



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

IV. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Nanopartikulen lipido
konposizioak rHDLen kolesterol
kanpora-fluxuaren efizientzian
eragina du**

*Shifa Jebari, Kepa B. Uribe, Asier
Benito-Vicente, Unai Galicia-García,
Asier Larrea-Sebal, Iraide Alloza,
Koen Vandenbroeck,
Helena Ostolaza eta Cesar Martín*

249-255 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.05.33>

ANTOLATZAILEA:



LAGUNTZAILEAK:



UPV EHU



Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa



Universidad
de Navarra



Universidad de Deusto
Deustuko Unibertsitatea



Mondragon
Unibertsitatea



Ayuntamiento
de Vitoria-Gasteiz
Vitoria-Gasteizko
Udala

araba álava
foru aldundia diputación foral



EUSKO JAURLARITZA
GOBIERNO VASCO

HEZKUNTZA SAIA
DEPARTAMENTO DE EDUCACIÓN



UDALBILTZA

Nanopartikulen lipido konposizioak rHDLen kolesterol kanpora-fluxuaren efizientzia eragina du

Jebari-Benslaiman, S.^{1,2}, Uribe, K.B.³, Benito-Vicente, A.^{1,2}, Galicia-Garcia, U.¹, Larrea-Sebal, A.¹, Alloza, I.^{2,4}, Vandenbroeck, K.^{2,4}, Ostolaza, H.^{1,2} eta Martín, C.^{1,2}

¹Biofisika Institutua (CSIC-EHU), 48940 Leioa

² Biokimika eta Biologia Molekularra Saila, EHU, 48940 Leioa

³ Center for Cooperative Research in Biomaterials (CIC biomaGUNE), 20018 Donostia

⁴ Biocruces Bizkaia Health Research Institute, 48903 Barakaldo

sjebari001@ikasle.ehu.eus

Laburpena

Aterosklerosia arteria nagusien intiman gertatzen den kolesterol metaketaren ondorioz garatzen da. Horren garrantzi klinikoa nabaria da, izan ere, ateroskleriaren konplikazioek gaixotasun kardiobaskularrak eragin ditzakete. Ateroskleriaren tratamendu zuzenerako, HDL naturalak imitatzen duten hainbat nanopartikulen diseinua burutu izan da (rHDL), ateroma plakako soberazko kolesterola irazteko helburuarekin, hainbat entsegu kliniko aurrera eraman direlarik. Ikerketa honen helburua, lipido konposizio desberdina duten rHDLek kolesterola zeluletatik jasotzeko duten efizientzia aztertzea izan da. Erabilitako lipido konposizioak DPPC, DPPC:Chol:LysoPC, DPPC:CE:LysoPC eta soja jatorridun fosfatidilkolinak izan dira.

Hitz gakoak: apoA-I; rHDL; nanodiskoak; kolesterol kanpora-fluxua; aterosklerosia

Abstract

Atherosclerosis is developed as result of the accumulation of cholesterol within the intima of large arteries. The clinical significance of this disease is relevant as its complication could lead cardiovascular diseases. Recently, the development of several nanoparticles that mimic natural HDLs (rHDL) have been carried out with the aim of excreting excess cholesterol from atheroma plaque, which have been tested in clinical trials. The aim of this study was to assess the cholesterol efflux efficiency of rHDLs with different lipid composition. Lipid compositions used in this study were: DPPC, DPPC:Chol:LysoPC, DPPC:CE:LysoPC and Soy-PC.

Keywords: apoA-I; rHDL; nanodisc; cholesterol efflux; atherosclerosis

1. Sarrera eta motibazioa

Aterosklerosia arteria nagusietan kolesterola eta zuntz-elementuak pilatzea bereizgarri duen gaixotasuna da (Lusis, 2000), eta gaixotasun kardiobaskularren (GKBen) kausa nagusienetakoa. Izan ere, GKBak (bihotzekoak eta infartuak, besteak beste) ateroskleriaren konplikazio klinikoak izan ohi dira.

Ateroskleriaren eragileak dentsitate txikiko lipoproteinak edo LDLak (ingelesetik, *Low Density Lipoprotein*) izeneko partikula natural batzuk dira, “kolesterol txar” moduan ezagutzen direnak. Partikula horiek lipido eta apolipoproteinaz osatuta daude, eta kolesterola gibeletik beste ehunetara garraiatzeaz arduratzen dira, prozesu zelular askotarako ezinbesteko molekula baita kolesterola (Hevonoja et al., 2000).

LDL partikulak baina, gai dira gorputzeko arterien endotelioa zeharkatzeko eta haren azpian metatzeko, kaltegarria izan daitekeena (hortik “kolesterol txarraren” ezizena). Izan ere, behin LDLak arteria barnean daudela, oxidazioak eta aztetilazioak bezalako aldaketak jasaten dituzte (Alique et al., 2015; Hevonoja et al., 2000) eta horren ondorioz, makrofagoek, gure gorputza

garbitzeaz arduratzen diren zelulek, eraldatutako LDL partikulak barneratuko dituzte hartzaile bidez, haiek deuseztatzeko helburuarekin. LDL metaketa handiegia bada, makrofagoek kontrolik gabe barneratzen jarraituko dute erregulazio gabeko mekanismoen bidez, eta kolesterolez osatutako tantak euren barnean pilatuz joango dira, zelula apartsu bihurtuz. Egoera kontrolatu ezinik, beste zelula-mota batzuk erakarriko dituzte, eta hanturazko mekanismoak martxan jarriko dira, une horretan ateriosklerosia garatzen hasiko delarik (Linton et al., 2000).

Hala, kolesterol gehiago eta zenbait zelula-mota pilatuko dira arteriaren gune azpiendotelialean. Horrez gain, zelulek ekoitzitako material zurrin batez estaltzen hasiko da, sortutako lesioa odol-korrontera jaria ez dadin. Denborak aurrera egin ahala, arteriako gune hori gero eta zabalagoa izango da, eta, ondorioz, odol-hodiaren diametroa estuagoa, plaka ateriosklerotikoa eratuz (Heusch et al., 2014).

Benetako konplikazio klinikoa ateroma-plakaren zati bat desegonkortu eta askatzen denean gerta daiteke, tronboa edo odolbildua sortzen baita (Linton et al., 2000; Heusch et al., 2014). Izan ere, tronboak odol-hodi bat blokea dezake, eta, ondorioz, odol-hodia inguratzen duen ehuna hiltzen hasiko da, oxigeno-falta dela eta. Hala, ehun horren heriotzari infartu deitzen diogu, eta bihotzean gertatzen bada, bihotzekoa.

Esan beharra dago, egoera fisiologikoetan plaka horren garapena ekidin daitekeela; izan ere, gure organismoak baditu plakaren garapena saihesteko mekanismoak. Haien artean, dentsitate handiko lipoproteina edo HDL (ingelesetik, *High Density Lipoprotein*) izeneko partikula lipido-proteikoak daude. Horiek ere, kolesterola garraiatzeaz arduratzen diren partikula naturalak dira, baina, kasu honetan, LDLen kontrako prozesua egiten dute: soberazko kolesterola ehun periferikoetatik jaso eta gibelerara eramaten dute, behazunarekin batera iraitzia izan dadin (Kosmas et al., 2018). Horregatik, HDLak “kolesterol on” moduan ezagutzen dira.

HDLak ere gai dira arteria-pareta zeharkatzeko, eta arteria barnean pilatzen hasi diren makrofagoetako kolesterola jasoko dute (Rosenson et al., 2012; von Eckardstein et al., 2001). Horretarako, HDLtan dagoen apoA-I apolipoproteinak makrofagoen mintz zelularren hartzaileekin (ABCA1-ekin) interakzionatzen du, eta hartzaile horiek, kanal moduan funtzionatzen dutela, soberazko kolesterola pasatuko diote HDLari. Hasiera batean, HDLak sortu-berriak direnean, apoA-I proteina eta fosfolipidoen soilik eratutako partikula diskoidalak dira. Ondoren, kolesterola jasotzen duten heinean, lehendabizi kolesterol askea (Chol) eta gero, kolesterol esterifikatua (CE) edukiko dute euren barnean. Azkenik, HDL partikula helduak odol-korrontera itzuliko dira, gibeleraino (Linton et al., 2000; Rosenson et al., 2012).

HDLak kolesterolaren kanpora-fluxua edo kanporanzko kanpora-fluxua indusitzeagatik, HDL partikulak atero-babesleak direla jotzen da. Horren ondorioz, ikerketa-talde askok laborategian HDLak sintetizatu izan dituzte, kolesterolaren kanporatzea indusitzeko helburuarekin.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

70 eta 80ko hamarkadetan sortu ziren lehen *in vitro* HDL partikulak; rHDLak hemendik aurrera (ingelesetik, *reconstituted HDL*). Horiek sintetizatzeko, HDLen proteina nagusia, apoA-I eta hainbat lipido-nahastura erabili ziren. Eta, hala, nanoeskalako partikula diskoidalak lortu ziren, HDL naturalen itxura bera zutenak. Geroztik, makina bat rHDL konbinazio argitaratu izan dira, eta haien funtzionaltasuna neurtu da ateroma-plakako zeluletatik kolesterola hartzeko gaitasunaren bidez, arrakasta itzelarekin (Cukier et al., 2017; Tang et al., 2016).

Ondoren, entsegu kliniko bidez *in vivo* azterketak burutzen hasi ziren. Hala, gizakietan probatu ziren lehen rHDLak, MILANO-PILOT deituriko entsegu klinikoan izan zen, 2016an amaitu zena. Entsegu hartan, nanopartikulen soluzioa pazienteei administratzen zitzairen, zain barneko injekzio bidez. Ez zuten, alabaina, emaitza esanguratsurik lortu ateroma-plakaren murriztapenean, eta entsegu klinikoa bertan behera utzi zen (Nicholls et al., 2018).

Horren ostean, rHDL konposizio berriekin beste saialdi batzuk egin izan ziren, sistemaren efizientzia emendatzeko helburuarekin. Hala, gaur egun martxan dagoen AEGIS II (NCT03473223) entsegu klinikoan adibidez, rHDLen lipido-konposizio berri bat probatzen ari dira, konkretuki, sojaren fosfatidilkolinak (Soy-PC) dituen rHDLak.

Lan honetan, konposizio lipidiko desberdina duten lau rHDL mota prestatu eta karakterizatu ziren. Alde batetik, HDLek *in vivo* jasaten duten garapena islatzen duten hiru konposizio lipidiko erabili ziren: DPPC soilik, DPPC:Chol:LysoPC eta DPPC:CE:LysoPC. Bestalde, AEGIS II entsegu klinikoan erabiltzen diren antzeko rHDLak presatatu ziren, SoyPC rHDLak. Ondoren, ateroma plakaren garapenean parte hartzen duten zeluletan, rHDL horiek kolesterol kanpora-fluxua indultzeko duten gaitasuna aztertu zen.

3. Ikerketaren muina

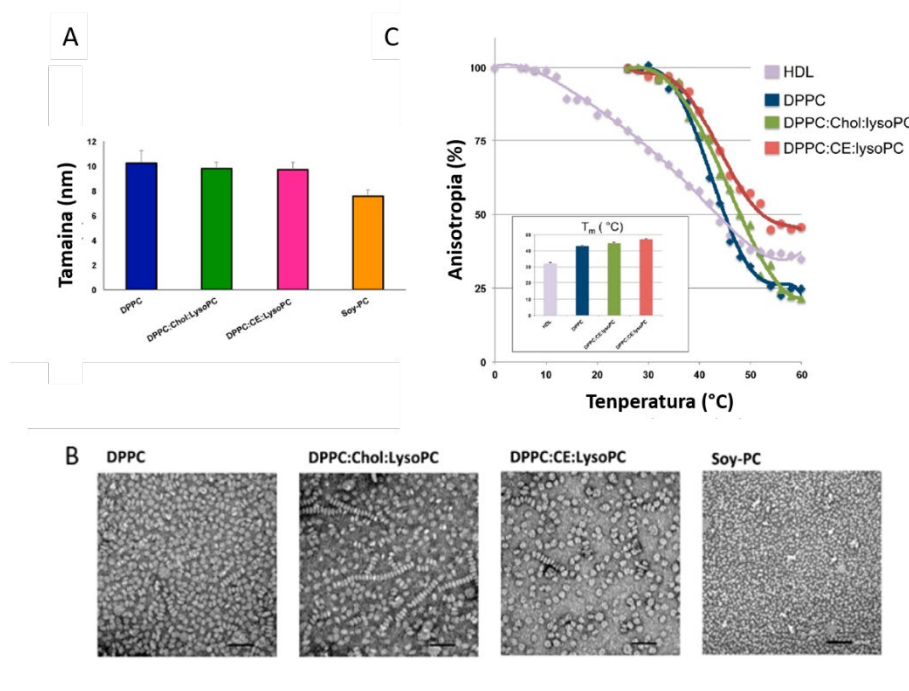
3.1. rHDLen prestaketa eta karakterizazioa

rHDLak apoA-I apolipoproteinaz eta lipidoz eratu ziren, aurretik deskribatutako protokoloan oinarrituta (Matz & Jonas, 1982). Horretarako, lehendabizi lipido konposizio desberdineko besikula multilamelarrak prestatu ziren: DPPC soilik, DPPC:Chol:LysoPC (8.5:1:0.5 erlazio molarrean), DPPC:CE:LysoPC (7.5:2:0.5 erlazio molarrean) eta Soy-PC soilik. Ondoren, aurretik purifikatutako apoA-I proteina lipido besikula nahastura mota bakoitzari gehitu zitzaion 1:125-eko erlazioan (M:M) 12 ordutan zehar inkubatzen utzi zirelarik. Nanopartikulak modu espontaneo batean eratzen dira, izan ere, apoA-I proteinak besikuletatik lipidoa hartu eta inguratzeko gaitasuna azaltzen du, azkenik, disko itxurako nanopartikulak (nanodiskoak) eratzen dituelarik, rHDLak alegia.

rHDL prestatu berriak gel filtrazio kromatografia bidez purifikatu ziren, nanodiskoak eratu ez zituzten lipido besikulelatik bereizteko. Intereseko frakzioa jaso, eta DLS (ingelesetik, *dynamic light scattering*) bidez intereseko tamaina zutela konfirmatu zen, partikulek dispersatzen duten argian oinarrituta (1.A Irudia). Lipido konposizio desberdineko rHDL guztiak antzeko tamaina erakutsi zuten (9-10 nm). Egia da Soy-PC rHDLak tamaina txikiagoa erakutsi zutela DLSan, baina desberdintasun hori ez zen esangarria mikroskopia elektronikoko irudietatik egindako neurketetan, tamaina zehatza neurtzeko teknika sentikorragoa dena. Horrez gain, transmisiozko mikroskopia elektronikoaren (TME) bidez nanopartikulen morfologia diskoidala aztertu zen (1.B Irudia). Ikusi daitekeenez, konposizio guztietan egitura desberdinak agertzen dira. Forma borobila nanopartikulen aurrealdeko aurpegia da; eta txanponen ilarak diruditen egiturak nanodiskoaren alboko aurpegiari dagokie.

Bestalde, anisotropia fluoreszentea erabilita rHDL bakoitzaren trantsizio tenperatura aztertu zen (1.C Irudia). Horretarako, DPH molekula fluoreszentea erabili zen, rHDLen bigeruza lipidikoan tartekatzen dena. Tenperaturaren igoerarekin batera, rHDLen lipido geruzaren jariakortasuna emendatzen da eta, horrekin batera, DPHaren errotazio gradua. Hala, DPHaren errotazio mugimendua anisotropia balioarekiko alderantziz proportzionala izanik, tenperaturaren igoerarekin anisotropia jaitsiera kurbak lortzen dira. Jaitsiera horren inflexio puntua trantsizio tenperatura moduan ezagutzen da (T_m). T_m balioa nanopartikula konposizio bakoitzak duen zurruntasunari buruzko informazioa eskaintzen du: zenbat eta T_m balio txikiagoa, orduan eta estruktura zurrunagoa duela esan nahi du. Gure neurketetatik (1.C Irudia) DPPC rHDLen T_m -a $42,9 \pm 0,3$ °C dela ondorioztatu zen. DPPC:Chol:lysoPC eta DPPC:CE:lysoPC T_m -ak aldiz, $44,6 \pm 0,6$ eta $47,0 \pm 0,5$ °C zirela ondorioztatu, hurrenez hurren. Soy-PC rHDLen T_m -a ezin izan zen neurtu 0 °C-tik behera, jada likido-kristalino fasean aurkitzen delako. Neurtutako T_m balioak, jarraian aztertuko den kolesterol kanpora-fluxu desberdintasunak azaltzeko erabiliko dira.

1. **Irudia. rHDLen karakterizazio biofisikoa.** (A) rHDLen tamaina DLS bidez. (B) Transmisiozko mikroskopia elektronikoko irudi errepresentatiboak (C) rHDLen trantsizio temperaturaren neurketa anisotropia fluoreszentearen bidez.



3.2. rHDLen kolesterol kanpora-fluxuaren azterketa ateroma plakan parte hartzen duten zeluletan

rHDLen konposizio lipidikoak kolesterol kanpora-fluxuan duen eragina aztertu zen, THP-1 eta J774A.1 lerro zelularretan, giza eta sagu makrofagoetan hurrenez hurren. Horiez gain, aterosklerosia duten pazienteen ateroma plakatik eratorritako VSMCak erabili ziren (ingelesetik, *vascular smooth muscle cells*). Azken horiek, ateroma plakaren muskulu leuneko zelulak dira, zeinak zelula apartsu fenotipoa erakusten duten.

Hala, azterketa hura burutzeko, zelulak TopFluor-kolesterolarekin kargatu ziren lehendabizi eta gero, kolesterol fluoreszente horren kanpora-kanpora-fluxua aztertu zen, zelulak rHDL konposizio desberdinekin inkubatu ostean. Kontrol moduan giza-plasmatik purifikatutako HDL naturalak erabili ziren eta rHDLen kolesterol kanpora-fluxuaren balioak horrekiko konparatu ziren.

THP-1 makrofagoen kasuan (2.A Irudia), DPPC eta DPPC:Chol:LysoPC rHDLak HDL naturalek baino kolesterol kanpora-fluxu handiagoa azaldu zuten (% 51 eta % 34 gehiago, hurrenez hurren). Bestalde, DPPC:CE:LysoPC eta Soy-PC rHDLak, HDL naturalen antzeko efizientzia erakutsi zuten.

Antzeko emaitzak lortu ziren J774A.1 makrofagoetan (2.B Irudia), baina neurri txikiagoan. DPPC eta DPPC:Chol:LysoPC rHDLak HDL naturalek baino % 35 eta % 24 efizientzia handiagoa azaldu zuten, hurrenez hurren. Bestalde, kasu horretan ere, DPPC:CE:LysoPC eta Soy-PC rHDLak HDL naturalen antzeko efizientzia erakutsi zuten.

Horrez gain, J774A.1 makrofagoetatik zelula apartsuak lortu ziren, aurretik deskribatutako metodologian oinarrituz (Banka et al., 1991). Horretarako, zelulak azetilutako LDLekin inkubatu ziren, zitoplasman lipido tantak behatu arte. Hala, J774A.1 zelula apartsuetan ere (2.C Irudia), DPPC rHDLek kolesterol kanpora-fluxu handiagoa indusitzen zuten, HDLekin alderatuz. Gainera, zelula apartsuetan lortu zen kolesterol kanpora-fluxua handiagoa izan zen, J774A.1 zeluletan lortu zen kanpora-fluxuarekin konparatuz (% 57 eta % 35, hurrenez hurren). DPPC:Chol:LysoPC eta DPPC:CE:LysoPC nanodiskoek ere adierazi zuten

kolesterol kanpora-fluxu emendatua HDLein alderatuz (% 20 eta % 25, hurrenez hurren), Soy-PC rHDLek HDLen antzeko kolesterol kanpora-fluxua erakutsi zuten bitartean.

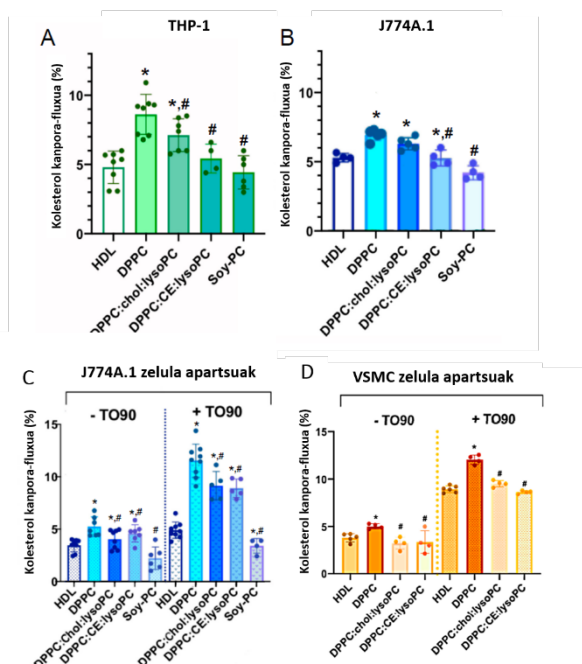
Ondoren, ABCA1 kolesterol garraiatzailearen gainadierazpenak kolesterol kanpora-fluxuan zuen eragina aztertu zen. Lehen esan bezala, ABCA1 kolesterol garraiatzaile bat da, kolesterol zeluletatik kanporatzen duena, HDLei pasaraziz. ABCA1 gainadierazpenarekin, lortutako kolesterol kanpora-fluxuen arteko desberdintasunak handiagoak izatea espero da. Horrez gain, kolesterol kanporaketa ABCA1 garraiatzailearen bidez gertatzen dela frogatzen da.

ABCA1-en gainadierazpena, J774A.1 zelula apartsuak TO90 erreaktiboarekin inkubatuz lortu zen eta rHDL desberdinek kolesterol kanpora-fluxuan zuten eragina aztertu zen. 2.C Irudian agertzen den moduan, ABCA1 garraiatzailearen gainadierazpenak modu esanguratsu batean emendatu zuen kolesterol kanpora-fluxua. Hala, DPPC rHDLek % 140 kanpora-fluxu gehiago erakutsi zuten HDL naturalekin alderatuz. DPPC:Chol:LysoPC eta DPPC:CE:LysoPC rHDLak aldiz, % 100-ko handipen bat erakutsi zuten HDLekiko. Bestalde, Soy-PC rHDLak indusitutako kolesterol kanpora-fluxua HDLen antzekoa izan zen.

Azkenik, azterketa bera VSMC zeluletan egin zen (2.D Irudia). Kasu horretan aldiz, DPPC-dun rHDLak kolesterol kanpora-fluxuaren igoera txikia (% 22) baina esanguratsua adierazi zuten, HDL naturalekin alderatuz. DPPC:Chol:LysoPC eta DPPC:CE:LysoPC rHDLak aldiz, HDLen antzeko kanpora-fluxua adierazi zuten.

VSMC zeluletan ere, ABCA1-en gainadierazpenak kolesterol kanpora-fluxuaren emendatzea eragin zuen baldintza guztietan. Horrez gain, eta orain arte behatu den bezala, DPPC-dun rHDLek kanpora-fluxu handiagoa eragin zuten HDL naturalekin konparatuta. Azkenik, bestelako rHDL konposizioek (DPPC:Chol:LysoPC eta DPPC:CE:LysoPC), HDLen antzeko kolesterol kanpora-fluxua indusitu zuten TO90 bidez estimulatutako VSMC zeluletan.

2. Irudia. rHDLek indusitutako kolesterol kanpora-fluxua THP-1 (A), J774A1 (B), J774A1 zelula apartsuetan (C) eta VSMC zeluletan (D). Datuek 3 esperimentu independenteen batz bestekoa adierazten dute. Esangura maila Student t testa bidez zehaztu zen. * HDLein alderatuz ($p < 0.01$). # DPPC rHDLekin alderatuz ($p < 0.01$).



4. Ondorioak

Aurkeztutako emaitzetan oinarrituz, DPPC lipidoz soilik eratutako rHDLak izan ziren kolesterol kanpora-fluxu handiena indusitu zutenak. Horren azalpena DPPCak osatutako bigerua lipidikoaren ezaugarrietan egon daiteke. Izan ere, anisotropia fluoreszentearen bidez, DPPC rHDLak izan ziren trantsizio tenperatura baxuena erakutsi zutenak, DPPC:Chol:LysoPC eta DPPC:CE:LysoPC rHDLekin alderatuz. Horrekin, DPPC nanopartikulak malguenak direla esan daiteke eta beraz, zeluletatik eratorritako kolesterola barneratzeko gaitasun handiagoa erakustea azaldu dezake. Hau da, HDL sortu-berrien antzekoak diren nanopartikulak (fosfolipidoz soilik eratuta daudenak) dira efizienteenak.

Bestalde, Soy-PC rHDLei dagokionez, kolesterol kanpora-fluxua murriztua adierazi zuten nahiz eta sojaren PC-en Tm-a baxuagoa izan. Horren azalpena aldiz, lipidoen saturazio mailan egon daiteke izan ere, Soy-PC lipidoaren % 80a gantz azido insaturatuen nahastura bat da, DPPCa lipido guztiz saturatua den bitartean. Eta aurretik deskribatu den bezala (Ma et al., 2012; Marmillot et al., 2007), lipido saturatuez eratutako rHDLek kolesterol kanpora-fluxu handiagoa indusitzea erakutsi dute.

Hitz gutxitan, rHDLen lipidoen ezaugarri fisikoak aintzat hartu beharko lirateke kolesterol kanpora-fluxua indusitzeko rHDLen diseinua egiteko unean.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Azterketa honetan, rHDLen ezaugarri biofisikoak zeluletako kolesterol kanpora-fluxuan duten eraginari buruzko informazioa eskuratu zen. Informazio hori erabilita, diseinatutako rHDLak lesio ateriosklerotikoetan agertzen den kolesterol extra-zelularra deuseztatze erabili nahi dira. Horrela, hurrengo pausua, DPPC-dun rHDLak pazienteen ateroma plaken mozketetan probatu nahi dira (animali ereduera pasa baino lehen).

6. Erreferentziak

- Alique, M., Luna, C., Carracedo, J., & Ramírez, R. (2015). LDL biochemical modifications: A link between atherosclerosis and aging. *Food & Nutrition Research*, 59(1), 29240.
- Banka, C. L., Black, A. S., Dyer, C. A., & Curtiss, L. K. (1991). THP-1 cells form foam cells in response to coculture with lipoproteins but not platelets. *Journal of Lipid Research*, 32(1), 35-43.
- Cukier, A. M. O., Therond, P., Didichenko, S. A., Guillas, I., Chapman, M. J., Wright, S. D., & Kontush, A. (2017). Structure-function relationships in reconstituted HDL: Focus on antioxidative activity and cholesterol efflux capacity. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(9), 890-900.
- Heusch, G., Libby, P., Gersh, B., Yellon, D., Böhm, M., Lopaschuk, G., & Opie, L. (2014). Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet (London, England)*, 383(9932), 1933-1943.
- Hevonoja, T., Pentikäinen, M. O., Hyvönen, M. T., Kovanen, P. T., & Ala-Korpela, M. (2000). Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1488(3), 189-210.
- Kosmas, C. E., Martinez, I., Sourlas, A., Bouza, K. V., Campos, F. N., Torres, V., Montan, P. D., & Guzman, E. (2018). High-density lipoprotein (HDL) functionality and its relevance to atherosclerotic cardiovascular disease. *Drugs in Context*, 7, 1-9.
- Linton, M. F., Yancey, P. G., Davies, S. S., Jerome, W. G., Linton, E. F., Song, W. L., Doran, A. C., & Vickers, K. C. (2000). The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. En K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J. M. Hershman, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M.

- Korbonits, R. McLachlan, J. E. Morley, M. New, L. Perreault, J. Purnell, R. Rebar, F. Singer, D. L. Trencce, *et al.* D. P. Wilson (Eds.), *Endotext*. MDText.com, Inc.
- Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, 407(6801), 233-241.
- Ma, C.-I. J., Beckstead, J. A., Thompson, A., Hafiane, A., Wang, R. H. L., Ryan, R. O., & Kiss, R. S. (2012). Tweaking the cholesterol efflux capacity of reconstituted HDL. *Biochemistry and Cell Biology*, 90(5), 636-645.
- Marmillot, P., Patel, S., & Lakshman, M. R. (2007). Reverse cholesterol transport is regulated by varying fatty acyl chain saturation and sphingomyelin content in reconstituted high-density lipoproteins. *Metabolism*, 56(2), 251-259.
- Matz, C. E., & Jonas, A. (1982). Micellar complexes of human apolipoprotein A-I with phosphatidylcholines and cholesterol prepared from cholate-lipid dispersions. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(8), 4535-4540.
- Nicholls, S. J., Puri, R., Ballantyne, C. M., Jukema, J. W., Kastelein, J. J. P., Koenig, W., Wright, R. S., Kallend, D., Wijngaard, P., Borgman, M., Wolski, K., & Nissen, S. E. (2018). Effect of Infusion of High-Density Lipoprotein Mimetic Containing Recombinant Apolipoprotein A-I Milano on Coronary Disease in Patients With an Acute Coronary Syndrome in the MILANO-PILOT Trial: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiology*, 3(9), 806.
- Rosenson, R. S., Brewer, H. B., Davidson, W. S., Fayad, Z. A., Fuster, V., Goldstein, J., Hellerstein, M., Jiang, X.-C., Phillips, M. C., Rader, D. J., Remaley, A. T., Rothblat, G. H., Tall, A. R., & Yvan-Charvet, L. (2012). Cholesterol efflux and atheroprotection: Advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation*, 125(15), 1905-1919.
- Tang, J., Baxter, S., Menon, A., Alaarg, A., Sanchez-Gaytan, B. L., Fay, F., Zhao, Y., Ouimet, M., Braza, M. S., Longo, V. A., Abdel-Atti, D., Duivenvoorden, R., Calcagno, C., Storm, G., Tsimikas, S., Moore, K. J., Swirski, F. K., Nahrendorf, M., Fisher, E. A., Mulder, W. J. M. (2016). Immune cell screening of a nanoparticle library improves atherosclerosis therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(44), E6731-E6740.
- von Eckardstein, A., Nofer, J. R., & Assmann, G. (2001). High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21(1), 13-27.

7. Eskerrak eta oharrak

Esker onak SGIker zerbitzuari (EHUko Biomedikuntza Zerbitzuko Mikroskopia Analitikoa eta Erresoluzio Handiko Mikroskopia) eta Rocío Alonsori emandako laguntza tekniko bikainagatik.

Lan hau Eusko Jaurlaritzak finantziatu du (Grupos Consolidados IT-1264-19). Taldearen finantziazioa: U.G.-G. eta A.L.-S. Fundación Biofisica Bizkaia, A.B.-V. UPV/EHUko ikertzaile doktoreen espezializaziorako Programa (2019), S.J.-B. eta A.L.-S. Eusko Jaurlaritzako PIF (2017–2018) eta PIF (2019–2020), hurrenez hurren.