

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Farmacologia e Tossicologia Sperimentali

XXVI Ciclo

Modulazione farmacologica del trasporto inverso del
colesterolo: studi in vivo ed in vitro dell'effetto inibitorio
della Ciclosporina A.

Coordinatore:

Chiar.ma Prof.ssa Elisabetta Barocelli

Tutor:

Chiar.mo Prof. Franco Bernini

Dottoranda:

Giulia Lusardi

Triennio Accademico 2010/2013

RIASSUNTO

Il trasporto inverso di colesterolo macrofagico (RCT) è il processo con il quale il colesterolo è rimosso dalle cellule schiumose delle placche aterosclerotiche nelle pareti arteriose, trasportato tramite le lipoproteine ad alta densità (HDL) nella circolazione, captato dal fegato ed infine eliminato con la bile e le feci. Tale processo è riconosciuto essere protettivo per lo sviluppo dell'aterosclerosi. Numerose dimostrazioni indicano che il rischio cardiovascolare è aumentato in pazienti che hanno subito trapianto di organo e sono in trattamento con il farmaco immunosoppressore Ciclosporina A (CsA).

Al fine di indagare eventuali effetti della CsA sull'RCT in vivo, abbiamo trattato 10 topi C57BL/6 per 14 giorni con CsA al dosaggio di 50 mg/kg/die, o con il solo veicolo, mediante iniezione sottocutanea e, al termine del trattamento, abbiamo misurato l'efficienza del processo di RCT macrofagico servendoci di una metodica radio isotopica. I risultati ottenuti mostrano come il processo di RCT risulti alterato dopo il trattamento dei topi con il farmaco.

Abbiamo inizialmente indagato se l'inibizione dell'RCT fosse a carico della prima tappa del processo: l'efflusso di colesterolo dai macrofagi. I risultati ottenuti da esperimenti in vitro di valutazione della capacità delle cellule di rilasciare il colesterolo mediante diversi trasportatori di membrana dopo trattamento con CsA, e della capacità del plasma dei topi trattati o meno con CsA di stimolare l'efflusso di colesterolo dalle cellule, non hanno mostrato alcuna attività inibitoria da parte del trattamento con il farmaco.

Mediante esperimenti in cellule epatiche (Fu5AH), abbiamo dimostrato che il trattamento dei topi con CsA ha invece alterato la seconda tappa dell'RCT, inibendo la captazione di colesterolo mediato dal Recettore Scavenger BI (SR-BI), dopo esposizione delle stesse a plasma di topi trattati.

Inoltre abbiamo dimostrato che il trattamento con CsA porta a riduzione anche della terza tappa dell'RCT, l'escrezione di colesterolo nelle feci. Per approfondire come la CsA esplichi tale azione inibitoria, abbiamo analizzato, in campioni epatici dei topi trattati o meno, l'espressione genica dei trasportatori responsabili dell'escrezione di colesterolo nella bile, i trasportatori ATP-Binding Cassette G5 e G8 (ABCG5/G8), e dell'enzima colesterolo-7- α -idrossilasi (CYP7 α), coinvolto nella conversione del colesterolo in acidi biliari. Analisi di RT-PCR hanno evidenziato una assenza di effetti negativi nell'espressione dell'mRNA dei trasportatori e una riduzione significativa dell'espressione del Cyp7 α , nei topi trattati con il farmaco. L'analisi dell'espressione proteica dei trasportatori non ha mostrato alcuna differenza tra i topi trattati con CsA e quelli non trattati. Abbiamo ripetuto le analisi in campioni intestinali, in cui ABCG5/G8 sono responsabili dell'escrezione di colesterolo dal plasma al lume intestinale, e abbiamo misurato anche l'espressione genica del trasportatore responsabile del riassorbimento di colesterolo intestinale, la proteina Niemann Pick C1-Like 1 (NPC1L1). I risultati ottenuti dall'analisi sia di *Abcg5/g8* che di *Npc1l1*, non hanno mostrato differenze significative tra i topi del gruppo controllo e trattato con CsA.

Abbiamo inoltre effettuato esperimenti in vitro per indagare se la CsA, non alterando l'espressione genica di ABCG5/G8, causa inibizione dell'attività di ABCG5/G8 nell'intestino. Mentre esperimenti in vitro di efflusso di colesterolo nella parte apicale di cellule CACO₂ hanno mostrato una inibizione del trasporto di colesterolo attraverso ABCG5/G8 dopo trattamento delle cellule con CsA, la quantificazione del β -sitosterolo nel plasma dei topi trattati con CsA ha mostrato quantitativi simili tra gli animali dei due gruppi.

In conclusione, questi risultati indicano che il trattamento CsA altera in vivo il processo di RCT macrofagico, in particolare mediante l'inibizione della seconda e terza tappa del processo, la captazione epatica del colesterolo e la sua escrezione fecale, senza agire sulla prima tappa, l'efflusso di colesterolo dai macrofagi. I nostri risultati indicano che l'effetto negativo si esplica principalmente attraverso l'inibizione del trasporto di colesterolo mediante SR-BI epatico e della sintesi degli acidi biliari mediante il CYP7 α .

ABSTRACT

Macrophage Reverse Cholesterol Transport (RCT) process, by which cholesterol is removed from the foam cells in the arterial wall and transported by lipoproteins (HDL) to the liver for elimination into the feces, is recognized as protective against atherosclerosis. Abundant data indicate that cardiovascular risk is increased in transplanted patients treated with the immunosuppressant drug Cyclosporine A (CsA).

To investigate whether CsA impairs in vivo RCT, we treated C57BL/6 mice (n=10) with CsA for 14 days at 50 mg/kg/die, or with the only vehicle, through subcutaneous injection and, at the end of treatment, we measured macrophage RCT by using a radio isotopic technique. What we saw is that RCT is impaired after mice CsA treatment.

We initially investigate whether CsA treatment inhibited the first step of the process: cholesterol efflux from macrophages. We evaluated the cells capacity to release cholesterol through various cholesterol transporters after CsA treatment, and the capacity of CsA treated or not mice plasma to stimulate cholesterol efflux from cells; CsA treatment did not impair none of these processes.

Through experiments carried out in hepatic cells, we demonstrate that CsA impairs the second step of the RCT process, through the inhibition of cholesterol uptake by the Scavenger Receptor BI (SR-BI), after cells exposition to plasma from CsA treated mice.

Moreover we demonstrate that, after CsA treatment, also the third step of RCT in mice, fecal cholesterol excretion is impaired. To investigate how CsA carries out this effect we analyzed, in hepatic tissues of CsA treated or untreated mice, gene expression of transporters responsible for sterol excretion into the bile, ATP-Binding Cassette transporters G5 (ABCG5) and G8 (ABCG8), and cholesterol-7- α -hydroxylase (CYP7 α), involved in cholesterol conversion into bile acids. RT-PCR analysis revealed a lack of

negative effect on transporters mRNA expression and a significant reduction in *Cyp7a* mRNA expression in CsA treated mice. In contrast, ABCG5/G8 western blotting analysis showed similar protein content in the two sample groups. We repeated the analysis in mouse intestinal tissues, where ABCG5/G8 are responsible for the excretion of cholesterol in the intestinal lumen, together with RT-PCR of Niemann-PickC1-Like 1 (NPC1L1) protein, involved in cholesterol intestinal absorption. Both RT-PCR analysis on *Abcg5/g8* and *Npc1l1*, showed no significant differences between the control group and CsA treated group.

We also made in vitro experiments to investigate if CsA impairs the activity of ABCG5/G8 transporters in the intestine. While experiments of in vitro cholesterol efflux from the apical side of CACO₂ cells showed an inhibition of cholesterol transport through ABCG5/G8 after CsA treatment, the measurement of β -sitosterol in CsA treated mice plasma showed a similar content to plasma from untreated mice.

Taken together, these results indicate that CsA treatment impaired the in vivo process of macrophage RCT, in particular by affecting its second and third step, cholesterol hepatic uptake and fecal sterol excretion, without affecting the first step, cholesterol efflux from macrophages: our results indicate that this negative effect of CsA occurs possibly through the inhibition of cholesterol transport through hepatic SR-BI and of biliary acids synthesis through CYP7 α .

INDICE

Introduzione	8
LIPIDI PLASMATICI	9
LIPOPROTEINE PLASMATICHE	12
METABOLISMO LIPOPROTEICO	13
Via esogena	13
Via endogena	14
MALATTIA CARDIOVASCOLARE – aspetti generali	16
ATEROSCLEROSI	16
TRASPORTO INVERSO DI COLESTEROLO (RCT) MACROFAGICO	21
Efflusso di colesterolo dai macrofagi	23
<i>Diffusione acquosa</i>	23
<i>Recettore Scavenger BI (SR-BI)</i>	25
<i>Trasportatori ABC</i>	29
Rimodellamento delle HDL e uptake epatico	37
Escrezione biliare	46
TRASPORTO TRANSINTESTINALE DEL COLESTEROLO (TICE)	49
CICLOSPORINA A	53
Scopo	57
Materiali e Metodi	61
ANIMALI	62
VALUTAZIONE DELL'RCT IN VIVO	63

Formazione di cellule schiumose in vitro da macrofagi murini J774	63
Prelievo dei campioni dai topi	63
Estrazione lipidica dal fegato	64
Estrazione lipidica dalle feci	64
Analisi del profilo lipidico plasmatico dei topi trattati o meno con CsA	65
 VALUTAZIONE DELL'EFFLUSSO DI COLESTEROLO IN VITRO	 66
Manipolazione delle colture cellulari	66
Materiale e reagenti	66
Prelievo macrofagi peritoneali murini (MPM)	67
Efflusso di colesterolo da MPM	68
Efflusso di colesterolo da CACO ₂	69
Potenziale d'efflusso del plasma dei topi trattati o meno con CsA	70
Misurazione del colesterolo intracellulare in Fu5AH	71
 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA DI <i>Abcg5</i> , <i>Abcg8</i> , <i>Cyp7a</i> e <i>Npc1l1</i>	 72
 ANALISI DELL'ESPRESSIONE PROTEICA DI ABCG5 E ABCG8 EPATICI	 73
 QUANTIFICAZIONE DEL β -SITOSTEROLO PLASMATICO NEI TOPI TRATTATI O MENO CON CsA	 74
 ANALISI STATISTICA DEI DATI	 74
 Risultati	 75
 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DELLA CsA SULL'EFFICIENZA DEL PROCESSO DI RCT MACROFAGICO (RCT _m) IN VIVO DA J774	 76
Trattamento e valutazione del peso e del profilo lipidico dei topi trattati o meno con CsA	76
Quantificazione dell'RCT in vivo da J774	78
 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON CsA SULLA PRIMA TAPPA DELL'RCT _m : EFFLUSSO DI COLESTEROLO DAL MACROFAGO	 82

Effetto del trattamento con CsA sulla capacità delle cellule di rilasciare il colesterolo	82
Effetto del trattamento con CsA sul potenziale d'efflusso del plasma dei topi	85
<i>Potenziale d'efflusso di colesterolo attraverso diffusione passiva e ABCA1-mediato</i>	85
<i>Potenziale d'efflusso di colesterolo ABCG1-mediato</i>	87
<i>Potenziale d'efflusso di colesterolo SR-BI-mediato</i>	88
 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON CsA SULLA SECONDA TAPPA DELL'RCT _m : CAPTAZIONE DEL COLESTEROLO NEL FEGATO	 90
 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON CsA SULLA TERZA TAPPA DELL'RCT _m : ESCREZIONE DI COLESTEROLO NELLA BILE	 92
 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON CsA SUL TRASPORTO INTESTINALE DI COLESTEROLO	 94
 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON CsA SUL RIASSORBIMENTO INTESTINALE DI COLESTEROLO	 99
 Discussione	 101
 Bibliografia	 113

Introduzione

LIPIDI PLASMATICI

I lipidi ricoprono un ruolo importante in quasi tutti gli aspetti della vita biologica, sono componenti strutturali delle cellule e sono coinvolti in processi metabolici e ormonali. I lipidi sono definiti come composti organici che sono scarsamente solubili in acqua ma miscibili in solventi organici.

Le quattro principali forme in cui si trovano i lipidi circolanti nel plasma sono le seguenti:

- Acidi grassi
- Trigliceridi
- Fosfolipidi
- Colesterolo

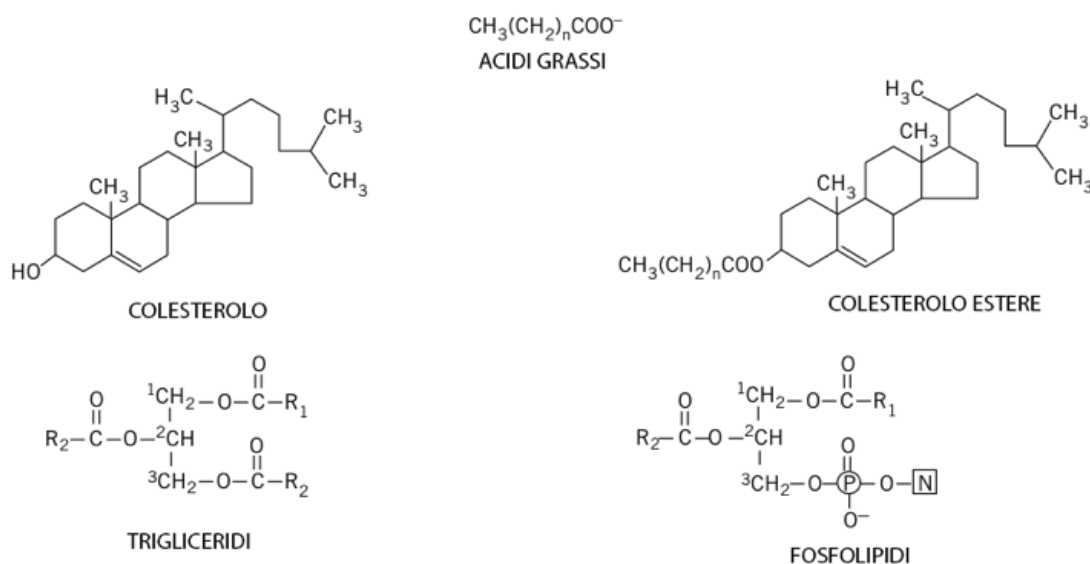


Figura 1: strutture lipidiche plasmatiche; P=gruppo fosfato, N=base azotata, R=acido grasso.

(Crook M. A. 2012)

Gli **acidi grassi** sono composti formati da catene lineari di carbonio di diversa lunghezza. Possono essere saturi, cioè non contenenti doppi legami, monoinsaturi, con un doppio legame, o polinsaturi, con più di un doppio legame. Gli acidi grassi possono presentarsi come non-esterificati (NEFA), esterificati, oppure liberi. I NEFA plasmatici liberati dai tessuti adiposi grazie all'attività delle lipasi, sono trasportati al fegato e ai tessuti muscolari principalmente legati all'albumina e rappresentano una porzione importante dell'energia richiesta dall'organismo. Tre acidi grassi esterificati con il glicerolo formano i **trigliceridi**; questi sono trasportati nelle lipoproteine, a partire dall'intestino, a vari tessuti inclusi il fegato e il tessuto adiposo.

I **fosfolipidi** sono lipidi complessi, di struttura simile a quella dei trigliceridi ma contenenti un gruppo fosfato e uno azotato al posto di uno dei tre acidi grassi. Ricoprono un ruolo strutturale molto importante nelle membrane cellulari, e il gruppo fosfato conferisce solubilità ai lipidi apolari e al colesterolo nelle lipoproteine (Crook M. A. 2012).

Il **colesterolo** è una molecola lipidica costituita da 27 atomi di carbonio organizzati in quattro anelli policicloalifatici (condensati tra loro in formazione trans), una coda alifatica e gruppi funzionali. Esso è componente essenziale della membrana cellulare di tutte le cellule animali: si inserisce fra i due strati di fosfolipidi orientandosi con il gruppo -OH vicino alle teste polari dei fosfolipidi, diminuendo così la fluidità della membrana e aumentando la stabilità meccanica delle cellule.

Tutti i tessuti degli animali durante la crescita hanno bisogno di colesterolo per la sintesi delle membrane; alcuni organi (per esempio la corteccia surrenale e le gonadi) utilizzano questa molecola come precursore per la produzione degli ormoni steroidei. Il colesterolo è anche il precursore della vitamina D.

Il colesterolo prodotto nel fegato viene impiegato in buona parte per la produzione di bile, una sostanza secreta nel duodeno che serve a emulsionare i lipidi alimentari per renderli assorbibili dall'intestino tenue (Crook M. A. 2012).

La struttura di questo composto a 27 atomi di carbonio sottintende una complessa via di sintesi. Tuttavia tutti i suoi atomi di carbonio derivano da un unico precursore: l'acetato. Le unità isopreniche, intermedi essenziali della via che dall'acetato porta al colesterolo, sono precursori anche di altri lipidi naturali, e le reazioni con cui esse vengono polimerizzate sono le stesse in tutti i processi biosintetici.

La sintesi si svolge in quattro tappe: (1) condensazione di tre unità di acetato, per formare un intermedio a sei atomi di carbonio, il mevalonato; (2) conversione del mevalonato in unità isopreniche attivate; (3) polimerizzazione di unità isopreniche a cinque atomi di carbonio, a dare lo squalene, un composto lineare a 30 atomi di carbonio; e (4) ciclizzazione dello squalene a dare il nucleo steroideo a quattro anelli, da cui, attraverso una serie di altre modifiche (ossidazioni, rimozione o migrazione di gruppi metilici) si forma il colesterolo.

Nei vertebrati il colesterolo può essere sintetizzato da qualsiasi tipo cellulare ma la maggior parte viene prodotta nel fegato. Una piccola quota è incorporata nelle membrane degli epatociti, mentre la quota maggiore è esportata sotto una delle due seguenti forme possibili:

- acidi biliari,
- colesterolo e suoi esteri.

Gli **acidi biliari** e i loro sali sono derivati del colesterolo relativamente idrofilici, sintetizzati nel fegato per favorire la digestione dei lipidi.

Gli **esteri del colesterolo** si formano a partire dal **colesterolo** mediante l'azione dell'acil-CoA-colesterolo aciltrasferasi (ACAT). Questo enzima catalizza il trasferimento di un acido grasso dal coenzima A al gruppo ossidrilico del colesterolo, convertendolo in una forma ancora più idrofobica. Il colesterolo e i suoi esteri sono conservati negli epatociti o sono trasportati, insieme ad altri lipidi, sotto forma di lipoproteine secrete dal fegato a quei tessuti che utilizzano il colesterolo (Crook M. A. 2012), o escreti dall'organismo con la bile.

LIPOPROTEINE PLASMATICHE

Poiché i lipidi sono relativamente insolubili in mezzi acquosi, vengono trasportati nei fluidi sanguigni in complessi sferici di proteine solubili, chiamati lipoproteine. I gruppi solubili delle proteine (polari), i fosfolipidi e il colesterolo libero si affacciano all'esterno del complesso e avvolgono la parte più interna insolubile (non polare) formata da trigliceridi ed esteri del colesterolo. Le lipoproteine sono classificate in base alla loro densità, la quale è inversamente correlata alla loro dimensione: maggiore è il rapporto tra i lipidi e proteine, più grandi sono le lipoproteine, più bassa è la loro densità. Le lipoproteine sono classificate in cinque gruppi principali:

- Chilomicroni
- Lipoproteine a densità molto bassa – VLDL (very low-density lipoproteins)
- Lipoproteine a densità intermedia – IDL (intermediate-density lipoproteins)
- Lipoproteine a bassa densità – LDL (low density lipoproteins)
- Lipoproteine ad alta densità – HDL (high density lipoproteins)

Alle prime tre classi appartengono lipoproteine ricche in trigliceridi che, per le loro grandi dimensioni, deviano la luce, conferendo al plasma un aspetto torbido se presenti in alte concentrazioni. Le altre due classi comprendono lipoproteine più piccole in dimensioni contenenti soprattutto colesterolo.

Le proteine associate alle lipoproteine sono chiamate apolipoproteine (apo). L'apoA (apoA₁ e apoA₂) è principalmente associata alle particelle HDL, mentre l'apoB (apoB₁₀₀) si ritrova nelle LDL che ne presentano una sola molecola per particella. Nella circolazione sanguigna sono presenti anche l'apoC e l'apoE, particolarmente importanti nel metabolismo dei trigliceridi e negli scambi tra varie lipoproteine (Crook M. A. 2012).

METABOLISMO LIPOPROTEICO

Via esogena

Il colesterolo e gli acidi grassi rilasciati dopo digestione dei grassi introdotti con la dieta, sono assorbiti, insieme alla bile, dalle cellule della mucosa intestinale dove vengono ri-esterificati a formare esteri del colesterolo e trigliceridi. Questi, insieme a fosfolipidi, apoA e apoB sono quindi secreti nel sistema linfatico come chilomicroni. L'apoC e l'apoE, entrambi derivati dalle HDL, sono aggiunti ai chilomicroni nella linfa e nel plasma. L'enzima lipasi lipoproteica (LPL), collocato nell'endotelio vascolare e attivato dall'apoC associata ai chilomicroni, idrolizza i trigliceridi ad acidi grassi e glicerolo. I primi due sono captati dalle cellule adipose e muscolari o legati dall'albumina plasmatica, mentre il glicerolo entra nel processo glicolitico epatico. Durante la loro permanenza nella circolazione, i chilomicroni diventano più piccoli e rilasciano una quota di apoA e apoC insieme a fosfolipidi, diventando così chilomicroni remnants. Questi si arricchiscono in apoB, apoE e colesterolo e sono captati dal fegato in un processo di endocitosi

mediata da recettori: il legame tra apoE e recettori specifici sulla superficie degli epatociti promuove la captazione della particella che viene poi degradata nei lisosomi. Il colesterolo residuo viene utilizzato e le apolipoproteine catabolizzate (Crook M. A. 2012).

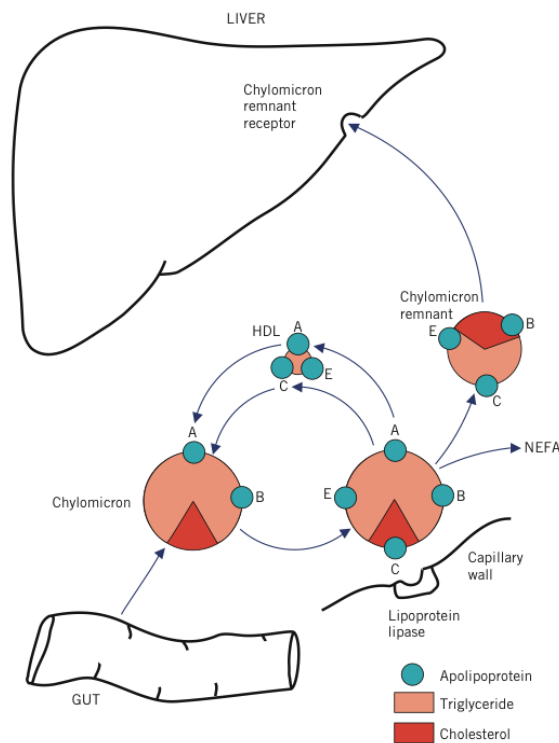


Figura 2: pathway esogeno lipidico; HDL=lipoproteine ad alta densità, NEFA=acidi grassi non-esterificati. (Crook M. A. 2012)

Via endogena

Il fegato è la principale sorgente endogena di lipidi. I trigliceridi sono sintetizzati a partire dagli acidi grassi e glicerolo, che derivano, rispettivamente, da accumuli di grasso o glucosio; il colesterolo può derivare dai chilomicroni remnants del processo esogeno o essere sintetizzato localmente. Questi lipidi sono trasportati dal fegato nella circolazione sistemica come VLDL.

Le VLDL sono particelle ricche in trigliceridi costituite da apoB₁₀₀, apoC e apoE; nella circolazione esse si arricchiscono ulteriormente di apoC derivante dalle HDL. Come i chilomicroni, le VLDL sono idrolizzate da LPL nei tessuti periferici ma con velocità inferiore. Le risultanti IDL contengono colesterolo, trigliceridi, apoB e apoE e sono rapidamente captate dal fegato o convertite in LDL dalla lipasi epatica (HL) attraverso la perdita di apoE e trigliceridi.

Le LDL sono lipoproteine di dimensioni ridotte contenenti solo apoB₁₀₀. Rappresentano circa il 70% della concentrazione totale di colesterolo nella circolazione plasmatica. Possono essere captate da numerosi tipi cellulari, con preferenza per le cellule epatiche tramite il recettore per le LDL che riconosce e lega l'apoB₁₀₀. Nelle cellule le LDL sono degradate ad opera dei lisosomi, rilasciando così colesterolo. Questo colesterolo può essere incorporato nelle membrane cellulari o in tessuti specifici come la corteccia surrenale o le gonadi ed essere substrato per la sintesi di ormoni steroidei (Crook M. A. 2012).

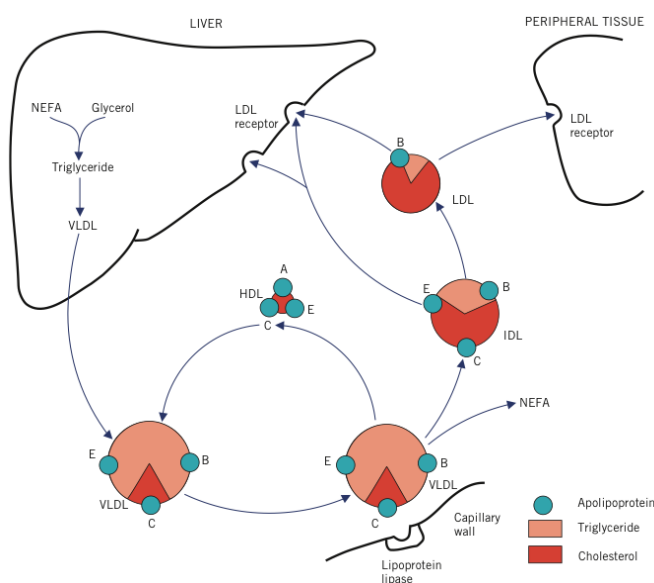


Figura 3: pathway endogeno lipidico; HDL=lipoproteine ad alta densità, IDL=lipoproteine a densità intermedia, LDL=lipoproteine a bassa densità, NEFA=acidi grassi non esterificati, VLDL=lipoproteine a densità molto bassa.(Crook M. A. 2012)

MALATTIA CARDIOVASCOLARE – aspetti generali

La malattia cardiovascolare (CVD), che comprende infarto del miocardio (MI), angina instabile (UA), ictus e morte cardiaca improvvisa, è la principale causa globale di morte (Santos-Gallego C. G., Giannarelli C., and Badimón J. J. 2011) ("Global Status Report on Noncommunicable Diseases" 2010) (Geneva, World Health Organization, 2011). L'importanza della CVD nel mondo è enorme e in continua crescita (Beaglehole R. and Yach D. 2003). Nel 2008 è stato stimato che il 30% delle morti in tutto il mondo (17.3 milioni) fosse dovuto a CVD. Di queste morti, 7.3 milioni sono attribuite a malattia coronaria del cuore e 6.2 milioni ad ictus (Federation, 2011). Al 2030 è stimato che la CVD continuerà ad essere la causa principale di problemi di salute nel mondo, diventando responsabile del 40% della mortalità globale (Mathers C. D. and Loncar D. 2006).

Il principale processo patologico alla base dello sviluppo di CVD è l'**aterosclerosi**.

ATEROSCLEROSI

L'aterosclerosi può essere definita sia genericamente come una malattia cronica caratterizzata da un ispessimento e indurimento anormali della parete dei vasi con conseguente perdita di elasticità sia, più in particolare come una malattia progressiva caratterizzata dall'accumulo di lipidi ed elementi fibrosi nella parete delle grandi arterie. Gli eventi che danno inizio all'aterosclerosi possono essere diversi in diverse condizioni ma, è generalmente accettato che la disfunzione endoteliale sia uno degli eventi principali. Tale disfunzione può essere dovuta a diversi fattori: danni vasali con esposizione di collagene, deposito di metaboliti nella parete vasale, cambiamenti nella reattività vascolare dovuti a cambiamenti nella velocità e nella forza del flusso sanguigno

(Tiwari R. L., Singh V., and Barthwal M. K. 2007). Il primo evento che dà inizio all'aterosclerosi è la formazione di lesioni precoci, chiamate strie lipidiche, nell'endotelio vasale. Le strie lipidiche dell'aterosclerosi consistono nell'accumulo sub endoteliale di macrofagi arricchiti in colesterolo, chiamati cellule schiumose (foam cells). Nell'uomo queste lesioni possono di norma trovarsi nell'aorta durante la prima decade di vita, a livello delle arterie coronarie nella seconda decade e nelle arterie cerebrali nella terza e quarta decade. Tali lesioni non sono clinicamente significative, ma possono essere i precursori di lesioni più avanzate, caratterizzate dall'accumulo di detriti necrotici ricchi in lipidi, linfociti e cellule muscolari lisce (SMC). Tali lesioni fibrose hanno tipicamente un cosiddetto cappuccio fibroso, costituito da SMC e matrice extracellulare che racchiude un "core" necrotico ricco in lipidi. Le placche possono assumere strutture sempre più complesse, con calcificazione e ulcerazione nella superficie luminale. Anche se le lesioni avanzate possono diventare sufficientemente grandi da occludere il vaso bloccando la circolazione, la complicazione clinica più importante dell'aterosclerosi è l'occlusione acuta dovuta alla formazione di un trombo o di un coagulo di sangue, che porta a infarto del miocardio o ictus. Di norma la trombosi è associata e conseguente alla rottura o all'erosione della lesione aterosclerotica (Lusis A. J. 2000).

Studi epidemiologici portati avanti negli ultimi 50 anni, hanno mostrato come, alla base dell'aterosclerosi, ci sia una grande complessità di fattori di rischio coinvolti (Lusis A. J. 2000). Questi possono essere suddivisi in fattori con una componente genetica rilevante (che presuppone il coinvolgimento di numerosi geni), e in fattori prevalentemente ambientali. In più, l'interazione tra diversi fattori di rischio complica ulteriormente la già complessa eziologia di questa patologia; spesso, infatti, gli effetti che ne derivano non sono semplicemente additivi (Lusis A. J. 2000).

È generalmente accettato e confermato da numerose osservazioni cliniche e sperimentali, Il concetto che l'aterosclerosi sia una malattia cronica infiammatoria, che ha inizio dall'adesione dei monociti alle cellule endoteliali attivate e disfunzionali (Glass C. K. and Witztum J. L. 2001) (Binder C. 2002). Possibili cause di tali disfunzioni endoteliale, che portano all'aterosclerosi, includono elevati livelli e modificazioni delle LDL, radicali liberi causati dal fumo di sigaretta, ipertensione, diabete mellito, alterazioni genetiche, elevate concentrazioni di omocisteina plasmatica, infezioni da microorganismi quali virus herpes o *Chlamidia pneumoniae* e combinazioni tra questi e altri fattori (Ross R. 1999).

La disfunzione endoteliale risultante dal danno porta a risposte compensatorie che alterano le normali proprietà omeostatiche dell'endotelio (Ross R. 1999). Manifestazioni di una disfunzione dell'endotelio causate da un danno includono un aumentato richiamo di lipoproteine e loro aggregati nelle arterie e la comparsa di specifiche glicoproteine di adesione sulla superficie delle cellule endoteliali (Ross R. 1993). In particolare, queste ultime producono molecole di adesione come le molecole di adesione cellulare vascolare (VCAM-1), molecole di adesione intracellulare (ICAM-1), selectine-P e selectine-E (Dong Z. M. 1998) e fattori chemotattici come la *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) (Lusis A. J. 2000).

In seguito a tali modificazioni di superficie monociti circolanti e linfociti-T cominciano ad aderire all'endotelio. I monociti quindi migrano attraverso il monostrato endoteliale all'interno dell'intima, e lì proliferano, si differenziano in macrofagi e cominciano a internalizzare le lipoproteine ossidate, diventando cellule schiumose (Cybulsky M. I. and Jongstra-Bilen J. 2010). Con il tempo le cellule schiumose muoiono riversando il loro contenuto lipidico nel "core" necrotico della lesione che prende il nome di stria lipidica.

Successivamente alcune strie lipidiche accumulano cellule muscolari lisce, che migrano dallo strato medio intinale. Con la secrezione di elementi fibrosi dalle cellule muscolari lisce, si formano placche fibrose che aumentano in dimensioni formando un cosiddetto cappuccio fibroso che racchiude i linfociti, le cellule schiumose, i lipidi e i detriti necrotici. Inizialmente, le lesioni crescono all'interno dell'avventizia finché non raggiungono un punto critico dopo il quale ha inizio la loro espansione verso l'esterno e l'invasione del lume vasale. Le lesioni continuano a crescere con la migrazione di nuove cellule mononucleate dal sangue che entrano nella placca; questo fenomeno è accompagnato da proliferazione cellulare, produzione di matrice extracellulare e accumulo di lipidi extracellulari.

La rottura del cappuccio fibroso che ricopre la lesione avanzata o la sua ulcerazione può rapidamente portare a trombosi e di norma avviene nelle zone più sottili. L'assottigliamento del cappuccio fibroso pare sia dovuta al continuo influsso e attivazione dei macrofagi, che rilasciano metallo-proteinasi e altri enzimi proteolitici (Ross R. 1999). Questi enzimi causano la degradazione della matrice che può portare a rottura del cappuccio e fuoriuscita di fattori pro-trombotici racchiusi al suo interno causando così formazione del trombo e occlusione dell'arteria (Libby P. 2005).

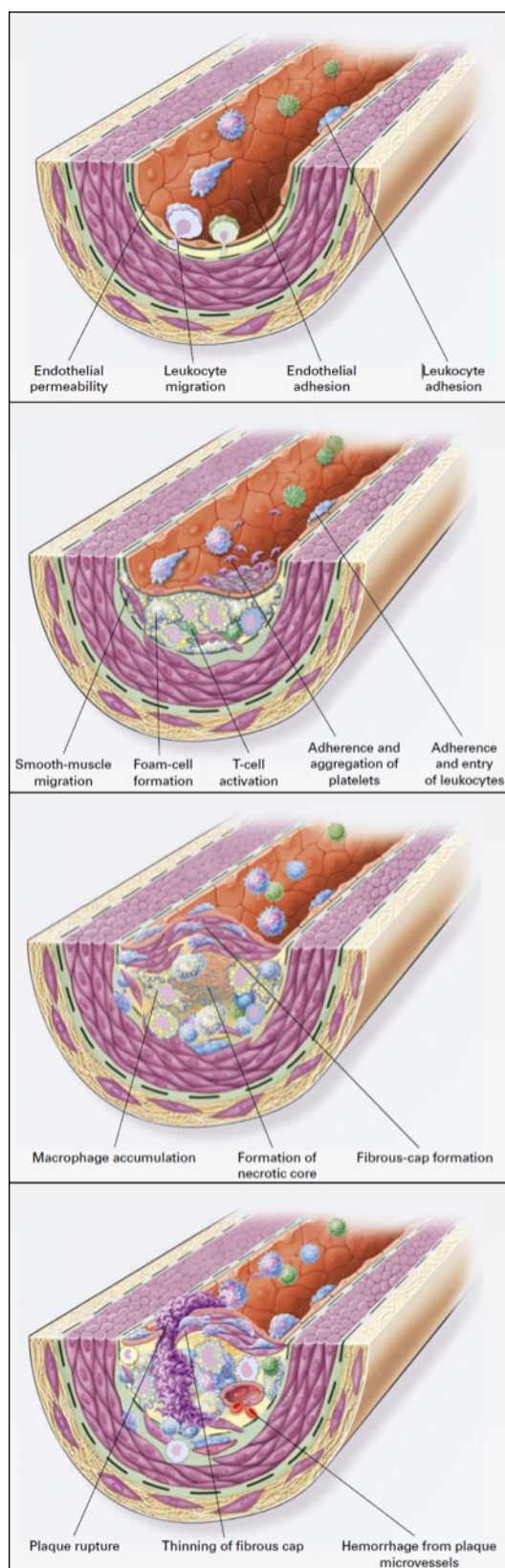


Figura 4: stadi progressivi di sviluppo della placca aterosclerotica. (Ross R. 1999)

TRASPORTO INVERSO DEL COLESTEROLO (RCT) MACROFAGICO

Molte cellule animali, ad eccezione degli epatociti e delle cellule steroideogeniche, non sono in grado di catabolizzare il colesterolo. Quasi tutte invece, sono in grado di sintetizzarlo, e, in aggiunta a questo, di acquisirlo anche dalle lipoproteine circolanti. Il colesterolo si trova in abbondanza nella membrana plasmatica, in particolare in quei depositi che prendono il nome di “lipid rafts”, e che formano aree ricche in proteine che partecipano alla trasduzione del segnale (Simons K. and Ehelalt R. 2002). Il colesterolo libero in eccesso all'interno delle cellule incapaci di metabolizzarlo, risulta essere citotossico (Tabas I. 2002). Vi sono diversi meccanismi che vengono messi in atto dalle cellule per evitare il raggiungimento del livello intracellulare tossico di colesterolo. Il principale meccanismo è l'esterificazione del colesterolo per mezzo dell'acil-coenzima A:colesterolo aciltransferasi (ACAT): il colesterolo estere viene successivamente stoccato in goccioline lipidiche citoplasmatiche per essere disponibile successivamente per varie esigenze della cellula (Alberts A. W. 1980).

È stato fortemente dimostrato che vi è un altro meccanismo di grande rilevanza, attraverso il quale le cellule dei tessuti incapaci di catabolizzare il colesterolo evitano il suo accumulo al loro interno: tale meccanismo è l'efflusso di colesterolo verso il compartimento plasmatico, in modo da farlo arrivare ai tessuti in grado di catabolizzarlo o al fegato, dove viene trasformato in ormoni steroidei o in sali biliari, rispettivamente. Questo meccanismo alternativo di rimozione del colesterolo da tali tessuti per eccellenza è il trasporto inverso del colesterolo (RCT), definito per la prima volta da Glomset nel 1968. Tale processo permette il trasporto di colesterolo, a partire da qualsiasi cellula periferica, nella circolazione sanguigna per mezzo delle HDL, la sua

captazione a livello degli epatociti e la sua escrezione, con la via epatobiliare, nella bile e successivamente nelle feci (Glomset J. 1968).

La relazione tra RCT e aterosclerosi è stata proposta negli anni '70, quando è stata avvalorata l'ipotesi che lo sviluppo della lesione aterosclerotica derivasse da uno squilibrio tra il deposito e la rimozione di colesterolo nelle arterie in seguito a danno endoteliale (Ross. R. and Glomset G. A. 1973). Successivamente, a sostegno di tale ipotesi, ha acquisito sempre più importanza il concetto che, sulla base della relazione inversa tra il colesterolo presente nelle HDL (HDL-C) e la malattia cardiovascolare, si dovesse dare importanza ad aumentare le HDL come meccanismo per favorire l'eliminazione del colesterolo dalla parete arteriosa attraverso l'RCT e prevenire così il progredire della placca aterosclerotica (Miller G. J. and Miller N. E. 1975). Nelle lesioni aterosclerotiche le principali cellule che si sovraccaricano di colesterolo sono i macrofagi; quindi, contestualizzando il processo di RCT nell'ambito dell'aterosclerosi, assume maggiore significato parlare di un processo macrofagico-specifico. Per questo è stato supportato l'utilizzo di un termine più preciso per tale processo, ovvero "RCT macrofagico" (Cuchel M. and Rader D. J. 2006).

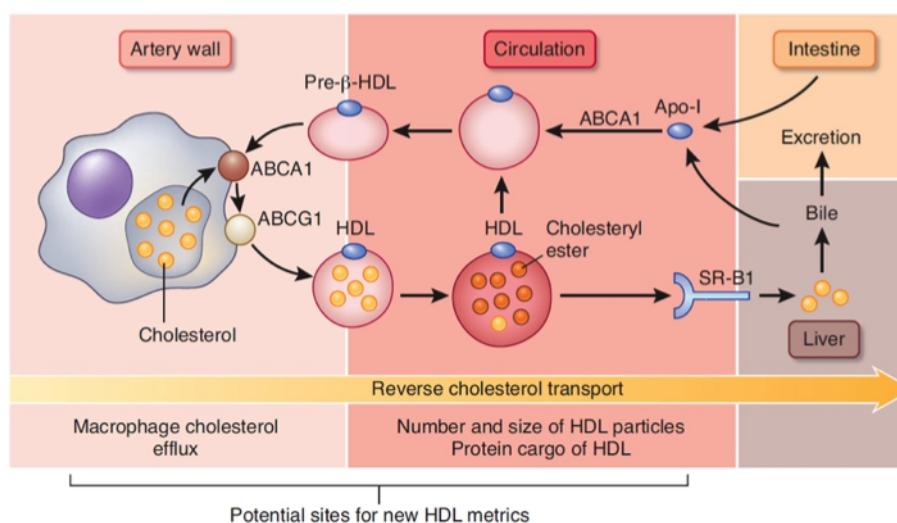


Figura 5: trasporto inverso del colesterolo

Efflusso di colesterolo dai macrofagi

I macrofagi arricchiti in colesterolo (cellule schiumose) residenti nella placca aterosclerotica, come tutte le cellule dei tessuti periferici incapaci di catabolizzare il colesterolo, possono proteggersi contro la tossicità derivante dall'accumulo di colesterolo libero sia convertendolo in estere, sia facendolo fuoriuscire ad accettori extracellulari. La velocità di questo secondo meccanismo, che prende il nome di efflusso di colesterolo (Johnson W. J. 1991), è dipendente dallo stato del colesterolo nei macrofagi, dal livello di espressione dei trasportatori e dalla composizione e concentrazione degli accettori extracellulari, generalmente HDL o loro sottofrazioni (Rader D. J. 2009) e rappresenta la prima tappa, e quella limitante, l'intero processo di RCT. Al 2003 erano noti tre meccanismi di efflusso di colesterolo libero dai macrofagi: (1) diffusione acquosa, (2) efflusso mediato dal recettore scavenger B-I (SR-BI) e (3) efflusso mediato dal trasportatore appartenente alla famiglia delle proteine leganti ATP, ABCA1 (Yancey P. G. 2003). Un quarto meccanismo è stato aggiunto due anni dopo, nel 2005, ovvero l'efflusso mediato dal trasportatore ABCG1 (Kennedy M. 2005).

Diffusione acquosa

Il meccanismo più semplice responsabile dell'efflusso di colesterolo cellulare è il processo attraverso il quale singole molecole di colesterolo sono sottoposte a desorbimento dalla membrana plasmatica, diffondono attraverso la fase acquosa e sono successivamente incorporate in accettori contenenti fosfolipidi; questo processo segue il gradiente di concentrazione di colesterolo tra le cellule e il compartimento plasmatico (Rothblat G. H. 1999). A basse concentrazioni di accettore, la velocità di trasferimento dipende dalla frequenza di collisione mediata dalla diffusione tra le

molecole di colesterolo e gli accettori plasmatici. Lo strato acquoso stagnante che circonda le cellule crea una significativa barriera alla diffusione (Phillips M. C. 1987). Ad elevate concentrazioni di accettore extracellulare, il desorbimento delle molecole di colesterolo dalla superficie delle particelle donatrici diventa il passaggio che influenza la velocità; c'è una elevata energia di attivazione associata a questo passaggio, e la velocità di trasferimento del colesterolo è fortemente dipendente dalla temperatura (Yancey P. G. 2003). La velocità di desorbimento può essere modulata anche dalla distribuzione dei lipidi nei diversi domini di membrana. Sono presenti, infatti, cosiddetti domini "veloci" e "lenti". L'organizzazione del colesterolo nei diversi domini della membrana plasmatica può cambiare a seconda del tipo cellulare e della quantità di tale molecola in membrana (Brown D. A. and London E. 1998). La velocità del rilascio di colesterolo mediato dal processo di diffusione acquosa è significativamente influenzata dalle proprietà degli accettori (Davidson W. S. 1995). La dimensione degli accettori è un fattore importante per il processo di diffusione in quanto la presenza di matrice extracellulare limita l'accesso alla superficie della cellula; infatti, piccole particelle contenenti fosfolipidi possono avvicinarsi con più facilità alla superficie della cellula, riducendo lo spessore dello strato acquoso che le molecole di colesterolo desorbite devono attraversare (Rothblat G. H. 1999). Nonostante questo è stato dimostrato che anche le piccole particelle contenenti fosfolipidi non riescono ad entrare direttamente in contatto con la membrana plasmatica a causa della repulsione tra fosfolipidi (McIntosh T. J. 1995), e della presenza di uno strato acquoso che, seppur sottile, si opporrà ai movimenti del colesterolo mediati da questo processo. Il desorbimento e la diffusione acquosa possono quindi essere visti come meccanismi relativamente inefficienti che operano in tutti i tipi cellulari. Il loro contributo relativo all'efflusso di colesterolo varia a

seconda del tipo cellulare e dipende dalla disponibilità di meccanismi aggiuntivi che aumentano l'efficienza del processo di efflusso (Rothblat G. H. 1999).

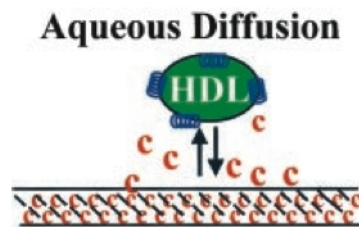


Figura 6: meccanismo di efflusso di colesterolo libero mediante diffusione acquosa (Yancey P. G. 2003)

Recettore Scavenger BI (SR-BI)

Uno dei meccanismi in grado di facilitare il processo di diffusione acquosa è l'efflusso mediato dal recettore scavenger BI (SR-BI) (Yancey P. G. 2003).

SR-BI è un membro della superfamiglia dei recettori di membrana CD36 (Rigotti A. 2003). E' una glicoproteina di 509 aminoacidi e 82 kDa con struttura a ferro di cavallo, un ampio loop extracellulare ancorato alla membrana plasmatica attraverso i domini transmembrana ammino- e carbossi-terminali, ed una corta estensione intracellulare (Acton S. L. 1994). La sua espressione avviene prevalentemente nel fegato, nella corteccia surrenale, nelle ovaie e testicoli e in tutti quei tessuti che hanno elevate richieste di colesterolo per la sintesi di acidi biliari e steroidogenesi (Owen J. S. 2002) oltre che nei macrofagi residenti nella placca aterosclerotica. Numerose molecole endogene e composti sintetici possono modulare la trascrizione genica di SR-BI. L'espressione del gene *Sr-bi* è regolata da SREBP e dal fattore steroidogenico-1 (SF-1) (Lopez L. and McLean M. P. 1999). In più, i ligandi LXR sono in grado di regolare sia l'espressione epatica di *Sr-bi* che quella in modelli di cellule endoteliali murine (Malerød L. 2003) (Malerød L. 2002). Nella placca aterosclerotica, la differenziazione dei monociti

in macrofagi porta all'aumento dell'espressione di *Sr-bi* mediante PPAR- α (Chinetti G. 2000a).

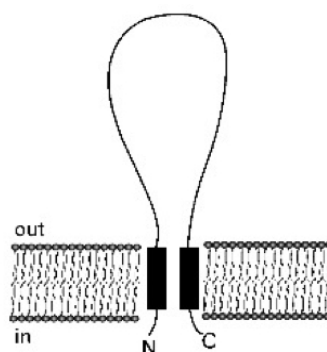


Figura 7: struttura del recettore SR-BI (Jessup W. 2006)

SR-BI è stato identificato inizialmente come un recettore in grado di riconoscere AcLDL, OxLDL e LDL native (Krieger M. and Herz J. 1994); successivamente gli è stato attribuito anche un ruolo di legame ad alta affinità alle HDL e di uptake del colesterolo estere presente nelle HDL, in assenza della loro conseguente degradazione (Acton S. L. 1994) (Murao M. 1997). Questo processo, diverso da quello di uptake del colesterolo dalle LDL, prende il nome di “uptake selettivo di lipidi”; diversamente dall’apoB₁₀₀, l’apolipoproteina presente nelle LDL che viene degradata a livello lisosomiale in seguito all’endocitosi delle LDL, la componente maggiore delle HDL, l’apoA₁, non viene degradata (Owen J. S. 2002). Inoltre SR-BI è risultato essere in grado di mediare anche un flusso di colesterolo libero ad accettori che siano però ricchi in fosfolipidi, come le HDL (Ji Y. 1997): non si osserva, infatti, alcun efflusso verso apolipoproteine prive di lipidi.

Il flusso di colesterolo mediato da SR-BI risulta essere bidirezionale e, come la diffusione acquosa, dipende dal gradiente di concentrazione tra i due lati della membrana plasmatica (Yancey P. G. 2003).

Il meccanismo con cui SR-BI media l'efflusso di colesterolo ad HDL non è stato totalmente compreso; inizialmente non era chiaro se le HDL si legassero fisiologicamente al recettore per mediare il flusso di lipidi, o se invece SR-BI promuovesse l'efflusso in modo indipendente dal legame ma ridistribuendo il colesterolo nei diversi domini di membrana, come le caveole (de la Llera-Moya M. 1999) (Kellner-Weibel G. 2000), che facilitano il flusso di colesterolo libero tra le cellule e le lipoproteine. Studi più recenti basati sull'utilizzo di anticorpi selettivi e mutanti difettivi nella capacità di legame di SR-BI, hanno invece mostrato che il legame tra le HDL e SR-BI è un prerequisito fondamentale per l'efflusso di colesterolo mediato da tale recettore (Gu X. 2000).

SR-BI è presente nei macrofagi (Hirano K. 1999) (Ji Y. 1997), ma il controllo della sua espressione differisce da ABCA1 e ABCG1, la cui espressione è fortemente indotta dall'accumulo di colesterolo. L'importanza di SR-BI nel processo di efflusso di colesterolo, come tappa limitante l'RCT, è stata ed è fonte di opinioni controverse in quanto numerosi studi in vitro hanno dimostrato la ridotta efficienza del processo di efflusso, mediato da SR-BI, dopo arricchimento dei macrofagi con AcLDL (Adorni et al. 2007) (Duong M. 2006), e vi sono evidenze che l'accumulo di colesterolo causi inibizione dell'espressione di SR-BI nei macrofagi umani e murini (Yu L. 2004). Questo meccanismo sembra essere indipendente da LXR e dalle proteine leganti elementi regolatori (SREBP) (Yu L. 2004), nonostante ci siano evidenze della presenza di elementi responsivi a SREBP nel promotore di SR-BI (Tréguier M. 2004). Altre evidenze, in contrasto con le precedenti, riportano una aumentata espressione di SR-BI nei macrofagi umani durante l'uptake di LDL modificate (Svensson P. 2005) (Hirano K. 1999). Tali differenze potrebbero essere dovute a diversi livelli di differenziazione

macrofagica nei diversi esperimenti, in quanto l'espressione di SR-BI aumenta con la differenziazione da monociti a macrofagi (Chinetti G. 2000b) (Yu L. 2004) (Svensson P. 2005). Non sono riportate differenze nei livelli di espressione di SR-BI nei macrofagi tra pazienti con aterosclerosi e sani (Svensson P. 2005). In generale, studi sul controllo dell'espressione e sulla stabilità di SR-BI nei macrofagi in risposta ai livelli di steroli presenti, sono limitati e non chiariscono il suo ruolo nella risposta cellulare agli eccessi di colesterolo.

Per la presenza di SR-BI nei macrofagi e nel fegato e per la sua azione di trasporto di colesterolo, è stato comunque ipotizzato un suo coinvolgimento positivo all'RCT macrofagico. In accordo con tale ipotesi, la sovraespressione al livello epatico di SR-BI, è stata dimostrata aumentare significativamente la quantità di colesterolo di origine macrofagica escreta con le feci (Zhang Y. 2005a). Evidenze successive discordanti hanno invece messo in dubbio tale ruolo positivo di SR-BI sull'RCT: è stato dimostrato che il deficit di SR-BI nei macrofagi non causa alterazione nel processo di RCT (Wang X. 2007), ma anche che topi knock out per il recettore delle LDL e per l'apoE e con assenza di SR-BI nei macrofagi sviluppavano aterosclerosi spontanea (Covey S. 2003). In risposta a tali dubbi altre evidenze dimostrano che SR-BI macrofagico può ricoprire ruolo pro- o anti-aterogeno a seconda dello stadio di sviluppo della placca aterosclerotica (Van Eck M. 2004).

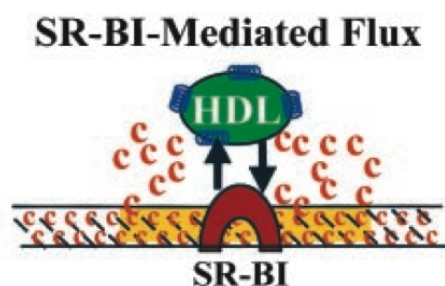


Figura 8: meccanismo di efflusso di colesterolo libero mediato da SR-BI (Yancey P. G. 2003)

Trasportatori ABC

I trasportatori appartenenti alla classe ABC (ATP-Binding Cassette) sono la più vasta famiglia di trasportatori presenti in membrana (Dean M. 2001). Essi sono suddivisi in sette sottoclassi, da ABCA ad ABCG. Tutti i membri della famiglia ABC sono proteine integrali di membrana e utilizzano ATP come fonte di energia per trasportare metaboliti attraverso le membrane. Possono essere suddivisi in due gruppi a seconda della loro struttura: (1) trasportatori “interi”, come ABCA1, che hanno due unità strutturali simili, legate covalentemente, che mediano il trasporto di fosfolipidi e colesterolo e particelle povere o prive di lipidi; (2) gli “emi”-trasportatori, caratterizzati da una singola unità strutturale formante sia omodimeri, come ABCG1, che mediano il trasporto di colesterolo cellulare verso particelle lipidate, sia eterodimeri, come ABCG5/G8, che limitano l'assorbimento intestinale e promuovono l'escrezione biliare di steroli neutri (Dean M. 2001) (Oram J. F. 2006).

ABCA1 è una proteina di membrana formata da 2261 aminoacidi, organizzata in due strutture simili covalentemente legate tra loro (Fitzgerald M. L. 2001). Ciascuna metà possiede un dominio transmembrana contenente 6 eliche e un dominio legante nucleotidi (NBD) formato da due motivi peptidici conservati noti come Walker A e Walker B, che sono presenti in molte proteine che idrolizzano ATP, e un Walker C, che caratterizza unicamente gli ABC (Dean M. 2001). Si pensa che ABCA1 abbia un dominio N-terminale orientato nel citoplasma e due loops extracellulari che sono altamente glicosilati e legati tra loro da uno o più legami cisteina (Bungert S. 2001)

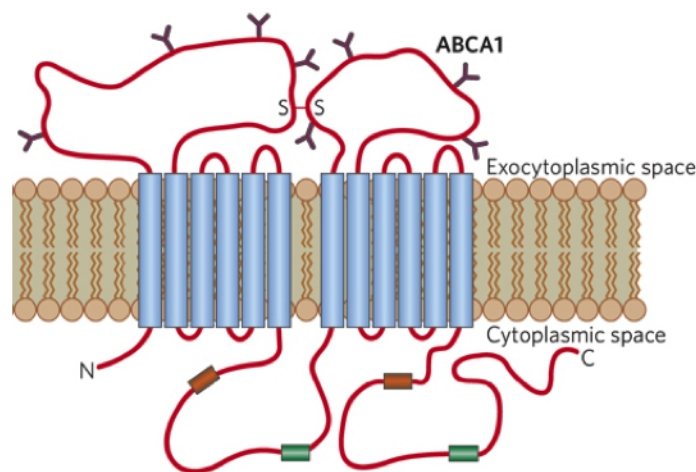


Figura 9: struttura del trasportatore ABCA1 (Maxfield F. R. and Tabas I. 2005)

ABCA1 è largamente espressa nei tessuti animali, nei quali svolge diverse funzioni. Nell'uomo e nei babbuini, l'mRNA di ABCA1 è maggiormente abbondante nel fegato, nella placenta, nell'intestino tenue e nei polmoni (Kielar D. 2001). Nel topo è presente soprattutto nel fegato, nei reni, nei surreni, nel cuore, nelle gonadi e nel cervello (Wellington C. L. 2002).

Basandosi su studi in vitro si è potuto affermare che tessuti ricchi in macrofagi possiedono elevati livelli relativi di ABCA1. In qualità di cellule spazzine i macrofagi ingeriscono lipoproteine modificate e membrane cellulari danneggiate accumulando così grandi quantità di colesterolo e ossisteroli che sono induttori di ABCA1. ABCA1 è anche ampiamente espresso nel fegato, dove viene indotto quando i topi sono nutriti con dieta ricca in colesterolo (Wellington C. L. 2002). Ci si può aspettare, di conseguenza, che ABCA1 epatico giochi un ruolo importante nel metabolismo lipoproteico per l'intero organismo.

I livelli proteici di ABCA1 e la sua attività sono altamente regolati da numerosi processi trascrizionali e post-trascrizionali (Chen W. 2005). Sembra che questi meccanismi

regolatori coordinano l'attività totale di ABCA1 in modo cellula-specifico, in risposta a diversi stimoli ambientali. Diversi di questi processi possono essere coinvolti nel metabolismo lipoproteico e nell'aterogenesi (Oram J. F. 2006). Come ci si può aspettare per un trasportatore che media la secrezione di eccessi di colesterolo cellulare, la trascrizione di ABCA1 è fortemente indotta da un sovraccarico delle cellule con colesterolo (Langmann T. 1999). Questo avviene esclusivamente attraverso il recettore nucleare epatico X (LXR α e/o LXR β) e il recettore retinoide X (RXR) (Costet P. 2000). LXR e RXR formano eterodimeri obbligati che legano preferenzialmente elementi di risposta tra il promotore del gene *Abca1* e il primo introne. LXR e RXR si legano e sono attivati da ossisteroli e dall'acido retinoico, rispettivamente (Repa J. J. 1999). Il trattamento delle cellule con ossisteroli o acido retinoico induce ABCA1, ma il trattamento combinato con entrambi esercita un effetto sinergico sul sistema (Costet P. 2000).

Uno studio pubblicato nel 2002 mostra un elevato livello di discordanza tra i livelli di mRNA di ABCA1 e quelli di proteina in tessuti murini (Wellington C. L. 2002), implicando un elevato grado di regolazione post-trascrizionale. La maggior parte di questa regolazione sembra avvenire a livello della stabilità della proteina. In cellule in coltura in condizioni basali, ABCA1 è altamente instabile (emivita intorno alle 1/2 ore) (Wang N. 2003) (Wang Y. and Oram J. F. 2002). L'interazione delle apolipoproteine con cellule che esprimono ABCA1 riduce drasticamente la velocità di degradazione del trasportatore inibendo la sua proteolisi mediata dalla calpaina (Wang N. 2003) e attivando altri eventi di segnale (Arakawa R. and Yokoyama S. 2002). Questa regolazione agisce come un meccanismo di feedback per sostenere i livelli di ABCA1 quando sono disponibili elevati livelli di accettori di lipidi cellulari (Oram J. F. 2006).

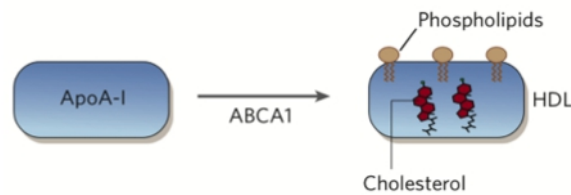


Figura 10: attività di trasporto di ABCA1 (Maxfield F. R. and Tabas I. 2005)

È ampiamente dimostrato che ABCA1 media il trasporto di fosfolipidi e colesterolo ad apolipoproteine povere in lipidi come l'apoA₁ (Oram J. F. 2005).

Si pensa che ABCA1 formi un canale nella membrana che promuove il passaggio dei lipidi dall'interno all'esterno della membrana con un meccanismo dipendente da ATP (Oram J. F. 2005).

È stato suggerito un meccanismo di attività sequenziale per ABCA1, inizialmente con lo stimolo dell'efflusso di fosfolipidi ad apoA₁ a generare un accettore di colesterolo adatto, nel quale successivamente il colesterolo può essere trasferito. Tale modello sequenziale nasce da alcune evidenze che l'efflusso di colesterolo e quello di fosfolipidi possono essere sperimentalmente dissociati (Fielding P. E. 2000); altre osservazioni, invece, sembrano contraddire tale modello (Smith J. D. 2004). È stato proposto un meccanismo alternativo di trasporto di colesterolo e fosfolipidi che prevede il loro efflusso simultaneo ad apoA₁ come unità (detto "microsolubilizzazione di membrana" (Yancey P. G. 2003)).

Sembra ABCA1 sia in grado di agire sui domini lipidici principalmente con due meccanismi (Oram J. F. 2005); il primo prevede che ABCA1 generi domini lipidici sulla membrana plasmatica che successivamente vengono rimossi dalle apolipoproteine che interagiscono con ABCA1 presente sulla superficie cellulare (Gillotte K. L. 1999). Il

secondo modello suggerisce che vescicole endocitiche contenenti ABCA1 e apolipoproteine si muovano verso i depositi lipidici, e lì ABCA1 sposti i lipidi nelle vescicole per il rilascio mediante esocitosi (Santamarina-Fojo S. 2001) (Takahashi Y. 1999). Ci sono evidenze che dimostrano che entrambi i meccanismi possono coesistere nella stessa cellula (Chen W. 2005).

L'accumulo di macrofagi arricchiti in colesterolo (cellule schiumose) nella parete delle arterie è uno degli eventi precoci nella formazione delle lesioni aterosclerotiche; per questo, l'attività relativa di ABCA1 espresso nei macrofagi delle placche può avere un forte impatto sul processo di aterogenesi. Studi nell'uomo su patologie delle HDL e su modelli murini supportano tali considerazioni (Oram J. F. 2006).

Mutazioni funzionali di ABCA1 causano la malattia di Tangier, caratterizzata da una severa riduzione delle HDL circolanti, accumulo di steroli nei macrofagi tissutali e accelerata aterosclerosi. I soggetti omozigoti ed eterozigoti composti per tale malattia con più di 30 anni presentano un'incidenza di sviluppo di malattia cardiovascolare 6 volte più alta del normale (Serfaty-Lacroisniere C. 1994). In generale, malattia cardiovascolare prematura è associata con mutazioni di ABCA1 che danneggiano la sua funzione (Singaraja R. R. 2003).

Nei topi, la delezione di ABCA1 macrofagico causa bassi livelli di HDL e aumenta lo sviluppo dell'aterosclerosi (Aiello R. J. 2002) mentre una sua overespressione riduce l'aterosclerosi in topi iperlipidemici knock out per il recettore delle LDL (Van Eck M. 2006). In base al suo ruolo chiave nel fegato, la delezione epatica specifica di ABCA1 porta ad un aumento dello sviluppo dell'aterosclerosi come conseguenza della ridotta quota di HDL circolanti (Brunham L. R. 2009).

ABCG1 appartiene alla famiglia degli emi-trasportatori ABCG. Poiché un trasportatore attivo necessita di due domini che legano nucleotidi e due domini transmembrana, i membri della famiglia ABCG devono formare etero- o omodimeri per esercitare le loro attività di trasporto. Si pensa che ABCG1 agisca come omodimero nei macrofagi (Nakamura K. 2004) (Oram J. F. 2005). Il gene completo *Abcg1* presenta 23 esoni (Kennedy M. 2001) e sono stati evidenziati trascritti multipli di ABCG1 umano e murino mediante l'utilizzo di esoni o promotori alternati (Baldán A. 2006); nonostante questo è stato dimostrato esserci un solo trascritto attivo in vivo (Oram J. F. 2006).

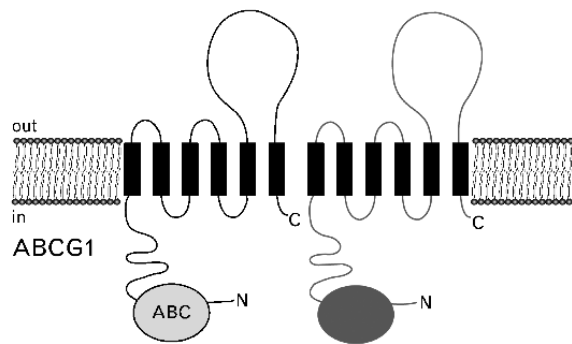


Figura 11: struttura del trasportatore ABCG1 (Jessup W. 2006)

Come ABCA1, l'espressione di ABCG1 può essere ritrovata in molti tessuti, ma in modo preponderante è presente nei tessuti ricchi in macrofagi. Nel fegato l'espressione è maggiore nelle cellule di Kupffer e più bassa nelle cellule parenchimali (Hoekstra M. 2003).

Il controllo dell'espressione di ABCG1 è simile a quello di ABCA1, e questo fa ipotizzare per entrambi un comune ruolo di trasporto di colesterolo (Schmitz G. 2005). Nei macrofagi umani l'espressione di ABCG1 è bassa ma fortemente indotta durante la differenziazione (Klucken J. 2000), dopo carico con colesterolo (Hoekstra M. 2003) e da

ligandi che attivano LXR (Venkateswaran A. 2000). L'espressione di ABCG1 può essere controllata da agenti che inibiscono (es. statine) o stimolano (es. inibitori della 2,3-ossisqualene:lanosterolo ciclastasi) la sintesi di ligandi di LXR ossisterolici endogeni (Jessup W. 2006). In modo interessante, i ligandi di PPAR- γ inducono l'espressione di ABCG1 in macrofagi knock out per *Lxr a/b*, indicando l'esistenza un meccanismo di controllo dell'espressione indipendente da LXR (Li A. C. 2004). L'espressione di ABCG1 può inoltre aumentare in risposta ad agenti infiammatori (Argmann C. A. 2001) (Rubic T. and Lorenz R. L. 2006).

Studi in topi knock out per *Abcg1* hanno dimostrato la sua importanza nel trasporto di lipidi a livello macrofagico ed epatico. La delezione mirata di *Abcg1* nei topi non causa alterazioni nei livelli di lipidi circolanti ma porta ad un massiccio accumulo sia di lipidi neutri che di fosfolipidi negli epatociti e nei macrofagi presenti in diversi tessuti, in seguito a somministrazione di una dieta ricca in colesterolo (Kennedy M. 2005). Al contrario, l'overespressione di ABCG1 umano protegge i tessuti dall'accumulo di lipidi indotto dalla dieta iperlipidemica (Kennedy M. 2005). Questi risultati indicano che ABCG1 è essenziale per l'omeostasi del colesterolo nei macrofagi ed è necessario per la rimozione dell'eccesso di colesterolo da queste cellule. L'elevato contenuto in trigliceridi osservato nelle cellule di topi knock out per *Abcg1* suggerisce anche che ABCG1 potrebbe ricoprire un ruolo importante nella modulazione del metabolismo di questa classe di lipidi in vivo. Sempre negli stessi topi, l'accumulo di lipidi a livello epatico ha portato alla formulazione dell'ipotesi che questo trasportatore fosse coinvolto nel metabolismo o trasporto lipidico epatico. ABCG1 è relativamente poco espresso nel fegato (Kennedy M. 2005), specialmente se comparato con ABCA1 e l'assenza di alterazioni nel profilo lipidico plasmatico in modelli animali, dopo ablazione o aumento

dell'espressione di ABCG1, implica che il coinvolgimento di questo trasportatore nella produzione ed eliminazione delle lipoproteine a livello epatico sia comunque scarso e che preveda una sua attività a livello del trafficking o secrezione biliare del colesterolo intraepatico (Ito T. 2003).

ABCG1 stimola sia l'efflusso di colesterolo libero dai macrofagi ad HDL mature (Nan Wang et al. 2004) che l'efflusso di fosfolipidi (Kobayashi et al. 2006) con una entità del contributo che risulta essere molto inferiore a quello di ABCA1 (Zanotti et al 2012). A differenza del modello proposto per l'efflusso mediato da ABCA1, l'efflusso dipendente da ABCG1 non necessita il legame della cellula donatrice all'accettore extracellulare (Sankaranarayanan et al. 2009). Sono stati proposti due differenti modelli per descrivere l'efflusso di colesterolo mediato da ABCG1. Il primo suggerisce che ABCG1 permetta alle molecole steroliche di superare l'energia di attivazione necessaria per oltrepassare lo strato idrofobico; successivamente la collisione accidentale con accettori extracellulari contribuisce a completare il processo di efflusso (A. R. Tall et al. 2008). Il secondo meccanismo propone che ABCG1 aumenti la disponibilità di colesterolo in pool specifici di membrana nei quali diventa disponibile per le HDL mature ma non per l'apoA₁ povera in lipidi (Vaughan and Oram 2005). Quest'ultima osservazione è consistente con la distribuzione di ABCG1 nella membrana cellulare.

È stato ipotizzato che i trasportatori ABCA1 ed ABCG1 agiscano in modo sinergico nel rimuovere colesterolo dalle cellule (Gelissen IC, et al., 2006). Il modello proposto prevede che ABCA1 medi la conversione delle particelle di apoA₁ prive o povere di lipidi ad HDL nascenti; tali particelle, poi, continuerebbero ad arricchirsi in colesterolo attraverso il trasporto lipidico ABCG1-mediato (Gelissen I. C. 2006) (Oram J. F. 2006).

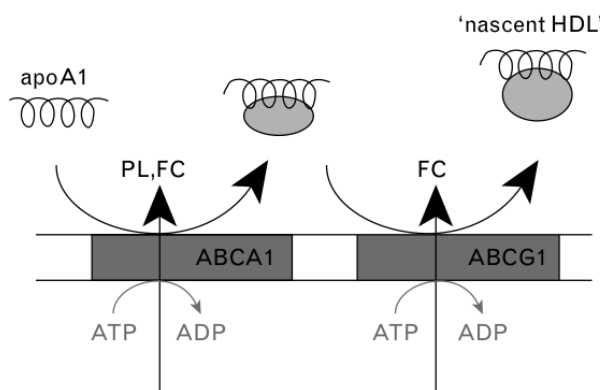


Figura 12: attività sinergica di trasporto di ABCA1 e ABCG1 (Jessup W. 2006)

Rimodellamento delle HDL e uptake epatico

Il colesterolo fuoriuscito dalle cellule dei tessuti periferici (inclusi i macrofagi della placca aterosclerotica) viene successivamente trasportato attraverso il compartimento plasmatico nei vari passaggi di rimodellamento delle lipoproteine HDL.

Le HDL trasportano approssimativamente un terzo del colesterolo plasmatico totale nell'uomo (Oram J. F. 1996) e sono lipoproteine multifunzionali ed eterogenee che differiscono tra loro per densità, dimensione, mobilità elettroforetica, composizione lipidica e contenuto apolipoproteico (Rothblat G. H. and Phillips M. C. 2011), e che sono in grado di scambiare vari lipidi e molecole lipofile tra tessuti e altre lipoproteine.

Le HDL umane contengono due principali apolipoproteine: l'apoA₁ e l'apoA₂, in percentuale rispettivamente del 70% e del 20%. In percentuale molto ridotta rientrano nella composizione delle HDL anche altre apolipoproteine come l'apoA₄, le apoC, apoD, apoE ed apoJ (Barter P. J. 2002).

Le HDL possono essere frazionate in sottoclassi discrete attraverso diverse tecniche che permettono di discriminarle secondo le loro proprietà fisico-chimiche. Le HDL umane, se separate per ultracentrifugazione, formano due principali sottoclassi in base

alla densità: le HDL₂ (1.063–1.125 g/ml) e le HDL₃ (1.125–1.21 g/ml) che sono relativamente ricche in proteine (Havel R. J., Eder H. A., and Bragdon J. H. 1955). Le HDL₂ e le HDL₃ possono ulteriormente essere suddivise per mezzo di gradiente elettroforetico in HDL_{2b} (10.6 nm), HDL_{2a} (9.2 nm), HDL_{3a} (8.4 nm), HDL_{3b} (8.0 nm) e HDL_{3c} (7.6 nm), in ordine decrescente di diametro (Rothblat G. H. and Phillips M. C. 2011). Le HDL possono essere separate anche in base alla loro mobilità elettroforetica, in due classi principali: la sottoclasse maggiore possiede una densità relativa di carica superficiale negativa ed è chiamata α -HDL, mentre l'altra frazione viene chiamata pre β -HDL (Kunitake S. T. 1985). La maggior parte delle HDL plasmatiche appartiene alla sottoclasse delle α -HDL, mentre le pre β -HDL rappresentano approssimativamente solo il 5% del totale delle lipoproteine contenenti apoA₁ (Fielding C. J. and Fielding P. E. 1995).

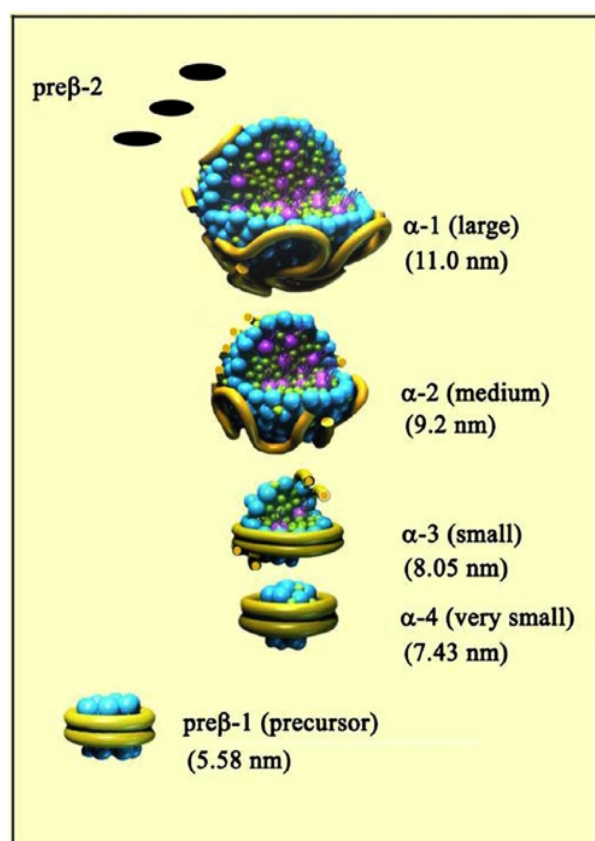


Figura 13: sottopopolazioni di HDL (Asztalos B. F. 2010)

Il rimodellamento delle HDL a carico di fattori plasmatici è un punto cruciale del loro metabolismo e ne sottolinea la natura dinamica. Le HDL sono substrato di enzimi plasmatici (Tabella 1) e l'attività di trasferimento di lipidi di questi enzimi causa la continua interconversione delle varie popolazioni di HDL presenti nel plasma umano (Zannis V. I., Chroni A., and Krieger M. 2006).

Rimodellamento delle HDL	Fattori plasmatici
Disco → sfera	LCAT
Sfera grande → sfera piccola + apoA ₁	CETP e lipasi epatica
Sfera grande → sfera piccola	Lipasi endoteliale
Sfera → sfera più grande o più piccola + apoA ₁	PLTP

Tabella 1: fattori plasmatici coinvolti nel rimodellamento delle HDL (adattato da (Rothblat G. H. and Phillips M. C. 2011)

Le HDL sono sintetizzate attraverso un complesso processo. Il loro assemblaggio coinvolge inizialmente il trasporto, mediato da ABCA1 di membrana, di fosfolipidi cellulari e di colesterolo ad apoA₁ extracellulare: l'apoA₁ è sintetizzata nel fegato e nell'intestino ed è secreta come apolipoproteina priva di lipidi; nella circolazione, l'apoA₁ a cui vengono trasferite alcune molecole lipidiche, forma le pre β -HDL (Asztalos B. F. 2010); queste interagiscono con ABCA1 sulle membrane degli epatociti e delle cellule dei tessuti periferici, acquisiscono altri fosfolipidi e colesterolo di derivazione cellulare (non esterificato) e si trasformano in particelle con minore mobilità elettroforetica: le α -HDL₄ (Asztalos B. F. 2010). Questo è seguito dal rimodellamento delle particelle HDL nel compartimento plasmatico, che avviene in seguito a diversi meccanismi: l'esterificazione del colesterolo ad opera dell'enzima lecitina:colesterolo aciltrasferasi

(LCAT), il trasferimento di apoA₁ tra HDL povere e ricche in lipidi, il trasferimento di esteri del colesterolo dalle HDL ad altre lipoproteine e il simultaneo scambio con trigliceridi ad opera della proteina di trasferimento del colesterolo estere (CETP), e lo scambio di fosfolipidi tra le HDL e altre lipoproteine mediato dalla proteina di trasferimento dei fosfolipidi (PLTP). Questi meccanismi causano, nelle HDL, una maturazione e conseguente crescita in dimensioni.

Le particelle HDL con le maggiori dimensioni sono le α -HDL₁ e le α -HDL₂. Queste HDL di grandi dimensioni possono rilasciare colesterolo direttamente nella bile attraverso il trasportatore SR-BI espresso negli epatociti. Alternativamente il colesterolo può essere trasferito da queste HDL a lipoproteine ricche in trigliceridi tramite la CETP. L'azione della CETP risulta in un trasferimento di massa: esteri del colesterolo vengono trasferiti dalle HDL a lipoproteine contenenti apoB come le VLDL, ricche in trigliceridi, i quali vengono trasferiti, in senso inverso, da tali lipoproteine verso HDL e LDL (Barter P. J. 2002) (Rader D. J. 2003).

La PLTP è un'altra glicoproteina del plasma che interviene nel rimodellamento delle HDL, prodotta da un gene della stessa famiglia dei geni della CETP. La PLTP promuove il trasferimento di fosfolipidi tra HDL e altre lipoproteine. Di particolare importanza è il ruolo della PLTP nel rilascio di fosfolipidi dai chilomicroni alle HDL (Qin S. 2000) (Rader D. J. 2003).

Le α -HDL₁ arricchite in trigliceridi, substrato per una lipolisi progressiva ad opera della lipasi epatica HL, sono convertite in particelle più piccole. Per questo, soggetti con aumentati livelli di trigliceridi possiedono spesso livelli ridotti di piccole HDL (Asztalos B. F. 2010).

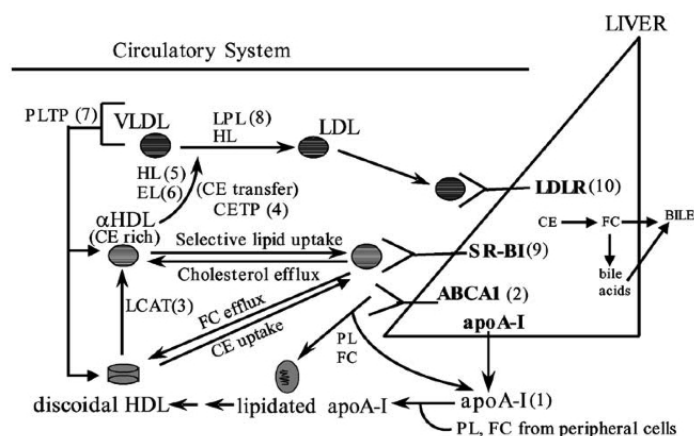


Figura 14: pathway biogenetico e catabolico delle HDL (Zannis V. I., Chroni A., and Krieger M. 2006)

È stato ampiamente dimostrato che i diversi meccanismi di rimodellamento delle HDL e le diverse sottopopolazioni di queste lipoproteine ricoprono ruoli chiave nel processo di RCT macrofagico, permettendo al colesterolo fuoriuscito dalle placche aterosclerotiche di essere trasportato efficientemente nella circolazione, arrivare al fegato ed essere captato.

L'attività dell'enzima LCAT è stata ritenuta, per lungo tempo, critica per la promozione dell'RCT, grazie al mantenimento di un gradiente di colesterolo libero tra le cellule periferiche e le HDL nel plasma (Glomset J. 1968), processo indispensabile perché si abbia un flusso continuo di colesterolo dalle cellule al plasma (Franceschini G. 1991) e sia impedito il ritorno del colesterolo nelle cellule (Glomset J. 1968) (Czarnecka H. and Yokoyama S. 1996). Inoltre, la stabilità delle HDL dipende in qualche modo dall'azione di LCAT e dal contenuto di CE: le pre-β-HDL povere in lipidi sono infatti soggette a rapido turnover. A sostegno del ruolo positivo di LCAT nel processo di RCT, è stato dimostrato che tale enzima facilita anche il rilascio di colesterolo al fegato (Fournier N. 1999).

Nonostante tali evidenze, vi sono diverse ragioni che hanno portato a mettere in dubbio il ruolo di LCAT nel processo di RCT: pazienti con deficit in LCAT mostrano accumulo di colesterolo solo in cellule e organi specifici, come enterociti, reni e cornea (Kunnen S. and Van Eck M. 2012); è stato dimostrato che, all'efflusso di colesterolo, contribuiscono processi che non necessitano di un gradiente di colesterolo per svolgere la loro funzione, come il trasporto mediato da ABCA1 e ABCG1, e che il contributo di tali trasportatori sia maggiore rispetto all'efflusso mediante trasporto passivo secondo gradiente (Yancey P. G. 2000); la sovraespressione di LCAT nel fegato di topi wild type non stimola il processo di efflusso di colesterolo da tessuti extraepatici nonostante vi sia accumulo di particelle HDL ricche in colesterolo estere nella circolazione (Alam K. 2001); il siero di portatori di mutazioni geniche in LCAT possiede la stessa capacità dei controlli di ridurre il contenuto di colesterolo da macrofagi arricchiti in colesterolo a causa del maggior contributo dell'efflusso mediato da ABCA1 (Calabresi L. 2009).

Inoltre nel 2009 è stato dimostrato che la sovraespressione stabile di LCAT in modelli murini non porta ad aumento dell'RCT macrofagico, nonostante l'incremento sostanziale dei livelli di colesterolo associato alle HDL. Anche in condizioni di coespressione, in questi modelli, di SR-BI e CETP, che aumentano il trasperimento del colesterolo estere derivato dalle HDL al fegato, l'overespressione di LCAT non è in grado di stimolare l'RCT macrofagico (Tanigawa H. 2009).

Nonostante siano necessari ulteriori esperimenti, questi risultati mettono in dubbio se l'attivazione farmacologica di LCAT porti necessariamente ad una promozione dell'RCT e, di conseguenza, a ricoprire un ruolo ateroprotettivo.

Nel modello classico di RCT, le HDL sono trasportate al fegato e captate dagli epatociti; di conseguenza tale meccanismo di uptake è stato oggetto di grande interesse. Il

processo più diretto individuato è stato la captazione selettiva delle HDL per mezzo del recettore SR-BI epatico. Con “captazione selettiva” si intende l’internalizzazione da parte degli epatociti via SR-BI solo del colesterolo presente nelle HDL, mantenendo nella circolazione le proteine come l’apoA₁. La maggior parte delle discussioni riguardanti la captazione di colesterolo da parte di SR-BI si è incentrata sulla capacità del trasportatore di captare non solo il colesterolo estere, ma anche quello libero (Wang N. 1998) (Ji N. 1999). La sovraespressione di SR-BI nel fegato riduce i livelli di colesterolo circolante associato alle HDL in conseguenza all’aumentato uptake epatico (Kozarsky K. F.) mentre la delezione di SR-BI in modelli murini ha portato ad un aumento del colesterolo HDL circolante in seguito ad una ridotta captazione epatica (Varban M. L. 1998) (Rigotti A. 1997) (Brundert M. 2005). È stato dimostrato che l’espressione di SR-BI a livello epatico nei topi porta ad una regolazione positiva del processo di RCT macrofagico (Zhang Y. 2005b) anche a fronte di ridotte concentrazioni di HDL circolanti, mentre una sua delezione causa una riduzione dell’RCT macrofagico nonostante l’aumento delle HDL circolanti. Queste dimostrazioni portano alla formulazione del concetto che il flusso di colesterolo nei diversi stadi dell’RCT sia un determinante più importante per l’ateroprotezione rispetto alla concentrazione in sé e per sé di HDL circolanti.

Alcune specie animali, compreso l’uomo, possiedono un meccanismo alternativo di trasporto di colesterolo al fegato, quello mediato da CETP, che arricchisce le LDL in CE. Le LDL possono poi cedere il CE al fegato in seguito all’interazione con il recettore per le LDL (LDLR).

Il deficit di CETP nell’uomo è associato a manifestazioni quali iper-alfalipoproteinemia, elevati livelli plasmatici di HDL sferiche di grosse dimensioni, e cambiamenti nella

composizione delle HDL e LDL (Inazu A. 1994). Ad esempio, in pazienti con deficit di CETP, si ritrova un incremento dei livelli di HDL ricche in apoE (Yamashita S. 1990) o presenza di LDL più piccole e con minore affinità per i siti recettoriali (Sakai N. 1995). Tali dati sono supportati anche dai risultati di esperimenti condotti in vivo su animali normo- ed iper-colesterolemici: il trattamento di questi animali con anticorpi neutralizzanti l'azione della CETP provoca una diminuzione dei livelli di LDL e VLDL ed un incremento nei livelli di HDL ricche in apoE (Evans GF, Bensch WR, 1994). Questi dati avvalorano la tesi che l'inibizione dell'attività della CETP possa essere uno degli approcci per aumentare la quota di colesterolo HDL (Wang M, Briggs MR, 2004).

Da qui l'interesse nello sviluppo farmacologico di inibitori di tale enzima, come il torcetrapib, l'anacetrapib e il dalcetrapib.

Dopo essere arrivati in sperimentazione di fase III, nel 2006, tutti gli studi sull'efficacia del torcetrapib sono stati interrotti a causa dei risultati ottenuti con lo studio ILLUMINATE (Investigation of Lipid Level Management to Understand Its Impact in Atherosclerotic Events): gli individui trattati con torcetrapib hanno riportato un aumentato rischio di sviluppare eventi cardiovascolari nonostante un aumento del 72% del colesterolo associato alle HDL e una riduzione del 25% in quello associato alle LDL (Barter P. J. 2007).

Le cause degli effetti avversi causati dal torcetrapib, sono ad oggi poco chiare; è stato ipotizzato che l'inibizione della CETP possa portare ad una riduzione dell'efficienza del processo di RCT, in particolare inibendo il meccanismo indiretto di trasporto di colesterolo attraverso l'interazione tra LDL e il recettore specifico epatico, in quanto l'inibizione con CETP riduce i livelli di LDL circolanti; un'altra possibilità è che le HDL che vengono generate in più dopo inibizione dell'attività di CETP risultino disfunzionali; la

terza ipotesi, quella più accreditata, è che gli effetti avversi osservati siano da attribuire a cause indipendenti dall'effetto di inibizione della CETP, ma che dipendono da attività secondarie della molecola (Barter P. J. and Ryne K. A. 2006).

Per poter rispondere a tali questioni è necessario attendere i risultati degli studi in corso su altri inibitori dell'attività dell'enzima CETP.

Diverse specie animali, tra cui topi e ratti, naturalmente deficitari in CETP, e quindi con bassi livelli di lipoproteine contenenti apoB, utilizzano le HDL come maggiore mezzo di trasporto per il colesterolo nella circolazione. In accordo con quanto detto sull'ateroprotezione data da queste lipoproteine, questi roditori sono relativamente resistenti all'aterosclerosi (de Grooth G. 2004).

L'introduzione delle CETP umana nei topi ha portato in una riduzione dose-dipendente dei livelli di HDL e un debole aumento in quelli di VLDL e LDL e apoB. I topi, privi di CETP, risultano essere relativamente resistenti allo sviluppo dell'aterosclerosi indotta dalla dieta e, chiaramente, effettuano il trasporto di colesterolo attraverso meccanismi che non coinvolgono la CETP. Infatti, in studi in topi wild type nutriti con una dieta ricca in colesterolo, l'introduzione e l'espressione della CETP di scimmia, è risultata in un aumento della formazione delle lesioni aterosclerotiche (Marotti K. R. 1993).

Uno studio su pazienti sani ha mostrato come, dopo l'iniezione di HDL marcate con un tracciante per il colesterolo estere, la maggior parte del tracciante ritrovato nella bile, fosse arrivato dopo trasferimento a lipoproteine contenenti apoB (presumibilmente da CETP) (Schwartz C. 2004). Alla luce di questi risultati, il ruolo di questo enzima nel modulare l'RCT sembra acquisire una nuova importanza.

Escrezione biliare

Come ultima tappa del processo di RCT vi è l'escrezione di colesterolo con la bile. Numerose evidenze suggeriscono che il colesterolo derivato dalle HDL può essere deviato più direttamente nella bile rispetto ad altri pool epatici di colesterolo (Schwartz C. 2004) (Schwartz C. 1978). Il colesterolo libero associato alle HDL può essere escreto nella bile in modo diretto o previa conversione in acidi biliari (la cui tappa limitante è rappresentata dall'attività dell'enzima colesterolo 7- α idrossilasi). Il colesterolo estere invece deve essere idrolizzato a colesterolo libero prima di poter essere escreto o trasformato in acidi biliari (Cuchel M. and Rader D. J. 2006).

ABCG5 e **ABCG8** sono emi-trasportatori, appartenenti alla superfamiglia dei trasportatori ABC, che per funzionare devono eterodimerizzare (Graf G. A. 2002). I geni per ABCG5 e ABCG8 contengono 18 geni ciascuno e sono arrangiati in una configurazione testa-testa sul cromosoma 2p21, con sono 140 paia basi che li separano (Lu K. 2002).

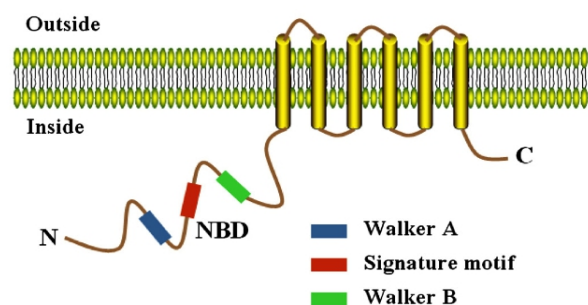


Figura 15: struttura di ABCG5 e ABCG8 (Yu X. 2013)

La trascrizione separata di *Abcg5* o *Abcg8* genera emi-trasportatori non funzionali; essi devono formare eterodimeri per ottenere la funzionalità di trasporto di steroli. Diversi studi hanno mostrato che ABCG5 e ABCG8 eterodimerizzano nel reticolo

endoplasmico, vengono trasferiti insieme attraverso l'apparato del Golgi e si spostano nei sottodomini apicali della membrana plasmatica (Calandra S. 2011) (Dijkers A. and Tietge U. 2010). La mancata espressione di uno dei due trasportatori porta all'accumulo nel reticolo endoplasmico dell'altro, come risultato di un'alterazione della traslocazione nella membrana plasmatica e indice del fatto che ABCG5 e ABCG8 sono obbligati ad eterodimerizzare per traslocare correttamente sulla superficie cellulare (Graf G. A. 2004a).

L'eterodimero ABCG5/G8 è espresso sulla membrana apicale degli enterociti, verso il lume intestinale, e negli epatociti, verso il canalicolo biliare (Berge K. E. 2000) (Graf G. A. 2002) (Graf G. A. 2004b).

Si pensa che LXR sia il regolatore maggiore dell'espressione dell'mRNA di ABCG5/G8; a supporto di questa teoria è stato dimostrato che sia una dieta ricca in colesterolo sia l'agonista LXR T0901317 incrementano significativamente l'espressione genica di ABCG5 e ABCG8 nell'intestino tenue e nel fegato di topi wild type ma non in topi knock out per *Lxr* (Berge K. E. 2000) (Lee M. 2006) (Calpe-Berdiel L. 2008) (van der Veen J. 2007).

Studi in malattie dell'uomo e modelli murini hanno mostrato che ABCG5/G8 è in grado di regolare l'assunzione di fitosteroli e la secrezione biliare di steroli neutri relativi a tutto l'organismo (Wilund K. R. 2004) (Yu L. 2005) (Berge K. E. 2000), funzionando probabilmente in modo molto simile agli altri trasportatori ABC (Oram J. F. 2006). Mutazioni a carico del gene *Abcg5* o *Abcg8* sono alla base di uno stato patologico chiamato sitosterolemia (Berge K. E. 2000) (Hubacek J. 2001) (Sabeva N. 2009). La malattia è caratterizzata da elevati livelli plasmatici di steroli vegetali e da un incremento

moderato della colesterolemia, entrambi dovuti a fenomeni di iper-assorbimento intestinale e ridotta escrezione biliare (Salen G. 1992).

Poiché l'eterodimero ABCG5/G8 gioca un ruolo chiave nella rimozione di colesterolo dall'organismo, sembra logico presumere che una sovraespressione di tali trasportatori porti ad inibizione dell'aterosclerosi mentre la delezione dei loro geni porti a sviluppo di tale patologia. In accordo con questa ipotesi, l'incrementata espressione di ABCG5/G8 sia nel fegato che nell'intestino di topi knock-out per il recettore per le LDL, porta ad una significativa riduzione dei livelli di colesterolo plasmatico e di area delle lesioni aterosclerotiche aortiche (Wilund K. R. 2004).

TRASPORTO TRANS-INTESTINALE DEL COLESTEROLO (TICE)

Già agli inizi del XX secolo era stata proposta, ma mai direttamente dimostrata, l'esistenza di un meccanismo di trasporto di colesterolo trans-intestinale (TICE), che si affiancava alla classica via di eliminazione del colesterolo per via epatobiliare. Nel 1927 è stato riportato che cani con una fistula biliare eliminavano più colesterolo nelle feci di quello che ci si aspettava in confronto ai controlli sani (Sperry W. 1927). Allo stesso modo, steroli fecali di derivazione esogena sono stati dimostrati essere presenti nelle feci di pazienti con ostruzione biliare (Cheng S. H. 1959) o in ratti con deviazione biliare a lungo termine (Bandsma R. 2000).

Con il tempo e il conseguente miglioramento degli approcci sperimentali e agli inizi degli anni '80 sono state investigate le origini degli steroli neutri fecali in ratti sani, utilizzando la metodica del bilancio isotopico di colesterolo (van der Veen J. N. 2009). Lo studio mostrava che, nei ratti nutriti con una dieta priva di steroli, circa il 40-50% di steroli neutri fecali aveva almeno due origini: la leccatura del pelo e l'origine diretta dall'intestino. In condizioni che prevenivano la leccatura del pelo mediante il lavaggio dei ratti con acetone o costrizione fisica, il contributo degli steroli di origine intestinale rimaneva circa del 33% (Miettinen T. A. 1981).

Recentemente è stato dimostrato in topi wild type che una quota sostanziale di colesterolo è secreta dall'organismo attraverso il TICE (van der Velde A. E. 2007). Questo processo è osservato nella parte prossimale dell'intestino tenue. L'avvento dell'utilizzo sperimentale di animali geneticamente modificati ha portato sempre di più alla luce l'importanza del TICE. In topi knock out per la colesterolo 7 α -idrossilasi, l'escrezione di steroli fecali risulta essere il doppio rispetto ai topi wild-type, senza un'apparente alterazione della secrezione biliare di colesterolo (Schwarz M. 1998).

Nel 2009 è stato sviluppato un metodo per la quantificazione del contributo relativo e assoluto alla perdita fecale totale di steroli neutri, di diversi flussi di colesterolo in modelli murini (van der Veen J. N. 2009). Questo ha portato alla dimostrazione dell'importanza reale del TICE e all'individuazione dell'origine del colesterolo eliminato per questa via, che risulta essere il sangue piuttosto che l'intestino stesso.

È stato ipotizzato che il TICE coinvolga l'attività di trasporto di proteine espresse sia al livello apicale che basolaterale degli enterociti.

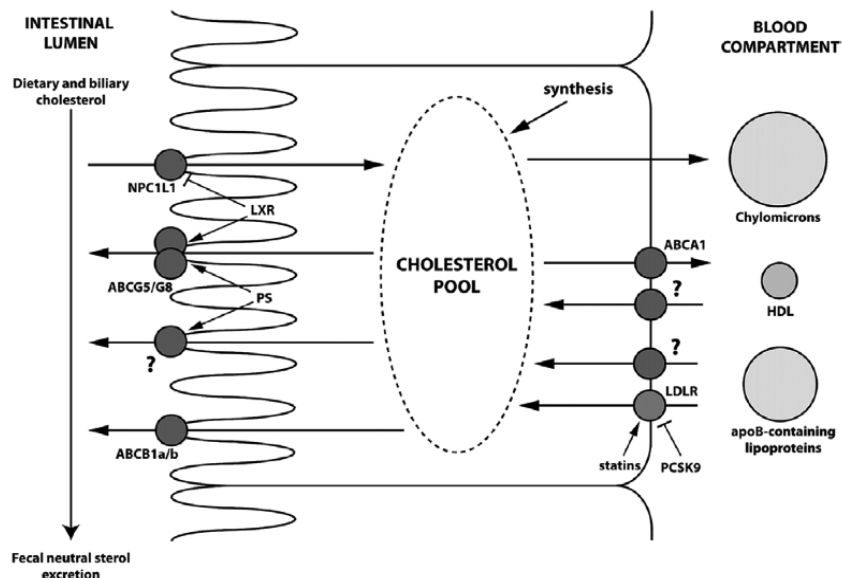


Figura 16: rappresentazione schematica dei flussi di colesterolo negli enterociti relativi al TICE (Tietge U. and Groen A. K. 2013)

Come noto l'SR-BI media la captazione di colesterolo dalle HDL e LDL circolanti (Acton S. L. 1996) anche se le HDL sono state dimostrate essere le donatrici più efficienti (Stangl H. 1999). In cellule CACO₂, un modello ben caratterizzato di cellule intestinali (Tachibana S. 2007), l'espressione di SR-BI si osserva sia nella parte basolaterale che in quella apicale. Questo suggerisce che tale recettore possa avere diverse funzioni a livello intestinale: nella parte basolaterale sembra ricoprire un ruolo di captazione

intestinale di lipoproteine (Cai L. 2004). Inaspettatamente in topi knock out per *Sr-bi* il TICE è risultato essere significativamente aumentato (van der Velde A. 2008).

L'eterodimero ABCG5/G8, espresso nella parte apicale degli enterociti, sembra ricoprire un ruolo importante nel trasporto di colesterolo nel lume dell'intestino tenue (Berge K. E. 2000). Utilizzando traccianti isotopici è stato determinato che il contributo del TICE all'escrezione fecale di colesterolo diminuisce dal 25%, presente in topi wild type, al 15% in topi knock out per *Abcg5* (van der Veen J. N. 2009). In più il trattamento con un agonista LXR di topi knock out per *Abcg5/g8*, diversamente dai topi wild type, non aumenta la quantità di steroli escreti per la via intestinale (Yu L. 2003). Nonostante questi dati indichino che ABCG5/G8 giochi un ruolo attivo nel TICE, sembra che ci siano altri meccanismi importanti che concorrono al trasporto di colesterolo dall'enterocita al lume intestinale in quanto una quota di TICE rimane anche in assenza di ABCG5/G8.

Data la loro abilità nel trasportare colesterolo nel sangue e rilasciarlo a specifiche cellule e organi, le lipoproteine sembrano essere per certo coinvolte nel TICE. Tuttavia è ancora poco chiaro quali classi lipoproteiche siano coinvolte e come le lipoproteine siano indirizzate all'intestino tenue.

Uno studio molto recente ha dimostrato come sia le LDL che le HDL forniscano colesterolo per il TICE in vivo nei topi. Inoltre lo stesso studio dimostra, per la prima volta, che espianti di intestino umano possono eliminare colesterolo derivato dalle HDL e dalle LDL. Sulla base di tali studi è stato proposto un modello nel quale sia le LDL che le HDL possono contribuire al TICE. Il TICE a partire dalle LDL può essere regolato positivamente dalle statine e negativamente da PCSK9 (Proteina Convertasi Subtilisina/Kexina di tipo 9) (Le May C. 2013). PCSK9 è un enzima regolatore

dell'omeostasi del colesterolo; la sua funzione è quella di legarsi al recettore per le LDL e di portare alla sua degradazione, causando così un ridotto uptake delle LDL a livello epatico e un aumento dei loro livelli nel plasma.

Un altro trasportatore che sembra essere coinvolto nel trasporto intestinale di colesterolo è ABCB1, espresso nella zona apicale degli enterociti (Le May C. 2013). In topi knock out per *Abcb1*, il TICE risulta essere significativamente ridotto (van der Veen J. N. 2009).

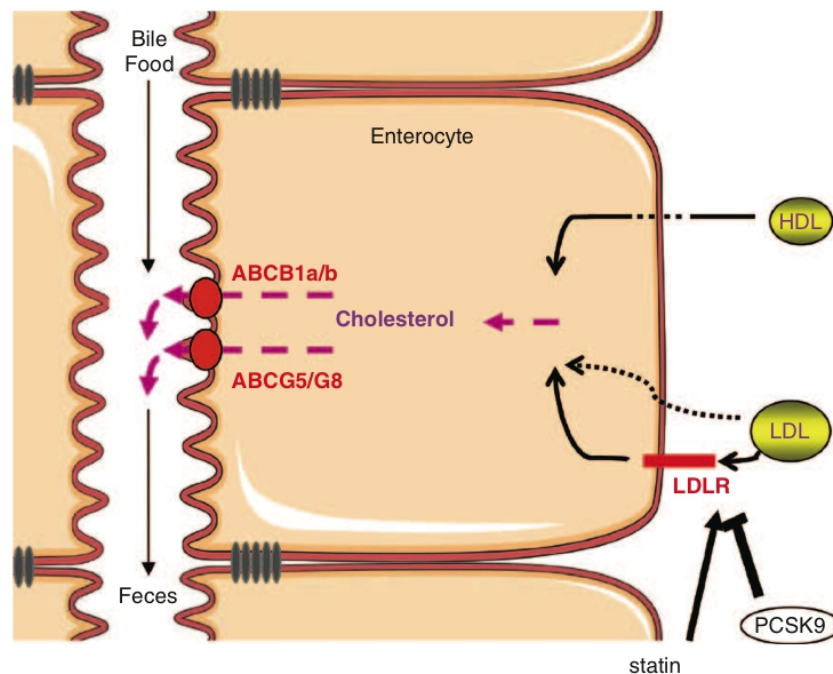


Figura 17: modello di TICE come meccanismo attivo che coinvolge sia le HDL che le LDL (Le May C. 2013)

CICLOSPORINA A

La Ciclosporina A (CsA) è un endecapeptide fungino ciclico con proprietà immunosoppressive, scoperto agli inizi degli anni '70, comunemente utilizzato in pazienti che hanno subito trapianto di organo, in particolare di rene, o affetti da malattie autoimmuni (Wenger R. M. and Payne T. 1989).

La CsA si lega al suo recettore intracellulare, la ciclofilina A (CypA), la prima immunofilina caratterizzata, e proteina target e mediatrice dell'immunosoppressione mediata dalla CsA. Il complesso CsA-CypA si lega alla calcineurina (CN) e ne inibisce la sua azione di fosfatasi. Questo impedisce la defosforilazione del fattore nucleare delle cellule T attivate (NFAT) ad opera di CN e la conseguente traslocazione nel nucleo di NFAT, sopprimendo così la trascrizione di geni pro infiammatori (Ho N. 1996).

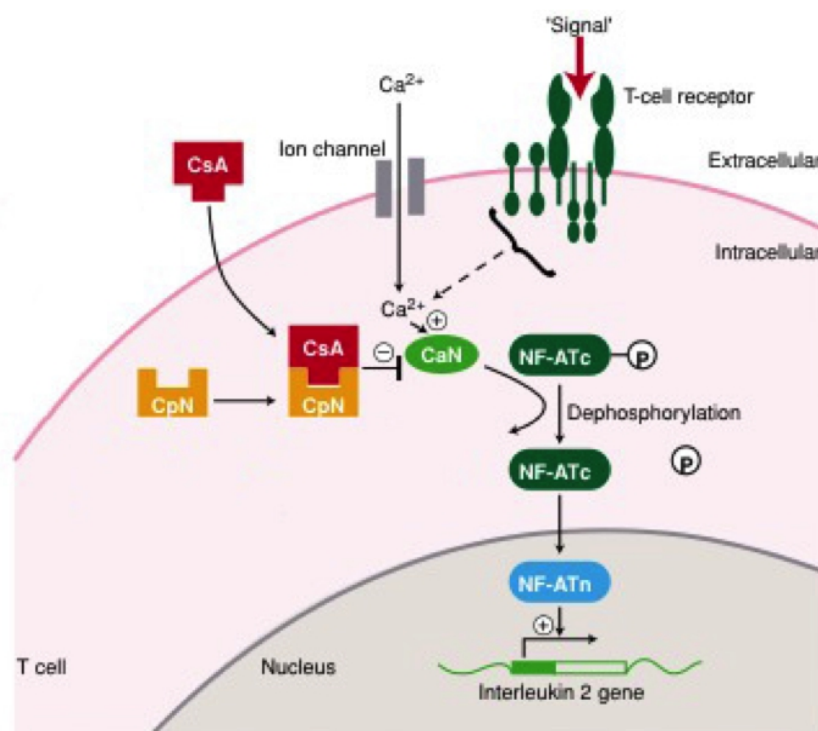


Figura 18: meccanismo molecolare dell'azione immunosoppressiva della CsA

Il trattamento con CsA è associato con vari effetti collaterali che includono nefrotossicità, diabete, ipertensione; in modo importante la CsA è stata associata ad una aumentata suscettibilità all'aterosclerosi e allo sviluppo di dislipidemie (Kockx M. 2010).

Il meccanismo con cui la CsA causa immunosoppressione può portare ad effetti ipertensivi, legati all'inibizione della calcineurina e dovuti a meccanismi renali (vasocostrizione), vascolari (inibizione della vasodilatazione mediata dall'ossido nitrico) e neurali (aumento del rilascio di glutammato dovuto all'incremento delle quantità di Ca^{+} intracellulare) (Miller L. W. 2002).

La dislipidemia indotta dalla CsA, che compare nei 3 mesi successivi l'inizio del trattamento è stata osservata nel 60% circa dei pazienti (Ojo A. 2006). Le frazioni lipidiche specifiche, che raggiungono valori anormali, variano nei pazienti che hanno subito trapianto d'organo, ma sono comuni a tutti un innalzamento delle LDL e dei trigliceridi e una riduzione delle HDL. Nei pazienti trapiantati la dislipidemia correla con lo sviluppo di vasculopatie e di malattia aterosclerotica dei vasi (Kobashigawa J. 2014).

Da osservazioni in pazienti trattati con CsA, sono stati postulati diversi meccanismi con cui la CsA esercita i suoi effetti metabolici: tra questi vi è la riduzione della sintesi degli acidi biliari e il trasporto di colesterolo all'intestino; il legame della CsA al recettore per le LDL con il conseguente aumento dei livelli di colesterolo circolante associato alle LDL; una marcata riduzione dell'attività della lipoprotein-lipasi e un aumento dell'attività della lipasi epatica, che risulta in difetti nell'eliminazione delle VLDL e LDL (Derfler K. 1991).

La CsA può anche avere effetti pro-ossidanti sul colesterolo plasmatico associato alle LDL con il conseguente aumento del rischio di malattie cardiovascolari, inclusa l'aterosclerosi accelerata osservata nei pazienti trapiantati.

Ratti, topi e conigli mostrano tutti livelli di colesterolo plasmatico incrementati specialmente nella frazione LDL dopo trattamento con CsA. È stato dimostrato, in modelli animali, che uno dei possibili meccanismi con cui la CsA causa tale effetto è la riduzione del loro uptake e catabolismo dovuto probabilmente ad una riduzione dell'espressione dell'mRNA del recettore per le LDL e ad una sua conseguente alterata sintesi (Rayyes O. 1996). Un'altra possibile causa è associata con l'aumento della formazione dei radicali liberi dell'ossigeno con conseguente produzione di LDL ossidate (Sutherland W. 1995). Queste hanno un'affinità di legame al recettore per le LDL significativamente ridotta rispetto alle normali LDL. Allo stesso modo la CsA potrebbe legarsi direttamente alle particelle LDL e potenzialmente alterare la loro composizione e affinità di legame (Vaziri N. D. 2000).

Come osservato nell'uomo, l'effetto della CsA sui livelli di HDL nel plasma degli animali è variabile e sono osservati deboli innalzamenti nei livelli di trigliceridi. Variazioni tra specie animali, dosaggi del trattamento con CsA, via di somministrazione e durata del trattamento possono causare differenze negli effetti. Numerosi studi hanno dimostrato che la CsA inibisce la fuoriuscita di colesterolo verso l'apoA₁, il primo step della formazione delle HDL (Le Goff W. 2004) (Karwatsky J. 2010). In modo interessante la CsA è in grado di aumentare le quantità di ABCA1 a livello delle membrane, un processo normalmente associato ad un incremento dell'efflusso di colesterolo ad apoA₁. L'uptake e l'internalizzazione dell'apoA₁ viene però diminuita dalla CsA, suggerendo che l'ABCA1 traslocata in membrana sia disfunzionale (Le Goff W. 2004).

Uno dei meccanismi principali di degradazione del colesterolo è la sintesi degli acidi biliari che avviene nel fegato attraverso l'attività dell'enzima colesterolo 7 α -idrossilasi (Cyp7 α) o attraverso il meccanismo alternativo dello sterolo 27-idrossilasi. L'effetto della

CsA sulla sintesi degli acidi biliari non è del tutto chiara; in vitro la CsA non è in grado di alterare l'attività del Cyp7 α (Princen H. M. 1991) (Souidi M. 1999) mentre inibisce la sterolo 27-idrossilasi (Princen H. M. 1991) (Souidi M. 1999) (Winegar D. A. 1996); in vivo è stata evidenziata l'inibizione dell'attività del Cyp7 α dopo trattamento con CsA (Vaziri N. D. 2000). Nonostante i dati sull'attività della CsA sulla sintesi degli acidi biliari siano contrastanti, diversi studi mostrano con chiarezza che la CsA inibisce la secrezione di lipidi e proteine nella bile. Numerosi esperimenti effettuati in ratti mostrano che la CsA diminuisce il flusso biliare di sali, fosfolipidi e colesterolo (Galan A. I. 1992) (Deters M. 2004).

Alla luce dei numerosi effetti collaterali del trattamento con CsA che portano, nei pazienti sotto regime di immunosoppressione con tale farmaco, ad un aumento del rischio cardiovascolare, è risultato interessante indagare se la CsA influenzasse anche il processo ateroprotettivo dell'RCT. Nel nostro laboratorio è stato effettuato un esperimento di RCT in vivo, a partire da macrofagi MPM, su topi wild type dopo un trattamento a breve termine con CsA a 50 mg/kg/die. È stato infatti dimostrato che gli effetti negativi del farmaco sull'aterosclerosi si manifestano sia dopo trattamenti a breve che a lungo termine e a dosaggi compresi tra 20 mg/kg/die e 50 mg/kg/die (Emeson E. 1993).

A fronte di un'assenza di alterazioni nel profilo lipidico degli animali trattati con CsA rispetto a quelli controllo, quello che è stato osservato è stata una inibizione del processo di RCT, con conseguente riduzione dell'escrezione fecale di colesterolo (Zanotti I. 2013). Tali risultati potrebbero rappresentare un nuovo meccanismo di aterogenicità del farmaco e confermare il suo impatto sull'aumento del rischio cardiovascolare.

Scopo

Il trasporto inverso del colesterolo (RCT) è un processo fisiologico che consente la rimozione del colesterolo in eccesso dai tessuti periferici, favorendone l'eliminazione da parte del fegato attraverso la bile (Rader D. J. 2009). Questo processo è molto importante per l'organismo perché la maggior parte dei tessuti periferici non è in grado di catabolizzare il colesterolo che, in forma libera e ad elevate concentrazioni, risulta essere tossico per le cellule.

Nelle lesioni aterosclerotiche le principali cellule che si sovraccaricano di colesterolo sono i macrofagi; quindi, nell'ambito dell'aterosclerosi, assume un significato rilevante parlare di un processo di trasporto di colesterolo macrofagico-specifico. Per questo viene utilizzato un termine più preciso per tale processo, ovvero "RCT macrofagico" (Cuchel M. and Rader D. J. 2006).

Stimolare l'RCT macrofagico potrebbe essere la via più efficace per ridurre in modo significativo l'accumulo di colesterolo nelle placche aterosclerotiche e, quindi, il rischio di sviluppare eventi cardiovascolari avversi su base aterosclerotica (Cuchel M. and Rader D. J. 2006). Queste caratteristiche fanno del trasporto inverso del colesterolo un interessante target terapeutico.

La malattia cardiovascolare può insorgere frequentemente in seguito a trapianto di organo e risulta essere la causa maggiore di mortalità dopo trapianto di rene e di cuore (Miller L. W. 2002). Ci sono quindi fattori di rischio specifici per i riceventi di trapianto che portano allo sviluppo di malattia cardiovascolare. Tali fattori sono principalmente legati al regime di immunosoppressione mediante somministrazione del farmaco Ciclosporina A (Kockx M. 2010). È stato dimostrato, infatti, che la CsA porta a diversi effetti avversi a livello cardiovascolare, che possono essere riassunti nell'alterazione del profilo lipoproteico plasmatico e dell'efflusso di colesterolo dai macrofagi, aspetti

importanti per l'efficienza dell'RCT e il mantenimento dell'omeostasi di colesterolo nell'organismo.

Esperimenti precedentemente effettuati nel nostro laboratorio, hanno voluto indagare l'effetto della CsA sul processo ateroprotettivo dell'RCT. È stato effettuato un esperimento di RCT in vivo su topi wild type, a partire da macrofagi peritoneali murini (MPM), dopo un trattamento con CsA a 50 mg/kg/die, attraverso iniezione sottocutanea, per 14 giorni. A fronte di un'assenza di alterazioni nel profilo lipidico degli animali trattati con CsA rispetto a quelli controllo, abbiamo dimostrato che il trattamento con CsA ha causato una inibizione del processo di RCT, con conseguente riduzione dell'escrezione fecale di colesterolo (Zanotti I. 2013).

In vitro è stato dimostrato che il trattamento con CsA inibisce la secrezione, dal macrofago, di apoE (Kockx M. 2009), apolipoproteina che è stato dimostrato avere grande importanza nel promuovere il processo di RCT macrofagico (Zanotti I. 2011).

Alla luce di queste considerazioni abbiamo voluto valutare se l'inibizione dell'RCT da MPM, data dal trattamento con CsA, fosse dovuto all'effetto di questo farmaco sulla secrezione di apoE.

A tale scopo abbiamo ripetuto l'esperimento di RCT in vivo avvalendoci di una metodica sperimentale che prevede la marcatura specifica del colesterolo contenuto nei macrofagi trasformati in cellule schiumose, in modo da definire il coinvolgimento di questo pool lipidico nei diversi stadi del trasporto. In questo secondo esperimento, per generare le cellule schiumose radiomarcate, che sono state successivamente iniettate nel peritoneo dei topi per poter tracciare il percorso del colesterolo nell'organismo, abbiamo utilizzato come cellule di macrofagi J774, che a differenza degli MPM non esprimono apoE, in modo da poter discriminare il contributo dell'inibizione della

secrezione di tale particella, dato dal trattamento con CsA, all'effetto inibitorio finale sull'intero processo di RCT.

Abbiamo poi preso in esame singolarmente i diversi stadi dell'RCT, per valutare gli eventuali effetti del trattamento con CsA su ciascuno di essi: l'efflusso di colesterolo dal macrofago, analizzato come capacità della cellula di rilasciare colesterolo attraverso i diversi meccanismi di trasporto, e come capacità del plasma di stimolare il processo di efflusso in base alla sua composizione lipoproteica; l'uptake di colesterolo a livello epatico mediato dal recettore scavenger SR-BI; l'escrezione di colesterolo nella bile come steroli neutri attraverso i trasportatori ABCG5/G8, e come acidi biliari attraverso lo studio della loro sintesi mediata principalmente dall'enzima colesterolo 7- α idrossilasi.

Abbiamo infine approfondito lo studio del trasporto di colesterolo dopo trattamento con CsA analizzando eventuali effetti a livello intestinale. A tale scopo abbiamo analizzato l'espressione genica, proteica e la funzionalità dei trasportatori ABCG5/G8 espressi negli enterociti e coinvolti nell'escrezione diretta del colesterolo dal plasma al lume intestinale, e di NPC1L1, la cui funzione è quella del riassorbimento di una quota di colesterolo presente nel lume, con conseguente ritorno nella circolazione plasmatica.

Materiali e Metodi

ANIMALI

Topi maschi C57BL/6 (n=10) (The Jackson Laboratory, Harbor, Me) di 12 settimane sono stati mantenuti in ambiente controllato a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ con 12h di luce alternate a 12h di buio e nutriti con dieta standard e acqua ad libitum. I topi (divisi in due gruppi da 5 animali ciascuno) sono stati trattati una volta al giorno per 14 giorni per mezzo di iniezione sottocutanea, con CsA disciolta in olio di oliva al dosaggio di 50 mg/kg/die oppure solo con il veicolo. Queste condizioni sperimentali sono state scelte alla luce di dati di letteratura che dimostrano effetti negativi della CsA in modelli animali, sia dopo trattamenti a breve che a lungo termine, a dosaggi compresi tra 20 mg/kg/die e 50 mg/kg/die (Emeson E. E. 1993).

Gli studi sono stati effettuati con l'approvazione del Comitato Etico per gli Esperimenti Animali dell'Università degli Studi di Parma.

VALUTAZIONE DELL'RCT IN VIVO

Formazione di cellule schiumose in vitro da macrofagi murini J774

Macrofagi murini J774 sono stati fatti crescere in sospensione in bottiglie di Teflon in RPMI al 10% di FCS; la crescita è stata monitorata attraverso un conteggio in camera di Burkner, fino al raggiungimento del numero prestabilito per l'esperimento (circa 8×10^6 cellule/topo, contenenti circa 20×10^6 cpm). Le cellule sono state quindi radiomarcate con 5 $\mu\text{Ci/ml}$ di $[^3\text{H}]$ -colesterolo e arricchite con 25 $\mu\text{g/ml}$ di AcLDL. Al termine del periodo d'incubazione (48h), le cellule schiumose che si sono formate sono state equilibrate per 2h in medium contenente lo 0,2% di BSA ed infine centrifugate, risospese in un idoneo volume di medium (1 ml/topo) ed iniettate nel peritoneo degli animali riceventi, trattati o meno con CsA.

La distribuzione del $[^3\text{H}]$ -colesterolo cellulare nelle forme libera ed esterificata è stata determinata attraverso una cromatografia su strato sottile (TLC).

Prelievo dei campioni dai topi

Nel giorno dell'iniezione con la sospensione cellulare, i topi sono stati suddivisi in gabbie singole e, dopo 24h dall'iniezione, sacrificati per eccesso di etere. È stato prelevato il sangue dal cuore e la quantità di $[^3\text{H}]$ -colesterolo è stata misurata con liquido di scintillazione. È stato prelevato il fegato ed è stata effettuata l'estrazione dei lipidi con la metodica Bligh & Dyer (Iverson S. J. 2001). Le feci sono state raccolte al momento del sacrificio e i lipidi sono stati estratti con una metodica che permette la separazione tra steroli neutri e acidi biliari (Batta A. K 1999).

Estrazione lipidica dal fegato

I lipidi presenti nel fegato sono stati estratti secondo il metodo di Bligh e Dyer (Iverson S. J. 2001): dopo l'aggiunta di uno standard interno ($[^{14}\text{C}]$ -colesterolo) e l'omogeneizzazione in 0,8 ml di acqua, sono stati aggiunti in sequenza 2 ml di metanolo, 1 ml di cloroformio per due volte, e 1 ml di acqua. La sospensione è stata centrifugata, la fase surnatante eliminata e quella sottostante lipofila mandata a secco, ripresa con toluene e letta al β -counter.

Estrazione lipidica dalle feci

Gli steroli neutri e gli acidi biliari nelle feci sono stati estratti secondo una metodica che ne permette la loro separazione (Batta A. K 1999). Un'aliquota di 0,4 g di feci è stata sospesa in 3 ml di EtOH assoluto ed omogeneizzata, dopo l'aggiunta di uno standard interno ($[^{14}\text{C}]$ -colesterolo). Successivamente sono stati addizionati 0,4 ml di NaOH 5N e i campioni sono stati riscaldati a 95°C per 1h, in modo da favorire la salificazione degli acidi biliari. Al termine di questo periodo, sono stati isolati gli steroli neutri attraverso tre successive estrazioni con esano; la radioattività della fase lipofila, una volta mandata a secco e ripresa con un ugual volume di toluene, è stata contata al β -counter. Alla restante fase idrofila è stato aggiunto HCl concentrato, in modo da riportare i sali biliari in forma acida; si è proceduto quindi con un'ulteriore serie di estrazioni con acetato di etile, che ha permesso di separare gli acidi biliari nella fase lipofila e di quantificarli dopo aggiunta del liquido di scintillazione, come in precedenza per gli steroli neutri.

Analisi del profilo lipidico plasmatico dei topi trattati o meno con CsA

Il colesterolo totale plasmatico, le HDL e i trigliceridi sono stati misurati attraverso l'uso di kit colorimetrici utilizzando kit commerciali (Instrumentation Laboratory, Werfen Group, Milano). In breve, i kit per la determinazione del contenuto plasmatico di colesterolo e trigliceridi si basano su una reazione enzimatica che porta alla formazione di un colorante rosso che causa aumento dell'assorbanza dei campioni in modo proporzionale al contenuto totale di colesterolo e trigliceridi nel campione.

Il kit per la determinazione del contenuto di HDL nel plasma è basato su una reazione enzimatica preceduta da un legame tra anticorpi specifici e le lipoproteine non-HDL. I complessi antigene-anticorpo che si formano, bloccano la successiva reazione enzimatica per tutte le lipoproteine eccetto che per le HDL. In seguito alla reazione si forma un colorante blu la cui assorbanza è proporzionale alla concentrazione di HDL nel campione.

VALUTAZIONE DELL'EFFLUSSO DI COLESTEROLO IN VITRO

Manipolazione delle colture cellulari

Tutte le operazioni riguardanti la manipolazione delle colture cellulari sono state effettuate in condizioni di sterilità, utilizzando una cappa a flusso laminare verticale. La vetreria viene sterilizzata in stufa a secco (Air Concept, FIRLABO Lione) per 4 ore a 180°C, mentre i materiali plastici (puntali, vials) in autoclave (Certoclav, Austria) per 20 minuti a 121°C ad 1 atmosfera di pressione. Le cellule vengono mantenute in incubatore (RS Biotech, UK) a 37°C con un tasso di umidità del 90-95% e di anidride carbonica del 5%. L'osservazione morfologica delle cellule viene effettuata con un microscopio ad ottica invertita (Leica, Germania).

Materiale e reagenti

Le flask, le piastre, le provette sterili monouso, le bottiglie di Teflon ed i criotubi sterili per la coltivazione e la conservazione delle cellule sono stati acquistati dalla ditta Corning, gli inserti semipermeabili dalla ditta Greiner Bio-one. La glutammina, il piruvato di sodio, gli aminoacidi non essenziali e la tripsina sono stati forniti dalla ditta Gibco. I terreni di coltura per i macrofagi J774 (RPMI 1640, Lonza) e per epatomi di ratto Fu5AH (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Lonza) sono stati addizionati di penicillina/streptomicina o gentamicina (Sigma) prima dell'uso e conservati a 4°C; all'occorrenza sono stati completati con siero fetale bovino (Fetal Calf Serum, FCS, Euroclone) o con albumina (BSA, Bovine Serum Albumin, Sigma). Il siero è stato aliquotato, sterilizzato per filtrazione (Millipore) e conservato ad una temperatura di -20°C; al momento dell'uso è stato scongelato in un bagnetto termostato a 37°C. Il terreno di coltura usato per la marcatura delle cellule è stato preparato utilizzando

medium completo all'1% di FCS addizionato di [³H]-colesterolo (Perkin Elmer), conservato in etanolo a -20°C; l'etanolo è stato eliminato per evaporazione in corrente d'azoto. Prima dell'incubazione con le cellule il medium radiomarcato è stato equilibrato per qualche ora con medium in presenza di 1% di FCS ed eventualmente lipoproteine acetilate (AcLDL). Le AcLDL sono state preparate a partire da LDL umane mediante reazione con anidride acetica, come precedentemente descritto (Basu S. K. 1976).

Il 22-idrossicolesterolo e l'acido 9-cis-retinoico (entrambi Sigma) sono stati solubilizzati in dimetilsolfossido (DMSO, Merck), mentre il clorofeniltio-adenosinmonofosfato ciclico (cpt-cAMP) è stato disciolto in soluzione fisiologica, conservato in freezer in aliquote da 30 mM e utilizzato alla concentrazione di 0,3 mM.

L'inibitore dell'ACAT (SAH 58035, Sandoz), utilizzato alla concentrazione di 2 µg/ml è stato sciolto in DMSO, come La CsA (Sigma) e l'agonista LXR T0901317 (Alexis Biochemicals).

I campioni di plasma sono stati conservati a -20°; al momento dell'uso, sono stati scongelati in ghiaccio e mantenuti in tale condizione per tutta la durata del trattamento.

L'apoA₁ è stata acquistata dalla ditta Sigma, conservata a -20°C, e scongelata in ghiaccio al momento dell'utilizzo.

I solventi organici sono stati reperiti dalle ditte Romil, Carlo Erba e Merck.

Prelievo macrofagi peritoneali murini (MPM)

Tre giorni prima del sacrificio dei topi donatori di macrofagi peritoneali è stata effettuata, a questi animali, un'iniezione intraperitoneale di 3 ml di soluzione acquosa di tioglicolato 40 g/l (Sigma), precedentemente sterilizzata in autoclave; questo ha provocato lo sviluppo di un'inflammatione locale durante la quale i monociti circolanti si sono

differenziati in macrofagi. I topi sono stati poi sacrificati per eccesso di etere etilico. Sotto la cappa sterile, è stata praticata un'incisione addominale che ha permesso l'esposizione della sacca peritoneale, all'interno della quale sono stati iniettati 5 ml di una soluzione di saccarosio sterile ($3,4 \times 10^{-4}$ M). il peritoneo è stato massaggiato delicatamente in modo da favorire l'avvicinamento dei macrofagi da prelevare. La sospensione cellulare ottenuta è stata sottoposta a lavaggi successivi con medium base e contata, tramite l'uso della camera di Burker, per ottenere il numero di cellule prelevate.

Efflusso di colesterolo da MPM

Dopo la semina, macrofagi murini J774 o MPM sono stati marcati per 48h con [3 H]-colesterolo alla concentrazione di 2 mCi/ml in medium di coltura all' 1% di FCS. Le cellule sono state marcate con il colesterolo radioattivo e arricchite con 25 mg/ml di AcLDL. I monostrati cellulari sono stati quindi equilibrati per 6 h in medium contenente albumina allo 0,2%. L'efflusso di colesterolo è stato promosso mediante incubazione con un pool di plasma di topi wild type C57BL/6 diluito nel medium ad ottenere concentrazioni dello 0,1-0,5-1% in presenza o assenza di CsA 1-5 mM per 24h. Durante il periodo di marcatura e equilibramento è stato utilizzato un inibitore dell'enzima ACAT (2 mg/ml, Sandoz 58035) per prevenire l'accumulo intracellulare di colesterolo estere (Zanotti I., Favari E., and Bernini F. 2012). La concentrazione di CsA è stata selezionata in base a dati di letteratura di esperimenti in cui è stato testato il farmaco in colture cellulari (Zheng X. 2006) (Kockx M. 2009) (Le Goff W. 2004). Nella nostra esperienza la concentrazione di 5 μ M è stata la massima concentrazione che non ha causato tossicità cellulare. L'efflusso di colesterolo è stato calcolato come

percentuale di radioattività rilasciata nel medium rispetto alla radioattività incorporata dalle cellule prima dell'aggiunta del plasma (tempo zero) (Zanotti I. 2004). Ogni campione è stato analizzato in triplo e sono state calcolate la media e la deviazione standard. Dal valore di ogni campione è stato sottratto il valore di efflusso ottenuto senza l'aggiunta dell'accettore.

Efflusso di colesterolo da CACO₂

Cellule di carcinoma di colon umano (CACO₂) sono state messe in coltura in inserti in policarbonato semi-permeabili con pori di 0,4 µm di diametro ad una densità di 2,0 x 10⁵ cellule/inserto in piastre a 12 pozzetti per 14 giorni in DMEM al 10% di FCS. Ogni 3-4 giorni il medium di coltura è stato rinnovato. Gli inserti dividono, nel pozzetto, una zona apicale da una zona basolaterale e, piastrate in tali inserti, le cellule possono differenziare e assumere le caratteristiche di polarizzazione degli enterociti in vivo. Dopo il periodo di differenziazione, i monostrati cellulari sono stati marcati per 24h con 2 µCi/ml di [³H]-colesterolo in DMEM al 10% di FCS. L'espressione dei trasportatori ABC è stata indotta dall'uso di un agonista sintetico di LXR, il T0901317 (10 µM), durante il periodo di equilibrio di 24h, con o senza CsA alla concentrazione di 5 µM. In alcune condizioni la CsA è stata aggiunta durante il periodo di efflusso di 24h. Le percentuali di efflusso di colesterolo sono state ottenute misurando il rilascio di colesterolo radiomarcato nel medium, come precedentemente descritto (Tachibana S. 2007). Il medium dello spazio apicale e basolaterale è stato raccolto e centrifugato a 15000 rpm per 10 minuti per precipitare i detriti cellulari. Le cellule, dopo tre lavaggi con PBS, sono state raccolte e lisate in una soluzione di TritonX-100-PBS allo 0,1%. La radioattività secreta nel medium e quella trattenuta dalle cellule sono state quantificate

con conta al β -counter. La percentuale di efflusso è stata calcolata dividendo la radioattività nel medium per la radioattività totale (radioattività nel medium apicale e basale + radioattività nel monostrato cellulare).

Potenziale d'efflusso del plasma dei topi trattati o meno con CsA

I campioni di plasma dei topi trattati con CsA o con il veicolo, come precedentemente descritto, sono stati raccolti e mantenuti -80°C ; le aliquote sono state poi scongelate in ghiaccio appena prima dell'aggiunta alle cellule. Per determinare la capacità di efflusso del plasma, diverse linee cellulari, ognuna esprime un diverso trasportatore di colesterolo, sono state radiomarcate con $[^3\text{H}]$ -colesterolo e arricchite in colesterolo mediante incubazione con AcLDL alla concentrazione di 25 mg/ml in medium di coltura cellulare all'1% di FCS per 24h. Per la valutazione del potenziale d'efflusso attraverso diffusione passiva e mediato da ABCA1, sono stati utilizzati macrofagi murini J774; per la valutazione del trasporto di colesterolo mediato da ABCG1 sono state utilizzate cellule di ovaio di criceto cinese (CHO) della linea controllo e di quella trasfettata permanentemente con *Abcg1*, e per l'efflusso SR-BI mediato, la linea di epatomi di ratto Fu5AH.

Dopo un periodo di equilibramento di 18h in medium contenente albumina allo 0,2%, l'efflusso di colesterolo è stato promosso con l'aggiunta di 0,5% (v/v) di plasma dei topi appartenenti ai gruppi controllo e trattato con CsA, per 5h. La capacità di efflusso del plasma è stata calcolata come percentuale di radioattività fuoriuscita nel medium in 5h rispetto alla radioattività incorporata nelle cellule prima dell'aggiunta del plasma (tempo zero). Ogni campione di plasma è stato analizzato in triplo e sono state calcolate le media e la deviazione standard. È stato testato in parallelo anche un campione

rappresentativo di un pool di siero di topi normolipidemicici per confermare la risposta cellulare; dal valore di ogni campione è stato sottratto il valore di efflusso ottenuto senza l'aggiunta dell'accettore.

Misurazione del colesterolo intracellulare in Fu5AH

Dopo la semina, epatomi di ratto Fu5AH sono stati equilibrati per 18h con medium allo 0,2% di BSA. Al termine del periodo di equilibramento le cellule sono state esposte a plasma di topi trattati o meno con CsA (0,5%).

L'esperimento di valutazione del flusso bidirezionale di colesterolo è stato effettuato come precedentemente descritto (Zimetti F. 2006). I monostrati cellulari sono stati lavati con PBS e lisati in 0,5 ml di una soluzione acquosa all'1% di sodio colato idrato addizionata con 50 U/ml di DNasi. Un totale di 125 µl di buffer di reazione contenente 0,5% di triton-X-100, 0,5M di potassio fosfato (pH 7,4), 0,25 M NaCl e 1% di sodio colato, è stato addizionato ai lisati cellulari e le piastre sono state agitate over night a temperatura ambiente. I monostrati lisati sono stati trasferiti in eppendorf e scaldati a 60°C per 30 minuti, per inattivare gli enzimi che potrebbero competere nella reazione di quantificazione del colesterolo. Il colesterolo è stato quantificato fluorimetricamente utilizzando l'Amplex Red Cholesterol Assay Kit (Life Technology) (Amundson D. M. 1999). Il kit enzimatico contiene l'enzima colesterolo esterasi e permette la misurazione del colesterolo cellulare. Il quantitativo di colesterolo in ogni pozzetto è stato misurato in confronto ad una curva di colesterolo standard, inclusa in ogni esperimento. Un'aliquota dei lisati cellulari è stata isolata per la misurazione del contenuto proteico intracellulare attraverso l'applicazione del metodo di Lowry (Lowry O. 1951).

ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA DI *Abcg5*, *Abcg8*, *Cyp7a* E *Npc1l1*

(in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, dott. Francesco Potì)

L'RNA totale è stato isolato da campioni di fegato e intestino attraverso l'uso di RNeasy Mini kit (Qiagen) in accordo con il protocollo fornito dalla ditta produttrice. Brevemente, i campioni di fegato sono stati lisati e omogenati mediante Ultraturrax e quindi caricati in una colonna in membrana di silice RNeasy. L'RNA è stato quindi eluito in acqua e quantificato attraverso spettrometria (Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific). Il cDNA è stato sintetizzato da 100 ng di RNA totale utilizzando il kit di sintesi iScript™ cDNA (Bio-Rad Laboratories). Il livelli di cDNA sono stati determinati con un sistema di rilevamento CFX96™ Real-Time PCR utilizzando la miscela SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad Laboratories). I primers utilizzati sono stati gli stessi pubblicati in Ye et al. (Ye D. 2008).

Abcg5: forward primer 5'–TGGCCCTGCTCAG- CATCT–3'
reverse primer 5'–ATTTTAAAGGAATGGG- CATCTCTT–3';

Abcg8: forward primer 5'–CCGTCGTCAGATTCCAATGA–3'
reverse primer 5'–GGCTTCCGACCCATGAATG–3';

Hprt: forward primer 5'–TTGCTCGAGATGTCATGAAGGA–3'
reverse primer 5'–AGCAGGTCAGCAAAGAACTTATAG–3';

β-actina: forward primer 5'–AACCGTGAAAAGATGACCCAGAT–3'
reverse primer 5'–CACAGCCTGGATGGCTACGTA–3').

Le sequenze dei primer per *Cyp7a* e *Npc1l1* sono state specificamente disegnate con il software Beacon Designer:

Cyp7a: forward primer 5'–TAGATAGCATCATCAAGGA–3'

reverse primer 5'–AAGGTGTAGAGTGAAGTC–3';

Npc1l1: forward primer 5'–TAGCAGCCAACATCACAG–3'

reverse primer 5'– ATCGTGTAAGGGAAGACC–3').

I valori di espressione relativa sono stati calcolati applicando il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak K. J. 2001). Brevemente, il valore di ciclo soglia (C_t) del gene target è stato sottratto al valore di C_t medio di Hprt e β -actina ($C_{t_{housekeeping}}$) e il risultato ottenuto è stato utilizzato come potenza di 2. La media del valore di C_t dei due geni housekeeping è stato usato per escludere la possibilità che cambiamenti nell'espressione relativa fossero causati da variazioni nell'espressione di due geni housekeeping separati.

ANALISI DELL'ESPRESSIONE PROTEICA DI ABCG5 E ABCG8 EPATICI

Campioni di fegato dei topi dei gruppi trattati con CsA e con il veicolo sono stati lisati in RIPA buffer contenente aprotinina 10 mg/ml, leupeptina 1 mg/ml, pepstatina 1 mg/ml, fluoruro di fenilmetanosulfonile 0.2 mM and omogenati mediante Ultraturrax. Quantità uguali di proteina (50 μ g) sono state separate in gel 10% di acrilammide e trasferite su membrana di nitrocellulosa. ABCG5 e ABCG8 sono stati rilevati con anticorpi primari (Santa Cruz), anticorpi secondari coniugati a perossidasi (GE Healthcare) e visualizzati tramite reazione di chemiluminescenza (ECL Plus) (GE Healthcare), in accordo con il protocollo fornito dalla ditta produttrice.

QUANTIFICAZIONE BETA SITOSTEROLO PLASMATICO NEI TOPI TRATTATI O MENO CON CsA

*(in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari,
Università degli Studi di Milano, dott. Lorenzo Arnaboldi, Prof. Alberto Corsini)*

120 µl di plasma, dei topi appartenenti ai gruppo controllo e trattato con CsA, sono stati idrolizzati, dopo l'aggiunta di 5 mg di 5- α colestano come standard interno, con una soluzione al 96% di etanolo e 50% di KOH per 2 ore a 85°C in vials di vetro e periodicamente mescolati. Alla fine della reazione, ai campioni sono stati aggiunti etanolo, KOH 1M ed etere di petrolio (40/60°C) e successivamente vigorosamente agitati e scaldati per 20 minuti. È stata eliminata la fase organica e la procedura ripetuta per tre volte. Gli estratti sono stati essiccati sotto flusso di azoto e risospesi in esano, prima di essere analizzati per cromatografia gas-liquida. I cromatogrammi ottenuti sono stati analizzati e la quantità di beta-sitosterolo misurata con Software Clarity, comparando l'area del picco corrispondente con quello del 5- α -colestano e correggendo il valore ottenuto per 1,112, che corrisponde alla differenza in peso tra i due steroli.

ANALISI STATISTICA DEI DATI

I risultati degli esperimenti sono stati riportati come media per gruppo dei valori ottenuti da 5 animali $\pm$ deviazione standard.

I risultati degli esperimenti in vitro sono riportati come media di triplicati $\pm$ deviazione standard. La significatività statistica è stata determinata dal test t di Student. Le variazioni osservate sono state ritenute significative a partire da $p < 0,05$.

Risultati

VALUTAZIONE DELL' EFFETTO DELLA CSA SULL'EFFICIENZA DEL PROCESSO DI RCT MACROFAGICO (RCT_m) IN VIVO DA J774

Trattamento e valutazione del peso e del profilo lipidico dei topi trattati o meno con CsA.

Durante il periodo di trattamento è stato monitorato il peso dei topi come indice generale del loro stato di salute. Il trattamento degli animali ha previsto la somministrazione, nel gruppo trattato (n=5), di CsA in olio d'oliva a 50 mg/kg/die per via sottocutanea, una volta al giorno per 15 giorni (il gruppo controllo, n=5, è stato trattato con il solo veicolo). Gli animali dei due gruppi sono stati pesati all'inizio e alla fine del trattamento. I valori dei pesi sono stati confrontati attraverso la media dei due gruppi ed è stata calcolata la variazione media percentuale per gruppo (*Tabella 1*).

	INIZIO TRATTAMENTO (g)	FINE TRATTAMENTO (g)	
CTRL	28,0	24,5	
	30,2	26,6	
	25,6	23,8	
	24,6	24,5	
	24,9	24,3	
	media±dev.st.	26,6±2,39	24,7±1,08 -7,1%
CsA	29,2	25,6	
	34,5	29,4	
	25,0	23,7	
	26,1	25,7	
	23,9	23,4	
	media±dev.st.	27,7±4,27	25,6±2,39 -7,5%

Tabella 1: Variazione ponderale nei topi dei gruppi controllo e trattato con CsA nell'esperimento di valutazione dell'efficienza dell'RCT macrofagico a partire da macrofagi J774.

Abbiamo effettuato analisi del profilo lipidico sul plasma dei topi dei due gruppi nell'esperimento di RCTm: il trattamento con CsA, nelle nostre condizioni, non ha causato alterazioni nella quantità di lipidi circolanti, solo una tendenza all'aumento del colesterolo non-HDL (*Tabella 2*).

	Ctrl (n=5)	CsA (n=5)
COLESTEROLO TOTALE (mg/dl)	73,5±17,4	85,0±14,0
TRIGLICERIDI (mg/dl)	47,7±31,7	43,4±11,5
COLESTEROLO HDL (mg/dl)	32,5±3,5	31,4±4,7
COLESTEROLO NON HDL (mg/dl)	41,0±11,3	53,6±9,2

Tabella 2: profilo lipidico plasmatico dei topi dei gruppi controllo e trattato con CsA nell'esperimento di valutazione dell'efficienza dell'RCT macrofagico a partire da macrofagi J774. I dati sono espressi come media del gruppo ± dev. st.

Quantificazione dell'RCTm in vivo da J774

Nel nostro laboratorio abbiamo dimostrato che gli effetti negativi sull'aterosclerosi osservati in modelli murini in seguito a trattamento con CsA (Emeson E. E. 1993), possono essere legati ad un effetto inibitorio sul processo ateroprotettivo dell'RCTm a partire da MPM. Inoltre in vitro è stato dimostrato che il trattamento con CsA inibisce la secrezione di apoE dal macrofago (Kockx M. 2009). Poiché recentemente è stata dimostrata l'importanza di questa apolipoproteina nel promuovere il processo di trasporto del colesterolo dai macrofagi (Zanotti I. 2011) abbiamo voluto valutare se l'effetto di inibizione dell'RCTm da MPM dato dal trattamento con CsA fosse dovuto all'effetto di questo farmaco sulla secrezione di apoE. A tale scopo, l'RCTm è stato ripetuto utilizzando macrofagi J774 che, a differenza degli MPM, non esprimono l'apoE. I macrofagi J774 sono stati radiomarcati con [3 H]-colesterolo e arricchiti con AcLDL, iniettati nel peritoneo dei topi dei due gruppi ed è stata valutata la radioattività ritrovata nei tre distretti principali coinvolti nel processo di RCT: il plasma, il fegato e le feci. Al momento del sacrificio abbiamo prelevato il sangue dal cuore degli animali e abbiamo isolato il plasma. I risultati sono espressi come cpm nel volume totale di sangue, stimato come il 5% del peso del topo. Successivamente abbiamo prelevato il fegato e raccolto le feci e la radioattività è stata stimata come descritto nella sezione Materiali e Metodi. A livello di compartimento epatico e plasmatico non si verificano alterazioni del contenuto di [3 H]-colesterolo in seguito a trattamento con CsA. Una riduzione significativa del contenuto di colesterolo radiomarcato è osservabile nel compartimento fecale dei topi trattati con CsA rispetto ai topi del gruppo controllo (*Figura 1*).

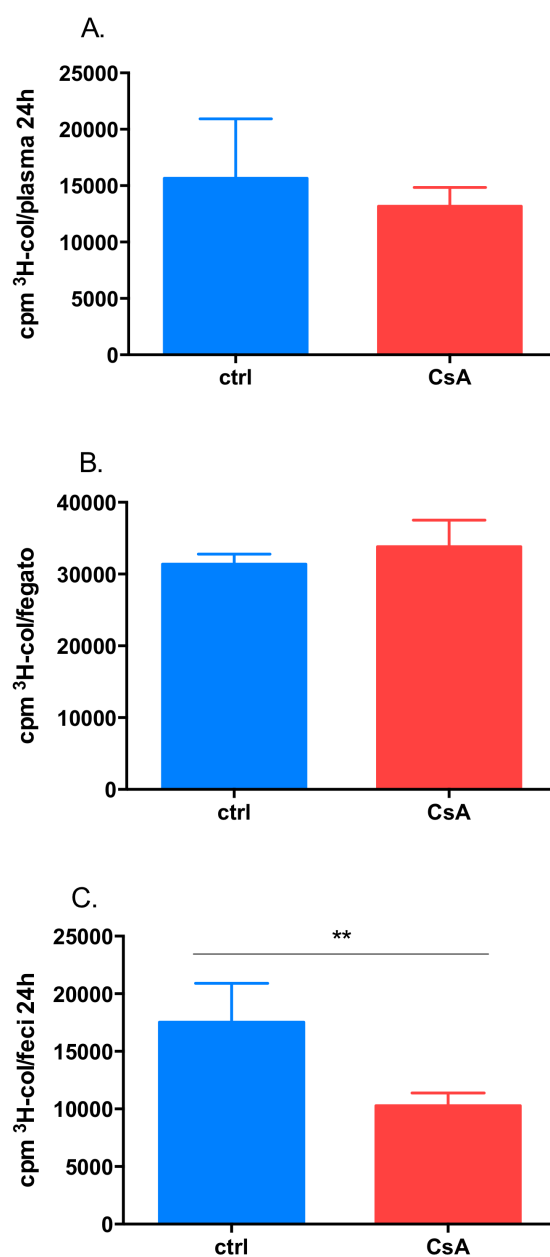


Figura 1: Effetto del trattamento con CsA sulle tre tappe principali dell'RCTm in vivo da macrofagi J774.

I topi C57BL/6 sono stati trattati con CsA e la valutazione della radioattività è stata effettuata nei diversi distretti dell'organismo coinvolti, come descritto nella sezione *Materiali e Metodi*. A: [^3H]-colesterolo nel plasma; B: [^3H]-colesterolo nel fegato; C: [^3H]-colesterolo nelle feci. I risultati sono espressi come media $\pm$ dev. st. (n=5) **p<0.01 vs. gruppo controllo.

Per ottenere un indice dell'efficienza del processo totale abbiamo sommato la radioattività presente nei diversi distretti. Quello che abbiamo osservato è una tendenza alla riduzione, seppur non significativa ($p=0,09$), del processo di RCTm nei topi trattati con CsA rispetto ai topi controllo (*Figura 2*).

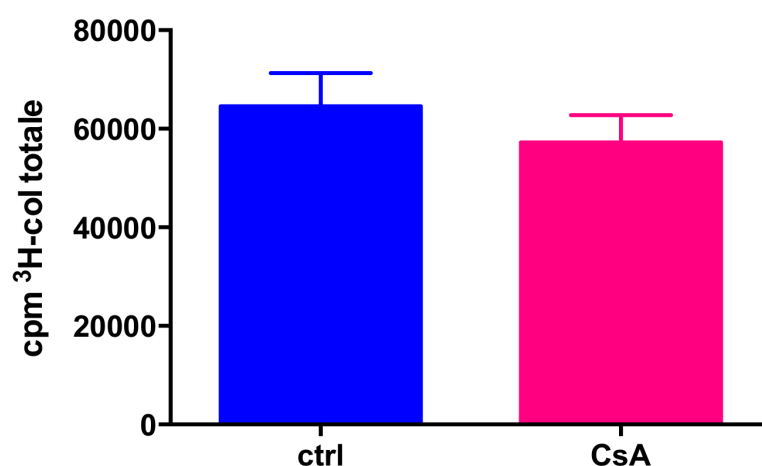


Figura 2: Effetto del trattamento con CsA sull'RCTm in vivo da macrofagi J774.

Un gruppo di topi C57BL/6 ($n=5$) è stato trattato con CsA al dosaggio di 50 mg/kg/die in olio d'oliva, mentre il gruppo controllo ($n=5$) è stato trattato con il solo veicolo. Al tredicesimo giorno di trattamento, macrofagi J774 radiomarcati con [^3H]-colesterolo e arricchiti con AcLDL, sono stati iniettati nel peritoneo degli animali di entrambi i gruppi. Dopo 24 ore dall'iniezione, i topi sono stati sacrificati ed è stata valutata la distribuzione del [^3H]-colesterolo nei vari distretti dell'organismo e, in seguito, sommata.

Per approfondire l'inibizione osservata a livello dell'escrezione fecale, abbiamo estratto i lipidi dalle feci raccolte al momento del sacrificio, discriminando tra steroli neutri e acidi biliari.

Il contributo maggiore all'osservata riduzione del colesterolo radioattivo a livello fecale risulta essere dato dagli steroli neutri, che sono ridotti in modo significativo dal trattamento con CsA rispetto agli acidi biliari in cui vi è una tendenza non significativa alla riduzione ($p=0,07$) (Figura 3).

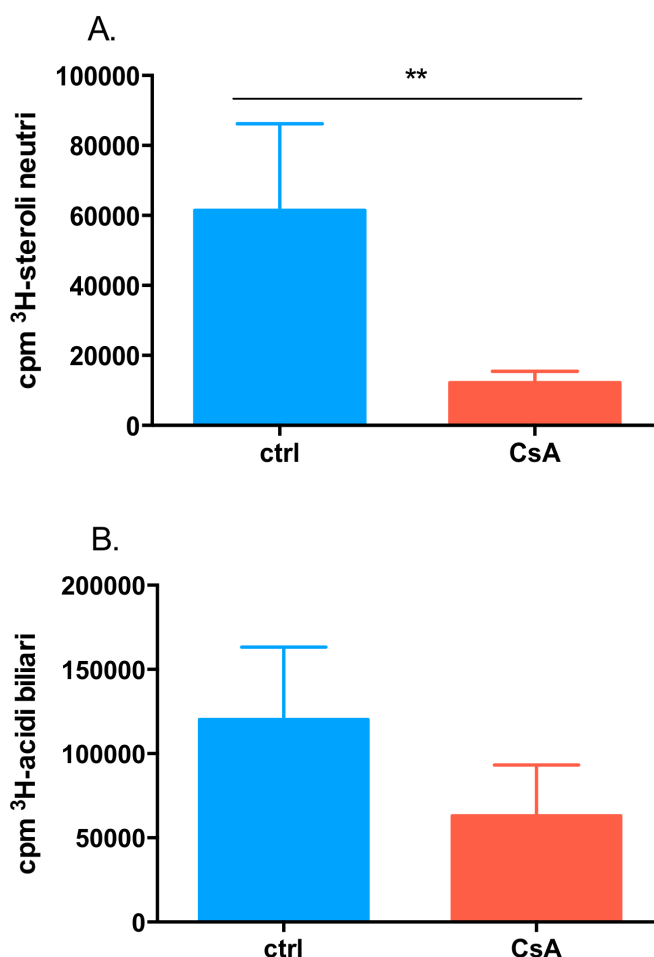


Figura 3: Effetto del trattamento con CsA sull'escrezione di colesterolo nelle feci.

Campioni di feci provenienti dai due gruppi di topi sono stati estratti con la metodica descritta in letteratura, come descritto nella sezione *Materiali e Metodi*, al fine di isolare le frazioni steroliche. A: [^3H]-colesterolo estratto come steroli neutri; B: [^3H]-colesterolo estratto come acidi biliari. I risultati sono espressi come media $\pm$ dev. st. ($n=5$) ** $p<0.01$ vs. gruppo controllo.

VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON CsA SULLA PRIMA TAPPA DELL'RCT_m: EFFLUSSO DI COLESTEROLO DAL MACROFAGO

Abbiamo valutato l'effetto del trattamento con CsA sulla prima tappa dell'RCT_m, l'efflusso di colesterolo, che è tappa limitante l'intero processo. Abbiamo approfondito due aspetti dell'efflusso di colesterolo che ne influenzano l'efficienza: la capacità della cellula di rilasciare colesterolo e la capacità del plasma di stimolare il processo di efflusso (potenziale d'efflusso).

Effetto del trattamento con CsA sulla capacità delle cellule di rilasciare il colesterolo

Dati precedentemente pubblicati evidenziano come la CsA sia un potente inibitore in vitro dell'efflusso di colesterolo mediato da ABCA1 in macrofagi primari umani e murini (Le Goff W. 2004). Abbiamo voluto riprodurre il dato nelle stesse condizioni e abbiamo valutato l'efflusso di colesterolo in macrofagi MPM a tempi brevi e utilizzando l'accettore preferenziale del colesterolo trasportato da ABCA1, l'apoA₁. I risultati ottenuti mostrano come in tempi brevi, 6h di efflusso, la CsA causa inibizione dell'efflusso mediato dal trasportatore ABCA1 (*Figura 4*).

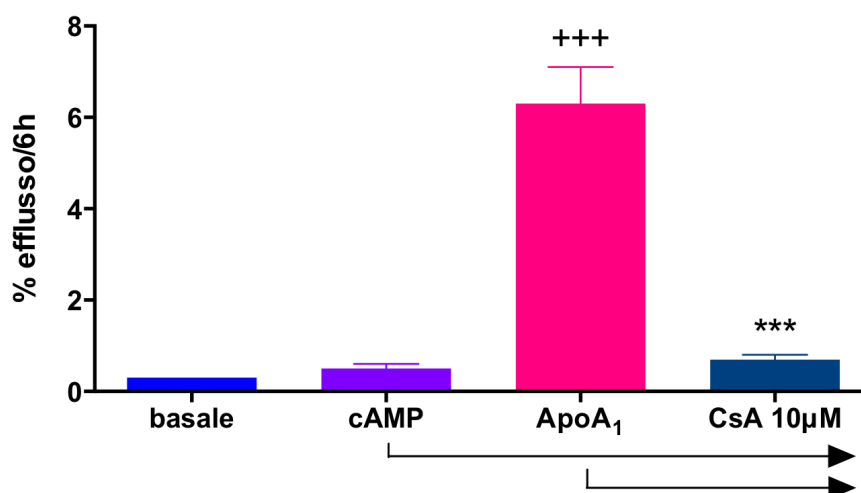


Figura 4. Effetto del trattamento con CsA sull'efflusso di colesterolo da macrofagi MPM.

MPM sono stati radiomarcati con [^3H]-colesterolo alla concentrazione di $2\mu\text{Ci/ml}$ per 24 ore. Dopo un periodo di equilibramento, e di stimolo della trascrizione di ABCA1 con cpt-cAMP, di 6 ore, le cellule sono state esposte all'accettore preferenziale dell'efflusso di colesterolo via ABCA1, l'apoA₁, e a CsA ($10\mu\text{M}$) per 6 ore. L'efflusso di colesterolo è espresso come $\text{cpm nel medium/cpm al tempo zero} \times 100 \pm \text{dev. st.}$ (ogni condizione è stata ripetuta in triplo) $+++p<0.01$ vs condizione con cAMP; $***p<0.001$ vs condizione con apoA₁.

Abbiamo poi valutato se gli stessi risultati si ottenevano in condizioni sperimentali che riproducessero le condizioni alle quali i macrofagi iniettati nei topi (cellule schiumose) sono stati esposti al farmaco durante il trattamento nell'esperimento di RCTm in vivo.

Abbiamo quindi effettuato esperimenti di efflusso di colesterolo in vitro sia da macrofagi J774 che da MPM arricchiti con lipoproteine a bassa densità acetilate (AcLDL), trattati con due concentrazioni differenti di CsA ed esposti a tre concentrazioni crescenti di plasma di topo wild type.

Dai risultati si osserva, sia nell'esperimento con J774 (*Figura 5*) che in quello con MPM (*Figura 6*), un'assenza di alterazione dell'efficienza del processo di efflusso di colesterolo in seguito al trattamento delle cellule con entrambe le concentrazioni di CsA.

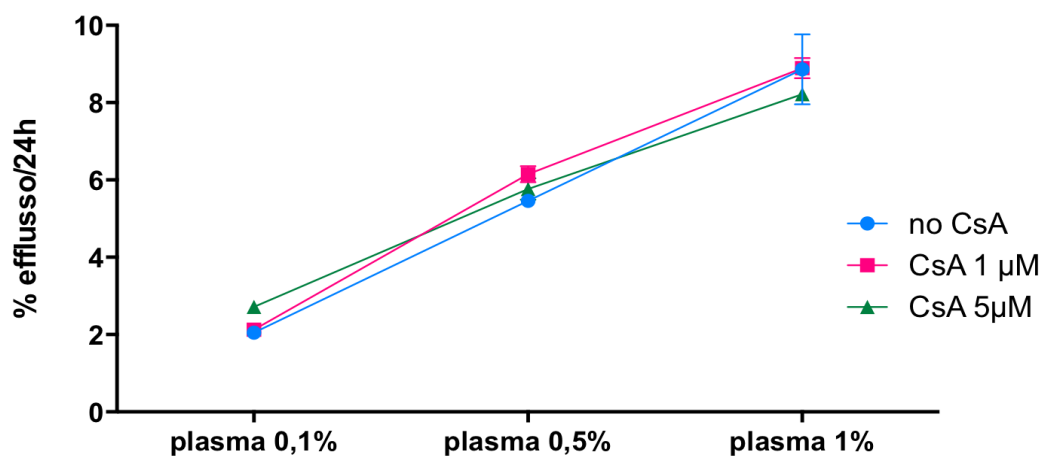


Figura 5. Effetto del trattamento con CsA sull'efflusso di colesterolo da macrofagi J774.

Macrofagi J774 sono stati radiomarcati con [3 H]-colesterolo alla concentrazione di 2 μ Ci/ml per 48 ore. Dopo un periodo di equilibramento di 6 ore, le cellule sono state esposte a concentrazioni crescenti di plasma di topo wild type in presenza o assenza di CsA a due concentrazioni (1-5 μ M) per 24 ore. L'efflusso di colesterolo è espresso come cpm nel medium/cpm al tempo zero $\times$ 100 $\pm$ dev. st. (ogni condizione è stata ripetuta in triplo)

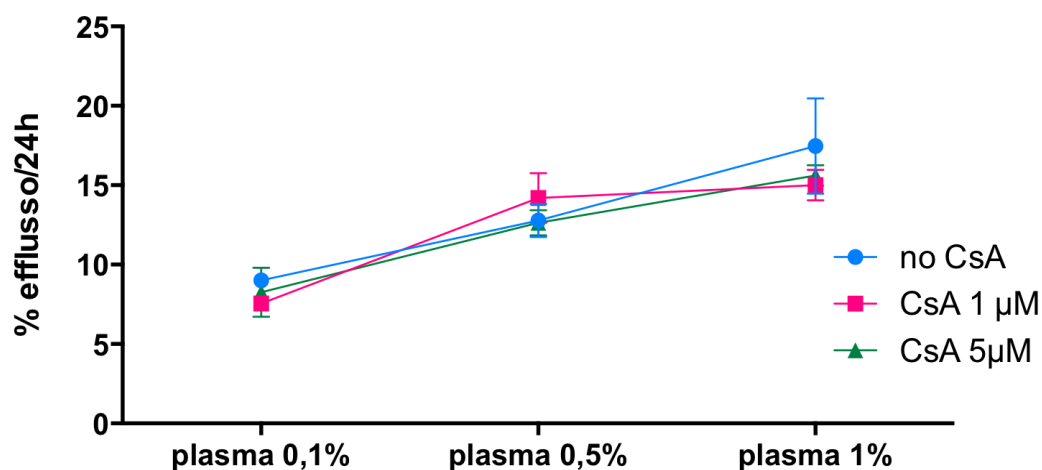


Figura 6. Effetto del trattamento con CsA sull'efflusso di colesterolo da macrofagi MPM.

MPM sono stati radiomarcati con [3 H]-colesterolo alla concentrazione di 2 μ Ci/ml per 48 ore. Dopo un periodo di equilibramento di 6 ore, le cellule sono state esposte a concentrazioni crescenti di plasma di topo wild type in presenza o assenza di CsA a due concentrazioni (1-5 μ M) per 24 ore. L'efflusso di colesterolo è espresso come cpm nel medium/cpm al tempo zero $\times$ 100 $\pm$ dev. st. (media del triplo $\pm$ dev. st.)

Effetto del trattamento con CsA sul potenziale d'efflusso del plasma dei topi

Abbiamo preso in esame gli effetti del trattamento in vivo con CsA sul potenziale d'efflusso del plasma dei topi, ovvero la capacità del plasma di stimolare il processo di efflusso, analizzando singolarmente il contributo dei diversi meccanismi di efflusso di colesterolo presenti nei macrofagi.

Potenziale d'efflusso di colesterolo attraverso diffusione passiva e ABCA1-mediato

Per l'analisi del potenziale d'efflusso di colesterolo del plasma dei topi trattati o meno con CsA, attraverso diffusione passiva e mediato dal trasportatore ABCA1, abbiamo utilizzato macrofagi J774. Come descritto nella sezione *Materiali e Metodi*, le cellule sono state marcate con [³H]-colesterolo al fine di poter valutare la quota di colesterolo fuoriuscita dalla cellule. Per discriminare i contributi di diffusione passiva e ABCA1, l'espressione di quest'ultimo è stata stimolata con un analogo dell'adenosina monofosfato ciclica (cpt-cAMP).

Come riportato in grafico, il trattamento con CsA ha causato un incremento significativo della percentuale d'efflusso come diffusione passiva e come ABCA1 (*Figura 7*).

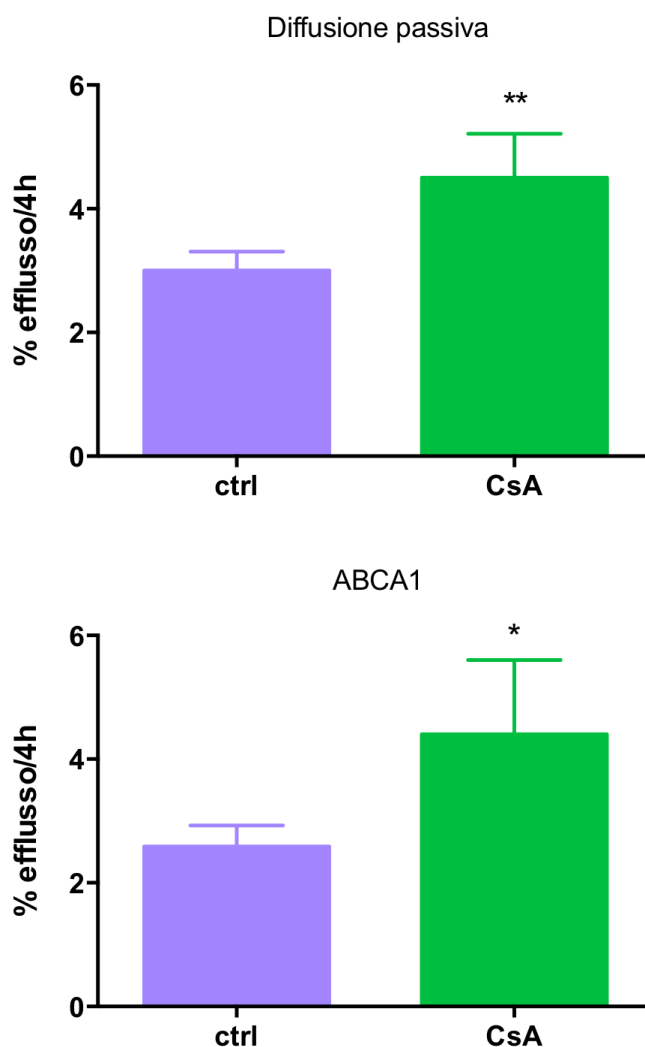


Figura 7. Effetto del trattamento con CsA sul potenziale d'efflusso di colesterolo del plasma dei topi trattati o meno con CsA, attraverso diffusione passiva e mediato da ABCA1.

Macrofagi J774 sono stati radiomarcati con [^3H]-colesterolo alla concentrazione di 2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ e caricati con AcLDL per 24 ore. Durante il periodo di equilibramento di 12 ore, le cellule sono state trattate con cpt-cAMP per stimolare l'espressione di ABCA1 e successivamente sono state esposte a plasma di topi trattati o meno con CsA (come descritto nella sezione *Materiali e Metodi*) per 4 ore. Il contributo all'efflusso di ABCA1 è stato calcolato sottraendo alla % di efflusso nella condizione con lo stimolo, la % di efflusso ottenuta senza stimolo. L'efflusso di colesterolo è espresso come cpm nel medium/cpm al tempo zero $\times 100 \pm \text{dev. st.}$ (ogni condizione è stata ripetuta in triplo). I risultati sono mostrati come media $\pm \text{dev. st.}$; $n=5$. * $p<0.05$ vs plasma di topi controllo; ** $p<0.01$ vs plasma di topi controllo.

Potenziale d'efflusso di colesterolo ABCG1-mediato

Abbiamo effettuato la valutazione del contributo di ABCG1 utilizzando cellule di ovaio di criceto cinese (CHO) trasfettate permanentemente con il gene per il trasportatore ABCG1 (Gelissen I. C. 2006) e dopo aver radiomarcato con [3 H]-colesterolo ed esposto le cellule al plasma dei topi dei gruppi trattato e controllo abbiamo ottenuto il contributo del trasportatore sottraendo alla percentuale di efflusso della linea trasfettata con il gene per ABCG1 quella ottenuta da una linea di CHO trasfettata con il vettore vuoto, sottoposta agli stessi trattamenti di quella esprimente ABCG1. Come osservabile nel grafico il trattamento con CsA non ha influenzato l'efficienza di efflusso di colesterolo mediata da ABCG1 (Figura 8).

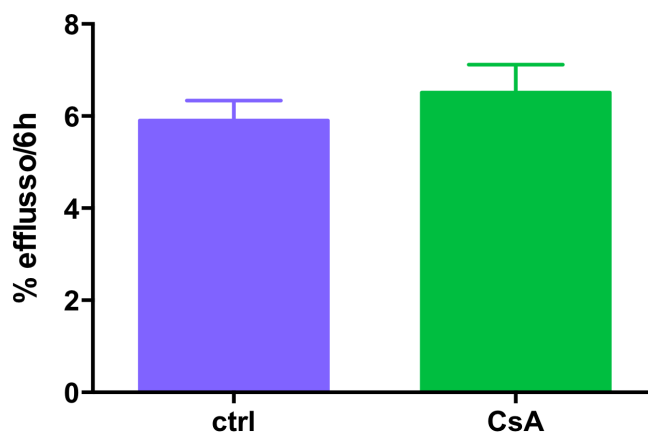


Figura 8. Effetto del trattamento con CsA sul potenziale d'efflusso di colesterolo del plasma dei topi trattati o meno con CsA, mediato da ABCG1.

Cellule CHO sono state radiomarcate con [3 H]-colesterolo alla concentrazione di 2 μ Ci/ml per 24 ore. Dopo un periodo di equilibramento di 2 ore, le cellule sono state esposte a plasma di topi trattati o meno con CsA (come descritto nella sezione *Materiali e Metodi*) per 6 ore. Il contributo all'efflusso di ABCG1 è stato calcolato sottraendo alla % di efflusso nella linea trasfettata con il vettore contenente il gene *Abcg1*, la % di efflusso ottenuta nella linea di CHO trasfettata con il vettore vuoto. L'efflusso di colesterolo è espresso come cpm nel medium/cpm al tempo zero x 100 $\pm$ dev. st. (ogni condizione è stata ripetuta in triplo) I risultati sono mostrati come media $\pm$ dev. st.; n=5.

Potenziale d'efflusso di colesterolo SR-BI-mediato

Abbiamo utilizzato epatomi di ratto (Fu5AH) per valutare il potenziale d'efflusso del plasma dei topi in esame mediato dal recettore scavenger SR-BI. Per discriminare il contributo di SR-BI abbiamo marcato le cellule con [^3H]-colesterolo e in seguito abbiamo utilizzato un inibitore selettivo di SR-BI, il BLT-1 (Nieland T. 2002), e alla percentuale d'efflusso ottenuta senza inibitore, è stata sottratta quella ottenuta dopo trattamento con l'inibitore. Anche in questo caso, come per ABCG1, abbiamo potuto osservare che il trattamento con CsA non ha alterato il potenziale d'efflusso del plasma dei topi trattati con CsA rispetto ai controlli (*Figura 9*)

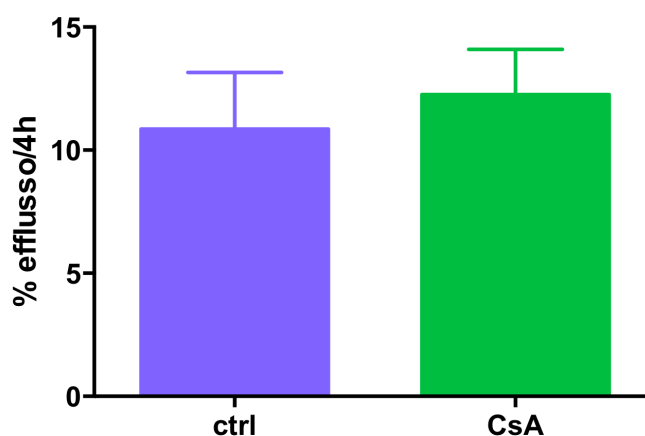


Figura 9. Effetto del trattamento con CsA sul potenziale d'efflusso di colesterolo del plasma dei topi trattati o meno con CsA, mediato da SR-BI.

Cellule Fu5AH sono state radiomarcate con [^3H]-colesterolo alla concentrazione di $2\mu\text{Ci/ml}$ per 24 ore. Dopo un periodo di equilibramento di 18 ore, le cellule sono state esposte a plasma di topi trattati o meno con CsA (come descritto nella sezione *Materiali e Metodi*) per 4 ore. Il contributo all'efflusso di SR-BI è stato calcolato sottraendo alla % di efflusso ottenuta senza inibizione, la % di efflusso ottenuta dopo aver inibito il recettore con BLT-1. L'efflusso di colesterolo è espresso come $\text{cpm nel medium/cpm al tempo zero} \times 100 \pm \text{dev. st.}$ (ogni condizione è stata ripetuta in triplo) I risultati sono mostrati come media $\pm$ dev. st.; $n=5$.

È stato dimostrato che nelle cellule schiumose il processo di efflusso avviene mediante diversi meccanismi, che agiscono sinergicamente, ciascuno con diverso contributo (Adorni et al. 2007). Abbiamo quindi voluto verificare, in condizioni che mimassero quelle dei macrofagi dell'esperimento di RCTm in vivo, se gli effetti del trattamento con CsA sul potenziale d'efflusso, mediato dai diversi trasportatori, si ripercuotessero sull'efflusso totale di colesterolo.

A tale scopo abbiamo esposto MPM caricati con AcLDL, al plasma dei topi trattati o meno con CsA. Questi macrofagi, essendo una coltura cellulare primaria, riproducono più fedelmente in vitro la condizione in vivo dei macrofagi della placca aterosclerotica. Dai risultati ottenuti è osservabile come il trattamento con CsA abbia portato ad una tendenza all'aumento ($p=0,06$) della capacità del plasma di stimolare la fuoriuscita di colesterolo da tali cellule schiumose (*Figura 10*).

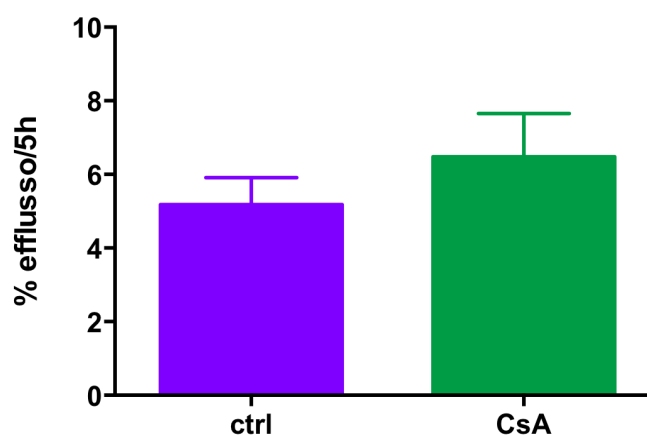


Figura 10. Effetto del trattamento con CsA sul potenziale d'efflusso di colesterolo del plasma dei topi trattati o meno con CsA, da macrofagi MPM.

MPM sono stati radiomarcati con [^3H]-colesterolo alla concentrazione di $2\mu\text{Ci/ml}$ e caricati con AcLDL per 24 ore. Dopo un periodo di equilibramento di 18 ore, le cellule sono state esposte a plasma di topi trattati o meno con CsA (come descritto nella sezione *Materiali e Metodi*) per 5 ore. L'efflusso di colesterolo è espresso come $\text{cpm nel medium/cpm al tempo zero} \times 100 \pm \text{dev. st.}$ (ogni condizione è stata ripetuta in triplo) I risultati sono mostrati come $\text{media} \pm \text{dev. st.}$; $n=5$.

VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON CsA SULLA SECONDA TAPPA DELL'RCTm: CAPTAZIONE DEL COLESTEROLO NEL FEGATO

Abbiamo valutato gli effetti del trattamento con CsA sulla seconda tappa del processo di RCT, ovvero il trasporto di colesterolo a livello epatico. Negli epatociti è espresso il recettore scavenger SR-BI, in grado di effettuare un trasporto di colesterolo bidirezionale (Ji Y. 1997) (Murao M. 1997). L'attività di tale recettore è in grado di modulare il processo di RCTm in quanto il colesterolo che viene captato a livello epatico può essere successivamente escreto nella bile (Wang X. 2007).

Un aspetto importante in grado di influenzare l'efficienza del trasporto di colesterolo a livello epatico è la capacità del plasma di cedere il colesterolo di derivazione macrofagica agli epatociti tramite l'uptake selettivo mediato da SR-BI. Abbiamo effettuato un esperimento in vitro di flusso netto di colesterolo in Fu5AH esponendo le cellule al plasma dei topi dei gruppi controllo e trattato con CsA, per evidenziare eventuali differenze nella capacità del plasma di cedere il colesterolo. Quello che osserviamo è una riduzione dell'uptake di colesterolo dal plasma dei topi trattati con CsA rispetto ai topi controllo (*Figura 11*).

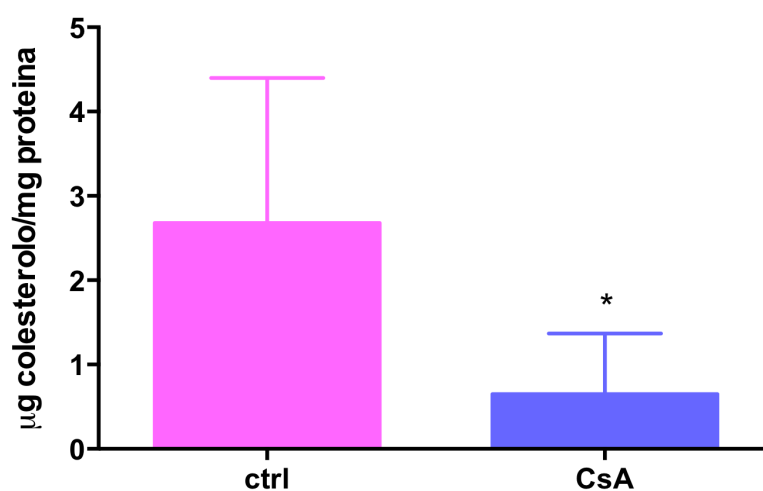


Figura 11: Effetto del trattamento con CsA sulla capacità del plasma dei topi di cedere il colesterolo al fegato.

Epatomi di ratto Fu5AH sono stati piastrati ed equilibrati di 18 ore; successivamente le cellule sono state esposte a plasma di topi trattati o meno con CsA (0,5%). Il contenuto di colesterolo intracellulare è stato misurato con la metodica descritta in *Materiali e Metodi*. Il quantitativo di colesterolo è espresso in rapporto al contenuto proteico. I risultati sono mostrati come media $\pm$ dev. st.; n=5.

VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON CsA SULLA TERZA TAPPA DELL'RCT_m: ESCREZIONE DI COLESTEROLO NELLA BILE

Per indagare se il trattamento con CsA comportasse un coinvolgimento del terzo stadio dell'RCT_m nell'inibizione del processo osservata, abbiamo inizialmente preso in esame l'escrezione degli acidi biliari, che dall'analisi della radioattività è risultata essere inibita sebbene in modo non significativo.

Abbiamo analizzato il meccanismo di sintesi degli acidi biliari che avviene negli epatociti e in particolare l'enzima colesterolo-7-alfa-idrossilasi (CYP7 α), che media una tappa limitante del processo di sintesi (Vaziri N. D. 2000). L'esperimento di quantificazione genica con Real Time RT-PCR, effettuato su lisati epatici dei topi dei gruppi trattato con CsA e controllo, evidenzia come il trattamento con il farmaco abbia inibito drasticamente l'espressione genica del Cyp7 α (Figura 12).

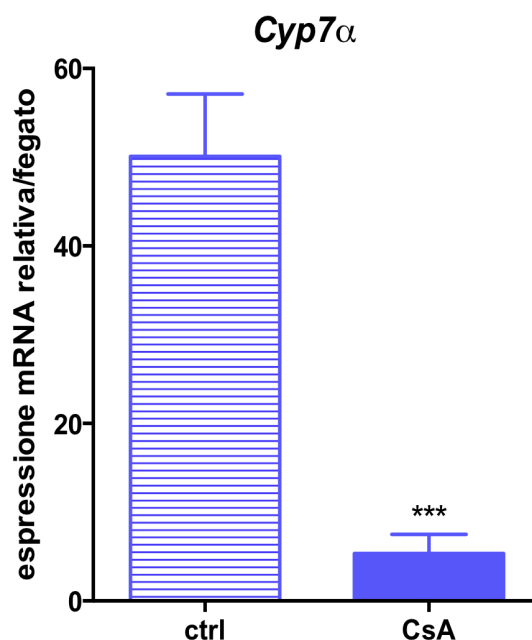


Figura 12: Effetto del trattamento con CsA sull'espressione genica epatica del Cyp7 α .

Topi C57BL6 sono stati trattati con CsA come descritto nella sezione *Materiali e Metodi*. Dopo il sacrificio è stato prelevato il fegato per l'isolamento dell'RNA. L'mRNA del Cyp7 α è stato quantificato mediante qRT-PCR. I risultati sono stati normalizzati contro l'espressione di Hprt. I risultati sono mostrati come media $\pm$ dev. st.; n=5. ***p<0.001 vs gruppo controllo.

Per approfondire l'inibizione dell'escrezione biliare di steroli neutri osservata dopo trattamento con CsA abbiamo valutato l'espressione genica e proteica epatica di ABCG5 e ABCG8 nei topi dei gruppi trattato e controllo. Abbiamo effettuato la quantificazione dell'mRNA mediante esperimenti di RT-qPCR e i risultati ottenuti escludono che il trattamento con CsA abbia inibito l'espressione genica dei trasportatori, mentre mostrano come, nel caso di *Abcg5*, abbia causato un incremento della stessa (Figura 13A, 13B); anche per quanto riguarda gli studi di espressione proteica di ABCG5 e ABCG8 epatici effettuati mediante western blot non sono state osservate alterazioni in seguito a trattamento con CsA (Figura 13C, 13D).

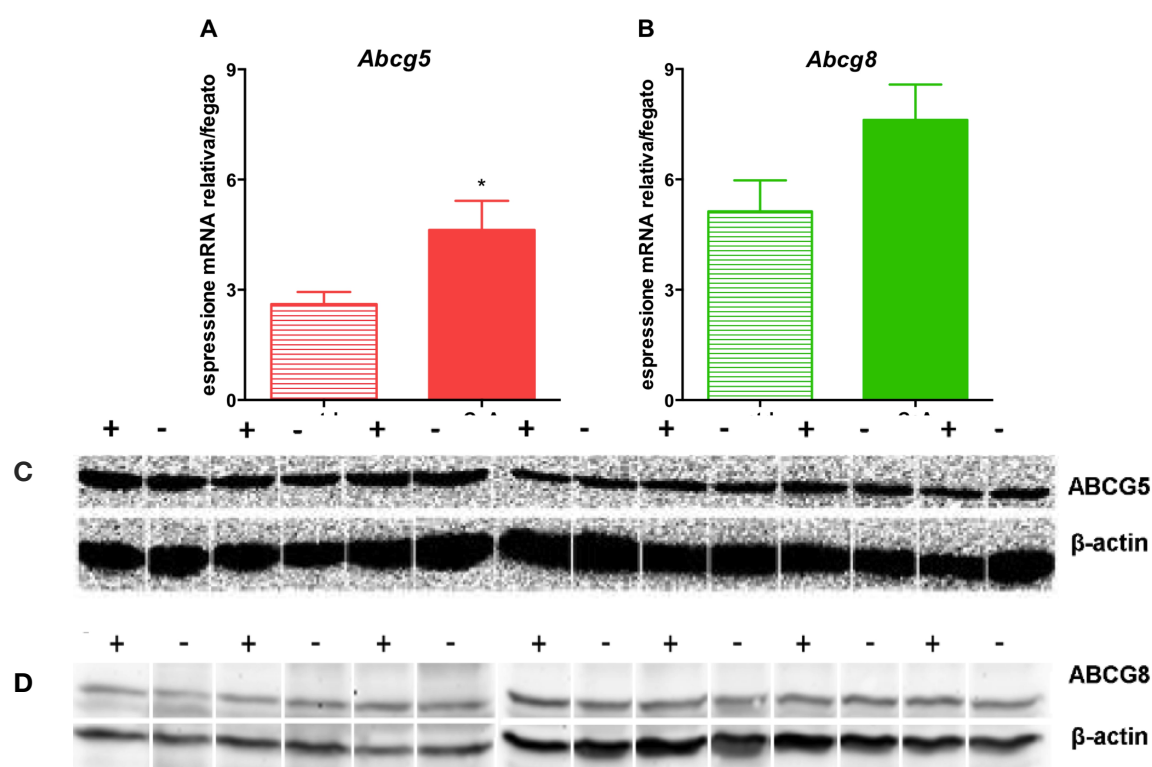


Figura 13: Effetto del trattamento con CsA sull'espressione genica e proteica epatica di ABCG5 e ABCG8.

Topi C57BL6 sono stati trattati con CsA come descritto nella sezione *Materiali e Metodi*. L'mRNA di *Abcg5* e *Abcg8* è stato quantificato mediante qRT-PCR (A, B). I risultati sono stati normalizzati contro l'espressione di Hprt. I risultati sono mostrati come media $\pm$ dev. st.; n=5. ***p<0.001 vs gruppo controllo. L'espressione proteica di ABCG5 e ABCG8 è stata effettuata con western blot (C, D) Colonne (-): topi trattati con il veicolo; colonne (+): topi trattati con CsA.

VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON CsA SUL TRASPORTO INTESTINALE DI COLESTEROLO

Recentemente è stata dimostrata l'esistenza di un meccanismo alternativo di escrezione di colesterolo che si affianca alla classica via di trasporto epatobiliare. Questo trasporto intestinale prevede l'escrezione del colesterolo nel lume direttamente dal compartimento plasmatico, per mezzo di trasportatori di colesterolo presenti negli enterociti. I principali trasportatori coinvolti in tale processo, espressi nella parte apicale delle cellule intestinali, sono ABCG5 e ABCG8.

Per valutare se il trattamento con CsA avesse causato una inibizione del trasporto di colesterolo a tale livello, abbiamo quantificato l'espressione genica dei trasportatori ABCG5 e ABCG8 presenti negli enterociti. Esperimenti di RT-qPCR hanno evidenziato come, anche a livello intestinale come in quello epatico, il trattamento non ha causato inibizione dell'espressione genica, ma che, a livello di *Abcg5* l'espressione abbia subito un incremento (*Figura 14*).

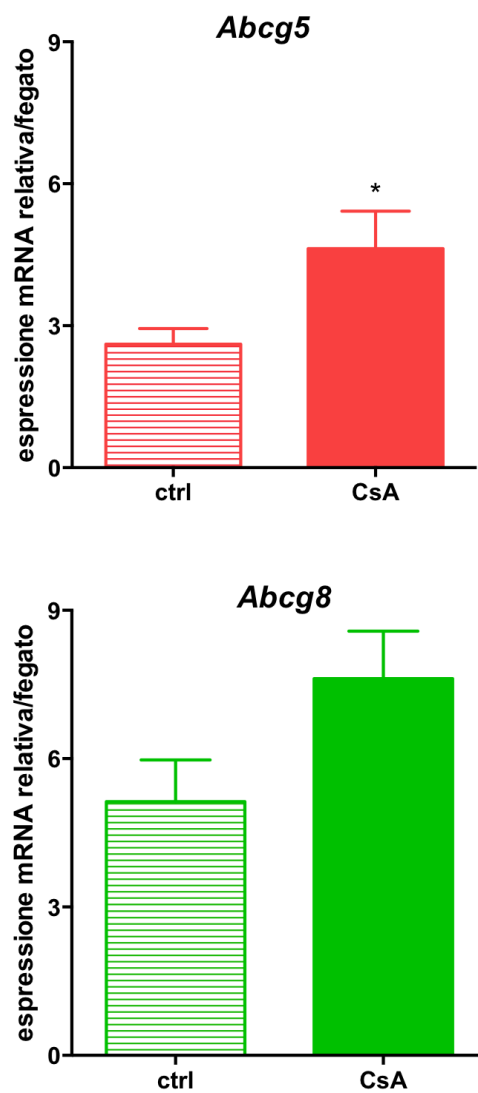


Figura 14: Effetto del trattamento con CsA sull'espressione genica intestinale di *Abcg5* e *Abcg8*.

Topi C57BL6 sono stati trattati con CsA come descritto nella sezione *Materiali e Metodi*. Dopo il sacrificio è stato prelevato l'intestino per l'isolamento dell'RNA. L'mRNA di *Abcg5* e *Abcg8* è stato quantificato mediante qRT-PCR. I risultati sono stati normalizzati contro l'espressione di *Hprt*. I risultati sono mostrati come media $\pm$ dev. st.; n=5. *p<0.05 vs gruppo controllo.

Allo scopo di verificare se fosse inibita l'attività dei trasportatori ABCG5 e ABCG8 espressi a livello intestinale abbiamo effettuato un esperimento di efflusso di colesterolo in cellule di carcinoma di colon umano (CACO₂), modello standardizzato di cellule intestinali (Tachibana S. 2007). Abbiamo marcato le cellule con [³H]-colesterolo e, durante il periodo di equilibramento abbiamo stimolato l'espressione dei trasportatori d'interesse con una molecola agonista LXR, il T0901317 (Zanotti I. 2008). Abbiamo stimolato l'efflusso con micelle di taurocolato (TC), accettore fisiologico di colesterolo presente nel lume intestinale; abbiamo contemporaneamente trattato le cellule con CsA alla concentrazione di 5 µM.

Dai risultati ottenuti abbiamo osservato che il trattamento delle cellule con il T0901317 incrementa la percentuale di efflusso di colesterolo, ad indicare un conseguente aumento dell'attività dei trasportatori ABCG5 e ABCG8; la percentuale di efflusso aumenta similmente quando l'efflusso è stimolato con micelle di taurocolato, e ancora di più quando sono presenti entrambi gli stimoli. Il trattamento con CsA causa inibizione nella percentuale di efflusso di colesterolo in tutte e tre le condizioni, in particolare quando le cellule sono trattate con T0901317 ed esposte a micelle, la CsA causa una tendenza all'inibizione, negli altri casi l'inibizione è significativa (*Figura 15*).

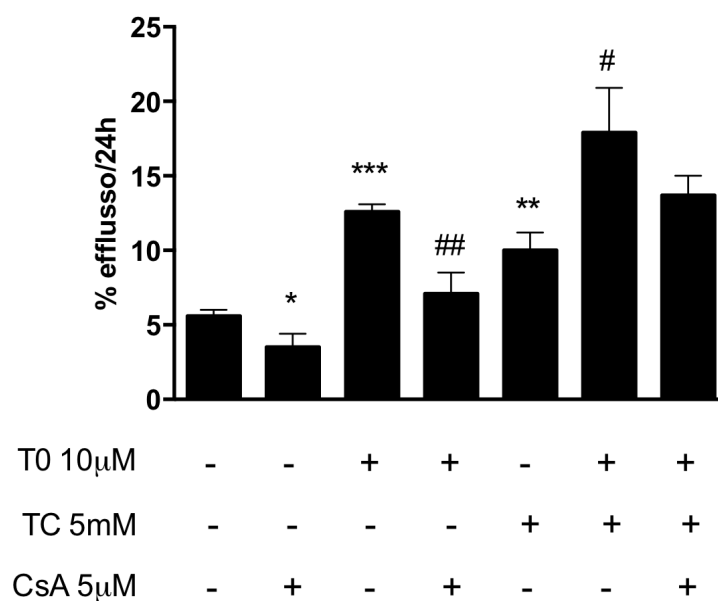


Figura 15. Effetto del trattamento con CsA sull'efflusso di colesterolo da cellule CACO₂.

Cellule CACO₂ sono state radiomarcate con [³H]-colesterolo alla concentrazione di 2µCi/ml per 24 ore. Durante il periodo di equilibramento di 18 ore, l'espressione di ABCG5 e ABCG8 è stata stimolata attraverso un trattamento con T0; durante il periodo di efflusso, stimolato dall'esposizione a micelle di TC, le cellule sono state esposte a CsA alla concentrazione di 5 µM per 24 ore. L'efflusso di colesterolo è espresso come cpm nel medium/(cpm nel monostrato cellulare + cpm nel medium) x 100 ± dev. st. (media del triplo ± dev. st.) *p<0.05 vs condizione basale; **p<0.01 vs condizione basale; ***p<0.001 vs condizione basale; #p<0.05 vs condizione con T0; ##p<0.01 vs condizione con T0.

Come indice dell'attività in vivo dei trasportatori ABCG5 e ABCG8 negli enterociti, abbiamo quantificato i livelli di β -sitosterolo circolante nel plasma dei topi dei gruppi controllo e trattato con CsA. Il β -sitosterolo è un fitosterolo trasportato esclusivamente dai trasportatori di nostro interesse e una loro inibizione si tradurrebbe in un accumulo di β -sitosterolo nel sangue (Sabeva N. 2009)

La quantificazione effettuata indica che la CsA non ha causato alterazione nel trasporto di questo fitosterolo attraverso i trasportatori ABCG5 e ABCG8 (*Figura 16*).

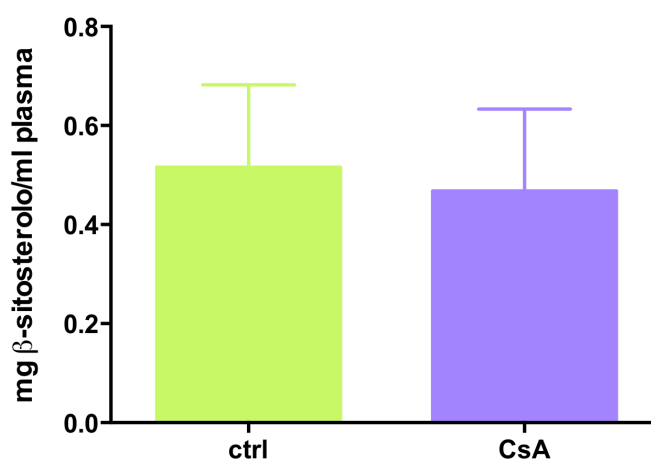


Figura 16. Effetto del trattamento con CsA sui livelli plasmatici di β -sitosterolo.

Topi C57BL6 sono stati trattati con CsA come descritto nella sezione *Materiali e Metodi*. Il contenuto plasmatico di β -sitosterolo è stato misurato mediante gas cromatografia, come descritto nella sezione *Materiali e Metodi*. I dati sono mostrati come media $\pm$ dev. st. (n=5)

VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON CsA SUL RIASSORBIMENTO INTESTINALE DI COLESTEROLO

Abbiamo valutato l'espressione del trasportatore intestinale Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1), coinvolto nel riassorbimento di colesterolo dal lume intestinale nell'enterocita. L'esperimento di valutazione dell'espressione genica di NPC1L1 con RT-qPCR sui lisati intestinali dei topi dei due gruppi, controllo e trattato con CsA, dimostra come il trattamento con CsA non abbia alterato l'espressione del trasportatore (*Figura 17*).

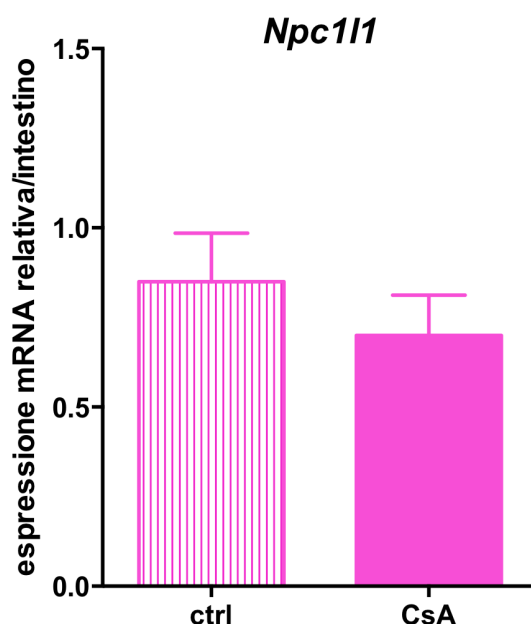


Figura 17: Effetto del trattamento con CsA sull'espressione genica intestinale di *Npc1l1*.

Topi C57BL6 sono stati trattati con CsA come descritto nella sezione *Materiali e Metodi*. Dopo il sacrificio è stato prelevato l'intestino per l'isolamento dell'RNA. L'mRNA di *Npc1l1* è stato quantificato mediante qRT-PCR. I risultati sono stati normalizzati contro l'espressione di Hprt. I risultati sono mostrati come media $\pm$ dev. st.; n=5.

Discussione

Come noto, la malattia cardiovascolare (CVD), che comprende infarto del miocardio (MI), angina instabile (UA), ictus e morte cardiaca improvvisa, è la principale causa globale di morte (Santos-Gallego C. G., Giannarelli C., and Badimón J. J. 2011). Oltre ad essere conseguenza dalla presenza dei più noti fattori di rischio come ipertensione, fumo di sigaretta, diabete, iperlipidemia e predisposizione genetica, è stato dimostrato che la CVD può insorgere frequentemente anche in seguito a trapianto di organo e risulta essere la principale causa di mortalità dopo trapianto di rene e di cuore (Miller L. W. 2002). Ci sono quindi fattori di rischio specifici per i riceventi di trapianto che portano allo sviluppo di malattia cardiovascolare. Tali fattori sono principalmente legati all'immunosoppressione indotta in tali pazienti, per prevenire il rigetto dell'organo, mediante l'utilizzo di farmaci che inibiscono l'attività del sistema immunitario; uno di questi è la Ciclosporina A (Kockx M. 2010). La CsA porta a diversi effetti avversi a livello cardiovascolare, che possono essere riassunti nell'alterazione del profilo lipoproteico plasmatico e del flusso di colesterolo nell'organismo, aspetti importanti per il mantenimento dell'omeostasi di colesterolo e la protezione dalla malattia cardiovascolare, in particolare mediante la prevenzione della patogenesi aterosclerotica. Uno dei processi ateroprotettivi più importanti, presente fisiologicamente nell'organismo, è il trasporto inverso del colesterolo (RCT); tale processo, se considerato a partire dai macrofagi arricchiti in colesterolo residenti nella placca aterosclerotica (RCT macrofagico), è in grado di portare a deplezione in colesterolo della placca e a sua conseguente stabilizzazione.

L'RCT macrofagico (RCT_m) è un processo multi-stadio che prevede la mobilitazione del colesterolo dalle cellule, il suo trasporto nella circolazione sanguigna nelle lipoproteine ad alta densità (HDL), la sua successiva captazione a livello epatico e la sua

escrezione finale con la bile nelle feci. Sperimentalmente la metodica d'elezione per la valutazione di tale processo prevede la marcatura radioisotopica del colesterolo di derivazione macrofagica; tale marcatura permette di tracciare il precorso del colesterolo nell'organismo e la sua quantificazione nei tre distretti principali coinvolti nell'RCTm: il plasma, il fegato e le feci (Zhang Y. and Zanotti I. 2003).

Al fine di chiarire eventuali interferenze dell'immunosoppressione con CsA sul processo ateroprotettivo dell'RCTm, abbiamo recentemente dimostrato, nel nostro laboratorio, che un trattamento a breve termine con il farmaco di topi wild type causa una riduzione nell'efficienza del processo a partire da macrofagi peritoneali murini (MPM), a fronte di un'assenza di alterazioni nel profilo lipidico degli animali (Zanotti I. 2013). Tale dimostrazione aggiunge un nuovo meccanismo di aterogenicità a quelli già dimostrati essere associati con l'utilizzo della CsA, in quanto è noto che l'efficienza dell'RCTm correla inversamente con il rischio cardiovascolare (Rader D. J. 2009).

Il presente lavoro è stato concepito e sviluppato al fine di approfondire i meccanismi alla base di tale effetto negativo della CsA sull'RCTm.

Alla luce di dati di letteratura che dimostrano che il trattamento con CsA inibisce la secrezione di apoE dai macrofagi (Kockx M. 2009) e che l'apoE macrofagica è importante per la promozione del trasporto inverso di colesterolo (Zanotti I. 2011), abbiamo voluto chiarire se l'osservata inibizione dell'RCT da MPM, in seguito a trattamento con CsA, fosse dovuta all'effetto inibitorio di questo farmaco sulla secrezione di apoE. A tale scopo, abbiamo ripetuto l'esperimento di RCTm in vivo utilizzando, come cellule cariche in colesterolo radiomarcato, macrofagi J774 che, a differenza degli MPM, non esprimono l'apoE. Le condizioni di trattamento degli animali sono state le stesse dell'esperimento condotto precedentemente, a partire dagli MPM: i

topi (divisi in due gruppi da 5 animali ciascuno) sono stati trattati una volta al giorno per 14 giorni per mezzo di iniezione sottocutanea, con CsA disciolta in olio di oliva al dosaggio di 50 mg/kg/die oppure con il solo veicolo. Il dosaggio e la frequenza di somministrazione sono stati scelti in base a dati di letteratura che riportano effetti negativi della CsA, sia dopo trattamenti a breve che a lungo termine, a dosaggi compresi tra 20 mg/kg/die e 50 mg/kg/die (Emeson E. E. 1993). Durante i giorni di trattamento, abbiamo monitorato il peso dei topi come indice del loro stato di salute; in entrambi i gruppi si è verificato un calo ponderale di circa il 7%. Questa riduzione, presente anche nel gruppo controllo, fa ipotizzare che sia indice di uno stress dovuto alle iniezioni giornaliere piuttosto che ad un effetto collaterale della presenza del farmaco.

Le analisi effettuate per la misurazione dell'RCTm nell'organismo hanno mostrato come, a livello di trasporto totale, il trattamento con CsA abbia portato una tendenza alla riduzione dell'efficienza del processo; analizzando singolarmente le tre tappe principali, abbiamo potuto osservare la presenza di una riduzione significativa dell'eliminazione del colesterolo a livello fecale nel gruppo trattato con CsA, mentre a livello plasmatico ed epatico non si osserva alcuna differenza tra il gruppo di topi controllo e trattato con il farmaco.

Dai risultati ottenuti possiamo escludere il coinvolgimento della secrezione di apoE dai macrofagi nell'inibizione dell'RCTm in vivo data dal trattamento con CsA; infatti abbiamo osservato un analogo effetto inibitorio dell'efficienza del processo sia quando le cellule di partenza esprimono apoE (macrofagi MPM) sia quando ne sono prive (macrofagi J774).

La ridotta escrezione fecale di colesterolo osservata, può essere conseguenza sia di una diretta inibizione dell'ultima tappa, sia di una inibizione a carico delle prime due tappe del processo, che si ripercuote sull'efficienza dell'RCTm totale. Allo scopo di approfondire i meccanismi con cui la CsA inibisce il processo di RCTm, abbiamo preso in esame singolarmente le tre tappe del processo.

Pur non avendo osservato alcuna riduzione del contenuto di [^3H]-colesterolo nel compartimento plasmatico, è comunque possibile che in vivo la CsA abbia causato una alterazione del trasporto di colesterolo a questo livello. Tale alterazione non viene osservata nel contenuto di [^3H]-colesterolo plasmatico in quanto la misurazione viene effettuata ad un tempo definito (24 h), è dunque possibile che i risultati ottenuti siano conseguenza di un equilibrio venutosi a creare mediante ridistribuzione del colesterolo in diversi distretti dell'organismo. Sarebbe interessante valutare il contenuto di [^3H]-colesterolo in tempi più brevi, in cui l'eventuale variazione potrebbe essere apprezzabile. Gli aspetti dell'efflusso di colesterolo che potrebbero essere alterati dalla CsA sono la capacità delle cellule di rilasciare il colesterolo nello spazio extracellulare, e la capacità del plasma di stimolare il processo di efflusso secondo la sua composizione lipoproteica. I meccanismi di trasporto coinvolti in tale processo sono mediati da proteine di membrana che permettono il passaggio del colesterolo dall'interno della cellula agli accettori extracellulari: i trasportatori appartenenti alla famiglia dei trasportatori ABC (ABCA1 e ABCG1), che mediano un trasporto attivo unidirezionale, e il recettore scavenger BI (SR-BI) che, lavorando secondo gradiente di colesterolo, media un trasporto bidirezionale. Inoltre le molecole di colesterolo libero possono diffondere liberamente nella membrana mediante diffusione acquosa, secondo gradiente (Cuchel M. and Rader D. J. 2006). Nel plasma sono presenti gli accettori extracellulari di

colesterolo: l'apolipoproteina A₁ (apoA₁), povera in lipidi, in grado di stimolare l'efflusso mediato da ABCA1, e le lipoproteine ad alta densità (HDL) mature che accettano il colesterolo trasportato mediante gli altri meccanismi (Cuchel M. and Rader D. J. 2006). È stato dimostrato che trattamenti in vivo con CsA causano una inibizione dell'espressione dell'apoA₁ (Zheng X. 2006) e una riduzione dei livelli di HDL circolanti (Le Goff W. 2004), due effetti che influenzano negativamente l'RCTm causando una variazione del profilo lipoproteico che diventa pro aterogeno. Tuttavia nelle nostre condizioni sperimentali il trattamento con CsA non ha causato alterazioni significative del profilo lipidico dei topi: i livelli di HDL circolanti sono risultati essere paragonabili tra il gruppo controllo e quello trattato con CsA ed è stato riportata solo una tendenza all'aumento nel colesterolo non associato alle HDL.

La mancanza di una alterazione nel profilo lipoproteico, in seguito a trattamento con CsA, riportata nel nostro esperimento non è del tutto inattesa dal momento che la somministrazione del farmaco negli animali non è risultata essere sempre associata ad un aumento nei livelli di lipidi plasmatici, anche se in presenza di effetti pro-aterosclerotici (Emeson E. E. 1993) (Zheng X. 2006). È anche da ricordare come gli effetti di interventi farmacologici sull'RCTm siano spesso indipendenti da variazioni nel profilo lipoproteico (Rader D. J. 2009) e come recentemente si stia consolidando sempre più il concetto che gli effetti antiaterogeni (tra cui la promozione dell'RCTm) delle HDL non siano dipendenti solamente dalla loro quantità nella circolazione, ma soprattutto dalle loro qualità biologiche (Von Eckardstein A. 2001).

Come precedentemente anticipato, la stimolazione dell'efflusso di colesterolo dalle cellule, influenzata dalla composizione in HDL del plasma, è un processo in grado di aumentare l'efficienza dell'RCTm, con conseguente incremento dell'ateroprotezione

(Cuchel M. and Rader D. J. 2006). Per valutare eventuali influenze della CsA su tale importante parametro, abbiamo analizzato la capacità del plasma dei topi, trattati o meno con il farmaco, di stimolare l'efflusso di colesterolo dai macrofagi, discriminando gli effetti sui contributi dei diversi meccanismi di trasporto: il plasma dei topi trattati con CsA ha mostrato un potenziale d'efflusso simile a quello dei topi del gruppo controllo attraverso tutti i pathway, ed eccezione del trasporto di colesterolo mediato da ABCA1 che è risultato essere incrementato dopo esposizione delle cellule al plasma dei topi trattati con il farmaco. Questo dato suscita grande interesse, in quanto potrebbe indicare un'attività della CsA specifica nel causare un aumento della frazione pre β delle HDL, accettori preferenziali dell'efflusso mediato da ABCA1, insieme all'apoA₁. Il contributo di ABCA1 nel totale dell'efflusso di colesterolo dai macrofagi arricchiti in colesterolo è stato dimostrato essere predominante (Adorni et al. 2007), inoltre le pre β -HDL, arricchendosi in colesterolo, formano le altre frazioni di HDL mature, in grado di stimolare l'efflusso attraverso gli altri trasportatori di colesterolo (Cuchel M. and Rader D. J. 2006).

Quando abbiamo testato il potenziale d'efflusso di colesterolo del plasma dei topi dei due gruppi da macrofagi, in condizioni che mimassero quelle a cui i macrofagi iniettati nel peritoneo dei topi sono stati sottoposti nell'esperimento di RCTm in vivo, i risultati hanno mostrato come il plasma dei topi del gruppo trattato con CsA possiede una capacità di stimolare l'efflusso solo tendenzialmente più alta di quello dei topi del gruppo controllo. In un sistema complesso, come è quello del macrofago carico in colesterolo in vitro, che non evidenzia il contributo di ogni singolo trasportatore, l'eventuale effetto di promozione dell'efflusso attraverso uno di questi potrebbe venire

mascherato dall'attività degli altri trasportatori, non alterata dal trattamento farmacologico.

È stato dimostrato che la CsA inibisce, in vitro, l'efflusso di colesterolo mediato da ABCA1 in macrofagi primari umani e murini (Le Goff W. 2004). ABCA1, come noto, è associato a funzioni ateroprotettive di promozione dell'efflusso di colesterolo dai macrofagi (Ye D. 2011), e di RCT macrofagico (Wang X. 2007). Alla luce di queste evidenze abbiamo ipotizzato che anche nelle nostre condizioni la CsA potesse causare inibizione nell'attività di ABCA1, alterando così la tappa limitante l'intero processo di RCTm. I risultati che abbiamo ottenuto dal trattamento di macrofagi con CsA, in condizioni che riproducessero quelle dei macrofagi iniettati nel peritoneo dei topi nell'RCT in vivo, hanno smentito tale ipotesi in quanto la capacità di rilasciare il colesterolo di macrofagi in coltura, arricchiti con lipoproteine pro aterogene (che esprimono elevati livelli di ABCA1 (Adorni et al. 2007)), è risultata essere uguale sia nelle condizioni controllo che in quelle trattate con CsA. È possibile ipotizzare che l'ottenimento di risultati diversi da quelli precedentemente dimostrati sia da imputare alle diverse condizioni sperimentali a cui abbiamo sottoposto le cellule: le nostre cellule sono state esposte a plasma intero, contenente quindi tutte le lipoproteine nella loro complessità a differenza degli esperimenti condotti da Le Goff et al. in cui l'efflusso è stato stimolato con l'accettore preferenziale di ABCA1, l'apoA₁; inoltre, il periodo di esposizione delle cellule agli accettori, nel nostro esperimento, è stato sensibilmente maggiore, 24h invece di 4h nell'esperimento di Le Goff et al.: è possibile che a lungo termine venga perso l'effetto inibitorio della CsA su ABCA1.

È noto che l'apoE secreta dai macrofagi, ricopre ruoli importanti di stimolazione dell'RCTm (Zanotti I. 2011) e di regolazione dei livelli di lipoproteine circolanti (Mahley R.

1999) (Mahley R. W. and Rall Jr S. C. 2000); l'aver effettuato lo stesso esperimento di efflusso di colesterolo sia in MPM che in J774, che non esprimono l'apoE, ci ha permesso, in vitro, come osservato in vivo, di concludere che l'effetto inibitorio dell'RCTm dato dalla CsA, nelle nostre condizioni sperimentali, non è dato dall'inibizione della secrezione di apoE, in quanto l'assenza di effetti del trattamento con CsA è stato visto in entrambe i modelli cellulari.

L'efficienza della seconda tappa dell'RCTm, ovvero la captazione del colesterolo a livello epatico attraverso l'attività del recettore SR-BI, in grado di mediare un flusso bidirezionale di colesterolo secondo gradiente (Yancey P. G. 2003), è influenzata dalla capacità del plasma di cedere il colesterolo agli epatociti in base alla composizione lipoproteica.

Quando abbiamo esposto gli epatociti al plasma dei topi trattati o meno con CsA, misurando l'accumulo di colesterolo intracellulare rispetto a quello escreto, il farmaco ha portato ad una significativa inibizione di tale parametro; questo risultato è in accordo con la ridotta escrezione di colesterolo a livello fecale osservata dopo trattamento con CsA poiché se il plasma presenta ridotta capacità di cedere il colesterolo agli epatociti, la quota di colesterolo che viene trasferito alla bile per l'escrezione fecale risulta essere inferiore.

L'effetto inibitorio del farmaco potrebbe esplicarsi anche nella terza tappa del processo, l'escrezione di colesterolo nella bile, attraverso modulazione di diversi meccanismi, presenti negli epatociti, che includono l'attività delle proteine coinvolte nella sintesi degli acidi biliari, come il CYP7 α (colesterolo 7 α -idrossilasi) e il CYP27A1 (sterolo-27-idrossilasi), o delle proteine responsabili del trasferimento nella bile degli steroli neutri (i trasportatori ABCG5 e ABCG8).

L'osservata riduzione significativa dell'espressione genica epatica del *Cyp7a* nei topi trattati con CsA, oltre ad essere concorde con dati precedentemente riportati in altri modelli animali (Vaziri N. D. 2000) suggerisce che l'effetto di ridotta escrezione di acidi biliari osservata dopo trattamento con CsA sia da imputare all'inibizione di tale enzima a livello epatico. Nonostante tale inibizione sia sufficiente per spiegare la ridotta escrezione di acidi biliari, non possiamo escludere che vi sia un coinvolgimento, anche nel nostro modello sperimentale, come già dimostrato in letteratura (Gueguen Y. 2007), di meccanismi alternativi di catabolismo del colesterolo e di sintesi di acidi biliari, come l'attività del CYP27A1.

L'analisi dell'espressione genica di *Abcg5* e *Abcg8*, in campioni epatici appartenenti ai topi dei gruppi controllo e trattato con CsA, ha evidenziato un incremento dei livelli di mRNA da parte del trattamento con CsA a carico di *Abcg5* e un'assenza degli stessi per quanto riguarda *Abcg8*. Abbiamo misurato successivamente l'espressione proteica di ABCG5 e ABCG8: dai risultati ottenuti è stato possibile osservare che il trattamento con CsA non ha portato alcuna alterazione nei livelli di proteina espressa, facendoci escludere un'inibizione, a questo livello, di escrezione biliare di steroli neutri che giustificasse quella osservata mediante la misurazione degli steroli neutri radioattivi ritrovati nelle feci dei topi in esame. Non essendoci stato un riscontro di un aumento dell'espressione proteica di ABCG5, nonostante l'aumento significativo dell'espressione genica, possiamo ipotizzare che la regolazione dei livelli di proteina, per tale trasportatore, non sia direttamente dipendente dai livelli di mRNA, ma che sottostia a meccanismi di regolazione post-trascrizionale, come spesso si verifica in processi di regolazione cellulari.

Recentemente è emersa l'importanza di un meccanismo alternativo di escrezione di colesterolo, che si affianca alla classica via di trasporto epatobiliare. Questa escrezione trans-intestinale di colesterolo (TICE) prevede il trasporto degli steroli neutri nel lume intestinale direttamente dal compartimento plasmatico, per mezzo di trasportatori di colesterolo presenti negli enterociti. I principali trasportatori coinvolti in tale processo, espressi nella parte apicale delle cellule intestinali, sono ABCG5 e ABCG8 (Berge K. E. 2000).

Alla luce di queste nuove osservazioni, abbiamo valutato se alla base dell'osservata inibizione di escrezione di steroli neutri nelle feci ci potesse essere un'attività inibitoria specifica della CsA su tali trasportatori espressi a livello intestinale. A supporto di tale ipotesi, la valutazione in vitro dell'effetto della CsA sull'attività di ABCG5 e ABCG8, effettuata in un modello cellulare di enterociti umani (le cellule CACO₂), ha evidenziato un'attività inibitoria da parte del farmaco sulla capacità dei trasportatori di far fuoriuscire il colesterolo dalle cellule.

Nonostante questi dati promettenti, non è emerso alcun coinvolgimento in vivo di tali trasportatori intestinali nella riduzione del processo di RCTm data dal trattamento con CsA. Le analisi di espressione genica di tali trasportatori in porzioni intestinali di duodeno-digiuno-ileo dei topi dei gruppi controllo e trattato con CsA hanno dato risultati paragonabili e con un andamento simile a quello osservato con l'analisi dell'espressione genica di ABCG5 e ABCG8 nel fegato.

L'inibizione di tali trasportatori a livello intestinale, in vivo, dovrebbe causare un'alterazione nell'equilibrio di colesterolo e fitosteroli nell'organismo, con il conseguente aumento significativo di questi ultimi, tra cui il β -sitosterolo. È questo il caso dei soggetti affetti da sitosterolemia (Sabeva N. 2009) o dei topi con delezione dei

geni *Abcg5/Abcg8* (Yu L. 2002). Quando abbiamo valutato la quantità di β -sitosterolo circolante nei topi trattati con CsA non sono emerse differenze rispetto ai topi trattati con il solo veicolo, suggerendo che, in vivo, la CsA non è in grado di causare inibizione dell'attività di ABCG5 e ABCG8.

Per avere un quadro più completo dell'attività della CsA a livello intestinale, abbiamo analizzato l'eventuale modulazione, data dal trattamento con CsA, dell'assorbimento intestinale di colesterolo, mediato dal trasportatore NPC1L1. In questo caso, la ridotta escrezione fecale di colesterolo potrebbe essere attribuita ad una aumentata attività di questa proteina, che porterebbe ad una ridotta disponibilità di colesterolo nel lume intestinale per l'eliminazione finale. Le analisi di espressione genica ci hanno portato ad escludere tale ipotesi in quanto il trattamento con CsA non ha portato ad alcuna differenza nell'espressione di *Npc1l1* tra il gruppo di topi controllo e trattati con il farmaco.

Non avendo rilevato effetti inibitori del trattamento con il farmaco sui meccanismi di trasporto intestinali del colesterolo presi in considerazione, è possibile ipotizzare che la CsA agisca su altri trasportatori espressi negli epatociti quali, per esempio ABCB1, di recentissima dimostrazione (Le May C. 2013), che in futuro sarà interessante approfondire.

In conclusione questo studio fornisce la dimostrazione che la CsA inibisce il processo ateroprotettivo dell'RCT macrofagico in vivo e che tale effetto rappresenta un ulteriore meccanismo con cui la CsA porta ad innalzamento del rischio cardiovascolare nei pazienti trattati con tale farmaco. Dai nostri risultati emerge come questo effetto sia associato, almeno in parte, alla ridotta captazione di colesterolo a livello epatico mediata

dal recettore SR-BI e all'inibizione dell'eliminazione del colesterolo dall'organismo mediante la sua trasformazione in acidi biliari ad opera dell'enzima CYP7 α .

Bibliografia

- Acton S. L. 1994. "Expression Cloning of SR-BI, a CD36-Related Class B Scavenger Receptor." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (33) (August 19): 21003–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11923102>.
- Acton S. 1996. "Identification of Scavenger Receptor SR-BI as a High Density Lipoprotein Receptor" 271: 18–20.
- Adorni, Maria Pia, Francesca Zimetti, Jeffrey T Billheimer, Nan Wang, Daniel J Rader, Michael C Phillips, and George H Rothblat. 2007. "The Roles of Different Pathways in the Release of Cholesterol from Macrophages." *Journal of Lipid Research* 48 (11) (November): 2453–62. doi:10.1194/jlr.M700274-JLR200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17761631>.
- Aiello R. J. 2002. "Increased Atherosclerosis in Hyperlipidemic Mice With Inactivation of ABCA1 in Macrophages." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22 (4) (March 7): 630–637. doi:10.1161/01.ATV.0000014804.35824.DA. <http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.ATV.0000014804.35824.DA>.
- Alam K. 2001. "Effect of up-Regulating Individual Steps in the Reverse Cholesterol Transport Pathway on Reverse Cholesterol Transport in Normolipidemic Mice." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (19) (May 11): 15641–9. doi:10.1074/jbc.M010230200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11278646>.
- Alberts A. W. 1980. "Mevinolin: a Highly Potent Competitive Inhibitor of Hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A Reductase and a Cholesterol-Lowering Agent." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77 (7) (July): 3957–61. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=349746&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Amundson D. M. 1999. "Fluorometric Method for the Enzymatic Determination of Cholesterol." *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 38 (1) (January 13): 43–52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10078872>.
- Arakawa R., and Yokoyama S. 2002. "Helical Apolipoproteins Stabilize ATP-Binding Cassette Transporter A1 by Protecting It from Thiol Protease-Mediated Degradation." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (25) (June 21): 22426–9. doi:10.1074/jbc.M202996200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11950847>.
- Argmann C. A. 2001. "Transforming Growth Factor-1 Inhibits Macrophage Cholesteryl Ester Accumulation Induced by Native and Oxidized VLDL Remnants." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 21 (12) (December 1): 2011–2018. doi:10.1161/hq1201.099426. <http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/hq1201.099426>.
- Asztalos B. F. 2010. "High-Density Lipoprotein Particles, Coronary Heart Disease, and Niacin." *Journal of Clinical Lipidology* 4 (5): 405–10. doi:10.1016/j.jacl.2010.08.012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21122684>.
- Baldán A. 2006. "ATP-Binding Cassette Transporter G1 and Lipid Homeostasis." *Current Opinion in Lipidology* 17 (3) (June): 227–32. doi:10.1097/01.mol.0000226113.89812.bb. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17727861>.
- Bandsma R. 2000. "The Contribution of Newly Synthesized Cholesterol to Bile Salt Synthesis in Rats Quantified by Mass Isotopomer Distribution Analysis" 1483: 343–351.

- Barter P. J. 2002. "Hugh Sinclair Lecture: The Regulation and Remodelling of HDL by Plasma Factors." *Atherosclerosis. Supplements* 3 (4) (December): 39–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12573362>.
- Barter P. J. 2007. "Effects of Torcetrapib in Patients at High Risk for Coronary Events."
- Barter P. J., and Ryne K. A. 2006. "Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) Inhibition as a Strategy to Reduce Cardiovascular Risk."
- Basu S. K. 1976. "Degradation of Cationized Low Density Lipoprotein and Regulation of Cholesterol Metabolism in Homozygous Familial Hypercholesterolemia Fibroblasts." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (9) (September): 3178–82. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=430973&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Batta A. K. 1999. "Highly Simplified Method for Gas-Liquid Chromatographic Quantitation of Bile Acids and Sterols in Human Stool." *Journal of Lipid Research* 40 (6) (June): 1148–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10357847>.
- Beaglehole R., and Yach D. 2003. "Public Health Globalisation and the Prevention and Control of Non-Communicable Disease: the Neglected Chronic Diseases of Adults" 362: 903–908.
- Berge K. E. 2000. "Accumulation of Dietary Cholesterol in Sitosterolemia Caused by Mutations in Adjacent ABC Transporters." *Science* 290 (5497) (December 1): 1771–1775. doi:10.1126/science.290.5497.1771. <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.290.5497.1771>.
- Binder C. 2002. "Innate and Acquired Immunity in Atherogenesis" 8 (11).
- Brown D. A., and London E. 1998. "Structure and Origin of Ordered Lipid Domains in Biological Membranes." *Journal of Membrane Biology* 164 (2): 103–114. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0032527642&partnerID=40&md5=a2d5ae0593099267aea11ce41db0ddf5>.
- Brundert M. 2005. "Scavenger Receptor Class B Type I Mediates the Selective Uptake of High-Density Lipoprotein-Associated Cholesteryl Ester by the Liver in Mice." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25 (1) (January): 143–8. doi:10.1161/01.ATV.0000149381.16166.c6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15528479>.
- Brunham L. R. 2009. "Tissue-Specific Roles of ABCA1 Influence Susceptibility to Atherosclerosis." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29 (4) (April): 548–54. doi:10.1161/ATVBAHA.108.182303. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19201688>.
- Bungert S. 2001. "Membrane Topology of the ATP Binding Cassette Transporter ABCR and Its Relationship to ABC1 and Related ABCA Transporters: Identification of N-Linked Glycosylation Sites." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (26) (June 29): 23539–46. doi:10.1074/jbc.M101902200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11320094>.
- Cai L. 2004. "Scavenger Receptor Class B Type I Reduces Cholesterol Absorption in Cultured Enterocyte CaCo-2 Cells." *Journal of Lipid Research* 45 (2) (February): 253–62. doi:10.1194/jlr.M300303-JLR200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14617739>.
- Calabresi L. 2009. "Functional Lecithin: Cholesterol Acyltransferase Is Not Required for Efficient Atheroprotection in Humans." *Circulation* 120 (7) (August 3): 628–635.

- doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.848143.
<http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.848143>.
- Calandra S. 2011. "Mechanisms and Genetic Determinants Regulating Sterol Absorption, Circulating LDL Levels, and Sterol Elimination: Implications for Classification and Disease Risk." *Journal of Lipid Research* 52 (11) (November): 1885–926. doi:10.1194/jlr.R017855. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3284125&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Calpe-Berdiel L. 2008. "Liver X Receptor-Mediated Activation of Reverse Cholesterol Transport from Macrophages to Feces in Vivo Requires ABCG5/G8." *Journal of Lipid Research* 49 (9) (September): 1904–11. doi:10.1194/jlr.M700470-JLR200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18509196>.
- Chen W. 2005. "A PEST Deletion Mutant of ABCA1 Shows Impaired Internalization and Defective Cholesterol Efflux from Late Endosomes." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (32) (August 12): 29277–81. doi:10.1074/jbc.M505566200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15951431>.
- Cheng S. H. 1959. "Secretion of Cholesterol by Intestinal Mucosa in Patients with Complete Common Bile Duct Obstruction." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 101 (2): 223–225. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33750986589&partnerID=40&md5=8fc573723090d059c0b4603288984243>.
- Chinetti G. 2000a. "CLA-1/SR-BI Is Expressed in Atherosclerotic Lesion Macrophages and Regulated by Activators of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors." *Circulation* 101 (20): 2411–2417. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034705071&partnerID=40&md5=16b16ba85e1f3781b3ac4b67afa8575b>.
- Chinetti G. 2000b. "CLA-1/SR-BI Is Expressed in Atherosclerotic Lesion Macrophages and Regulated by Activators of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors." *Circulation* 101 (20) (May 23): 2411–2417. doi:10.1161/01.CIR.101.20.2411. <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.101.20.2411>.
- Costet P. 2000. "Sterol-Dependent Transactivation of the ABC1 Promoter by the Liver X Receptor/retinoid X Receptor." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (36) (September 8): 28240–5. doi:10.1074/jbc.M003337200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10858438>.
- Covey S. 2003. "Scavenger Receptor Class B Type I-Mediated Protection Against Atherosclerosis in LDL Receptor-Negative Mice Involves Its Expression in Bone Marrow-Derived Cells." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (9) (September 1): 1589–94. doi:10.1161/01.ATV.0000083343.19940.A0. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12829524>.
- Crook M. A. 2012. "Plasma Lipids and Lipoproteins."
- Cuchel M., and Rader D. J. 2006. "Macrophage Reverse Cholesterol Transport: Key to the Regression of Atherosclerosis?" *Circulation* 113 (21) (May 30): 2548–55. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.475715. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16735689>.
- Cybulsky M. I., and Jongstra-Bilen J. 2010. "Resident Intimal Dendritic Cells and the Initiation of Atherosclerosis." *Current Opinion in Lipidology* 21 (5) (October): 397–403. doi:10.1097/MOL.0b013e32833ded96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20720490>.
- Czarnecka H., and Yokoyama S. 1996. "Regulation of Cellular Cholesterol Efflux by Lecithin:Cholesterol Acyltransferase Reaction through Nonspecific Lipid Exchange." *Journal of Biological Chemistry* 271

- (4) (January 26): 2023–2028. doi:10.1074/jbc.271.4.2023. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.271.4.2023>.
- Davidson W. S. 1995. "Effects of Acceptor Particle Size on the Efflux of Cellular Free Cholesterol." *Journal of Lipid Research* 36 (1) (January): 1967–74. doi:10.1194/jlr.R400007-JLR200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15342674>.
- De Grooth G. 2004. "A Review of CETP and Its Relation to Atherosclerosis." *Journal of Lipid Research* 45 (11) (November): 1967–74. doi:10.1194/jlr.R400007-JLR200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15342674>.
- De la Llera-Moya M. 1999. "Scavenger Receptor BI (SR-BI) Mediates Free Cholesterol Flux Independently of HDL Tethering to the Cell Surface." *Journal of Lipid Research* 40 (3) (March): 575–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10064746>.
- Dean M. 2001. "The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily." *Journal of Lipid Research* 42 (7) (July): 1007–17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11441126>.
- Derfler K. 1991. "Decreased Postheparin Lipolytic Activity in Renal Transplant Recipients with Cyclosporin A." *Kidney International* 40 (4) (October): 720–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1745023>.
- Deters M. 2004. "Everolimus/cyclosporine Interactions on Bile Flow and Biliary Excretion of Bile Salts and Cholesterol in Rats." *Digestive Diseases and Sciences* 49 (1) (January): 30–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14992431>.
- Dijkers A., and Tietge U. 2010. "Biliary Cholesterol Secretion: More Than a Simple ABC IMPORTANCE OF BILIARY CHOLESTEROL." *Online* 16 (47): 5936–5945. doi:10.3748/wjg.v16.i47.5936.
- Dong Z. M. 1998. "The Combined Role of P- and E-Selectins in Atherosclerosis." *The Journal of Clinical Investigation* 102 (1) (July 1): 145–52. doi:10.1172/JCI3001. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=509076&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Duong M. 2006. "Relative Contributions of ABCA1 and SR-BI to Cholesterol Efflux to Serum from Fibroblasts and Macrophages." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26 (3): 541–547. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33646558306&partnerID=40&md5=63bc385fdb60e079dadbec945d7bb086>.
- Emeson E. E. 1993. "Accelerated Atherosclerosis in Hyperlipidemic C57BL/6 Mice Treated with Cyclosporin A." *The American Journal of Pathology* 142 (6) (June): 1906–15. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1887004&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Fielding C. J., and Fielding P. E. 1995. "Molecular Physiology of Reverse Cholesterol Transport" 36.
- Fielding P. E. 2000. "A Two-Step Mechanism for Free Cholesterol and Phospholipid Efflux from Human Vascular Cells to Apolipoprotein A-1." *Biochemistry* 39 (46) (November 21): 14113–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11087359>.
- Fitzgerald M. L. 2001. "LIPIDS AND LIPOPROTEINS: ATP-Binding Cassette Transporter A1 Contains an NH 2 -Terminal Signal Anchor Sequence That Translocates the Protein ' s First Hydrophilic Domain to the Exoplasmic Space ATP-Binding Cassette Transporter A1 Contains an NH 2 -Termin." doi:10.1074/jbc.M100474200.
- Fournier N. 1999. "Fractional Efflux and Net Change in Cellular Cholesterol Content Mediated by Sera from Mice Expressing Both Human Apolipoprotein AI and Human Lecithin:cholesterol

- Acyltransferase Genes." *Atherosclerosis* 147 (2) (December): 227–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10559507>.
- Franceschini G. 1991. "Reverse Cholesterol Transport: Physiology and Pharmacology." *Atherosclerosis* 88 (2-3): 99–107. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0025883538&partnerID=40&md5=57c0beb255a11b4dfecaf02655b5c281>.
- Galan A. I. 1992. "Inhibition of Biliary Lipid and Protein Secretion by Cyclosporine A in the Rat." *Biochemical Pharmacology* 44 (6): 1105–1113. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0026641666&partnerID=40&md5=216d11364e6b8d45f71651bb448787ea>.
- Gelissen I. C. 2006. "ABCA1 and ABCG1 Synergize to Mediate Cholesterol Export to apoA-I." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26 (3) (March): 534–40. doi:10.1161/01.ATV.0000200082.58536.e1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16357317>.
- Gillotte K. L. 1999. "Apolipoprotein-Mediated Plasma Membrane Microsolubilization. ROLE OF LIPID AFFINITY AND MEMBRANE PENETRATION IN THE EFFLUX OF CELLULAR CHOLESTEROL AND PHOSPHOLIPID." *Journal of Biological Chemistry* 274 (4) (January 22): 2021–2028. doi:10.1074/jbc.274.4.2021. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.274.4.2021>.
- Glass C. K., and Witztum J. L. 2001. "Atherosclerosis: The Road Ahead Review" 104: 503–516.
- "Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control."
- "Global Status Report on Noncommunicable Diseases." 2010.
- Glomset J. 1968. "The Plasma Lecithins:cholesterol Acyltransferase Reaction." *Journal of Lipid Research* 9 (2) (March): 155–67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4868699>.
- Graf G. A. 2002. "Coexpression of ATP-Binding Cassette Proteins ABCG5 and ABCG8 Permits Their Transport to the Apical Surface" 110 (5): 659–669. doi:10.1172/JCI200216000.Introduction.
- Graf G. A. 2004a. "Missense Mutations in ABCG5 and ABCG8 Disrupt Heterodimerization and Trafficking." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (23) (June 4): 24881–8. doi:10.1074/jbc.M402634200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15054092>.
- Graf G. A. 2004b. "Missense Mutations in ABCG5 and ABCG8 Disrupt Heterodimerization and Trafficking." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (23) (June 4): 24881–8. doi:10.1074/jbc.M402634200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15054092>.
- Gu X. 2000. "Scavenger Receptor Class B , Type I-Mediated [3H]Cholesterol Efflux to High and Low Density Lipoproteins Is Dependent on Lipoprotein Binding to the Receptor Scavenger Receptor Class B , Type I-Mediated [3 H] Cholesterol Efflux to High and Low Density Li." doi:10.1074/jbc.M00415220.
- Gueguen Y. 2007. "Compared Effect of Immunosuppressive Drugs Cyclosporine A and Rapamycin on Cholesterol Homeostasis Key Enzymes CYP27A1 and HMG-CoA Reductase." *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 100 (6) (June): 392–7. doi:10.1111/j.1742-7843.2007.00066.x. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17516993>.
- Havel R. J., Eder H. A., and Bragdon J. H. 1955. "The Distribution and Chemical Composition of Ultracentrifugally Separated Lipoproteins in Human Serum." 1345–1353.

- Hirano K. 1999. "Expression of Human Scavenger Receptor Class B Type I in Cultured Human Monocyte-Derived Macrophages and Atherosclerotic Lesions." *Circulation Research* 85 (1) (July 9): 108–116. doi:10.1161/01.RES.85.1.108. <http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.RES.85.1.108>.
- Ho N. 1996. "Activation Protein 1-Dependent Transcriptional Activation of Interleukin 2 Gene by Ca²⁺/Calmodulin Kinase Type IV/Gr" 184 (July).
- Hoekstra M. 2003. "Specific Gene Expression of ATP-Binding Cassette Transporters and Nuclear Hormone Receptors in Rat Liver Parenchymal, Endothelial, and Kupffer Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (28) (July 11): 25448–53. doi:10.1074/jbc.M301189200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12704191>.
- Hubacek J. 2001. "Mutations in ATP-Cassette Binding Proteins G5 (ABCG5) and G8 (ABCG8) Causing Sitosterolemia." *Human Mutation* 18 (4) (October): 359–60. doi:10.1002/humu.1206. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11668628>.
- Inazu A. 1994. "Genetic Cholesteryl Ester Transfer Protein Deficiency Caused by Two Prevalent Mutations as a Major Determinant of Increased Levels of High Density Lipoprotein Cholesterol." *The Journal of Clinical Investigation* 94 (5) (November): 1872–82. doi:10.1172/JCI117537. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=305391&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ito T. 2003. "Physiological Function of ABCG1." *Drug News and Perspectives* 16 (8): 490–492. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0344444708&partnerID=40&md5=61575d1ab91128e909a7e17d93197380>.
- Iverson S. J. 2001. "Comparison of the Bligh and Dyer and Folch Methods for Total Lipid Determination in a Broad Range of Marine Tissue." *Lipids* 36 (11): 1283–1287. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035658164&partnerID=40&md5=24005e57291c3540220043a6ce97fd19>.
- Jessup W. 2006. "Roles of ATP Binding Cassette Transporters A1 and G1, Scavenger Receptor BI and Membrane Lipid Domains in Cholesterol Export from Macrophages." *Current Opinion in Lipidology* 17 (3) (June): 247–57. doi:10.1097/01.mol.0000226116.35555.eb. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16680029>.
- Ji N. 1999. "Hepatic Scavenger Receptor BI Promotes Rapid Clearance of High Density Lipoprotein Free Cholesterol and Its Transport into Bile." *Journal of Biological Chemistry* 274 (47) (November 19): 33398–33402. doi:10.1074/jbc.274.47.33398. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.274.47.33398>.
- Ji Y. 1997. "Scavenger Receptor BI Promotes High Density Lipoprotein-Mediated Cellular Cholesterol Efflux." *Journal of Biological Chemistry* 272 (34) (August 22): 20982–20985. doi:10.1074/jbc.272.34.20982. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.272.34.20982>.
- Johnson W. J. 1991. "Cholesterol Transport Between Cells and High-Density Lipoproteins." *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism* 1085 (3): 273–298. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0025941724&partnerID=40&md5=72e989cca905674c351d05d08f9885ea>.
- Karwatsky J. 2010. "Cholesterol Efflux to apoA-I in ABCA1-Expressing Cells Is Regulated by Ca²⁺-Dependent Calcineurin Signaling." *Journal of Lipid Research* 51 (5) (May): 1144–56.

- doi:10.1194/jlr.M003145. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2853441&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kellner-Weibel G. 2000. "Expression of Scavenger Receptor BI in COS-7 Cells Alters Cholesterol Content": 221–229.
- Kennedy M. 2001. "Characterization of the Human ABCG1 Gene: Liver X Receptor Activates an Internal Promoter That Produces a Novel Transcript Encoding an Alternative Form of the Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (42) (October 19): 39438–47. doi:10.1074/jbc.M105863200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11500512>.
- Kennedy M. 2005. "ABCG1 Has a Critical Role in Mediating Cholesterol Efflux to HDL and Preventing Cellular Lipid Accumulation." *Cell Metabolism* 1 (2) (February): 121–31. doi:10.1016/j.cmet.2005.01.002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16054053>.
- Kielar D. 2001. "Rapid Quantification of Human ABCA1 mRNA in Various Cell Types and Tissues by Real-Time Reverse Transcription-PCR." *Clinical Chemistry* 47 (12) (December): 2089–97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11719471>.
- Klucken J. 2000. "ABCG1 (ABC8), the Human Homolog of the Drosophila White Gene , Is a Regulator of Macrophage Cholesterol and Phospholipid Transport" 97 (2).
- Kobashigawa J. 2014. "HYPERLIPIDEMIA IN SOLID ORGAN TRANSPLANTATION" 63 (February 1997): 331–338.
- Kockx M. 2009. "Cyclosporin A Decreases Apolipoprotein E Secretion from Human Macrophages via a Protein Phosphatase 2B-Dependent and ATP-Binding Cassette Transporter A1 (ABCA1)-Independent Pathway." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (36) (September 4): 24144–54. doi:10.1074/jbc.M109.032615. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2782008&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kockx M. 2010. "Cyclosporin A and Atherosclerosis--Cellular Pathways in Atherogenesis." *Pharmacology & Therapeutics* 128 (1) (October): 106–18. doi:10.1016/j.pharmthera.2010.06.001. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20598751>.
- Kozarsky K. F. "Overexpression of the HDL Receptor SR-BI Alters Plasma HDL and Bile Cholesterol Levels."
- Krieger M., and Herz J. 1994. "Structures and Functions of Multiligand Lipoprotein Receptors: Macrophage Scavenger Receptors and LDL Receptor-Related Protein (LRP)." *Annual Review of Biochemistry* 63: 601–637. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0028173897&partnerID=40&md5=8ff19fb8a94f3020311b2ed79df0fbe6>.
- Kunitake S. T. 1985. "Apolipoprotein A-I-Containing Lipoproteins with Pre-Beta Electrophoretic Mobility." *Journal of Lipid Research* 26 (5) (May): 549–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3926924>.
- Kunnen S., and Van Eck M. 2012. "Lecithin:cholesterol Acyltransferase: Old Friend or Foe in Atherosclerosis?" *Journal of Lipid Research* 53 (9) (September): 1783–99. doi:10.1194/jlr.R024513. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3413220&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Langmann T. 1999. "Molecular Cloning of the Human ATP-Binding Cassette Transporter 1 (hABC1): Evidence for Sterol-Dependent Regulation in Macrophages." *Biochemical and Biophysical Research*

- Communications* 257 (1) (April 2): 29–33. doi:10.1006/bbrc.1999.0406. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10092505>.
- Le Goff W. 2004. "Cyclosporin A Traps ABCA1 at the Plasma Membrane and Inhibits ABCA1-Mediated Lipid Efflux to Apolipoprotein A-I." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (11) (November): 2155–61. doi:10.1161/01.ATV.0000144811.94581.52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15358601>.
- Le May C. 2013. "Transintestinal Cholesterol Excretion Is an Active Metabolic Process Modulated by PCSK9 and Statin Involving ABCB1." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33 (7) (July): 1484–93. doi:10.1161/ATVBAHA.112.300263. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23559630>.
- Lee M. 2006. "Dietary Cholesterol Absorption" 27 (1): 79–83.
- Li A. C. 2004. "Differential Inhibition of Macrophage Foam-Cell Formation and Atherosclerosis in Mice by PPAR α , β / δ , and γ " 114 (11). doi:10.1172/JCI200418730.1564.
- Libby P. 2005. "Pathophysiology of Coronary Artery Disease." *Circulation* 111 (25) (June 28): 3481–8. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.537878. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15983262>.
- Livak K. J. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4) (December): 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>.
- Lopez L., and McLean M. P. 1999. "Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1a Binds to Cis Elements in the Promoter of the Rat High Density Lipoprotein Receptor SR-BI Gene." *Endocrinology* 140 (12): 5669–5681. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033305513&partnerID=40&md5=b2ae28cd967bfa45dde237ee9aa969b5>.
- Lowry O. 1951. "ARTICLE: PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT."
- Lu K. 2002. "Molecular Cloning, Genomic Organization, Genetic Variations, and Characterization of Murine Sterolin Genes Abcg5 and Abcg8." *Journal of Lipid Research* 43 (4) (April): 565–78. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1815568&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lusis A. J. 2000. "Atherosclerosis" 407 (6801): 233–241. doi:10.1038/35025203.Atherosclerosis.
- Mahley R. 1999. "Remnant Lipoprotein Metabolism: Key Pathways Involving Cell-Surface Heparan Sulfate Proteoglycans and Apolipoprotein E." *Journal of Lipid Research* 40 (1) (January): 1–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9869645>.
- Mahley R. W., and Rall Jr S. C. 2000. "Apolipoprotein E: Far More Than a Lipid Transport Protein." *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034575124&partnerID=40&md5=b66dd8fd4d70438bea189fa03c176b71>.
- Malerød L. 2002. "Oxysterol-Activated LXRs/RXR Induces hSR-BI-Promoter Activity in Hepatoma Cells and Preadipocytes." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 299 (5): 916–923. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0038542910&partnerID=40&md5=dbd8de698af2667602f8d9e88864e17c>.
- Malerød L. 2003. "Hepatic Scavenger Receptor Class B, Type I Is Stimulated by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and Hepatocyte Nuclear Factor 4 α ." *Biochemical and Biophysical Research*

- Communications* 305 (3): 557–565. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0037564358&partnerID=40&md5=ea5a853b138eaeae9b3e7f897fe95807>.
- Marotti K. R. 1993. "Severe Atherosclerosis in Transgenic Mice Expressing Simian Cholesteryl Ester Transfer Protein." *Nature* 364 (6432): 73–75. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0027325516&partnerID=40&md5=da0030fde75ea4d22a64a42879b79fef>.
- Mathers C. D., and Loncar D. 2006. "Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030." *PLoS Medicine* 3 (11) (November): e442. doi:10.1371/journal.pmed.0030442. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1664601&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- McIntosh T. J. 1995. "Experimental Tests for Protrusion and Undulation Pressures in Phospholipid Bilayers." *Biochemistry* 34 (27): 8520–8532. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0029063594&partnerID=40&md5=20f415f7ab76bcfa78df47140850f591>.
- Miettinen T. A. 1981. "Origins of Fecal Neutral Steroids in Rats." *Journal of Lipid Research* 22 (3) (March): 485–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7240973>.
- Miller G. J., and Miller N. E. 1975. "Plasma High Density Lipoprotein Concentration and Development of Ischaemic Heart Disease." *Lancet* 1 (7897): 16–19. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0016433018&partnerID=40&md5=ab761bfe6c4dbd8cf1dd550b64a2b522>.
- Miller L. W. 2002. "Cardiovascular Toxicities of Immunosuppressive Agents." *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2 (9) (October): 807–18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12392286>.
- Murao M. 1997. "Characterization of CLA-1, a Human Homologue of Rodent Scavenger Receptor BI, as a Receptor for High Density Lipoprotein and Apoptotic Thymocytes." *Journal of Biological Chemistry* 272 (28) (July 11): 17551–17557. doi:10.1074/jbc.272.28.17551. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.272.28.17551>.
- Nakamura K. 2004. "Expression and Regulation of Multiple Murine ATP-Binding Cassette Transporter G1 mRNAs/isoforms That Stimulate Cellular Cholesterol Efflux to High Density Lipoprotein." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (44) (October 29): 45980–9. doi:10.1074/jbc.M408652200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15319426>.
- Nieland T. 2002. "Discovery of Chemical Inhibitors of the Selective Transfer of Lipids Mediated by the HDL Receptor SR-BI."
- Ojo A. 2006. "Cardiovascular Complications after Renal Transplantation and Their Prevention." *Transplantation* 82 (5) (September 15): 603–11. doi:10.1097/01.tp.0000235527.81917.fe. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16969281>.
- Oram J. F. 1996. "Apolipoprotein-Mediated Removal of Cellular Cholesterol and Phospholipids." *Journal of Lipid Research* 37 (12) (December): 2473–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9017501>.
- Oram J. F. 2005. "ATP-Binding Cassette Transporter A1: A Cell Cholesterol Exporter That Protects Against Cardiovascular Disease" (8): 1343–1372. doi:10.1152/physrev.00005.2005.
- Oram J. F. 2006. "ATP-Binding Cassette Cholesterol Transporters and Cardiovascular Disease." *Circulation Research* 99 (10) (November 10): 1031–43. doi:10.1161/01.RES.0000250171.54048.5c. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17095732>.

- Owen J. S. 2002. "ATP-Binding Cassette A1 Protein and HDL Homeostasis." *Atherosclerosis Supplements* 3 (4) (December): 13–22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12573359>.
- Phillips M. C. 1987. "Mechanisms and Consequences of Cellular Cholesterol Exchange and Transfer." *BBA - Reviews on Biomembranes* 906 (2): 223–276. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0023663531&partnerID=40&md5=0ce73b1a7a19a1414bb9e23101a99f8a>.
- Princen H. M. 1991. "Cyclosporin A Blocks Bile Acid Synthesis in Cultured Hepatocytes by Specific Inhibition of Chenodeoxycholic Acid Synthesis." *The Biochemical Journal* 275 (Pt 2 (April 15): 501–5. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1150079&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Qin S. 2000. "Phospholipid Transfer Protein Gene Knock-Out Mice Have Low High Density Lipoprotein Levels, Due to Hypercatabolism, and Accumulate apoA-IV-Rich Lamellar Lipoproteins." *Journal of Lipid Research* 41 (2) (February): 269–76. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10681411>.
- Rader D. J. 2003. "Regulation of Reverse Cholesterol Transport and Clinical Implications." *The American Journal of Cardiology* 92 (4) (August): 42–49. doi:10.1016/S0002-9149(03)00615-5. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002914903006155>.
- Rader D. J. 2009. "The Role of Reverse Cholesterol Transport in Animals and Humans and Relationship to Atherosclerosis." *Journal of Lipid Research* 50 Suppl (April): S189–94. doi:10.1194/jlr.R800088-JLR200. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2674717&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Rayyes O. 1996. "Cyclosporine Inhibits Catabolism of Low-Density Lipoproteins in HepG2 Cells by About 25%." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 24 (3) (September): 613–9. doi:10.1002/hep.510240325. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8781333>.
- Repa J. J. 1999. "Nuclear Receptor Regulation of Cholesterol and Bile Acid Metabolism." *Current Opinion in Biotechnology* 10 (6) (December): 557–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10600692>.
- Rigotti A. 1997. "A Targeted Mutation in the Murine Gene Encoding the High Density Lipoprotein (HDL) Receptor Scavenger Receptor Class B Type I Reveals Its Key Role in HDL Metabolism." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (23) (November 11): 12610–5. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=25055&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Rigotti A. 2003. "The Role of the High-Density Lipoprotein Receptor SR-BI in the Lipid Metabolism of Endocrine and Other Tissues." *Endocrine Reviews* 24 (>3) (June 1): 357–387. doi:10.1210/er.2001-0037. <http://edrv.endojournals.org/cgi/doi/10.1210/er.2001-0037>.
- Ross R. 1993. "The Pathogenesis of Atherosclerosis: a Perspective for the 1990s."
- Ross R. 1999. "Atherosclerosis: An Inflammatory Disease": 115–126.
- Ross. R., and Glomset G. A. 1973. "Atherosclerosis and the Arterial Smooth Muscle Cell: Proliferation of Smooth Muscle Is a Key Event in the Genesis of the Lesions of Atherosclerosis." *Science* 180 (4093): 1332–1339. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0015829488&partnerID=40&md5=945c32e1f2382e5ea3642bbda38b79d3>.

- Rothblat G. H. 1999. "Cell Cholesterol Efflux: Integration of Old and New Observations Provides New Insights." *Journal of Lipid Research* 40 (5) (May): 781–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10224147>.
- Rothblat G. H., and Phillips M. C. 2011. "High-Density Lipoprotein Heterogeneity and Function in Reverse Cholesterol Transport" 21 (3): 229–238.
- Rubic T., and Lorenz R. L. 2006. "Downregulated CD36 and oxLDL Uptake and Stimulated ABCA1/G1 and Cholesterol Efflux as Anti-Atherosclerotic Mechanisms of Interleukin-10." *Cardiovascular Research* 69 (2) (February 1): 527–35. doi:10.1016/j.cardiores.2005.10.018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16336952>.
- Sabeva N. 2009. "The ABCG5 ABCG8 Sterol Transporter and Phytosterols: Implications for Cardiometabolic Disease." *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* 16 (2) (April): 172–177. doi:10.1097/MED.0b013e3283292312. <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=01266029-200904000-00013>.
- Sakai N. 1995. "Decreased Affinity of Low Density Lipoprotein (LDL) Particles for LDL Receptors in Patients with Cholesteryl Ester Transfer Protein Deficiency." *European Journal of Clinical Investigation* 25 (5): 332–339. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0029045831&partnerID=40&md5=782147ca71c7e365c375edfbd9d40fef>.
- Salen G. 1992. "Sitosterolemia." *Journal of Lipid Research* 33 (7) (July): 945–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1431587>.
- Santamarina-Fojo S. 2001. "Regulation and Intracellular Trafficking of the ABCA1 Transporter." *Journal of Lipid Research* 42 (9) (September): 1339–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11518753>.
- Santos-Gallego C. G., Giannarelli C., and Badimón J. J. 2011. "Experimental Models for the Investigation of High-Density Lipoprotein-Mediated Cholesterol Efflux." *Current Atherosclerosis Reports* 13 (3) (June): 266–76. doi:10.1007/s11883-011-0177-0. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21484293>.
- Schmitz G. 2005. "Transcriptional Regulatory Networks in Lipid Metabolism Control ABCA1 Expression." *Biochimica et Biophysica Acta* 1735 (1) (June 15): 1–19. doi:10.1016/j.bbalip.2005.04.004. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15922656>.
- Schwartz C. 1978. "Multicompartmental Analysis of Cholesterol Metabolism in Man" 61 (February).
- Schwartz C. 2004. "Lipoprotein Cholesteryl Ester Production, Transfer, and Output in Vivo in Humans." *Journal of Lipid Research* 45 (9) (September): 1594–607. doi:10.1194/jlr.M300511-JLR200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15145983>.
- Schwarz M. 1998. "Marked Reduction in Bile Acid Synthesis in Cholesterol 7 α -Hydroxylase-Deficient Mice Does Not Lead to Diminished Tissue Cholesterol Turnover or to Hypercholesterolemia." *Journal of Lipid Research* 39 (9) (September): 1833–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9741696>.
- Serfaty-Lacrosniere C. 1994. "Homozygous Tangier Disease and Cardiovascular Disease." *Atherosclerosis* 107 (1): 85–98. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0028307614&partnerID=40&md5=06c6189ebb669df84e0e6f372922a9f4>.
- Simons K., and Eehalt R. 2002. "Cholesterol , Lipid Rafts , and Disease" 110 (5): 597–603. doi:10.1172/JCI200216390.Lipid.

- Singaraja R. R. 2003. "Efflux and Atherosclerosis: The Clinical and Biochemical Impact of Variations in the ABCA1 Gene." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (8) (August 1): 1322–32. doi:10.1161/01.ATV.0000078520.89539.77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12763760>.
- Smith J. D. 2004. "ABCA1 Mediates Concurrent Cholesterol and Phospholipid Efflux to Apolipoprotein A-I." *Journal of Lipid Research* 45 (4) (April): 635–44. doi:10.1194/jlr.M300336-JLR200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14703508>.
- Soudi M. 1999. "Modulation of Cholesterol 7 α -Hydroxylase and Sterol 27-Hydroxylase Activities by Steroids and Physiological Conditions in Hamster" 64 (17).
- Sperry W. 1927. "LIPID EXCRETION: IV . A STUDY OF THE RELATIONSHIP OF THE BILE TO THE FECAL LIPIDS WITH SPECIAL REFERENCE TO CERTAIN PROBLEMS OF STEROL METABOLISM."
- Stangl H. 1999. "Transport of Lipids from High and Low Density Lipoproteins via Scavenger Receptor-BI." *Journal of Biological Chemistry* 274 (46) (November 12): 32692–32698. doi:10.1074/jbc.274.46.32692. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.274.46.32692>.
- Sutherland W. 1995. "Oxidation of Low Density Lipoproteins from Patients with Renal Failure or Renal Transplants." *Kidney International* 48 (1) (July): 227–36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7564083>.
- Svensson P. 2005. "Regulation and Splicing of Scavenger Receptor Class B Type I in Human Macrophages and Atherosclerotic Plaques." *BMC Cardiovascular Disorders* 5 (January): 25. doi:10.1186/1471-2261-5-25. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1215476&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Tabas I. 2002. "Consequences of Cellular Cholesterol Accumulation: Basic Concepts and Physiological Implications." *October* 110 (7). doi:10.1172/JCI200216452.The.
- Tachibana S. 2007. "Cholesterol and Plant Sterol Efflux from Cultured Intestinal Epithelial Cells Is Mediated by ATP-Binding Cassette Transporters." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71 (8): 1886–1895. doi:10.1271/bbb.70109. <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/bbb/70109?from=CrossRef>.
- Takahashi Y. 1999. "Cholesterol Efflux to Apolipoprotein AI Involves Endocytosis and Resecretion in a Calcium-Dependent Pathway." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (20) (September 28): 11358–63. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=18038&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Tanigawa H. 2009. "Lecithin: Cholesterol Acyltransferase Expression Has Minimal Effects on Macrophage Reverse Cholesterol": 160–169. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.825109.
- Tiwari R. L., Singh V., and Barthwal M. K. 2007. "Macrophages: An Elusive et Emerging Therapeutic Target of Atherosclerosis" 28 (4): 483–544. doi:10.1002/med.
- Tréguier M. 2004. "Transcription Factor Sterol Regulatory Element Binding Protein 2 Regulates Scavenger Receptor Cla-1 Gene Expression." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (12) (December): 2358–64. doi:10.1161/01.ATV.0000147896.69299.85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15486308>.

- Van der Veen J. 2007. "Cholesterol Feeding Strongly Reduces Hepatic VLDL-Triglyceride Production in Mice Lacking the Liver X Receptor Alpha." *Journal of Lipid Research* 48 (2) (February): 337–47. doi:10.1194/jlr.M600170-JLR200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17088263>.
- Van der Veen J. N. 2009. "Activation of the Liver X Receptor Stimulates Trans-Intestinal Excretion of Plasma Cholesterol." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (29) (July 17): 19211–9. doi:10.1074/jbc.M109.014860. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2740545&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Van der Velde A. 2008. "Regulation of Direct Transintestinal Cholesterol Excretion in Mice." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 295 (1) (July): G203–G208. doi:10.1152/ajpgi.90231.2008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18511744>.
- Van der Velde A. E. 2007. "Direct Intestinal Cholesterol Secretion Contributes Significantly to Total Fecal Neutral Sterol Excretion in Mice." *Gastroenterology* 133 (3) (September): 967–75. doi:10.1053/j.gastro.2007.06.019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17854600>.
- Van Eck M. 2004. "Dual Role for Scavenger Receptor Class B, Type I on Bone Marrow-Derived Cells in Atherosclerotic Lesion Development." *American Journal of Pathology* 165 (3): 785–794. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-4344574038&partnerID=40&md5=aecdc3c7e29ab2a3282467bc6d4187b7>.
- Van Eck M. 2006. "Macrophage ATP-Binding Cassette Transporter A1 Overexpression Inhibits Atherosclerotic Lesion Progression in Low-Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26 (4) (April): 929–34. doi:10.1161/01.ATV.0000208364.22732.16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16456089>.
- Varban M. L. 1998. "Targeted Mutation Reveals a Central Role for SR-BI in Hepatic Selective Uptake of High Density Lipoprotein Cholesterol." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (8) (April 14): 4619–24. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=22539&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Vaziri N. D. 2000. "Effect of Cyclosporine on HMG-CoA Reductase, Cholesterol 7 α -Hydroxylase, LDL Receptor, HDL Receptor, VLDL Receptor, and Lipoprotein Lipase Expressions." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 294 (2) (August): 778–83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10900260>.
- Venkateswaran A. 2000. "Human White/Murine ABC8 mRNA Levels Are Highly Induced in Lipid-Loaded Macrophages. A TRANSCRIPTIONAL ROLE FOR SPECIFIC OXYSTEROLS." *Journal of Biological Chemistry* 275 (19) (May 5): 14700–14707. doi:10.1074/jbc.275.19.14700. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.275.19.14700>.
- Von Eckardstein A. 2001. "High Density Lipoproteins and Arteriosclerosis: Role of Cholesterol Efflux and Reverse Cholesterol Transport." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 21 (1) (January 1): 13–27. doi:10.1161/01.ATV.21.1.13. <http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.ATV.21.1.13>.
- Wang N. 1998. "Liver-Specific Overexpression of Scavenger Receptor BI Decreases Levels of Very Low Density Lipoprotein ApoB, Low Density Lipoprotein ApoB, and High Density Lipoprotein in Transgenic Mice." *Journal of Biological Chemistry* 273 (49) (December 4): 32920–32926. doi:10.1074/jbc.273.49.32920. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.273.49.32920>.

- Wang N. 2003. "A PEST Sequence in ABCA1 Regulates Degradation by Calpain Protease and Stabilization of ABCA1 by apoA-I" 111 (1): 99–107. doi:10.1172/JCI200316808.Introduction.
- Wang X. 2007. "Macrophage ABCA1 and ABCG1, but Not SR-BI, Promote Macrophage Reverse Cholesterol Transport in Vivo." 117 (8). doi:10.1172/JCI32057DS1.
- Wang Y., and Oram J. F. 2002. "Unsaturated Fatty Acids Inhibit Cholesterol Efflux from Macrophages by Increasing Degradation of ATP-Binding Cassette Transporter A1." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (7) (February 15): 5692–7. doi:10.1074/jbc.M109977200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11741998>.
- Wellington C. L. 2002. "ABCA1 mRNA and Protein Distribution Patterns Predict Multiple Different Roles and Levels of Regulation." *Laboratory Investigation* 82 (3): 273–283. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0036127574&partnerID=40&md5=394609b1b9cd31b69167e65662c64a0d>.
- Wenger R. M., and Payne T. 1989. "Cyclosporine: Intrinsic Binding Energies to Interpret Structure-Activity Relationships." *Progress in Clinical and Biological Research* 291: 301–305. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0024491863&partnerID=40&md5=fd2adee593911a98865fdae87b1abe8>.
- Wilund K. R. 2004. "High-Level Expression of ABCG5 and ABCG8 Attenuates Diet-Induced Hypercholesterolemia and Atherosclerosis in Ldlr^{-/-} Mice." *Journal of Lipid Research* 45 (8) (August): 1429–36. doi:10.1194/jlr.M400167-JLR200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15175362>.
- Winegar D. A. 1996. "Effects of Cyclosporin on Cholesterol 27-Hydroxylation and LDL Receptor Activity in Hep G2 Cells." *Journal of Lipid Research* 37 (1) (January): 179–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8820113>.
- Yamashita S. 1990. "Accumulation of Apolipoprotein E-Rich High Density Lipoproteins in Hyperalphalipoproteinemic Human Subjects with Plasma Cholesteryl Ester Transfer Protein Deficiency." *The Journal of Clinical Investigation* 86 (3) (September): 688–95. doi:10.1172/JCI114764. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=296782&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Yancey P. G. 2000. "High Density Lipoprotein Phospholipid Composition Is a Major Determinant of the Bi-Directional Flux and Net Movement of Cellular Free Cholesterol Mediated by Scavenger Receptor BI." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (47) (November 24): 36596–604. doi:10.1074/jbc.M006924200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10964930>.
- Yancey P. G. 2003. "Importance of Different Pathways of Cellular Cholesterol Efflux." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (5) (May 1): 712–9. doi:10.1161/01.ATV.0000057572.97137.DD. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615688>.
- Ye D. 2008. "Hepatic Cell-Specific ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Profiling Identifies Putative Novel Candidates for Lipid Homeostasis in Mice." *Atherosclerosis* 196 (2) (February): 650–8. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.07.021. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17727861>.
- Ye D. 2011. "ATP-Binding Cassette Transporters A1 and G1, HDL Metabolism, Cholesterol Efflux, and Inflammation: Important Targets for the Treatment of Atherosclerosis." *Current Drug Targets* 12 (5): 647–660. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79953328337&partnerID=40&md5=60af2bc9c1c9999eb30f886140e3ef99>.

- Yu L. 2002. "Disruption of Abcg5 and Abcg8 in Mice Reveals Their Crucial Role in Biliary Cholesterol Secretion." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (25) (December 10): 16237–42. doi:10.1073/pnas.252582399. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=138595&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Yu L. 2003. "Stimulation of Cholesterol Excretion by the Liver X Receptor Agonist Requires ATP-Binding Cassette Transporters G5 and G8." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (18) (May 2): 15565–70. doi:10.1074/jbc.M301311200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12601003>.
- Yu L. 2004. "Sterol Regulation of Scavenger Receptor Class B Type I in Macrophages." *Journal of Lipid Research* 45 (5) (May): 889–99. doi:10.1194/jlr.M300461-JLR200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14967816>.
- Yu L. 2005. "Expression of ABCG5 and ABCG8 Is Required for Regulation of Biliary Cholesterol Secretion." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (10) (March 11): 8742–7. doi:10.1074/jbc.M411080200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15611112>.
- Zannis V. I., Chroni A., and Krieger M. 2006. "Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the Biogenesis of HDL." *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 84 (4) (April): 276–94. doi:10.1007/s00109-005-0030-4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16501936>.
- Zanotti I. 2004. "Pitavastatin Increases ABCA1-Mediated Lipid Efflux from Fu5AH Rat Hepatoma Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 321 (3) (August 27): 670–4. doi:10.1016/j.bbrc.2004.07.020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15358158>.
- Zanotti I. 2008. "The LXR Agonist T0901317 Promotes the Reverse Cholesterol Transport from Macrophages by Increasing Plasma Efflux Potential." *Journal of Lipid Research* 49 (5) (May): 954–60. doi:10.1194/jlr.M700254-JLR200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18252848>.
- Zanotti I. 2011. "Macrophage, but Not Systemic, Apolipoprotein E Is Necessary for Macrophage Reverse Cholesterol Transport in Vivo." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31 (1) (January): 74–80. doi:10.1161/ATVBAHA.110.213892. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20966401>.
- Zanotti I. 2013. "Cyclosporine a Impairs the Macrophage Reverse Cholesterol Transport in Mice by Reducing Sterol Fecal Excretion." *PloS One* 8 (8) (January): e71572. doi:10.1371/journal.pone.0071572. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3739729&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Zanotti I., Favari E., and Bernini F. 2012. "Cellular Cholesterol Efflux Pathways: Impact on Intracellular Lipid Trafficking and Methodological Considerations." *Current Pharmaceutical Biotechnology* 13 (2): 292–302. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84856488832&partnerID=40&md5=ac78cf604294f3e4e86b117de40a7d25>.
- Zhang Y. 2005a. "Hepatic Expression of Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI) Is a Positive Regulator of Macrophage Reverse Cholesterol Transport in Vivo." *Journal of Clinical Investigation* 115 (10): 2870–2874. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-26444435788&partnerID=40&md5=3e6d5d7b38df2060da06c66d49758e55>.
- Zhang Y. 2005b. "Hepatic Expression of Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI) Is a Positive Regulator of Macrophage Reverse Cholesterol Transport in Vivo" 115 (10). doi:10.1172/JCI25327.2870.

- Zhang Y., and Zanotti I. 2003. "Overexpression of Apolipoprotein A-I Promotes Reverse Transport of Cholesterol from Macrophages to Feces in Vivo." *Circulation* 108 (6) (August 12): 661–3. doi:10.1161/01.CIR.0000086981.09834.E0. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12900335>.
- Zheng X. 2006. "Cyclosporin A Inhibits Apolipoprotein AI Gene Expression." *Journal of Molecular Endocrinology* 37 (2) (October): 367–73. doi:10.1677/jme.1.02052. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17032751>.
- Zimetti F. 2006. "Measurement of Cholesterol Bidirectional Flux Between Cells and Lipoproteins." *Journal of Lipid Research* 47 (3) (March): 605–13. doi:10.1194/jlr.M500466-JLR200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16327021>.