



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

V. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2023ko maiatzaren 17, 18 eta 19a
Donostia, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 3.0

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Dislipidemiaren aurkako
tratamendu berriak nanopartikulak
erabiliz**

*Ane San José Urteaga,
Asier Larrea Sebal,
Shifa Jebari Benslaiman,
Asier Benito Vicente,
Kepa B. Uribe, Unai Galicia Garcia
eta Cesar Martín Plagaro*

377-384 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.v.05.48>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



Dislipidemiaren aurkako tratamendu berriak nanopartikulak erabiliz

Ane San José¹, Asier Larrea^{1,2}, Shifa Jebari¹, Asier Benito¹, Kepa Uribe¹, Unai Galicia¹,
Cesar Martín¹

1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, UPV/EHU, 48940 Leioa, Bizkaia
2 I Biofisika Institute (UPV/EHU, CSIC), Barrio Sarriena s/n., 48940 Leioa, Bizkaia

asurteaga@gmail.com

Laburpena

Hiperkolesterolemia dislipidemia ohikoena da, eta odoleko LDL-C (ingelesetik, *low-density lipoprotein cholesterol*) maila altua izateagatik bereizgarria da. LDL-C maila altuak zuzenean lotu izan dira gaixotasun kardiobaskularrak garatzeko arriskuarekin; horregatik, garrantzitsua da gaixotasun horri aurre egiteko terapia berriak garatzea. Ikerketa honen helburua izan da ApoE (ingelesetik, *Apolipoprotein E*) proteinan oinarritutako nanopartikulak garatzea azido bempedoikoaren, estatinen eta siRNA (ingelesetik, *small interfering RNA*)-ren bidezko tratamenduen eraginkortasuna hobetzeko. Izan ere, LDL barneraketa eta LDLr (ingelesetik, *low-density lipoprotein receptor*) adierazpena kuantifikatu dira tratamenduak probatu ostean, eta emaitza esangarriak lortu dira.

Hitz gakoak: ApoE proteina; nanopartikulak; hiperkolesterolemia; siRNA; estatinak; azido bempedoikoa

Abstract

Hypercholesterolemia is the most frequent dyslipidemia and is characterized by its high level of Low-density Lipoprotein cholesterol (LDL-C) in blood. High LDL-C levels are directly related to the risk of developing cardiovascular diseases, so it is important to develop new therapies to treat this disease. The objective of this study was to develop ApoE protein based nanoparticles to improve the efficacy of treatments with bempedoic acid, statins and small interfering RNA (siRNA). In fact, the uptake of LDL and low-density lipoprotein receptor (LDLr) expression have been quantified after treatment testing and significant results have been obtained.

Keywords: ApoE protein; nanoparticles; hypercholesterolemia; siRNA; statins; bempedoic acid

1. Sarrera eta motibazioa

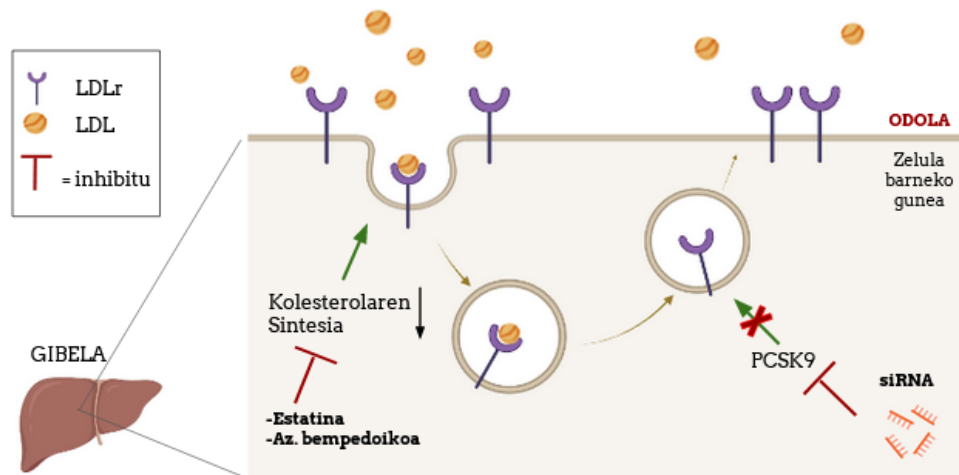
OME (Osasunaren Mundu Erakundea)-ren arabera gaixotasun kardiobaskularrak heriotza-arrazoi nagusia dira mundu mailan, eta gaixotasun kardiobaskularren garapenarekin lotutako arrisku-faktoreetako bat dislipidemiak (odoleko lipido kopuruaren asaldaketak) dira. Izan ere, kolesterol plasmatico totalaren eta LDLengatik garraiatutako kolesterolaren (LDL-C) mailaren igoerak giza populazio helduaren % 15ari inguru eragiten dio. Horregatik, arazo soziosanitario garrantzitsua da hiperkolesterolemia (Mattingly, 2023; Lorenzo, 2017).

Aipatutako LDL (ingelesetik, *Low Density Lipoprotein*)-ari jendeak arrunki “kolesterol txar” esaten dio. Eta berez, izen hori ez da batere okerra, LDL-C mailaren igoera zuzenean lotuta baitago

aterosklerosiaren agerpenarekin eta gaixotasun horri lotutako beste arazo kardiobaskularrekin (hipertentsioa eta bihotzekoak, besteak beste). Bestalde, hiperkolesterolemiaren eragileak genetikoak zein ingurugiroak eragindakoak (dieta, bizimodua, beste gaixotasun batzuk...) izan daitezke (Frayn, 2010). Arrazoi genetikoei dagokienez, LDLr (ingelesetik, *LDL receptor*) hartzailean gertatzen diren mutazioak dira nagusi, gaixotasuna eragiten duten mutazioen % 80-85 baitira. LDLr-ak, hain zuzen ere, LDLa zelulan barneratzeaz arduratzen dira, zelulak geroago ezabatu ahal izateko (1. irudia). Hortaz, mekanismo hori asaldatuta egonez gero, egoera patologikoak sor daitezke. Bestalde, beste mutazio batzuk ApoB (mutazioen % 5-10) eta PCSK9 (ingelesetik, *proprotein convertase subtilisin/kexyn type 9*) (mutazioen % 2) geneetan gertatzen dira (Galicía-García et al., 2020a).

Gaur egun, hiperkolesterolemia tratatzeko medikamenturik erabiliena estatinak dira, hau da, kolesterolaren sintesia inhibitzen dutenak HMG-CoA erreduktasa izeneko entzimaren mailan. Hala ere, farmako horien efektua ez da kolesterolaren sintesia murriztera mugatzen. Horrez gain, zelularen kolesterol maila jaisteak LDLr-en ekoizpena igotzea eragiten du, eta LDLr-en gainadierazpen horrek, bereziki gibelean, odoleko LDLak zelulan barneratzea. Ondorioz, odoleko kolesterol maila netoa murrizten da (1. irudia).

1. irudia: LDLr-en gainadierazpena eta LDL barneraketa estatina/azido bempedoiko/siRNA tratamenduen ondorioz. Estatinak eta azido bempedoikoak kolesterolaren sintesiaren inhibizioaren bidez LDLr-en gainadierazpena eragiten dute. siRNAk, ordea, PCSK9ren ekoizpena inhibitzeari esker, LDLr-ak ez degradatzea eta, ondorioz, horiek birziklatzea ahalbidetzen du.



Dena dela, estatinek zenbait albo-ondorio dituzte, hala nola gastrointestinalak, neurologikoak, larruazaleko gorritasuna, miopatiak (oinaze, ahultasun eta neke muskularra)... (Lorenzo, 2017). Gainera, ikusi da estatina dosi altuek bigarren motako diabetesa eragin dezaketela luzarora (Galicía-García et al., 2020b). Horregatik, ikerketa honetan, besteak beste, estatinen tratamenduen eraginkortasuna hobetzeko asmoarekin nanopartikulak eratu dira.

Era berean, estatinen ordez erabili daitezkeen beste tratamendu bat proposatzen da lan honetan; jada fase klinikoan dagoen *Inclisiran* izeneko farmakoaren antzeko mekanismoa jarraitzen duena, eta PCSK9 proteinaren ekoizpenari eragiten diona (Banerjee et al., 2022). Alde batetik, PCSK9 proteinak LDLr-ak degradatzea du helburu, horren ondorioz, kontzentrazioa murrizten da eta, beraz, LDL maila handitzen da. Bestetik, *Inclisirana* siRNA (ingeleseaz, *small interfering RNA*) bat da, PCSK9ren RNA mezulariari lotzen zaiona eta degradatzen duena; beraz, PCSK9 proteina ez da ekoizten (1. irudia). siRNAak oso desegonkorak dira, eta laguntza izan ezean euren itura iristeko, degradatu egiten dira. *Inclisiranek* arazo horri aurre egiteko, azido nukleiko bereziak eta ituratzeko balio duten molekula batzuk erabiltzen ditu. Modu horretan, PCSK9 mailak murriztea lortzen du era oso egonkor, baina

garestian. Hori horrela, siRNA gure nanopartikulei batzea proposatzen dugu, siRNA degradatu ez dadin eta zeluletan barneratzeko.

‘Nanopartikula’ izenak dioten bezala, nanometrotako tamaina duten egiturak dira, eta ikerketa honen kasuan, dipalmitoilfosfatidilkolina (DPPC) lipidoaz eta ApoE proteinaz egon dira osatuta. Lipidoa erabili da tratamenduak (estatina, azido bempedoikoa edo siRNA) atxikita eramateko balio duen bitartekari bezala; proteina, aldiz, lipido besikulak egituratzeko, eta farmakoak gure intereseko organora ituratzeko. Izan ere, ApoEk gerriko baten modukoa eraten du lipidoen inguruan eta, ondorioz, disko edo esfera itxurako egiturak sortzen dira (Jebari-Benslaiman et al., 2022; Pitas et al., 1980). Bestalde, ApoE espezifikoki lotzen da lehen aipatutako LDLr-ekin, ondorioz, LDLr-ak oso ugariak direnez giblean (Mahley et al., 2009), nagusiki gure nanopartikulak gibelera bideratzea da asmoa. Behin ituratuta, aipatutako tratamenduek LDL hartzaileen adierazpena eta LDLen barneratzea eragitea espero da.

2. Arloko egoera eta helburuak

Nanopartikulak urteetan zehar erabili izan dira biomedikuntzan tratamenduak hobetzeko asmoarekin. Izan ere, zenbait ikerketatan jada estatinak kapsulatu izan dira nanopartikuletan (Duivenvoorden et al., 2014). Bestalde, aterosklerosia tratatzeko, HDLak (ingelesetik, *High Density Lipoprotein*) imitatzen dituzten nanopartikulen eraketak ikerketa urte luzeak ditu atzetik (Jebari-Benslaiman et al., 2022; Ou et al., 2021). Hortaz, ez da harritzekoa hiperkolesterolemia tratatzeko nanopartikulen bidezko terapia berriak garatu nahi izatea.

2020an farmako berri bat onetsi zuen FDAk (US Food and Drug Administration) hiperkolesterolemia tratatzeko, azido bempedoikoa. Medikamentu horrek LDL-C balioak murrizten ditu kolesterolaren sintesian parte hartzen duen entzima bat inhibituz, estatinak bezala. Haatik, azido bempedoikoak ATP zitrato liasa entzimaren mailan inhibitzen du kolesterolaren sintesia. Gainera, farmako horrek zenbait albo-ondorio (muskulu-espasmoak, gehiegizko azido urikoa odolean, min abdominala...) dituen arren, estatinen albo-ondorio ohikoenetako bat ekiditen du, mialgia. Gainera, estatinen eta azido bempedoikoaren terapia konbinatuak emaitza esangarriak lortu ditu (Markham et al., 2020; Marrs et al., 2020). Horregatik, ikerketa honetan helburuak hurrengoak izan dira:

- Estatinak, azido bempedoikoa eta siRNA bezalako terapiak gibelera ituratzeko ApoEn oinarritutako nanopartikulen bidez, albo-ondorio extrahepatikoak ekiditeko asmoz.
- Azido bempedoikoaren eta estatinen arteko terapia konbinatua garatzea, estatinen dosia murrizteko helburuarekin. Horrela, epe luzera bigarren motako diabetesaren garapena bezalako albo-ondorioak murriztu ahal izateko.
- Bai estatinen, bai azido bempedoikoaren eraginkortasuna handitzea nanopartikula ituratu bidez. Ondorio modura LDLr-en gainadierazpena eta LDLen barneraketa esangarria lortu nahi delarik.
- Nanopartikuletan kapsulatutako azido bempedoiko bidezko tratamendu eraginkorra garatzea, estatinekiko intolerantzia garatzen duten gaixoei alternatiba berri bat eskaintzeko.

3. Ikerketaren muina

3.1. Nanopartikulen eraketa eta karakterizazioa

Prozesuaren amaieran lortzen ziren nanopartikula guztiak oinarrian ApoE3 proteinaz eta DPPC lipidoz osatuta zeuden. Hala ere, euren artean desberdinak ziren bost nanopartikula mota prestatu ziren (1. taula): nanopartikula hutsa (estatarik, azido bempedoikorik eta siRNarik gabekoa), estatina

zeramana (Estatina), azido bempedoikoa zeramana (A. B.), estatina eta azido bempedoikoa zeramatzana (Konbinazioa) eta siRNAk zeuzkana (siRNANano). Horretarako, lehenengo, lagin guztien lipido geruza eratzeko, lipidoa N_2 rekin lehortu zen; estatina zeramaten laginen kasuan, ordea, lipido eta estatina nahastea izan zen lehortutakoa. Ondoren, bi orduz hutsean sartu ziren, eta hutsetik atera ostean, A. B. eta Konbinazioa laginei azido bempedoikoa gehitu zitzairen. Horren ostean, berriro ere N_2 rekin lehortu, eta hutsean sartu ziren. Hurrengo pausuan, beste protokolo baten arabera purifikatutako ApoE3a (Argyri et al., 2011) gehitu zitzairen lagin guztiei 1:2,5 (lipido: ApoE3) ratioan. Prozesuaren puntu honetan, nanopartikulek hainbat lipido geruza dituzten besikula erraldoien itxura izan ohi dutenez, laginak sonikatu ziren, lipido geruza bakarreko nanopartikulak lortzeko helburuarekin. Azkenik, hondarrak kentzeko, $0,2\mu\text{m}$ -ko filtroarekin filtratu ziren.

siRNA zuten nanopartikulen kasuan, nanopartikula hutsak 90 minutuz 37°C -tan inkubatu ziren siRNArekin, molekula hau nanopartikulen mintzean itsasten delako.

1. taula: Nanopartikula mota desberdinen konposizioa.

	DPPC	ApoE3	Estatina	Azido Bempedoikoa	siRNA
Hutsa	✓	✓	✗	✗	✗
Estatina	✓	✓	✓	✗	✗
A.B.	✓	✓	✗	✓	✗
Konbinazioa	✓	✓	✓	✓	✗
siRNANano	✓	✓	✗	✗	✓

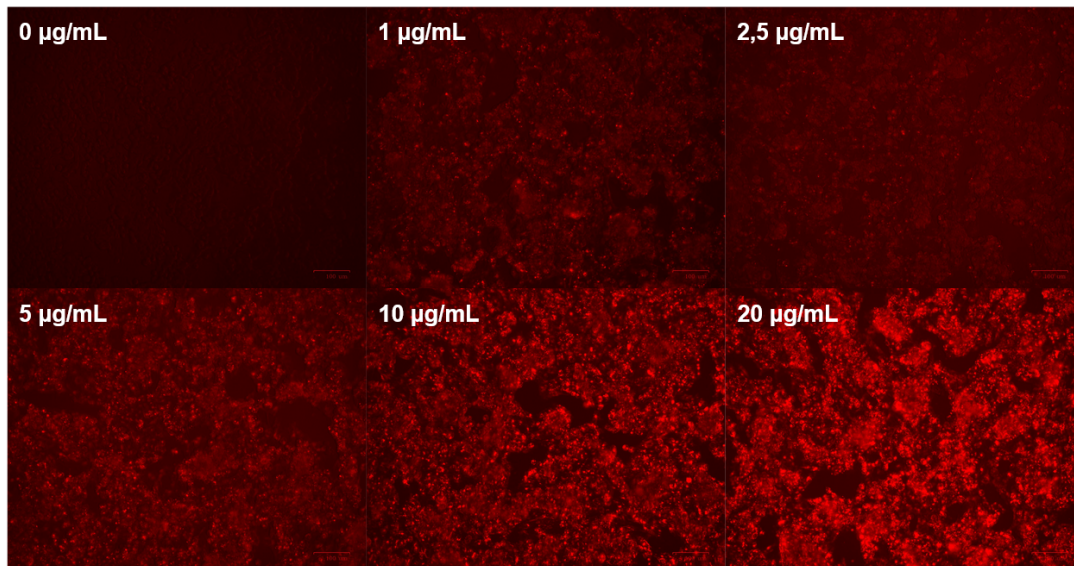
Behin nanopartikulak eratu zirela, espero zen tamaina eta itxura zutela egiaztatzeko, DLS (ingelesetik, *Dynamic Light Scattering*) eta dikroismo zirkular teknika espektroskopikoak erabili ziren, hots, argiaren eta materiaren elkarrekintzan oinarritzen diren teknikak. Alde batetik, DLSaren emaitzen arabera, 30nm inguruko nanopartikulak lortu ziren, esperotako tamainaren barruan zeudenak (Jebari-Benslaiman et al., 2022). Bestetik, dikroismo zirkulararen bidez, ApoE3 proteina nanopartikularen egitura integratu den aztertu zen. Horretarako, alfa helizidatea neurtu zen, hain zuzen ere, alfa helize deritzo proteinaren aminoazido-kate batzuek espazioan hartzen duten konfigurazioari. Beste ikerketa batzuetan azaldutakoaren arabera (Pitas et al., 1980; Jebari-Benslaiman et al., 2022), ApoE proteina nanopartikularen mihiztaketa parte denean, alfa helizidatea igotzen da. Izan ere, hori izan zen gure emaitzetan lortutakoa.

3.2. Nanopartikulen barneraketa

Nanopartikula mota bakoitzak zelulengan zuen eragina neurtu baino lehen, nanopartikulek zelula barrura sartzea lortzen ote zuten aztertu zen. Horretarako, nanopartikulak DiI deritzon markatzaile fluoreszentearen bidez markatu ziren, eta kontzentrazio desberdinetan inkubatu ziren zelulekin. Horretarako, HuH7 (ingelesetik, *Human Hepatoma 7*) zelula-lerroa erabili zen, giza gibel batetik eratortzen direlako, eta LDLr ugari adierazten dituelako, nanopartikulen sarrera ahalbidetzen duena. Zelulen hazkundera optimoa izan zenean, zelulak nanopartikulekin inkubatu ziren 48 orduz, eta fluoreszentziako mikroskopioaren bidez nanopartikulak barneratzen zirela antzeman zen (2. irudia).

Emaitzetan ikusi zen fluoreszentzia handitzen dela, nanopartikulen kontzentrazioa zenbat eta altuagoa izan. Aitzitik, 20 µg/mL-tik aurrera fluoreszentzia igoera ez zen hain nabarmena izan (2. irudia). Hortaz, saioetan nanopartikulen 10 µg/mL-ko kontzentrazioa erabili zen.

2. irudia: DiIrekin markatutako nanopartikulen barneraketa kontzentrazio desberdinetan (0-20 µg/mL), fluoreszentziako mikroskopiaren bidez ikusita. Eskala: 100µm. Zenbat eta nanopartikula kontzentrazio handiagoa, orduan eta fluoreszentzia biziagoa lortu zen.



3.3. Zitometria saioak

Zitometria zelulak banan-banan analizatzea ahalbidetzen duen teknika da; izan ere, dispersatutako argian edo igorritako fluoreszentzian oinarrituta zelulen ezaugarri fisiko-kimikoak ezagut daitezke. Ikerketa honen kasuan, zitometria zelulen LDL barneraketa eta LDL hartzaileen adierazpena neurtzeko erabili zen.

Alde batetik, LDL barneraketa neurtzeko, LDL molekulak DiI markatzaile fluoreszentearekin markatu ziren. Metodo horren arabera, zenbat eta LDL gehiago barneratu, orduan eta fluoreszentzia gehiago kuantifikatu zen. Bestetik, LDL hartzaileen adierazpena neurtzeko, zelulek ekoiztutako LDL hartzaileei espezifiko lotzen zaien antigorputz primarioak erabili ziren, eta ostean, antigorputz primario horiei lotzen zaizkien antigorputz sekundarioak, alegia, fluoreszentzia igortzen dutenak.

Beraz, bai LDL barneraketa saioan, bai LDL hartzaileen adierazpen saioan, zelulak 48 orduz inkubatu ziren nanopartikula mota guztiekin, siRNA zuten nanopartikulekin izan ezik. Azken kasu horretan, zelulak 24 orduz baino ez ziren mantendu nanopartikulekin, PCSK9ren adierazpena murrizteko; hala ere, zelulak jada nanopartikularik gabe, hurrengo 24 orduak hazkuntza medioan mantendu ziren, guztira 48 ordu izateko. Bestalde, hainbat kontrol gehitu ziren, nanopartikulen eragina zein zen ikusteko. Kontrol hauetan zelulak estatina, bempedoiko, bi konposatuekin batera eta nanopartikularik gabeko siRNArekin inkubatu ziren, nanopartikulak eratzeko jarritako kontzentrazio berdinetan.

LDL barneraketa saioan, LDL-DiIak gehitu ziren nanopartikulen inkubazioa amaitu ondoren, eta 24 orduz mantendu ziren kultibotan. Hori dela eta, inkubazioen ostean, zelulak birritan garbitu ziren, neurketa oztopa zezaketen hondarrak kentzeko. Azkenik, zelulen fluoreszentzia intentsitateak zitometria bidez neurtu ziren.

LDLr adierazpen saioan, aldiz, behin nanopartikulen inkubazioa amaituta, zelulak fixatu ziren, momentu horretan mintzean zeuden hartzaileak bertan mantentzeko. Ondoren, hartzailearen kontrako antigorputzak erabili ziren, fluoreszentzia zutenak, eta hori erabili zen zitometria bidez LDL hartzaile maila neurtzeko.

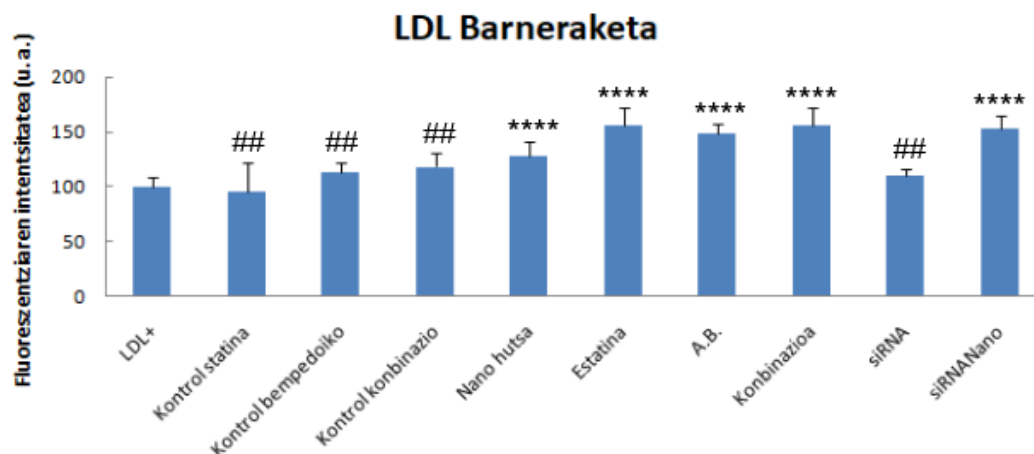
Aipatu beharra dago saio bakoitzaren hiru erreplika egin direla, eta saio bakoitzeko kondizio bakoitzaren 4 erreplika egon direla. Gainera, emaitzen analisi estatistikoa egiteko bi buztaneko Studenten t banaketa erabili da. p balioa $< 0,05$ zenekotan esangarritzat hartu da.

Emaitzei dagokienez (3. eta 4. irudiak), aztertutako tratamendu ezberdinen eraginkortasuna handitzen da nanopartikulen erabilerarekin. *Statin*, *Bempe*, *Mix* eta *siRNANano* laginen kasuan, antzeko LDL barneraketa lortu zen, hain zuzen ere, gainerako kondizio guztietan lortutakoa baino handiagoa.

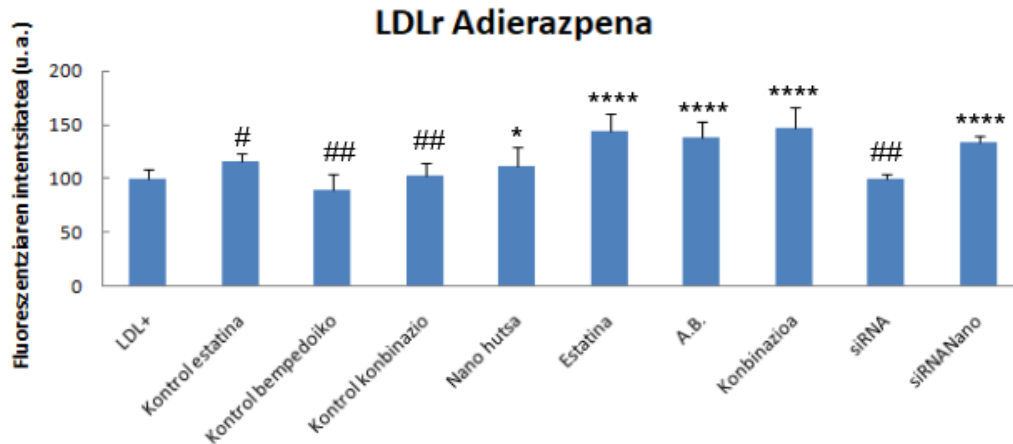
LDL hartzaileen adierazpena ere modu esangarrian handitzen da nanopartikulak erabiltzen direnean. Izan ere, nanopartikulen erabilerarekin lortutako LDLr adierazpena kontrolarekin lortutakoa baino nabariagoa zen kasu guztietan. Hala ere, *Estatinaren* eta *Kontrol estatinaren* arteko desberdintasuna ez da gainerako kasuetan lortutakoa bezain esangarria.

Dena dela, LDL barneraketaren zein LDLr adierazpenaren emaitzetan, nanopartikula mota ezberdinen arteko desberdintasuna ez da esanguratsua. Hortaz, estatinen eta azido bempedoikoaren eragin sinergikoa ezin da ukatu, ezta onartu ere. Estatinarekin eta Konbinazioarekin tratatuko zelulek emaitza oso antzekoak izan dituztelako (3. eta 4. irudiak).

3. irudia: DiRekin markatutako LDL molekulen barneraketaren kuantifikazioa zitometria bidez, zelulak nanopartikula mota desberdinekin inkubatu ostean. Nanopartikulen erabilerak LDL barneraketa handitzen du. Errore-barra bakoitzak batezbestekoa \pm desbiderapen estandarra (DE) adierazten du. $****p < 0,0001$ tratamendurik gabeko kontrolarekiko (LDL+) konparatuta; $###p < 0,0001$ nanopartikuladun tratamendu bakoitza haren kontrolarekiko. u. a.: unitate arbitrarioa.



4. irudia: Nanopartikulen erabilerak eragindako LDL hartzaileen adierazpenaren kuantifikazioa zitometria bidez neurtuta, zelulak nanopartikula mota desberdinekin inkubatu ostean. Nanopartikulen erabilerak LDL hartzaileen gainadierazpena eragiten du. Errore-barra bakoitzak batezbestekoa \pm DE adierazten du. $*p < 0,05$ eta $****p < 0,0001$ tratamendurik gabeko kontrolarekiko (LDL+) konparatuta; $#p < 0,001$ eta $###p < 0,0001$ nanopartikuladun tratamendu bakoitza haren kontrolarekiko. u. a.: unitate arbitrarioa.



4. Ondorioak

Nanopartikula bidezko tratamendu desberdinak probatu ostean, hurrengo ondorioztatu da:

- Nanopartikulen erabilerak estatinak eta azido bempedoikoa bezalako farmakoen eraginkortasuna handitzen du. Nolanahi ere, bi tratamendu horien arteko eragin sinergikoa ezin izan da ondorioztatu. Horretarako, bestelako saio gehigarriak egin beharko lirateke.
- Ezin daiteke esan nanopartikulen bidezko siRNA, estatina, azido bempedoiko edo konbinazio tratamenduetatik zein izan daitekeen esperantzagarriagoa, euren artean ez baitago alde esangarririk.
- siRNAk aitxikita daramaten nanopartikulek LDL barneraketa eta LDLr adierazpen balio esangarriak eragiten dituztenez, suposa daiteke nanopartikulak lortzen duela siRNA zelulara ituratzea degradatu gabe.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Egindako saioetan emaitza esangarriak lortu diren arren, ApoEn oinarritutako nanopartikula bidezko terapia berriak garatzeko lehen urratsak baino ez dira. Etorkizunean euren eragina aztertu beharko da giza ehunak imitatzen dituzten kultibotan eta animalietan, saio klinikoetan gizakiekin probatu baino lehen. Bestalde, farmakoen dosiak findu beharko dira, estatinen eta azido bempedoikoaren arteko sinergia nanopartikuletan ebaluatu eta nanopartikularen sistemak albo-ondoriorik eragiten duen aztertu. Hala ere, hiperkolesterolemia duten pazienteen pronostikoa hobetzera hel daitekeen terapia garatzea da etorkizuneko helburua.

6. Erreferentziak

Argyri, L., Skamnaki, V., Stratikos, E., & Chroni, A. (2011). A simple approach for human recombinant apolipoprotein E4 expression and purification. *Protein expression and purification*, 79(2), 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.06.011>

Banerjee Y, Pantea Stoian A, Cicero AFG, Fogacci F, Nikolic D, Sachinidis A, Rizvi AA, Janez A, Rizzo M. (2022). Inclisiran: a small interfering RNA strategy targeting PCSK9 to treat hypercholesterolemia. *Expert Opin Drug Saf.*, 21(1), 9-20. doi: 10.1080/14740338.2022.1988568

- Duivenvoorden, R., Tang, J., Cormode, D. P., Mieszawska, A. J., Izquierdo-Garcia, D., Ozcan, C., Otten, M. J., Zaidi, N., Lobatto, M. E., van Rijs, S. M., Priem, B., Kuan, E. L., Martel, C., Hewing, B., Sager, H., Nahrendorf, M., Randolph, G. J., Stroes, E. S., Fuster, V., Fisher, E. A., ... Mulder, W. J. (2014). A statin-loaded reconstituted high-density lipoprotein nanoparticle inhibits atherosclerotic plaque inflammation. *Nature communications*, 5, 3065. <https://doi.org/10.1038/ncomms4065>
- Frayn, K. N., & Frayn, K. N. (2010). *Metabolic regulation : a human perspective* (3rd ed.). Wiley-Blackwell, Chichester.
- Galicía-García, U., Amuategi, J., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Uribe, K.B., Ostolaza, H., Martín, C., Benito-Vicente, A. (2020a). *Hiperkolesterolemia Familiarra: patofisiologia, diagnostikoa eta tratamendua*, 4(1), 69. <http://doi.org/10.26876/osagaiz.1.2020.299>
- Galicía-García, U., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Uribe, K. B., Siddiqi, H., Ostolaza, H., Benito-Vicente, A., & Martín, C. (2020b). Statin Treatment-Induced Development of Type 2 Diabetes: From Clinical Evidence to Mechanistic Insights. *International journal of molecular sciences*, 21(13), 4725. <https://doi.org/10.3390/ijms21134725>
- Jebari-Benslaïman, S., Uribe, K. B., Benito-Vicente, A., Galicía-García, U., Larrea-Sebal, A., Santin, I., Alloza, I., Vandebroek, K., Ostolaza, H., & Martín, C. (2022). Boosting Cholesterol Efflux from Foam Cells by Sequential Administration of rHDL to Deliver MicroRNA and to Remove Cholesterol in a Triple-Cell 2D Atherosclerosis Model. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 18(13), e2105915. <https://doi.org/10.1002/sml.202105915>
- Lorenzo Velázquez, B. (2017): *Velázquez Farmacología Básica y Clínica, 19a Ed*, Editorial Médica Panamericana, Ciudad de México, México.
- Mahley, R. W., Weisgraber, K. H., & Huang, Y. (2009). Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *Journal of lipid research*, 50 Suppl(Suppl), S183–S188. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800069-JLR200>
- Markham A. (2020). Bempedoic Acid: First Approval. *Drugs*, 80(7), 747–753. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01308->
- Marrs, J. C., & Anderson, S. L. (2020). Bempedoic acid for the treatment of dyslipidemia. *Drugs in context*, 9, 2020-6-5. <https://doi.org/10.7573/dic.2020-6-5>
- Mattingly, Q. (2023). *Health topics, Cardiovascular diseases*. WHO, World Health Organization. Berreskuratua 2023ko otsailaren 20a, https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1-etik
- Ou, Lc., Zhong, S., Ou, Js. *et al.* (2021). Application of targeted therapy strategies with nanomedicine delivery for atherosclerosis. *Acta Pharmacol Sin* 42, 10–17 <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0436-0>
- Pitas, R. E., Innerarity, T. L., & Mahley, R. W. (1980). Cell surface receptor binding of phospholipid . protein complexes containing different ratios of receptor-active and -inactive E apoprotein. *The Journal of biological chemistry*, 255(11), 5454–5460.

7. Eskerrak

Eskerrak Cesar Martinen laborategiko kide guztiei ikerketa honen bidean gidatzeagatik, bereziki Asier Larrea-Sebali.