**, 1–25 (2006).
29. Jeon, H. & Blacklow, S. C. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 535–562 (2005).
30. Li, Y., Cam, J. & Bu, G. Low-Density Lipoprotein Receptor Family; Endocytosis and Signal Transduction. *Mol. Neurobiol.* **23**, 53–67 (2001).
31. Go, G.-W. & Mani, A. Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *Yale J. Biol. Med.* **85**, 19–28 (2012).
32. Herz, J. & Strickland, D. K. LRP: A multifunctional scavenger and signaling receptor. *Journal of Clinical Investigation* **108**, 779–784 (2001).
33. Willnow, T. E., Nykjaer, A. & Herz, J. Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nat. Cell Biol.* **1**, E157-62 (1999).
34. Andersen, O. M., Dagil, R. & Kragelund, B. B. New horizons for lipoprotein receptors: communication by β -propellers. *J. Lipid Res.* **54**, 2763–74 (2013).
35. Stenmark, K. R. *et al.* The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 23–47 (2013).
36. Perrotta, I. Ultrastructural features of human atherosclerosis. *Ultrastruct. Pathol.* **37**, 43–51 (2013).

37. Stary, H. C. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1177–1178 (2000).
38. Bertomeu Ruiz, A. & Zambón Rados, D. La placa aterogénica: fisiopatología y consecuencias clínicas. *Med. Integr.* **40**, 394–405 (2002).
39. Moreno, P. R., Purushothaman, K. R., Fuster, V. & O'Connor, W. N. Intimomedial interface damage and adventitial inflammation is increased beneath disrupted atherosclerosis in the aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation* **105**, 2504–11 (2002).
40. Badimón, L., Vilahur, G. & Padró, T. Lipoproteínas, plaquetas y aterotrombosis. *Rev. Esp. Cardiol.* **62**, 1161–1178 (2009).
41. Vidal, F., Colomé, C., Martínez-González, J. & Badimon, L. Atherogenic concentrations of native low-density lipoproteins down-regulate nitric-oxide-synthase mRNA and protein levels in endothelial cells. *Eur. J. Biochem.* **252**, 378–84 (1998).
42. Liao, J. K., Shin, W. S., Lee, W. Y. & Clark, S. L. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **270**, 319–24 (1995).
43. Georgescu, A., Alexandru, N., Constantinescu, E. & Popov, D. Effect of gap junction uncoupler heptanol on resistance arteries reactivity in experimental models of diabetes, hyperlipemia and hyperlipemia-diabetes. *Vascul. Pharmacol.* **44**, 513–8 (2006).
44. Kunjathoor, V. V. Scavenger Receptors Class A-I/II and CD36 Are the Principal Receptors Responsible for the Uptake of Modified Low Density Lipoprotein Leading to Lipid Loading in Macrophages. *J. Biol. Chem.* **277**, 49982–49988 (2002).
45. Katsuda, S. & Kaji, T. Atherosclerosis and extracellular matrix. *J. Atheroscler. Thromb.* **10**, 267–74 (2003).
46. 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.* **20**, 1572–9 (2000).
47. 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.* **74**, 526–36 (2007).
48. Borrell-Pagès, M., Romero, J. C., Juan-Babot, O. & Badimon, L.

- Wnt pathway activation, cell migration, and lipid uptake is regulated by low-density lipoprotein receptor-related protein 5 in human macrophages. *Eur. Heart J.* **32**, 2841–50 (2011).
49. Virmani, R., Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Farb, A. & Schwartz, S. M. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1262–75 (2000).
 50. Badimón, L., Vilahur, G. & Padró, T. Lipoproteins, platelets and atherothrombosis. *Rev. española Cardiol.* **62**, 1161–78 (2009).
 51. Rudijanto, A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med. Indones.* **39**, 86–93 (2007).
 52. Ong, P., Athanasiadis, A., Borgulya, G., Voehringer, M. & Sechtem, U. 3-year follow-up of patients with coronary artery spasm as cause of acute coronary syndrome: the CASPAR (coronary artery spasm in patients with acute coronary syndrome) study follow-up. *J. Am. Coll. Cardiol.* **57**, 147–52 (2011).
 53. Whitelaw, D. M. Observations on Human Monocyte Kinetics After Pulse Labeling. *Cell Prolif.* **5**, 311–317 (1972).
 54. Van Furth, R. & Cohn, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* **128**, 415–35 (1968).
 55. Passlick, B., Flieger, D. & Ziegler-Heitbrock, H. W. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* **74**, 2527–34 (1989).
 56. Griffin, J. D., Ritz, J., Nadler, L. M. & Schlossman, S. F. Expression of myeloid differentiation antigens on normal and malignant myeloid cells. *J. Clin. Invest.* **68**, 932–941 (1981).
 57. Antal-Szalmas, P., Strijp, J. A., Weersink, A. J., Verhoef, J. & Van Kessel, K. P. Quantitation of surface CD14 on human monocytes and neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **61**, 721–728 (1997).
 58. Devitt, A. *et al.* Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* **392**, 505–509 (1998).
 59. Onozuka, K. *et al.* Participation of CD14 in the phagocytosis of smooth-type *Salmonella typhimurium* by the macrophage-like cell line, J774.1. *Microbiol. Immunol.* **41**, 765–772 (1997).
 60. Peterson, P. K. *et al.* CD14 receptor-mediated uptake of nonopsonized *Mycobacterium tuberculosis* by human microglia. *Infect. Immun.* **63**, 1598–1602 (1995).
 61. Delude, R. L. *et al.* CD14 enhances cellular responses to endotoxin

- without imparting ligand-specific recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9288–92 (1995).
62. Pugin, J. *et al.* CD14 Is a pattern recognition receptor. *Immunity* **1**, 509–516 (1994).
63. Haziot, A., Rong, G. W., Lin, X. Y., Silver, J. & Goyert, S. M. Recombinant soluble CD14 prevents mortality in mice treated with endotoxin (lipopolysaccharide). *J. Immunol.* **154**, 6529–32 (1995).
64. Ziegler-Heitbrock, H. Molecular mechanism in tolerance to lipopolysaccharide. *J. Inflamm.* **45**, 13–26 (1994).
65. Hoshino, K. *et al.* Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* **162**, 3749–52 (1999).
66. Matsushima, N., Miyashita, H., Enkhbayar, P. & Kretsinger, R. Comparative Geometrical Analysis of Leucine-Rich Repeat Structures in the Nod-Like and Toll-Like Receptors in Vertebrate Innate Immunity. *Biomolecules* **5**, 1955–1978 (2015).
67. Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* **2**, 675–80 (2001).
68. Lohmann, K. L., Vandenplas, M. L., Barton, M. H., Bryant, C. E. & Moore, J. N. The equine TLR4/MD-2 complex mediates recognition of lipopolysaccharide from *Rhodobacter sphaeroides* as an agonist. *J. Endotoxin Res.* **13**, 235–242 (2007).
69. Ravetch, J. V & Bolland, S. IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 275–90 (2001).
70. Li, X. *et al.* The unique cytoplasmic domain of human FcγRIIIA regulates receptor-mediated function. *J. Immunol.* **189**, 4284–94 (2012).
71. Garcia-Garcia, E. & Rosales, C. Fc Receptor Signaling in Leukocytes: Role in Host Defense and Immune Regulation. *Curr. Immunol. Rev.* **5**, 227–242 (2009).
72. Rossol, M., Kraus, S., Pierer, M., Baerwald, C. & Wagner, U. The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum.* **64**, 671–7 (2012).
73. Tacke, F. & Randolph, G. J. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* **211**, 609–18 (2006).
74. Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D. R. Blood Monocytes

- Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity* **19**, 71–82 (2003).
75. Auffray, C. *et al.* Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* **317**, 666–70 (2007).
 76. Ziegler-Heitbrock, L. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 584–92 (2007).
 77. Ziegler-Heitbrock, H. W. *et al.* The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur. J. Immunol.* **23**, 2053–8 (1993).
 78. Mosig, S. *et al.* Different functions of monocyte subsets in familial hypercholesterolemia: potential function of CD14⁺ CD16⁺ monocytes in detoxification of oxidized LDL. *FASEB J.* **23**, 866–74 (2009).
 79. Häkkinen, T., Karkola, K. & Ylä-Herttuala, S. Macrophages, smooth muscle cells, endothelial cells, and T-cells express CD40 and CD40L in fatty streaks and more advanced human atherosclerotic lesions. Colocalization with epitopes of oxidized low-density lipoprotein, scavenger receptor, and CD16 (Fc γ₂ ga. *Virchows Arch.* **437**, 396–405 (2000).
 80. Berenson, G. S. *et al.* Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *N. Engl. J. Med.* **338**, 1650–6 (1998).
 81. Boisseau, M. R. Roles of mechanical blood forces in vascular diseases. A clinical overview. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **33**, 201–7 (2005).
 82. Weber, C. & Noels, H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat. Med.* **17**, 1410–22 (2011).
 83. Moore, K. J., Sheedy, F. J. & Fisher, E. a. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 709–21 (2013).
 84. Mirakaj, V. *et al.* Repulsive guidance molecule-A (RGM-A) inhibits leukocyte migration and mitigates inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 6555–60 (2011).
 85. Ly, N. P. *et al.* Netrin-1 inhibits leukocyte migration in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 14729–34 (2005).
 86. Korff, T., Braun, J., Pfaff, D., Augustin, H. G. & Hecker, M. Role of ephrinB2 expression in endothelial cells during arteriogenesis: impact on smooth muscle cell migration and monocyte

- recruitment. *Blood* **112**, 73–81 (2008).
87. Van Gils, J. M. *et al.* Endothelial expression of guidance cues in vessel wall homeostasis dysregulation under proatherosclerotic conditions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 911–9 (2013).
88. Unanue, E. R. & Allen, P. M. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science (80-.)*. **236**, 551–557 (1987).
89. Mayernik, D. G., Ul-Haq, A. & Rinehart, J. J. Differentiation-associated alteration in human monocyte-macrophage accessory cell function. *J Immunol* **130**, 2156–2160 (1983).
90. Karnovsky, M. L. & Lazdins, J. K. Biochemical criteria for activated macrophages. *J Immunol* **121**, 809–813 (1978).
91. Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K. B. & Dockrell, D. H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One* **5**, e8668 (2010).
92. Musson, R. A. Human serum induces maturation of human monocytes in vitro. Changes in cytolytic activity, intracellular lysosomal enzymes, and nonspecific esterase activity. *Am. J. Pathol.* **111**, 331–340 (1983).
93. Becker, S., Warren, M. K. & Haskill, S. Colony-stimulating factor-induced monocyte survival and differentiation into macrophages in serum-free cultures. *J. Immunol.* **139**, 3703–9 (1987).
94. Pabst, M. J., Hedegaard, H. B. & Johnston, R. B. Cultured human monocytes require exposure to bacterial products to maintain an optimal oxygen radical response. *J. Immunol.* **128**, 123–8 (1982).
95. Mangan, D. F. & Wahl, S. M. Differential regulation of human monocyte programmed cell death (apoptosis) by chemotactic factors and pro-inflammatory cytokines. *J. Immunol.* **147**, 3408–12 (1991).
96. Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O. & Samali, A. Cellular stress responses: Cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology* **2010**, 214074 (2010).
97. Wyllie, A. H. ‘where, o death, is thy sting?’ A brief review of apoptosis biology. *Molecular Neurobiology* **42**, 4–9 (2010).
98. Hotchkiss, R., Strasser, A., McDunn, J. & Swanson, P. Cell Death. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1570–83 (2009).
99. Walczak, H. Death receptor-ligand systems in cancer, cell death, and inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**,

- a008698 (2013).
100. Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M. & Greenwood, M. T. Anti-apoptosis and cell survival: A review. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1813**, 238–259 (2011).
 101. Kothakota, S. *et al.* Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* **278**, 294–8 (1997).
 102. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481–490 (1998).
 103. Oltval, Z. N., Milliman, C. L. & Korsmeyer, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609–619 (1993).
 104. Yang, E. & Korsmeyer, S. J. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* **88**, 386–401 (1996).
 105. Hockenbery, D., Nuñez, G., Milliman, C., Schreiber, R. D. & Korsmeyer, S. J. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348**, 334–336 (1990).
 106. Gilmore, A. P. Anoikis. *Cell Death Differ.* **12 Suppl 2**, 1473–7 (2005).
 107. Frisch, S. M. & Screaton, R. A. Anoikis mechanisms. *Current Opinion in Cell Biology* **13**, 555–562 (2001).
 108. Chiarugi, P. & Giannoni, E. Anoikis: A necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochemical Pharmacology* **76**, 1352–1364 (2008).
 109. Laguigne, L. M., Lin, S., Samara, R. N., Salesiotis, A. N. & Jessup, J. M. Nitrosative Stress in Rotated Three-Dimensional Colorectal Carcinoma Cell Cultures Induces Microtubule Depolymerization and Apoptosis. *Cancer Res.* **64**, 2643–2648 (2004).
 110. Laguigne, L. M. *et al.* DR5 receptor mediates anoikis in human colorectal carcinoma cell lines. *Cancer Res.* **68**, 909–17 (2008).
 111. Mariani, S. M. & Krammer, P. H. Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. *Eur. J. Immunol.* **28**, 973–982 (1998).
 112. Spierings, D. C. *et al.* Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J. Histochem. Cytochem.* **52**, 821–831 (2004).

113. Hymowitz, S. G. *et al.* Triggering cell death: The crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol. Cell* **4**, 563–571 (1999).
114. Mongkolsapaya, J. *et al.* Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 1048–1053 (1999).
115. Cha, S. S. *et al.* Crystal structure of TRAIL-DR5 complex identifies a critical role of the unique frame insertion in conferring recognition specificity. *J. Biol. Chem.* **275**, 31171–7 (2000).
116. Margadant, C., Monsuur, H. N., Norman, J. C. & Sonnenberg, A. Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 607–14 (2011).
117. Alahari, S. K., Reddig, P. J. & Juliano, R. L. Biological aspects of signal transduction by cell adhesion receptors. *International Review of Cytology* **220**, 145–184 (2002).
118. Giancotti, F. G. Complexity and specificity of integrin signalling. *Nat. Cell Biol.* **2**, E13–E14 (2000).
119. Armulik, A. Splice variants of human beta 1 integrins: origin, biosynthesis and functions. *Front Biosci* **7**, d219–27 (2002).
120. Van der Flier, A. & Sonnenberg, A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* **305**, 285–98 (2001).
121. Askari, J. A., Buckley, P. A., Mould, A. P. & Humphries, M. J. Linking integrin conformation to function. *J. Cell Sci.* **122**, 165–170 (2009).
122. Beauséjour, M. *et al.* Suppression of anoikis in human intestinal epithelial cells: differentiation state-selective roles of $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, and $\alpha 6\beta 4$ integrins. *BMC Cell Biol.* **14**, 53 (2013).
123. Gauthier, R. *et al.* Human intestinal epithelial cell survival: differentiation state-specific control mechanisms. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280**, C1540–C1554 (2001).
124. Harnois, C. *et al.* Human Intestinal Epithelial Crypt Cell Survival and Death: Complex Modulations of Bcl-2 Homologs by Fak, PI3-K/Akt-1, MEK/Erk, and p38 Signaling Pathways. *J. Cell. Physiol.* **198**, 209–222 (2004).
125. Ammon, C. *et al.* Comparative analysis of integrin expression on monocyte-derived macrophages and monocyte-derived dendritic cells. *Immunology* **100**, 364–369 (2000).
126. Moore, K. J. & Freeman, M. W. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler. Thromb. Vasc.*

- Biol.* **26**, 1702–11 (2006).
127. Van Reyk, D. M. & Jessup, W. The macrophage in atherosclerosis: modulation of cell function by sterols. *J. Leukoc. Biol.* **66**, 557–61 (1999).
 128. Buton, X. *et al.* Unique cellular events occurring during the initial interaction of macrophages with matrix-retained or methylated aggregated low density lipoprotein (LDL). Prolonged cell-surface contact during which ldl-cholesteryl ester hydrolysis exceeds ldl protein de. *J. Biol. Chem.* **274**, 32112–21 (1999).
 129. Kruth, H. S. Sequestration of aggregated low-density lipoproteins by macrophages. *Curr. Opin. Lipidol.* **13**, 483–8 (2002).
 130. Zhang, W. Y., Ishii, I. & Kruth, H. S. Plasmin-mediated macrophage reversal of low density lipoprotein aggregation. *J. Biol. Chem.* **275**, 33176–83 (2000).
 131. Kruth, H. S. Receptor-independent fluid-phase pinocytosis mechanisms for induction of foam cell formation with native low-density lipoprotein particles. *Curr. Opin. Lipidol.* **22**, 386–93 (2011).
 132. Llorente-Cortés, V., Royo, T., Juan-Babot, O. & Badimon, L. Adipocyte differentiation-related protein is induced by LRP1-mediated aggregated LDL internalization in human vascular smooth muscle cells and macrophages. *J. Lipid Res.* **48**, 2133–40 (2007).
 133. Cal, R. *et al.* Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates hypoxia-induced very low density lipoprotein-cholesteryl ester uptake and accumulation in cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* **94**, 469–79 (2012).
 134. Cal, R. *et al.* Low density lipoprotein receptor-related protein 1 expression correlates with cholesteryl ester accumulation in the myocardium of ischemic cardiomyopathy patients. *J. Transl. Med.* **10**, 160 (2012).
 135. Yancey, P. G. *et al.* Macrophage LRP-1 controls plaque cellularity by regulating efferocytosis and Akt activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 787–95 (2010).
 136. Overton, C. D., Yancey, P. G., Major, A. S., Linton, M. F. & Fazio, S. Deletion of macrophage LDL receptor-related protein increases atherogenesis in the mouse. *Circ. Res.* **100**, 670–677 (2007).
 137. Nakagawa, Y. *et al.* Fine Mapping of the Diabetes-Susceptibility Locus, *IDDM4*, on Chromosome 11q13. *Am. J. Hum. Genet.* **63**,

- 547–556 (1998).
138. Hashimoto, L. *et al.* Genetic mapping of a susceptibility locus for insulin-dependent diabetes mellitus on chromosome 11q. *Nature* **371**, 161–164 (1994).
 139. Cui, Y. *et al.* Lrp5 functions in bone to regulate bone mass. *Nat. Med.* **17**, 684–91 (2011).
 140. Narumi, S. *et al.* Various types of LRP5 mutations in four patients with osteoporosis- pseudoglioma syndrome: Identification of a 7.2-kb microdeletion using oligonucleotide tiling microarray. *Am. J. Med. Genet. Part A* **152**, 133–140 (2010).
 141. Kim, D.-H. *et al.* A New Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein, LRP5, Is Expressed in Hepatocytes and Adrenal Cortex, and Recognizes Apolipoprotein E. *J. Biochem.* **124**, 1072–1076 (1998).
 142. Borrell-Pages, M., Carolina Romero, J. & Badimon, L. LRP5 and plasma cholesterol levels modulate the canonical Wnt pathway in peripheral blood leukocytes. *Immunol. Cell Biol.* **93**, 653–61 (2015).
 143. Jiang, X. Y. *et al.* Association of LRP5 polymorphism with bone mass density and cholesterol level in population of chinese han. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **118**, 388–391 (2010).
 144. Suwazono, Y. *et al.* G-protein β 3 subunit polymorphism C1429T and low-density lipoprotein receptor-related protein 5 polymorphism A1330V are risk factors for hypercholesterolemia in Japanese males-a prospective study over 5 years. *Metabolism*. **55**, 751–757 (2006).
 145. MacDonald, B. T., Semenov, M. V., Huang, H. & He, X. Dissecting molecular differences between Wnt coreceptors LRP5 and LRP6. *PLoS One* **6**, e23537 (2011).
 146. Mani, A. *et al.* LRP6 mutation in a family with early coronary disease and metabolic risk factors. *Science* **315**, 1278–82 (2007).
 147. Dugue-Pujol, S. *et al.* Apolipoprotein A-II is catabolized in the kidney as a function of its plasma concentration. *J Lipid Res* **48**, 2151–2161 (2007).
 148. Faber, K., Hvidberg, V., Moestrup, S. K., Dahlback, B. & Nielsen, L. B. Megalin is a receptor for apolipoprotein M, and kidney-specific megalin-deficiency confers urinary excretion of apolipoprotein M. *Mol. Endocrinol.* **20**, 212–218 (2006).
 149. Dahlbäck, B. & Nielsen, L. B. Apolipoprotein M--a novel player in high-density lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Curr.*

- Opin. Lipidol.* **17**, 291–5 (2006).
150. Shen, G. Q. *et al.* Multi-allelic haplotype association identifies novel information different from single-SNP analysis: A new protective haplotype in the LRP8 gene is against familial and early-onset CAD and MI. *Gene* **521**, 78–81 (2013).
 151. Shen, G.-Q. Q. *et al.* An LRP8 variant is associated with familial and premature coronary artery disease and myocardial infarction. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 780–91 (2007).
 152. Ogita, M. *et al.* Increased circulating soluble LR11 in patients with acute coronary syndrome. *Clin. Chim. Acta* **415**, 191–194 (2013).
 153. Takahashi, M. *et al.* Enhanced circulating soluble LR11 in patients with coronary organic stenosis. *Atherosclerosis* **210**, 581–4 (2010).
 154. Jiang, M. *et al.* Ang II-stimulated migration of vascular smooth muscle cells is dependent on LR11 in mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 2733–2746 (2008).
 155. Brown, M. S. & Goldstein, J. L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* **89**, 331–40 (1997).
 156. Maxfield, F. R. & Tabas, I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* **438**, 612–21 (2005).
 157. Zhu, X. *et al.* Macrophage ABCA1 reduces MyD88-dependent Toll-like receptor trafficking to lipid rafts by reduction of lipid raft cholesterol. *J. Lipid Res.* **51**, 3196–206 (2010).
 158. Mogilenko, D. A. *et al.* Endogenous apolipoprotein A-I stabilizes ATP-binding cassette transporter A1 and modulates Toll-like receptor 4 signaling in human macrophages. *FASEB J.* **26**, 2019–30 (2012).
 159. Yvan-Charvet, L. *et al.* Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions. *Circulation* **118**, 1837–47 (2008).
 160. Tabas, I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 2255–64 (2005).
 161. Yvan-Charvet, L., Wang, N. & Tall, A. R. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 139–43 (2010).

162. Ouimet, M. *et al.* Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase. *Cell Metab.* **13**, 655–67 (2011).
163. Calkin, A. C. & Tontonoz, P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 213–24 (2012).
164. Netea, M. G., Quintin, J. & Van Der Meer, J. W. M. Trained immunity: A memory for innate host defense. *Cell Host and Microbe* **9**, 355–361 (2011).
165. Seijkens, T. *et al.* Hypercholesterolemia-induced priming of hematopoietic stem and progenitor cells aggravates atherosclerosis. *FASEB J.* **28**, 2202–2213 (2014).
166. van Kampen, E., Jaminon, A., van Berkel, T. J. C. & Van Eck, M. Diet-induced (epigenetic) changes in bone marrow augment atherosclerosis. *J. Leukoc. Biol.* **96**, 1–9 (2014).
167. Christ, A., Bekkering, S., Latz, E. & Riksen, N. P. Long-term activation of the innate immune system in atherosclerosis. *Seminars in Immunology* **28**, 384–393 (2016).
168. Tedgui, A. & Mallat, Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol. Rev.* **86**, 515–81 (2006).
169. Martinon, F., Mayor, A. & Tschopp, J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 229–65 (2009).
170. Duewell, P. *et al.* NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* **464**, 1357–61 (2010).
171. Usui, F. *et al.* Critical role of caspase-1 in vascular inflammation and development of atherosclerosis in Western diet-fed apolipoprotein E-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **425**, 162–8 (2012).
172. Sheedy, F. J. *et al.* CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat. Immunol.* **14**, 812–20 (2013).
173. Rajamäki, K. *et al.* Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS One* **5**, e11765 (2010).
174. Stewart, C. R. *et al.* CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat. Immunol.* **11**, 155–61 (2010).

175. Scalia, R., Appel, J. Z. & Lefer, A. M. Leukocyte-endothelium interaction during the early stages of hypercholesterolemia in the rabbit: role of P-selectin, ICAM-1, and VCAM-1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**, 1093–100 (1998).
176. Ridker, P. M. Hyperlipidemia as an instigator of inflammation: inaugurating new approaches to vascular prevention. *J. Am. Heart Assoc.* **1**, 3–5 (2012).
177. Adamson, S. & Leitinger, N. Phenotypic modulation of macrophages in response to plaque lipids. *Curr. Opin. Lipidol.* **22**, 335–42 (2011).
178. Recalcati, S. *et al.* Differential regulation of iron homeostasis during human macrophage polarized activation. *Eur. J. Immunol.* **40**, 824–835 (2010).
179. Borrell-Pages, M., Romero, J. C., Crespo, J., Juan-Babot, O. & Badimon, L. LRP5 associates with specific subsets of macrophages: Molecular and functional effects. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **90**, 146–56 (2016).
180. Butcher, M. J. & Galkina, E. V. Phenotypic and functional heterogeneity of macrophages and dendritic cell subsets in the healthy and atherosclerosis-prone aorta. *Frontiers in Physiology* **3** MAR, 44 (2012).
181. Feig, J. E. *et al.* Reversal of hyperlipidemia with a genetic switch favorably affects the content and inflammatory state of macrophages in atherosclerotic plaques. *Circulation* **123**, 989–98 (2011).
182. Feig, J. E. *et al.* HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 7166–71 (2011).
183. Chinetti-Gbaguidi, G. *et al.* Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPAR γ and LXR α pathways. *Circ. Res.* **108**, 985–95 (2011).
184. Gleissner, C. A. *et al.* CXCL4 downregulates the atheroprotective hemoglobin receptor CD163 in human macrophages. *Circ. Res.* **106**, 203–211 (2010).
185. Kadl, A. *et al.* Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circ. Res.* **107**, 737–746 (2010).
186. Boyle, J. J. *et al.* Coronary intraplaque hemorrhage evokes a novel atheroprotective macrophage phenotype. *Am. J. Pathol.* **174**,

- 1097–108 (2009).
187. Topoll, H. H., Zwadlo, G., Lange, D. E. & Sorg, C. Phenotypic dynamics of macrophage subpopulations during human experimental gingivitis. *J. Periodontal Res.* **24**, 106–12 (1989).
188. Peters, K. M., Rosendahl, T., Zilkens, K. W. & Zwadlo-Klarwasser, G. Pattern of macrophage subpopulations in post-traumatic bone infections after combined operative/antibiotic treatment. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* **114**, 56–59 (1994).
189. Pulford, K. *et al.* A monocyte/macrophage antigen recognized by the four antibodies GHI/61, Ber-MAC3, Ki-M8 and SM4. *Immunology* **75**, 588–595 (1992).
190. Backé, E., Schwarting, R., Gerdes, J., Ernst, M. & Stein, H. Ber-MAC3: new monoclonal antibody that defines human monocyte/macrophage differentiation antigen. *J. Clin. Pathol.* **44**, 936–45 (1991).
191. Law, S. K. *et al.* A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily. *Eur. J. Immunol.* **23**, 2320–2325 (1993).
192. Graversen, J. H., Madsen, M. & Moestrup, S. K. CD163: A signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 309–314 (2002).
193. Onofre, G., Kolácková, M., Jankovicová, K. & Krejsek, J. Scavenger receptor CD163 and its biological functions. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **52**, 57–61 (2009).
194. Wegiel, B. *et al.* Cell surface biliverdin reductase mediates biliverdin-induced anti-inflammatory effects via phosphatidylinositol 3-kinase and Akt. *J. Biol. Chem.* **284**, 21369–21378 (2009).
195. Otterbein, L. E. *et al.* Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* **6**, 422–428 (2000).
196. Wessling-Resnick, M. Iron homeostasis and the inflammatory response. *Annu. Rev. Nutr.* **30**, 105–22 (2010).
197. Stone, N. J. *et al.* 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: A report of the American college of cardiology/American heart association task force on practice guidelines. *Journal of the American College of Cardiology* **63**, 2889–2934 (2014).
198. Ton, V. K., Martin, S. S., Blumenthal, R. S. & Blaha, M. J. Comparing the new European cardiovascular disease prevention

- guideline with prior American heart association guidelines: An editorial review. *Clinical Cardiology* **36**, E1–E6 (2013).
199. Fredrickson, D. S. An international classification of hyperlipidemias and hyperlipoproteinemias. *Ann. Intern. Med.* **75**, 471–472 (1971).
 200. Fagge, C. Xanthomatous diseases of the skin. *Trans Pathol Soc L.* 242–50 (1873).
 201. Muller, C. Xanthomata, Hypercholesterolemia, Angina Pectoris. *Acta Med Scand* **89**, 75–84 (1938).
 202. Wilkinson, C. Essential familial hypercholesterolemia: cutaneous, metabolic and hereditary aspects. *Bull. N. Y. Acad. Med.* **26**, 670–85 (1950).
 203. Khachadurian, A. K. The Inheritance of Essential Familial Hypercholesterolemia. *Am. J. Med.* **37**, 402–407 (1964).
 204. Soutar, A. K. & Naoumova, R. P. Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **4**, 214–25 (2007).
 205. Brown, M. S. & Goldstein, J. L. Familial hypercholesterolemia: defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **71**, 788–92 (1974).
 206. Goldstein, J. L. & Brown, M. S. Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 2804–8 (1973).
 207. Tolleshaug, H., Goldstein, J. L., Schneider, W. J. & Brown, M. S. Posttranslational processing of the LDL receptor and its genetic disruption in familial hypercholesterolemia. *Cell* **30**, 715–24 (1982).
 208. Sun, X. M., Patel, D. D., Bhatnagar, D., Knight, B. L. & Soutar, A. K. Characterization of a splice-site mutation in the gene for the LDL receptor associated with an unpredictably severe clinical phenotype in English patients with heterozygous FH. *Arter. Thromb Vasc Biol* **15**, 219–227 (1995).
 209. Vohl, M. C. *et al.* Comparison of the effect of two low-density lipoprotein receptor class mutations on coronary heart disease among French-Canadian patients heterozygous for familial hypercholesterolaemia. *Eur. J. Clin. Invest.* **27**, 366–73 (1997).

210. Graham, C. A. *et al.* Mutation screening and genotype : phenotype correlation in familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* **147**, 309–316 (1999).
211. Leigh, S. E. A., Foster, A. H., Whittall, R. A., Hubbard, C. S. & Humphries, S. E. Update and analysis of the university college London low density lipoprotein receptor familial hypercholesterolemia database. *Ann. Hum. Genet.* **72**, 485–498 (2008).
212. Innerarity, T. L. *et al.* Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 6919–23 (1987).
213. Abifadel, M. *et al.* Mutations and polymorphisms in the proprotein convertase subtilisin kexin 9(PCSK9) gene in cholesterol metabolism and disease. *Human Mutation* **30**, 520–529 (2009).
214. Vaughan, C. J., Gotto, A. M. & Basson, C. T. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology* **35**, 1–10 (2000).
215. Mihos, C. G., Salas, M. J. & Santana, O. The pleiotropic effects of the hydroxy-methyl-glutaryl-CoA reductase inhibitors in cardiovascular disease: a comprehensive review. *Cardiol. Rev.* **18**, 298–304 (2010).
216. Liao, J. K. & Laufs, U. Pleiotropic Effects of Statins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 89–118 (2004).
217. Davignon, J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation* **109**, III39-43 (2004).
218. Sacco, R. L. & Liao, J. K. Drug Insight: statins and stroke. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **2**, 576–84 (2005).
219. Zhang, H. *et al.* Discontinuation of statins in routine care settings, A cohort study. *Ann. Intern. Med.* **158**, 526–534 (2013).
220. Mattick, J. S. & Makunin, I. V. Non-coding RNA. *Human molecular genetics* **15**, R17–R29 (2006).
221. Boon, R. A., Jaé, N., Holdt, L. & Dimmeler, S. Long Noncoding RNAs from Clinical Genetics to Therapeutic Targets? *J. Am. Coll. Cardiol.* **67**, 1214–1226 (2016).
222. Alexander, R. P., Fang, G., Rozowsky, J., Snyder, M. & Gerstein, M. B. Annotating non-coding regions of the genome. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 559–571 (2010).
223. Khraiwesh, B. *et al.* Transcriptional Control of Gene Expression by MicroRNAs. *Cell* **140**, 111–122 (2010).

224. Mercer, T. R. & Mattick, J. S. Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 300–7 (2013).
225. Wilusz, J. E., Sunwoo, H. & Spector, D. L. Long noncoding RNAs: Functional surprises from the RNA world. *Genes and Development* **23**, 1494–1504 (2009).
226. Guttman, M. & Rinn, J. L. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature* **482**, 339–46 (2012).
227. Barry, G. Integrating the roles of long and small non-coding RNA in brain function and disease. *Mol. Psychiatry* **19**, 410–6 (2014).
228. Keniry, A. *et al.* The H19 lincRNA is a developmental reservoir of miR-675 that suppresses growth and Igf1r. *Nat. Cell Biol* **14**, 659–65 (2012).
229. Cai, X. & Cullen, B. R. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *Rna* **13**, 313–316 (2007).
230. Jalali, S., Bhartiya, D., Lalwani, M. K., Sivasubbu, S. & Scaria, V. Systematic Transcriptome Wide Analysis of lincRNA-miRNA Interactions. *PLoS One* **8**, e53823 (2013).
231. Faghihi, M. A. *et al.* Evidence for natural antisense transcript-mediated inhibition of microRNA function. *Genome Biol.* **11**, R56 (2010).
232. Wang, Y. *et al.* Endogenous miRNA Sponge lincRNA-RoR Regulates Oct4, Nanog, and Sox2 in Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Dev. Cell* **25**, 69–80 (2013).
233. Johnsson, P. *et al.* A pseudogene long-noncoding-RNA network regulates PTEN transcription and translation in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 440–6 (2013).
234. Ludwig, N. *et al.* Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Res.* **1**, 1–13 (2016).
235. Lim, L. P. *et al.* Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* **433**, 769–73 (2005).
236. Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 126–139 (2009).
237. Kim, S., Hwang, D. W. & Lee, D. S. A study of microRNAs in silico and in vivo: Bioimaging of microRNA biogenesis and regulation. *FEBS Journal* **276**, 2165–2174 (2009).
238. He, Y., Yang, C., Kirkmire, C. M. & Wang, Z. J. Regulation of opioid tolerance by let-7 family microRNA targeting the mu opioid

- receptor. *J. Neurosci.* **30**, 10251–8 (2010).
239. Slezak-Prochazka, I., Durmus, S., Kroesen, B.-J. & van den Berg, A. MicroRNAs, macrocontrol: regulation of miRNA processing. *RNA* **16**, 1087–95 (2010).
240. Lipovich, L., Johnson, R. & Lin, C. Y. MacroRNA underdogs in a microRNA world: Evolutionary, regulatory, and biomedical significance of mammalian long non-protein-coding RNA. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* **1799**, 597–615 (2010).
241. Olive, V., Jiang, I. & He, L. Mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 1348–1354 (2010).
242. Ibáñez-Ventoso, C., Vora, M. & Driscoll, M. Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology. *PLoS One* **3**, e2818 (2008).
243. Cai, X., Hagedorn, C. H. & Cullen, B. R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* **10**, 1957–1966 (2004).
244. Lee, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415–419 (2003).
245. Lee, Y., Jeon, K., Lee, J. T., Kim, S. & Kim, V. N. MicroRNA maturation: Stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* **21**, 4663–4670 (2002).
246. Bohnsack, M. T., Czapinski, K. & Gorlich, D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* **10**, 185–91 (2004).
247. Ma, J.-B., Ye, K. & Patel, D. J. Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* **429**, 318–322 (2004).
248. Qureshi, I. A. & Mehler, M. F. Emerging roles of non-coding RNAs in brain evolution, development, plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 528–541 (2012).
249. Marson, A. *et al.* Connecting microRNA Genes to the Core Transcriptional Regulatory Circuitry of Embryonic Stem Cells. *Cell* **134**, 521–533 (2008).
250. He, L. *et al.* A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* **447**, 1130–1134 (2007).
251. Yang, W. *et al.* Modulation of microRNA processing and

- expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 13–21 (2006).
252. Newman, M. A., Thomson, J. M. & Hammond, S. M. Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *RNA* **14**, 1539–1549 (2008).
253. Rybak, A. *et al.* A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat. Cell Biol.* **10**, 987–93 (2008).
254. Bartel, D. P. *et al.* MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215–33 (2009).
255. Catto, J. W. F. *et al.* MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: A systematic review. *European Urology* **59**, 671–681 (2011).
256. Meister, G. *et al.* Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* **15**, 185–97 (2004).
257. Grimson, A. *et al.* MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Mol. Cell* **27**, 91–105 (2007).
258. Lee, I. *et al.* New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Res.* **19**, 1175–1183 (2009).
259. Takagi, S. *et al.* MicroRNAs regulate human hepatocyte nuclear factor 4alpha, modulating the expression of metabolic enzymes and cell cycle. *J. Biol. Chem.* **285**, 4415–4422 (2010).
260. Place, R. F., Li, L.-C., Pookot, D., Noonan, E. J. & Dahiya, R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 1608–13 (2008).
261. Chen, K.-C. & Juo, S.-H. H. MicroRNAs in atherosclerosis. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **28**, 631–40 (2012).
262. Seneviratne, A., Hulsmans, M., Holvoet, P. & Monaco, C. Biomechanical factors and macrophages in plaque stability. *Cardiovascular Research* **99**, 284–293 (2013).
263. Raitoharju, E., Oksala, N. & Lehtimäki, T. MicroRNAs in the atherosclerotic plaque. *Clinical Chemistry* **59**, 1708–1721 (2013).
264. Flowers, E., Singh, K., Molina, C., Mathur, A. & Aouizerat, B. E. MicroRNA associated with atherogenic dyslipidemia in South Asian men. *International Journal of Cardiology* **168**, 4884–4885 (2013).
265. Mata, N. *et al.* Clinical characteristics and evaluation of LDL-

- cholesterol treatment of the Spanish Familial Hypercholesterolemia Longitudinal Cohort Study (SAFEHEART). *Lipids Health Dis.* **10**, 94 (2011).
266. Caballero, P. *et al.* Detection of subclinical atherosclerosis in familial hypercholesterolemia using non-invasive imaging modalities. *Atherosclerosis* **222**, 468–472 (2012).
267. Alonso, R. *et al.* Cardiovascular disease in familial hypercholesterolaemia: influence of low-density lipoprotein receptor mutation type and classic risk factors. *Atherosclerosis* **200**, 315–21 (2008).
268. Friedewald, W., Levy, R. & Fredrickson, D. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* **18**, 499–502 (1972).
269. Mozas, P. *et al.* Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in Spain: identification of 39 novel and 77 recurrent mutations in LDLR. *Hum Mutat* **24**, 187 (2004).
270. Havel, R. J., Eder, H. A. & Bragdon, J. H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.* **34**, 1345–53 (1955).
271. Ohkawa, H., Ohishi, N. & Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351–8 (1979).
272. Guyton, J. R., Klemp, K. F. & Mims, M. P. Altered ultrastructural morphology of self-aggregated low density lipoproteins: coalescence of lipid domains forming droplets and vesicles. *J. Lipid Res.* **32**, 953–62 (1991).
273. Böyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **21**, 77–89 (1968).
274. Boyum, A. Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens* **4**, 269–74 (1974).
275. Eligini, S. *et al.* Human monocyte-derived macrophages spontaneously differentiated in vitro show distinct phenotypes. *J. Cell. Physiol.* **228**, 1464–72 (2013).
276. Friedländer, M. R. *et al.* Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nat. Biotechnol.* **26**, 407–15 (2008).
277. Friedländer, M. R., MacKowiak, S. D., Li, N., Chen, W. & Rajewsky, N. MiRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades.

- Nucleic Acids Res.* **40**, 37–52 (2012).
278. An, J., Lai, J., Lehman, M. L. & Nelson, C. C. MiRDeep*: An integrated application tool for miRNA identification from RNA sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **41**, 727–737 (2013).
279. Hackenberg, M., Sturm, M., Langenberger, D., Falcón-Pérez, J. M. & Aransay, A. M. miRanalyzer: A microRNA detection and analysis tool for next-generation sequencing experiments. *Nucleic Acids Res.* **37**, W68-76 (2009).
280. Pundhir, S., Poirazi, P. & Gorodkin, J. Emerging applications of read profiles towards the functional annotation of the genome. *Front. Genet.* **6**, 188 (2015).
281. Noordzij, M., Dekker, F., Zoccali, C. & Jager, K. Sample size calculations. *Nephron. Clin. Pract.* **118**, c319–c323 (2010).
282. Smalley, D. M. *et al.* Native LDL Increases Endothelial Cell Adhesiveness by Inducing Intercellular Adhesion Molecule 1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 585–590 (1996).
283. Serrano, C. V *et al.* Native LDL-cholesterol mediated monocyte adhesion molecule overexpression is blocked by simvastatin. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **23**, 215–20 (2009).
284. Ley, K., Miller, Y. I. & Hedrick, C. C. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **31**, 1506–1516 (2011).
285. Merino, A. *et al.* Senescent CD14+CD16+ monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity. *J. Immunol.* **186**, 1809–15 (2011).
286. Schaer, C. A., Schoedon, G., Imhof, A., Kurrer, M. O. & Schaer, D. J. Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin. *Circ. Res.* **99**, 943–50 (2006).
287. Rothe, G. *et al.* Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 1437–47 (1996).
288. Munn, D. H., Beall, A. C., Song, D., Wrenn, R. W. & Throckmorton, D. C. Activation-induced apoptosis in human macrophages: developmental regulation of a novel cell death pathway by macrophage colony-stimulating factor and interferon gamma. *J. Exp. Med.* **181**, 127–36 (1995).
289. Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322–6 (1998).

290. Perlman, H., Zhang, X., Chen, M. W., Walsh, K. & Buttyan, R. An elevated bax/bcl-2 ratio corresponds with the onset of prostate epithelial cell apoptosis. *Cell Death Differ.* **6**, 48–54 (1999).
291. Walczak, H. *et al.* TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* **16**, 5386–97 (1997).
292. Lee, M.-S., Cherla, R. P., Lentz, E. K., Leyva-Illades, D. & Tesh, V. L. Signaling through C/EBP homologous protein and death receptor 5 and calpain activation differentially regulate THP-1 cell maturation-dependent apoptosis induced by Shiga toxin type 1. *Infect. Immun.* **78**, 3378–91 (2010).
293. Andreou, I., Sun, X., Stone, P. H., Edelman, E. R. & Feinberg, M. W. miRNAs in atherosclerotic plaque initiation, progression, and rupture. *Trends Mol. Med.* **21**, 307–18 (2015).
294. Madrigal-Matute, J., Rotllan, N., Aranda, J. F. & Fernández-Hernando, C. MicroRNAs and atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* **15**, 322 (2013).
295. Sun, X. *et al.* Circulating microRNA-126 in patients with coronary artery disease: correlation with LDL cholesterol. *Thromb. J.* **10**, 16 (2012).
296. Pitzler, L. *et al.* miR-126-3p Promotes Matrix-Dependent Perivascular Cell Attachment, Migration and Intercellular Interaction. *Stem Cells* **34**, 1297–309 (2016).
297. Stupack, D. G. & Cheresch, D. A. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J. Cell Sci.* **115**, 3729–38 (2002).
298. Aviram, M. *et al.* Lesioned low density lipoprotein in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient transgenic mice and in humans is oxidized and aggregated. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**, 501–13 (1995).
299. Libby, P. Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art. *Am. J. Cardiol.* **91**, 3A–6A (2003).
300. Khoo, J. C., Miller, E., McLoughlin, P. & Steinberg, D. Enhanced macrophage uptake of low density lipoprotein after self-aggregation. *Arteriosclerosis* **8**, 348–58
301. Zhang, W. Y., Gaynor, P. M. & Kruth, H. S. Aggregated low density lipoprotein induces and enters surface-connected compartments of human monocyte-macrophages. Uptake occurs independently of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* **272**, 31700–6 (1997).
302. Marks, D., Thorogood, M., Neil, H. A. W. & Humphries, S. E. A review on the diagnosis, natural history, and treatment of familial

- hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* **168**, 1–14 (2003).
303. Linton, M. F. A Direct Role for the Macrophage Low Density Lipoprotein Receptor in Atherosclerotic Lesion Formation. *J. Biol. Chem.* **274**, 19204–19210 (1999).
304. Brown, M. S. & Goldstein, J. L. Suppression of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase Activity and Inhibition of Growth of Human Fibroblasts by 7-Ketocholesterol. *J. Biol. Chem.* **249**, 7306–7314 (1974).
305. Riddle, R. C. *et al.* Lrp5 and Lrp6 Exert Overlapping Functions in Osteoblasts during Postnatal Bone Acquisition. *PLoS One* **8**, e63323 (2013).
306. Mosig, S. *et al.* Monocytes of patients with familial hypercholesterolemia show alterations in cholesterol metabolism. *BMC Med. Genomics* **1**, 60 (2008).
307. Magoori, K. *et al.* Severe hypercholesterolemia, impaired fat tolerance, and advanced atherosclerosis in mice lacking both low density lipoprotein receptor-related protein 5 and apolipoprotein E. *J. Biol. Chem.* **278**, 11331–6 (2003).
308. Borrell-Pagès, M., Romero, J. C. & Badimon, L. LRP5 deficiency down-regulates Wnt signalling and promotes aortic lipid infiltration in hypercholesterolaemic mice. *J. Cell. Mol. Med.* **19**, 770–7 (2015).
309. Amini-Nik, S. *et al.* β -Catenin-regulated myeloid cell adhesion and migration determine wound healing. *J Clin Invest* **124**, 2599–2610 (2014).
310. Edin, S. *et al.* The Distribution of Macrophages with a M1 or M2 Phenotype in Relation to Prognosis and the Molecular Characteristics of Colorectal Cancer. *PLoS One* **7**, e47045 (2012).
311. Van Wijk, D. F. *et al.* Nonpharmacological lipoprotein apheresis reduces arterial inflammation in familial hypercholesterolemia. *J. Am. Coll. Cardiol.* **64**, 1418–1426 (2014).
312. Quintin, J. *et al.* *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell Host Microbe* **12**, 223–232 (2012).
313. Kleinnijenhuis, J. *et al.* Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 17537–42 (2012).
314. Bekkering, S. *et al.* Trained innate immunity and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **24**, 487–492 (2013).

315. Suades, R. *et al.* Circulating CD45+/CD3+ lymphocyte-derived microparticles map lipid-rich atherosclerotic plaques in familial hypercholesterolaemia patients. *Thromb. Haemost.* **111**, 111–21 (2014).
316. El Messal, M. *et al.* Elevated serum levels of proinflammatory cytokines and biomarkers of matrix remodeling in never-treated patients with familial hypercholesterolemia. *Clin. Chim. Acta.* **366**, 185–9 (2006).
317. Gu, L. *et al.* Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol. Cell* **2**, 275–81 (1998).
318. Gosling, J. *et al.* MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J. Clin. Invest.* **103**, 773–8 (1999).
319. Boring, L., Gosling, J., Cleary, M. & Charo, I. F. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* **394**, 894–7 (1998).
320. Haley, K. J. *et al.* Overexpression of eotaxin and the CCR3 receptor in human atherosclerosis: using genomic technology to identify a potential novel pathway of vascular inflammation. *Circulation* **102**, 2185–9 (2000).
321. Yao, L., Herlea-Pana, O., Heuser-Baker, J., Chen, Y. & Barlic-Dicen, J. Roles of the chemokine system in development of obesity, insulin resistance, and cardiovascular disease. *Journal of Immunology Research* **2014**, 181450 (2014).
322. Veillard, N. R. *et al.* Simvastatin modulates chemokine and chemokine receptor expression by geranylgeranyl isoprenoid pathway in human endothelial cells and macrophages. *Atherosclerosis* **188**, 51–8 (2006).
323. Trujillo, G., O'Connor, E. C., Kunkel, S. L. & Hogaboam, C. M. A novel mechanism for CCR4 in the regulation of macrophage activation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* **172**, 1209–21 (2008).