



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Efecto de la vacuna intranasal HB-ATV-8 en
la aterogénesis y en la enfermedad del
hígado graso no alcohólico en un modelo de
aterosclerosis en conejo**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

SANDRA DANIELA CALIXTO TLACOMULCO



**DIRECTOR DE TESIS
Dr. JAIME MAS OLIVA
Instituto de Fisiología Celular**

**Asesor interno
Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón**

CIUDAD DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios superiores Zaragoza.

Al Dr. Jaime Mas Oliva, por ser parte fundamental en mi formación, por su confianza y sobre todo quiero expresarle mi agradecimiento más profundo por darme la oportunidad de hacer lo que me ha hecho más feliz.

A la Dra. Roxana Gutiérrez Vidal, por compartir conmigo su conocimiento y guiarme durante este proyecto.

Al Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón, por todo el apoyo y la confianza que me ha brindado.

Al M.V.Z Héctor Alfonso Malagón Rivero por su invaluable orientación y apoyo para este trabajo.

Por último, deseo expresar mi gratitud a la M. en C. Blanca Delgado, a la Dra. Virginia Tapia, a la M. en C Eréndira Pérez y al M. en C Ismael Luna.

Dedicatoria

A mis padres y a mi hermana, con todo mi amor y cariño.

A mi papá por desvelarse conmigo, por enseñarme a ser feliz, que nunca es tarde, y por ser el mejor amigo del mundo.

A mi mamá, que es la persona más extraordinaria que conozco, por ser quien más me ha apoyado y ha creído en mí.

A Fer, que sin duda es el mejor regalo, por ser mi gran apoyo siempre.

A mis abuelitos y a mis tías Betty y Mel por cuidarme siempre. A Romina y Luciana por hacer más alegre mi vida.

A Marco Luna. Una vez me regalaste una libreta para que escribiera mis sueños, muchas gracias por construirlos juntos, por aprender y crecer conmigo.

A Carlos Ortiz, por su invaluable amistad e inmenso apoyo.

A mis mejores amigos Carlos, Uriel y Armando, por crecer juntos, por su apoyo incondicional en cada etapa que hemos vivido y por compartir conmigo una amistad que después de 10 años sigue siendo extraordinaria.

Contenido

| | |
|---|----|
| ABREVIATURAS | 1 |
| RESUMEN | 3 |
| 1. MARCO TEÓRICO | 4 |
| 1.1 Metabolismo de lípidos y lipoproteínas | 4 |
| 1.1.1 Vía exógena. | 6 |
| 1.1.2 Vía endógena | 7 |
| 1.1.3 Transporte Reverso del Colesterol | 8 |
| 1.2 Dislipidemia | 10 |
| 1.3 Aterosclerosis | 11 |
| 1.3.1 Factores de riesgo para la aterosclerosis | 11 |
| 1.3.2 Etiología de la aterosclerosis | 12 |
| 1.4 Enfermedad del hígado graso no alcohólico | 13 |
| 1.5 Fármacos | 15 |
| 1.6 Vacuna HB-ATV-8 | 19 |
| 2. HIPÓTESIS | 22 |
| 3. OBJETIVOS | 23 |
| 3.1 Objetivo General | 23 |
| 3.2 Objetivos Particulares | 23 |
| 4. MÉTODO | 24 |
| 4.1 Modelo experimental | 24 |
| 4.2 Preparación de la vacuna HB-ATV-8 | 27 |
| 4.3 Determinación de los niveles plasmáticos de anticuerpos contra CETP por medio del Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) | 27 |
| 4.4 Actividad de CETP | 28 |
| 4.5 Evaluación del perfil de lípidos | 29 |
| 4.6 Extracción de proteínas totales | 29 |
| 4.7 Cuantificación de proteínas | 30 |

| | |
|---|----|
| 4.8 Análisis de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y Western blot | 31 |
| 4.9 Análisis histológico de la lesión aterosclerótica e hígado graso no alcohólico | 32 |
| 4.10 Análisis estadístico | 33 |
| 5. RESULTADOS | 34 |
| 5.1 La administración de la vacuna HB-ATV-8 induce anticuerpos anti-CETP y reduce la actividad de CETP | 34 |
| 5.2 Peso corporal | 35 |
| 5.3 La vacuna HB-ATV-8 modifica el perfil de lípidos en conejos con dieta alta en grasa | 35 |
| 5.4 Proteínas asociadas al metabolismo de lípidos | 38 |
| 5.5 La vacuna HB-ATV-8 reduce la lesión aterosclerótica y el desarrollo de hígado graso no alcohólico | 39 |
| 6. DISCUSIÓN | 44 |

Abreviaturas

| | |
|------------------|---|
| ABCA1: | Proteína transportadora dependiente de ATP 1 |
| ACAT: | Acetil Coenzima A acetiltransferasa |
| AHA: | Asociación Americana del Corazón |
| Apo A1: | Apolipoproteína A1 |
| Apo E: | Apolipoproteína E |
| ApoB-100: | Apolipoproteína B 100 |
| ApoB-48: | Apolipoproteína B-48 |
| ATP: | Adenosin trifosfato |
| CD36: | Clúster de diferenciación 36 |
| CETP: | Proteína transferidora de ésteres de colesterol |
| C-HDL: | Colesterol contenido en lipoproteínas de alta densidad |
| CICUAL: | Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio |
| C-LDL: | Colesterol contenido en lipoproteínas de baja densidad |
| CT: | Control |
| EHGNA: | Enfermedad del Hígado Graso no Alcohólico |
| ELISA: | Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas |
| FATP: | Proteína transferidora de ácidos grasos |
| GAPDH: | Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa |
| GM-CSF: | Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos |
| H&E: | Hematoxilina y Eosina |
| HDL: | Lipoproteína de alta densidad |
| HFD: | Dieta alta en grasa |

HL: Lipasa hepática

HMG-CoA: Hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa

ICAM: Moléculas de adhesión intracelulares

IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia

LCAT: Lecitina colesterol aciltransferasa

LDL: Lipoproteína de baja densidad

LDLR: Receptor de LDL

LOX-1 Receptor tipo lecitina 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas

LP: Lipasa pancreática

LPL: Lipoproteína lipasa

MPC-1: Acarreador mitocondrial de piruvato

MTP: Proteína microsomal transferidora de triglicéridos

OxLDL: Lipoproteínas de baja densidad oxidadas

PCSK9: Proteína convertasa subtilisina kexina tipo 9

PPAR: Receptor activado por proliferadores de peroxisomas

RIPA: Radioimmunoprecipitation assay buffer, por sus siglas en inglés

Rpm: Revoluciones por minuto

SRB1: Receptor *scavenger* clase B tipo 1

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

VSMC: Células vasculares de músculo liso

SREBP: Proteína de unión a los elementos regulatorios de esteroides

TRC: Transporte reverso del colesterol

VCAM: Molécula de adhesión vascular

Resumen

Las alteraciones que ocurren en el metabolismo de lípidos se encuentran asociadas a diversas patologías, como la aterosclerosis y la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA). Estos desórdenes en el metabolismo conducen a un aumento en la concentración plasmática de triglicéridos y LDL, así como niveles bajos de HDL, alteraciones que en conjunto exhiben un patrón de dislipidemia aterogénica. Debido a esto, se han desarrollado fármacos que buscan modular el metabolismo de lípidos y, recientemente, los esfuerzos se han encaminado hacia el desarrollo de tratamientos que promuevan un perfil de lípidos antiaterogénico. En este contexto, la proteína CETP se ha convertido en un blanco terapéutico atractivo, ya que estudios revelan que la disminución de la actividad de esta enzima se asocia con perfiles lipídicos favorables (antiaterogénicos). Así, se han desarrollado diversos fármacos que buscan inhibir la actividad de CETP. Sin embargo, en algunos casos, no se observa la eficacia esperada o, más grave aún, se observan efectos secundarios severos relacionadas al uso de estos fármacos. Debido a lo anterior, en nuestro laboratorio se ha desarrollado una vacuna de aplicación intranasal que promueve la producción de anticuerpos que inhiben la región funcional de CETP. En este trabajo se muestran los efectos de la aplicación de dicha vacuna, denominada HB-ATV-8, en la aterogénesis y la EHGNA, en un modelo de aterosclerosis en conejo, generado por una exposición a una dieta alta en grasa. Los resultados obtenidos muestran que la vacuna produce anticuerpos antiCETP y una reducción en la actividad de la misma. Así mismo, observamos que HB-ATV-8 modifica el perfil de lípidos en conejos alimentados con dieta alta en grasa, siendo sobresaliente la reducción de los niveles de triglicéridos. Por otra parte, observamos que en conejos tratados con HB-ATV-8 los niveles de la proteína PPAR α se restablecen a niveles cercanos a los del grupo control. Finalmente, la aplicación de la vacuna muestra una reducción en la lesión aterosclerótica y en el desarrollo de la EHGNA. Con estos resultados, proponemos que HB-ATV-8 sea considerado como un agente terapéutico potencial para tratar el proceso de aterogénesis y el desarrollo de la EHGNA.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Metabolismo de lípidos y lipoproteínas

El adecuado metabolismo de lípidos es esencial para mantener el buen funcionamiento del organismo (Griffin, 2013). De esta manera, las alteraciones que ocurren en él se encuentran relacionadas con diversas patologías, tales como la aterosclerosis y la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), entre otras. Por tal motivo, es esencial entender los mecanismos del metabolismo y el transporte lipídico.

Debido a su carácter hidrofóbico los lípidos deben ser transportados en la sangre formando complejos con proteínas, llamadas apolipoproteínas, que además median funciones metabólicas, al actuar como ligando de receptores que activan o inhiben enzimas en el metabolismo de lípidos (Cox, 1990). Los complejos de lípidos y apolipoproteínas son denominados lipoproteínas y desempeñan un papel clave en la absorción y transporte de lípidos desde el hígado hacia tejidos periféricos, así como en dirección opuesta (Feingold & Grunfeld, 2018). Las lipoproteínas plasmáticas pueden ser divididas en diversas clases según su tamaño, composición lipídica y las apolipoproteínas que contienen (Tabla 1). Estas lipoproteínas tienen una participación esencial en las vías principales coordinadas por el hígado para garantizar el mantenimiento de la homeostasis del colesterol: vía exógena, vía endógena y el transporte reverso del colesterol (TRC). En el contexto de este trabajo, es importante conocer las características de cada una ellas.

| Lipoproteína | Densidad (g/mL) | Tamaño (nm) | Contenido de lípidos | Contenido de apolipoproteínas | Función |
|--|-----------------|-------------|----------------------------|---|---|
| Quilomicrones | < 0.930 | 75-1200 | Triglicéridos | Apo B-48, Apo C, Apo E, Apo A-I, A-II, A-IV | Partículas ricas en triglicéridos, que están involucradas en el transporte de los triglicéridos y el colesterol obtenidos de la dieta hacia los tejidos periféricos (Feingold & Grunfeld, 2000). |
| Remanentes de quilomicrones | 0.930- 1.006 | 30- 80 | Triglicéridos y colesterol | Apo B-48, Apo E | Son producto de la eliminación de triglicéridos de los quilomicrones, comparados con estos últimos los remanentes están enriquecidos con colesterol (Feingold & Grunfeld, 2000). |
| Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) | 0.930- 1.006 | 30- 80 | Triglicéridos | Apo B-100, Apo E, Apo C | Son partículas cuya función es transportar a los triglicéridos sintetizados en el hígado e intestino hacia los capilares en los tejidos adiposo y musculoso, en donde los triglicéridos son hidrolizados para proveer ácidos grasos que al ser oxidados producirán adenosina trifosfato (ATP) para la producción de energía. Alternativamente, si no es necesaria la producción de energía, pueden ser almacenados como grasas (Freeman & Walford, 2016). |
| Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) | 1.006- 1.019 | 23- 35 | Triglicéridos y colesterol | Apo B-100, Apo E, Apo C | La eliminación de triglicéridos por parte de las VLDL resulta en la formación de las IDL. |
| Lipoproteínas de baja densidad (LDL) | 1.019- 1.063 | 18- 25 | Colesterol | Apo B-100 | Transporta la mayor parte del colesterol que está en circulación. |
| Lipoproteínas de alta densidad (HDL) | 1.063- 1.210 | 5- 12 | Colesterol y fosfolípidos | Apo A-I, Apo A-II, Apo C, Apo E | Promueve el flujo de salida de colesterol de las células, capacidad que se atribuye a la apoA-I, también lleva a cabo la salida de colesterol de los macrófagos vasculares y otros tejidos periféricos, junto con la posterior transferencia de ésteres de colesterol hacia las VLDL y LDL para su excreción en el hígado (Ansell <i>et al.</i> , 2005). |

Tabla 1. Clases de lipoproteínas. Modificado de Feingold, K. R & Grunfeld, C. Introduction to lipids and lipoproteins. Endotex (MDText.com, Inc., 2000)

1.1.1 Vía exógena.

La vía exógena de las lipoproteínas da como resultado la transferencia eficiente de los ácidos grasos de la dieta al tejido muscular y adiposo para su almacenamiento y utilización como fuente energía. Los triglicéridos absorbidos por la dieta son hidrolizados por la enzima lipasa pancreática (LP) (Kindel *et al.*, 2010). Los ácidos grasos producto de la hidrólisis entran a los enterocitos a través de transportadores de ácidos grasos. Una vez dentro del enterocito, los ácidos grasos se ensamblan con la apolipoproteína B48 (apoB-48) por medio de la proteína microsomal transferidora de triglicéridos (MTP, por sus siglas en inglés), formando quilomicrones nacientes. Posteriormente los quilomicrones nacientes son secretados hacia los vasos linfáticos y se transportan a través del conducto torácico a la circulación. Una vez en circulación los quilomicrones nacientes reciben de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) apolipoproteína C-II, que es un activador de la lipoproteína lipasa (LPL), también recibe apolipoproteína E (apo E), que sirve como ligando para la eliminación posterior de quilomicrones, convirtiéndose así en quilomicrones maduros. Posteriormente, los triglicéridos presentes en los quilomicrones son hidrolizados por la LPL, proteína que se localiza en las células endoteliales, en los tejidos periféricos, especialmente en el tejido muscular y adiposo (Giammanco *et al.*, 2015; Vaziri, 2009); son las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP) y CD36, las que facilitan la absorción de ácidos grasos en los adipocitos y en las células musculares (Feingold & Grunfeld, 2018) para ser metabolizados, en consecuencia, se forman los restos de quilomicrones. Finalmente, el remanente de quilomicrón se une al hepatocito mediante la interacción de la apo E con el receptor remanente y se absorbe en los hepatocitos.

1.1.2 Vía endógena

Por un lado, la vía endógena se refiere al transporte de ácidos grasos sintetizados en el hígado hacia los tejidos muscular y adiposo, para su almacenamiento como fuente energía y también proporciona una vía para el transporte de colesterol desde el hígado hacia los tejidos periféricos por medio de la formación de baja densidad de (LDL). En el hígado, los triglicéridos y los ésteres de colesterol se transfieren a la apolipoproteína B100 (ApoB100) recién sintetizada, dando lugar a la formación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), esta transferencia también está mediada por la MTP. Las VLDL, al igual que los quilomicrones son sustratos para la eliminación de triglicéridos mediada por la LPL. La función de las VLDL es transportar a los triglicéridos sintetizados en el hígado y el intestino a los lechos capilares en los tejidos muscular y adiposo, donde la LPL los hidroliza; resultando en ácidos grasos libres que se incorporan principalmente a dichos tejidos (Freeman & Walford, 2016). La VLDL clarificada llamada lipoproteína de densidad intermedia (IDL) se incorpora al hígado a través de la interacción de la apo E con el receptor de LDL (LDLR) para su degradación, o alternativamente, los triglicéridos restantes en las partículas IDL son hidrolizados por la lipasa hepática (HL), lo que conduce a una disminución adicional en el contenido de triglicéridos y las apolipoproteínas de las IDL son transferidas para promover la formación de LDL, que a diferencia de las IDL, tienen un alto contenido de colesterol. Las partículas de LDL proporcionan colesterol a los tejidos periféricos o a las células hepáticas a través de la interacción de la apoB100 con los LDLR. Las partículas de LDL se unen e internalizan mediante endocitosis y se hidrolizan en lisosomas (Aizawa, 2015). Una vez liberado el colesterol en el interior de la célula, hay una disminución de los niveles de la enzima

clave en la biosíntesis de colesterol, la HMG CoA reductasa (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa) y de la expresión del LDLR. Con respecto a lo anterior, es importante señalar que los LDLR desempeñan un papel importante en la determinación de los niveles plasmáticos de las LDL, un bajo número de receptores está asociado con niveles elevados de LDL y viceversa (Feingold & Grunfeld, 2018). En ese sentido, cuando los niveles de colesterol intracelular disminuyen, el factor de transcripción SREBP se transporta desde el retículo hacia Golgi, donde las proteasas se escinden y activan a SREBP, que posteriormente migra al núcleo y estimula la expresión del LDLR, para favorecer la internalización de lípidos (Griffin, 2013).

1.1.3 Transporte Reverso del Colesterol

De manera contraria a la distribución de colesterol hacia células periféricas (no hepáticas) por las LDL y las VLDL, el hígado posee la maquinaria enzimática y celular para degradar y eliminar el colesterol mediante la conversión a sales biliares y la secreción en forma de bilis (Cohen, 2002). Son las HDL las que llevan a cabo el transporte del exceso de colesterol celular hacia el hígado para su excreción (Barter *et al.*, 2003; Lewis & Rader, 2005). De forma general, el mecanismo por el cual se lleva a cabo este transporte de colesterol es el siguiente: en primer lugar, se efectúa la transferencia de fosfolípidos y colesterol de las membranas celulares a las Apo A1, carentes de lípidos a través de la proteína transportadora dependiente de ATP 1 (ABCA1), dando lugar a HDL discoidales. En segundo lugar, la lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT), que circula en plasma, esterifica el colesterol libre de las HDL discoidales, eliminando un ácido graso de una molécula de fosfolípido y

esterificando al grupo hidroxilo libre del colesterol. Debido a su hidrofobicidad, los ésteres de colesterol se reubican en el núcleo de las HDL provocando que la partícula se vuelva esférica (Zannis *et al.*, 2006; Fielding & Fielding, 2002). En tercer lugar, el transporte reverso de colesterol se ve reforzado por la actividad de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP), que también circula en el plasma. CETP transfiere ésteres de colesterol de partículas HDL a las lipoproteínas que contienen apoB 100 (VLDL y LDL) a cambio de triglicéridos (Charles & Kane, 2012). Finalmente, la entrega de ésteres de colesterol para su excreción o reutilización ocurre por vía directa e indirecta: puede entregarse directa y selectivamente a los tejidos esteroideogénicos (hígado, glándula suprarrenal y gonadal) a través del receptor SRB1 (scavenger receptor class B type 1), o pueden ser transferidos a las VLDL y LDL por acción de CETP. Estas lipoproteínas son absorbidas principalmente por el hígado a través de los LDLR, para su posterior excreción, aunque también pueden conducir los ésteres de colesterol hacia los tejidos periféricos (Barter *et al.*, 2003; Gauthier *et al.*, 2005; Rensen & Havekes, 2006; Oliveira & Faria, 2011). Por lo tanto, CETP puede desempeñar un papel dual en el TRC, pues puede representar una ruta adicional para la administración de colesterol al hígado o promover la acumulación de colesterol LDL en el plasma y en tejidos periféricos (Oliveira & Faria, 2011).

1.2 Dislipidemia

Como se expuso anteriormente, el metabolismo de lipoproteínas es un proceso regulado con precisión que involucra la organización del suministro de triglicéridos al tejido muscular y adiposo y la eliminación del exceso de colesterol de las células (Feingold & Grunfeld, 2018). Las dislipidemias son desórdenes en este metabolismo que conducen a una alteración persistente en la concentración plasmática de colesterol y triglicéridos (Iqbal *et al.*, 2018; Madhu *et al.*, 2013). La aterosclerosis y la EHGA son patologías en las que se observan perturbaciones en el metabolismo de lipoproteínas, que en conjunto dan un patrón de dislipidemia aterogénica caracterizada por concentraciones plasmáticas aumentadas de triglicéridos, de LDL y bajos niveles de HDL (Speliotes *et al.*, 2010; Fadaei *et al.*, 2018; Ekstedt *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2013; Fadaei *et al.*, 2018).

También se han realizado estudios de algunas proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos y su comportamiento en ambas patologías. En común, se ha encontrado que la actividad de CETP se encuentra aumentada, así como la concentración de la apo B, en contraste los niveles de ApoA1 se encuentran disminuidos (Fadaei *et al.*, 2018; Rashid *et al.*, 2015; Shapiro & Fazio, 2017; Francis & Frohlich 2001; Luc *et al.*, 2002; Walldius & Jungner, 2006). Así mismo, se han observado desregulaciones en la concentración de proteínas como ABCA1 y de factores de transcripción involucrados en el metabolismo de lípidos como el Receptor activado por proliferadores de peroxisomas α (PPAR α) (Trieb *et al.*, 2016; Soumian *et al.*, 2005; Pawlak *et al.*, 2015; Zandbergen & Plutzky, 2007).

1.3 Aterosclerosis

La aterosclerosis es un tema de importancia para la salud pública ya que provoca una tasa elevada de morbilidad y mortalidad, siendo en México la principal causa de muerte (Badimón *et al.*, 2009; INEGI, 2018). Es un proceso inflamatorio sistémico que se caracteriza por la acumulación de lípidos y macrófagos dentro de la túnica íntima de las arterias (Badimon & Vilahur, 2014; Lusis, 2000). Como resultado hay una formación de estrías grasas en las paredes arteriales, que comienza con la deposición de moléculas de colesterol en la íntima y el músculo liso subyacente. De manera progresiva la placa aumenta su grosor con la proliferación de tejidos fibrosos y el músculo liso circundante, favoreciendo el abultamiento dentro de las arterias. En consecuencia, hay una reducción del flujo sanguíneo. Además, la producción de tejido conectivo por los fibroblastos y la deposición de calcio en la lesión provocan el endurecimiento de las arterias. La formación de la placa es asintomática, pero la rotura de la placa o la erosión endotelial pueden inducir la formación de trombos, lo que puede provocar un infarto al miocardio o accidente cerebrovascular isquémico (Gisterå & Hansson, 2017; Bentzon *et al.*, 2014; Tavafi, 2013).

1.3.1 Factores de riesgo para la aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial, donde interrelacionan factores genéticos y ambientales (Hegele, 1997). La dislipidemia, la EHGNA, la diabetes mellitus, el tabaquismo y la hipertensión arterial son algunos de los factores de

riesgo para la aterosclerosis. Sin embargo, cualquiera de estos es insuficiente para producir una lesión aterosclerótica por sí sola (Singh *et al.* 2002; Novo *et al.* 1991). Además de los factores de riesgo tradicionales, se han realizado estudios clínicos, epidemiológicos y moleculares que han identificado al estrés oxidante como un factor que contribuye al desarrollo y progresión de la aterosclerosis (Schulze & Lee, 2005).

1.3.2 Etiología de la aterosclerosis

Como se mencionó anteriormente, el colesterol y las lipoproteínas están implicados en la patogénesis de la aterosclerosis (Stary, 1994; Stary *et al.*, 1995), mientras que los niveles de triglicéridos son considerados como un biomarcador independiente de riesgo cardiovascular (Talayero & Sacks, 2011). Las lesiones inician en la íntima y progresivamente afectan la pared arterial, incluyendo la túnica media y adventicia (Insull, 2009). El componente característico de la placa aterosclerótica son las células espumosas derivadas de los macrófagos (Tabas, 2000). La oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (OxLDL) es el mecanismo que comúnmente origina el autoantígeno estimulante del proceso inflamatorio, en donde intervienen las células del sistema inmunitario innato (macrófagos) y las células del sistema inmunitario adaptativo (linfocitos T y B) (Rivera, 2001). El proceso comienza con la captación de las LDL, por parte del receptor LOX-1, el cual se encuentra en la superficie de las células endoteliales y de los macrófagos. Este evento ocasiona secreción de moléculas de adhesión provenientes de las células endoteliales (ICAM-1, VCAM-1), las cuales contribuyen a la dispersión, la adhesión y la trans migración de leucocitos a través del endotelio vascular. Las células endoteliales también

secretan endotelina 1, la cual estimula a los macrófagos presentes en la capa íntima arterial para que liberen una proteína quimiotáctica (MCP-1) la cual, a su vez, permite la trans migración de los monocitos a través del endotelio y la posterior transformación en macrófagos. Estos fagocitan a las OxLDL, transformándose en las células espumosas, que liberan endotelina-1 y un factor de crecimiento conocido como GM-CSF, moléculas que contribuyen para mantener el proceso inflamatorio (Rivera, 2001).

1.4 Enfermedad del hígado graso no alcohólico

La EHGNA se refiere a un desorden metabólico que se caracteriza por la acumulación de lípidos en los hepatocitos, motivo por el cual está relacionada con daño hepático que va desde la esteatosis hasta la esteatohepatitis, la fibrosis avanzada y la cirrosis (Gaudio *et al.*, 2012). En la actualidad la EHGNA es la enfermedad hepática crónica más común a nivel mundial (Kwak & Kim, 2018).

El hígado es uno de los principales sitios en donde los lípidos se acumulan cuando hay un exceso en la capacidad de almacenamiento del tejido adiposo, lo que conlleva a un aumento del flujo neto de lípidos a los órganos no adiposos, lo que puede provocar lipotoxicidad (Samuel *et al.*, 2010; Byrne, 2013; Mendez-Sanchez *et al.*, 2018). De hecho, el 60% de los lípidos que se acumulan en el hígado provienen de la lipólisis del tejido adiposo (Donnelly *et al.*, 2005). La patología de la acumulación crónica de grasa se caracterizó por primera vez en pacientes con alcoholismo debido a que en estos pacientes la hepatitis está exacerbada (Lieber & Rubin, 1969). Posteriormente se describió que la acumulación de lípidos en el tejido

hepático (esteatosis) también ocurre en pacientes no alcohólicos (Ludwig *et al.*, 1980). En ese sentido, la EHGNA es un espectro clínico-patológico de enfermedades asociadas con la acumulación excesiva de grasa en el hígado (Browning & Horton, 2004; Neuschwander-Tetri & Caldwell, 2003). Cuando la acumulación de grasa hepática no alcohólica se asocia con un estado inflamatorio significativo (inflamación globular) la patología se considera esteatohepatitis no alcohólica (Ludwig *et al.*, 1997) y puede ser causa de un mayor deterioro de la función hepática. Al menos el 30 % de los individuos con la EHGNA muestran evidencia de esteatohepatitis no alcohólica en pruebas histopatológicas (Williams *et al.*, 2011). En respuesta al daño hepático, las células estrelladas activadas proliferan y secretan colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular, lo que resulta en fibrosis, lo que ocurre en un 20 % de las personas que padecen esteatohepatitis no alcohólica (Matteoni *et al.*, 1999). En un esfuerzo por generar nuevas células, la esteatohepatitis no alcohólica progresa a cirrosis (Argo & Caldwell, 2009; Starley *et al.*, 2010), con los hepatocitos reemplazados por tejidos cicatriciales de colágeno producidos por las células estrelladas (Sorensen *et al.*, 2003; Yasui *et al.*, 2011; Haas *et al.*, 2016). La EHGNA es una enfermedad en cuyas causas intervienen además de los factores ambientales, un posible desequilibrio en los siguientes procesos: 1) captación hepática de ácidos grasos, lipoproteínas y glucosa, 2) síntesis *de novo* de triglicéridos, 3) degradación de triglicéridos, beta oxidación de los ácidos grasos y 4) secreción de lipoproteínas VLDL (Angulo *et al.*, 2002).

1.5 Fármacos

Debido a que la EHGNA y la aterosclerosis se encuentran asociadas con estados dislipidémicos, se han desarrollado fármacos que modulan el metabolismo de lípidos, tales como las estatinas (Rosenson, 2004; Gomez-Dominguez *et al.*, 2006), que son inhibidores de la enzima clave para la síntesis de colesterol, la hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA), por lo que su administración impide la producción de mevalonato, que es un intermediario para la formación de colesterol (Endo; 2010; Saku *et al.*, 2011). Las pruebas clínicas confirmaron la efectividad de la terapia con estatinas en la disminución de los niveles de colesterol LDL (C-LDL) (50%). También se observó una reducción en los niveles de triglicéridos (20%) y un aumento en los niveles séricos de colesterol HDL (C-HDL) (10%) (Zárate *et al.*, 2016; Taylor *et al.*, 2013; Odden *et al.*, 2015), considerándose como un agente efectivo en la prevención y tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, las estatinas han mostrado algunos efectos secundarios tales como niveles elevados de transaminasas hepáticas lo que se relaciona con daño hepático (Russo *et al.*, 2014), un incremento en el riesgo de diabetes tipo 2 (Bang & Okin, 2014; Cederberg *et al.*, 2015), así como alteraciones en el sistema nervioso central (Gaist *et al.*, 2002). Debido a que las estatinas no previenen más que el 30-40% de los eventos cardiovasculares, sin perder de vista los efectos secundarios que provocan, es preciso el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (Maranhão & Leite, 2015). Varios blancos terapéuticos se han estudiado para el tratamiento de la aterosclerosis. Entre los cuales destacan los inhibidores de la proteína convertasa subtilisina kexina tipo 9 (PCSK9) que evitan la degradación del LDLR (Verbeek *et al.*, 2015). Pero su uso se ha asociado con

fatiga, mialgia, trastornos neurocognitivos, oftalmológicos y artralgia (Robinson *et al.*, 2015; Sabatine *et al.*, 2015). También se han probado agonistas de los PPARs (fibratos), pero se han asociado con la generación de prostaglandinas vasodilatadoras provocando la disminución de la tasa de filtración glomerular provocando daño renal, además se han reportado casos de daño hepatocelular después de la exposición al fármaco (Tsimihodimos *et al.*, 2002; Jun *et al.*, 2012). Así mismo, se ha evaluado la efectividad de inhibidores de proteínas que también se encuentran asociadas al metabolismo de lípidos, tales como la acetil Coenzima A acetiltransferasa (ACAT), la apoB100 y la MTP, que han mostrado ser efectivos, pero su administración conlleva efectos adversos severos, entre los que destacan el aumento en los niveles de transaminasas y daños en el tracto gastrointestinal (Nissen & Wolski, 2007, Tardif *et al.*, 2004; Azen *et al.*, 1996; Waters *et al.*, 1993; Davis, 1999; Akdim *et al.*, 2010; Stein *et al.*, 2012; Visser *et al.*, 2010; Cuchel *et al.*, 2013).

En la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos adicionales, la atención se ha orientado hacia métodos que promuevan un perfil de lípidos antiaterogénico, como niveles disminuidos de triglicéridos y LDL, así como un aumento en los niveles de HDL (Gotto, 2001). Respecto a esto se ha evidenciado que la inhibición de la actividad de CETP aumenta de manera efectiva los niveles de HDL (Hesler *et al.*, 1987). De hecho, la inhibición de CETP se ha convertido en un objetivo antiaterogénico atractivo debido a que varios estudios en pacientes japoneses reportaron niveles elevados de C-HDL (3.9- 7.8 mmol/L) (Koizumi *et al.*, 1985; Matsuzawa *et al.*, 1984) debido a mutaciones en el gen de CETP que fueron identificadas como el defecto molecular que se relaciona a este aumento de C-HDL (Inazu *et al.*, 1990). Adicionalmente a la elevación de C-HDL en homocigotos

recesivos para las mutaciones de CETP, también se ha observado una reducción sustancial en la concentración de C-LDL y apoB (Sakai *et al.*, 1995). Además, se ha encontrado que los roedores que carecen de la actividad de CETP en plasma tienen niveles elevados de C-HDL y resistencia a la aterosclerosis inducida a través de la dieta (Gurfinkel & Joy, 2011).

Dado lo anterior, se han desarrollado diversos fármacos que tiene como finalidad inhibir la actividad de CETP. El primer fármaco inhibidor de CETP fue el torcetrapib. En modelos animales torcetrapib reduce la susceptibilidad al desarrollo de aterosclerosis (Morehouse *et al.*, 2007), en humanos produjo un aumento significativo en los niveles de C-HDL dependiente de la dosis y una reducción de los niveles de C-LDL (Brousseau *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2004). Sin embargo, su uso se relacionó con un aumento en la presión arterial, así como con niveles bajos de potasio y mayores niveles de sodio, que fueron atribuidos al hiperaldosteronismo; esta propuesta fue confirmada por hallazgos de un aumento en los niveles de aldosterona en el grupo al que se le administró el fármaco. Debido a lo anterior el mismo estudio mostró que el tratamiento es ineficaz sobre el desarrollo de la placa aterosclerótica (Nissen & Wolski, 2007) además se reportó un aumento del 25% en los eventos cardiovasculares y 58% de muertes (Barter *et al.*, 2007; Kosmas & Frishman, 2015).

También se evaluó el uso de otro inhibidor de CETP, dalcetrapib. Del cual se observó una reducción en la actividad de CETP que se asoció con un aumento de los niveles de C-HDL dosis dependiente pero no influenció efecto significativo sobre los niveles de C-LDL (Stein *et al.*, 2009; Lüscher *et al.*, 2012), por lo que no fue aceptado para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.

Otro inhibidor de CETP, denominado anacetrapib, ha sido probado en pacientes con cardiopatía coronaria. Tras su administración se encontró que hay un aumento de los niveles de C-HDL (138.1%) y una reducción de la concentración de C-LDL (39.8%). También se reportó un aumento en los niveles de apoA1 (44.7%) y disminuyó la concentración de apoB (21%). Sin embargo, la administración de anacetrapib fue en concomitancia con estatinas (Cannon *et al.*, 2010).

Finalmente, evacetrapib, otro inhibidor de CETP, elevó los niveles de C-HDL sin inducir aldosteronismo ni aumentar la presión sanguínea (Cao *et al.*, 2011). Como monoterapia, evacetrapib produjo aumento de la concentración de C-HDL dependientes de la dosis (128.8%) y disminuyó la concentración de C-LDL (35.9%) (Nicholls *et al.*, 2011). En combinación con estatinas, produjo un aumento (88.5%) de los niveles de C-HDL y una disminución (13.9%) de C-LDL (Nicholls *et al.*, 2011). Sin embargo, después de varios estudios se interrumpió su uso como tratamiento de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica de alto riesgo; el estudio fue detenido debido a que no se observó una reducción de los eventos cardiovasculares con el fármaco (Filippatos & Elisaf, 2017).

1.6 Vacuna HB-ATV-8

Con la finalidad de evitar la inespecificidad producida por los inhibidores de CETP, se ha buscado producir anticuerpos anti CETP que modulen su actividad de manera específica. En ese sentido, varios años de investigación sobre la estructura y función de CETP en nuestro laboratorio, han permitido desarrollar un tratamiento con un enfoque inmunológico, mediante el diseño y la elaboración de una vacuna que estimula la producción de anticuerpos específicos contra la región funcional de CETP.

Como primer punto, en nuestro laboratorio se ha propuesto que el transporte de lípidos mediado por CETP ocurre a través de la formación de estructuras micelares asociadas a la región del carboxilo terminal (hélice α), como un mecanismo alterno o simultáneo mediante el cual CETP lleva a cabo la transferencia de lípidos (García *et al.*, 2014; García & Mas, 2013). La resolución de la estructura tridimensional de CETP permitió establecer que, a través de la superficie cóncava, CETP se une solamente a una lipoproteína a la vez. Esto provee una base fuerte para la propuesta sobre que opera por medio de un mecanismo acarreador, que acepta lípidos neutros de una partícula donadora, los transporta a través de la fase acuosa y los libera en las lipoproteínas receptoras (Hamilton & Deckelbaum, 2007). Considerando que la estructura hélice α del carboxilo terminal es lo que le brinda funcionalidad a CETP, uno de los objetivos de nuestro laboratorio fue crear una vacuna que pudiera inhibir su actividad, utilizando los últimos 12 residuos de aminoácidos del carboxilo terminal de CETP (de H468 a S496) (García *et al.*, 2015; Mas & Alonso, 2010). Dentro de esta secuencia están incluidos tres de los cuatro

residuos esenciales para mantener la capacidad de unión y transferencia de lípidos (L 488, F 491 y L495) (García et al, 2014). El péptido de 12 residuos de aminoácidos (CHLLVDFLQSLS) está contenido en una nanopartícula micelar compuesta por fosfatidilcolina, lisofosfolípidos y lípidos de la membrana de la *Archaeobacteria Thermus aquaticus*. La estructura química de los lípidos arqueobacterianos que comprenden grupos alquilo de cadena larga unidos por un enlace éter con glicerol es una característica que permite que estas moléculas puedan funcionar como estructuras de andamiaje en las nanopartículas micelares. Además, el uso de lisofosfatidilcolina permite mantener estable la estructura secundaria de la α -hélice funcional del antígeno (CHLLVDFLQSLS), que es la conformación que facilita la función de transferencia de lípidos (García *et al.*, 2014) (Figura 1).

Previo a la realización de este trabajo, en nuestro laboratorio se han hecho dos estudios en los que se han evaluado los efectos de la vacuna HB-ATV-8. El primero de ellos se realizó en conejos Nueva Zelanda, al igual que el presente estudio, y se encontró que la vacuna reduce de forma significativa la formación de la lesión aterosclerótica. De manera interesante, dicho estudio es el primero que demuestra que la vacuna tiene un efecto positivo sobre la EHGNA (García *et al.*, 2015). El segundo estudio se realizó en cerdos, debido a que las condiciones fisiológicas y patológicas en este modelo asemejan a la de los humanos. En este trabajo, se encontró que la administración de la vacuna es capaz de regular los niveles de triglicéridos, el restablecimiento de los niveles de expresión de los genes de aorta KLF2, un factor de transcripción que regula la adipogénesis y la inflamación (entre otras cosas) ACTA2, que codifica para un tipo de actina que está involucrada en procesos de aterogénesis, SOD1, la proteína que codifica este gen destruye radicales libres superóxido, y COL1A1 que codifica las cadenas pro-alfa 1 del

colágeno tipo 1 que está presente en la lesión aterosclerótica; así como de la proteína PPAR α , que es un factor de transcripción involucrado en la oxidación de ácidos grasos (Gutiérrez *et al.*, 2018).

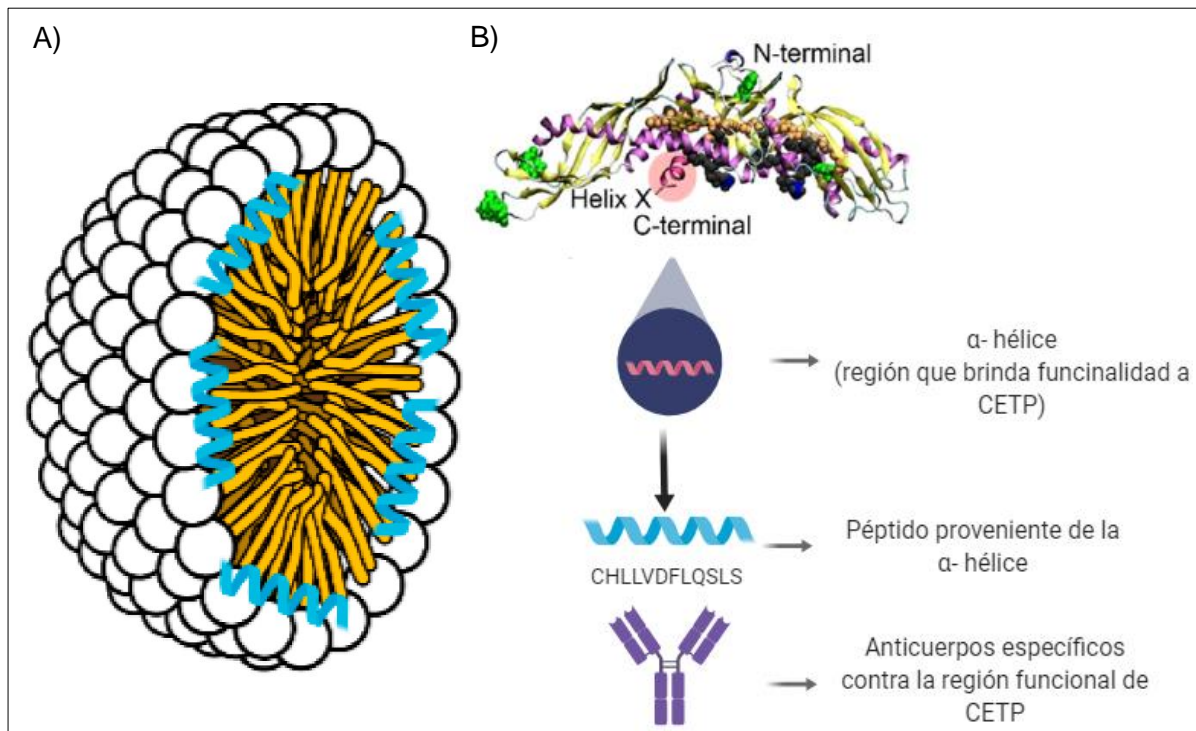


Figura 1. Estructura y función de HB-ATV-8. A) Estructura de la partícula micelar formada por lípidos archaeobacterianos, lisofosfolípidos, fosfatidilcolina y lisofosfatidilcolina. El péptido CHLLVDFVQSLS en su estructura alfa hélice (azul) se encuentra embebido entre la cabeza hidrofílica y las colas hidrofóbicas de los fosfolípidos. Ilustración modificada de Bitounis *et al.* 2012 doi: 10.5402/2012/738432. B) Generación de anticuerpos específicos contra la región funcional de CETP, comprendida por una hélice α en la región c-terminal. Ilustración modificada de Koivuniemi *et al.* 2012 doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002299.g001.

Por lo tanto, en este trabajo se pretenden evaluar los efectos de la administración de la vacuna intranasal HB-ATV-8 en un modelo de aterosclerosis en conejo y su efecto sobre la lesión hepática producida por una dieta alta en grasa.

2. HIPÓTESIS

Tomando en cuenta los antecedentes mencionados, consideramos que la vacuna HB-ATV-8 es capaz de estimular el sistema inmune de los conejos, generando anticuerpos anti CETP, lo que provocará la inhibición selectiva de su actividad, promoviendo la disminución del perfil lipídico aterogénico inducido por una dieta alta en grasa, la modulación en la concentración de proteínas involucradas en el metabolismo lipídico y la reducción en el daño tisular aórtico y hepático producido también por el perfil aterogénico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la vacuna HB-ATV-8 en un modelo de aterosclerosis en conejo, generado por la exposición a una dieta alta en grasa.

3.2 Objetivos Particulares

- Verificar por medio del Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) la producción de anticuerpos anti CETP tras la administración de la vacuna HB-ATV-8, así como la inhibición de la actividad de CETP mediada por dichos anticuerpos utilizando un método fluorométrico.
- Analizar el efecto de la vacuna sobre niveles séricos de colesterol total (C-HDL y C-LDL) y de triglicéridos por medio de métodos enzimáticos.
- Comprobar mediante western blot si existen cambios derivados de la administración de la vacuna en la concentración de los niveles de expresión del factor de transcripción PPAR α , y de la proteína ABCA1, ambas involucradas en el metabolismo lipídico.

- Observar los efectos de la vacuna sobre el daño tisular aórtico y hepático provocado por la dieta alta en grasa realizando un análisis histológico.

4. MÉTODO

4.1 Modelo experimental

El efecto de la vacuna HB-ATV-8 se evaluó en un modelo de aterosclerosis en conejos blancos Nueva Zelanda durante un periodo de 60 días. Los procedimientos se realizaron conforme a los requerimientos de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO- 1999) y fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Se emplearon 11 conejos que fueron distribuidos en tres grupos:

- 1) Conejos control (CT, n=4), los cuales consumieron una dieta chow (5321 de LabDiet).
- 2) Grupo dieta alta en grasa (HFD por sus siglas en inglés, n=4), fueron alimentados con una dieta alta en grasa, que consistió en la dieta chow suplementada con 1% (w/w) de colesterol y 10 % (w/w) de aceite de maíz. Brevemente, las dietas que inducen hipercolesterolemia en conejos se han utilizado en gran medida como modelo para estudiar el desarrollo de la aterosclerosis humana debido al rápido desarrollo de lesiones aórticas, en general las dietas utilizadas consisten en una suplementación que va del 0.5% al 4% de colesterol por peso durante aproximadamente entre 8 a 16 semanas. Bajo estas condiciones, los conejos desarrollan un perfil

hipercolesterolémico (colesterol en plasma > 1,000 mg/dL) (Kolodgie et al. 1996; Dornas et al. 2010).

- 3) Grupo dieta alta en grasa + vacuna HB-ATV-8 (HFD+HB-ATV-8, n=3), alimentados con la misma dieta alta en grasa, pero tratados con la vacuna HB-ATV-8. A los conejos de este grupo se les administraron 200 µg de la vacuna HB-ATV-8 por vía nasal, semanalmente durante 60 días.

Todos los conejos tuvieron agua y alimento *ad libitum*. Se llevó a cabo un registro semanal de los pesos de cada conejo durante todo el experimento. También se realizaron tomas de muestras sanguíneas con 15 horas y media de ayuno cada 15 días. Una vez concluidos los 60 días de experimento se realizó la eutanasia de los 11 conejos con una dosis letal de Pentobarbital (90-210 mg/kg).

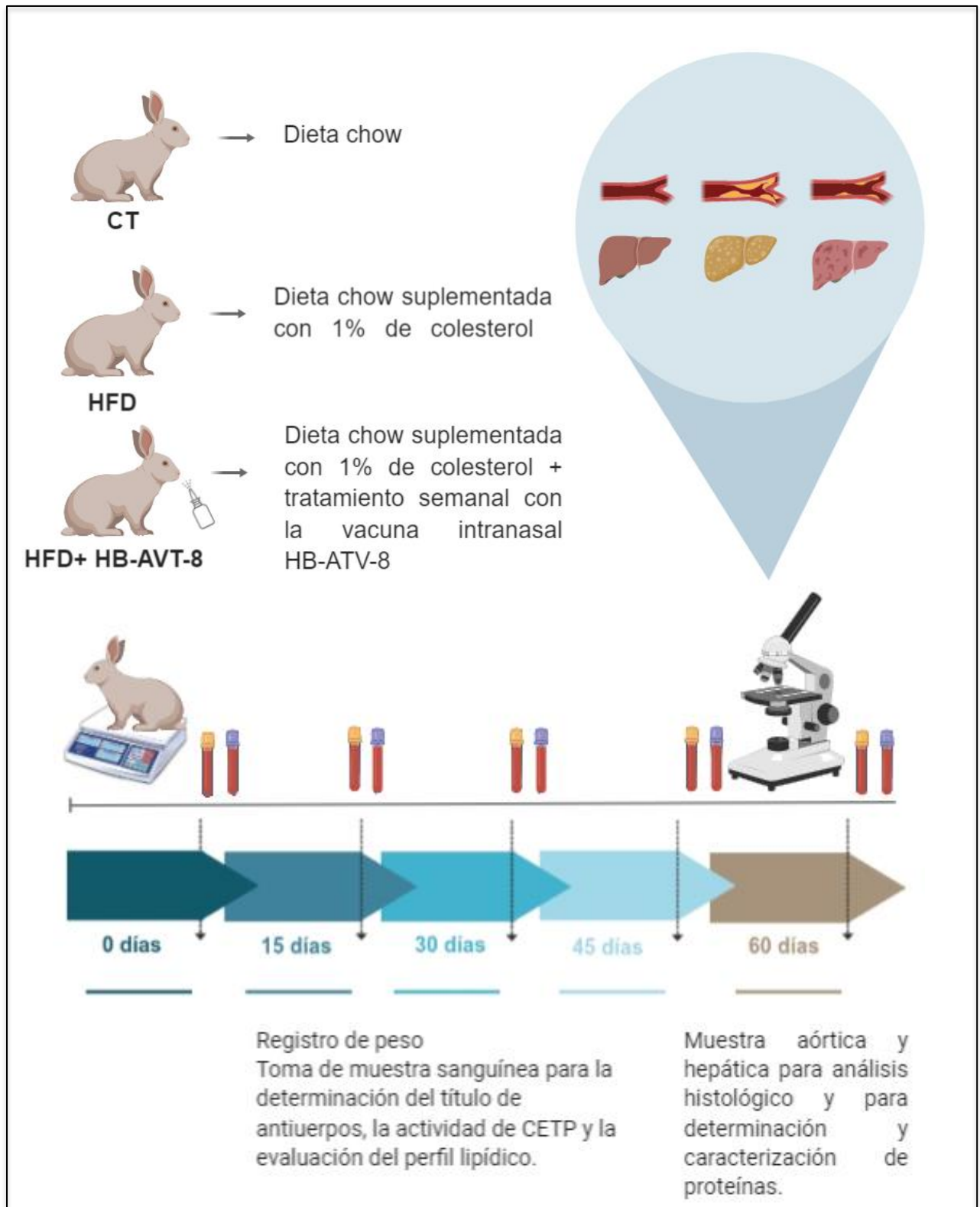


Figura 2. Esquema del diseño experimental y la cronología de la extracción de muestras y de la realización de experimentos.

4.2 Preparación de la vacuna HB-ATV-8

La vacuna HB-ATV-8 (No. de patente US 9539312, MX347400 B) que consta de un péptido del segmento carboxilo terminal de la proteína CETP (CHLLVDFLQSLS), constituyendo los últimos once residuos de la proteína (de H486 a S496) se preparó de acuerdo con el protocolo estandarizado por el Dr. Jaime Mas Oliva (Mas, 2017; García *et al.* 2014; García *et al.* 2013).

4.3 Determinación de los niveles plasmáticos de anticuerpos contra CETP por medio del Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

Para la determinación del título de anticuerpos contra CETP generados por los conejos del grupo HFD+HB-ATV-8, se empleó la técnica ELISA indirecto. La placa de 96 pozos Maxisorp (Thermo Fisher Scientific, USA) se tapizó con 100µL del antígeno (péptido CHLLVDFLQSLS (Gene Script, USA) disuelto en buffer NaHCO₃/NaCO₃ pH= 9.5) a una concentración de 2.5 µg/mL y se incubó a 37°C durante 4 horas. Posteriormente se realizaron dos lavados con 200 µL de TBS-Tween 20 al 0.05%. Para evitar la unión inespecífica de anticuerpos se adicionaron 200 µL de la solución de bloqueo, la cual consistió en un agente bloqueador al 2.5% (BIORAD, USA) y albúmina de suero bovino al 2.5% (Sigma-Adrich, USA) en TBS-Tween 20 al 0.05%. Después de incubar durante dos horas a 37°C se retiró la solución de bloqueo y se adicionaron 100 µL de plasma sanguíneo de conejo a una dilución (1:100). La placa se incubó nuevamente a 37°C durante 1 hora y 30 minutos, una

vez transcurrido dicho tiempo se retiró la solución con el plasma diluido y se realizaron tres lavados con 200 μ L de TBS-Tween 20 al 0.05%. Posteriormente se agregaron 100 μ L de anti-conejo (Sigma, USA) 1:5000 conjugado con peroxidasa de rábano (HRP). El cual se incubó a 37°C durante 30 minutos, se realizaron 3 lavados con 200 μ L de TBS-Tween 20 al 0.05% y uno más con TBS 1X para adicionar el sustrato colorimétrico 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Thermo Fisher Scientific, USA), el cual se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. El TMB es oxidado por la HRP. Finalmente, dado que la actividad óptima de la HRP se encuentra en un rango de pH que va de 6 a 7.5, al disminuir el pH de la reacción la enzima HRP no puede catalizar la oxidación sobre su sustrato (TMB) (Bally & Gribnau, 1989; Porstmann *et al.* 1985; Schomberg *et al.* 1993), por lo que la reacción enzimática se detuvo con ácido sulfúrico 2M, y la absorbancia se leyó a 450 nm en un lector de microplacas automatizado (Synergy HT BioTek, USA).

4.4 Actividad de CETP

Se evaluó la actividad de CETP en plasma (0 y 45 días) utilizando el CETP Activity Assay Kit Protocol (Sigma, USA), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Brevemente, la incubación de una partícula donadora y de las lipoproteínas plasmáticas aceptoras endógenas que contenían CETP, dio lugar a la transferencia de un fluoróforo a la partícula aceptora. Se leyó la fluorescencia de las muestras utilizando un lector de microplacas ($\lambda_{ex} = 465$ / $\lambda_{em} = 535$ nm).

4.5 Evaluación del perfil de lípidos

Se analizaron los niveles séricos de triglicéridos, colesterol total, LDL y HDL de todos los conejos mediante análisis colorimétricos y enzimáticos (al inicio tiempo 0, a los 15, 30, 45 y 60 días), los cuales se llevaron a cabo en el Departamento de Patología de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

4.6 Extracción de proteínas totales

Con la finalidad de determinar y caracterizar las proteínas presentes en el tejido hepático de conejo, se realizó una extracción de proteínas con el buffer de lisis RIPA (Radioimmunoprecipitation assay buffer, por sus siglas en inglés). En un tubo de reacción se adicionaron 600 μ L de RIPA adicionado con inhibidores de proteasas (Roche, Alemania), posteriormente se agregaron 70 mg de tejido de hígado congelado. El tejido se disgregó mediante el uso de un homogeneizador durante 1 minuto en intervalos de 10 segundos, se incubó durante 30 minutos y se realizaron agitaciones cada 10 minutos. Enseguida, las muestras se centrifugaron a 12 000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante y fueron almacenados a -70°C para evitar la degradación de las proteínas.

4.7 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo por medio del Kit DC protein assay de BIO-RAD. El cual, es un ensayo colorimétrico utilizado para determinar la concentración de proteínas en una muestra después de haber sido solubilizada en un detergente. La reacción sigue las bases del ensayo Lowry, pero ha sido modificado para aumentar la eficacia de la reacción con respecto al tiempo. Brevemente, a la muestra de interés se le añade un reactivo que forma un complejo coloreado. Los iones Cu^{2+} , en forma de tartrato de cobre, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos, estos complejos presentan una coloración azul tenue. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina. Posteriormente el cobre cataliza la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (color amarillo), por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, dando lugar a un complejo de color azul intenso, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas (Lowry *et al.* 1951).

4.8 Análisis de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y Western blot

La concentración de las proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos: ABCA1 y PPAR α se determinó por medio de Western Blot. Las proteínas fueron separadas de acuerdo a su peso molecular mediante SDS-PAGE en geles separadores de poliacrilamida. Para PPAR α se hicieron geles al 12% y se cargaron 80 μ g de proteína, mientras que para ABCA1 se hicieron geles separadores al 8% y se cargaron 100 μ g de proteína. Posteriormente, las proteínas presentes en el gel se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilo. Las membranas se bloquearon con buffer de Tris salino (TBS-Tween 20) (100 mM Trizma Base, 150 mM NaCl y 01% Tween 20, pH 7.3) con un agente bloqueador (Biorad) al 5% por 1 hora a temperatura ambiente y se incubaron con anticuerpos marcados específicamente contra PPAR α (1: 200) (Santa Cruz Biotechnology, USA), ABCA1 (1:200) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) y GAPDH (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) durante toda la noche a 4°C. Finalmente, las proteínas fueron visualizadas por medio del kit de quimioluminiscencia (Millipore, USA), y cuantificadas por densitometría utilizando el programa ImageJ.

4.9 Análisis histológico de la lesión aterosclerótica e hígado graso no alcohólico

Para evaluar el efecto de la vacuna HB-ATV-8 en el desarrollo de la aterosclerosis y el hígado graso no alcohólico, una vez realizada la eutanasia de los conejos, se obtuvo el cayado aórtico y un fragmento de hígado de cada conejo y se fijaron en formol al 10%. Posteriormente, se incluyeron en parafina, se hicieron cortes de 4 μm y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H & E). Se llevó a cabo un análisis de la severidad de las lesiones ateroscleróticas de acuerdo con los criterios de la Asociación Americana del Corazón (AHA por sus siglas en inglés) (Stary *et al.* 1994; Stary *et al.* 1995). Dichos criterios comprenden seis tipos de lesiones ateroscleróticas, la lesión tipo I se caracteriza por la presencia de células espumosas aisladas, la lesión tipo II por la acumulación intracelular de lípidos, la lesión tipo III presenta lesiones tipo II y pequeños depósitos extracelulares de lípidos, la lesión tipo IV también presenta lesiones tipo II además de un núcleo de lípidos extracelulares, en la lesión tipo V se observan núcleos de lípidos, capas fibrosas y depósitos de calcio, por último, en la lesión tipo VI se distingue la presencia de un defecto tisular en la superficie, hematoma-hemorragia o un trombo. Mientras que el daño en el tejido hepático se evaluó tomando en consideración las características histopatológicas del hígado graso no alcohólico: esteatosis, balonamiento e inflamación además se analizó el grado de fibrosis presente (Kleiner *et al.* 2005). También se utilizó microscopía de excitación de dos fotones y de generación de segundas armónicas para analizar la fibrosis en los tejidos. Para lo cual se utilizó un microscopio LSM-700 de Zeiss con un láser pulsado de titanio: zafiro (Coherent). Las muestras de H&E se excitaron a 850 nm de longitud de onda

(2.5% de poder de láser) y para la generación de segundas armónicas se excitó a 900 nm (12% de poder de láser) y se utilizó un filtro BP 420-480 nm (Zeiss). Se utilizaron los objetivos de inmersión de 10x y 20x.

4.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el uso del software SPSS (IBM). Todos los datos se sometieron a pruebas de normalidad (Saphiro-Wilk) para determinar el uso de pruebas paramétricas o no paramétricas. Para todos los casos se utilizó un alfa del 5%.

La significancia estadística de las diferencias de peso entre grupos, los niveles de triglicéridos y colesterol total (HDL y LDL) se realizó mediante la prueba Kruskal Wallis. Para realizar el análisis comparativo de los valores de concentración de proteínas se ejecutó una prueba t de Student con el software Prism (Graphpad). Los datos son expresados como medias \pm error estándar.

5. RESULTADOS

5.1 La administración de la vacuna HB-ATV-8 induce anticuerpos anti-CETP y reduce la actividad de CETP

La administración semanal de la vacuna intranasal HB-ATV-8 induce la producción de anticuerpos IgG anti CETP, observándose un título elevado a partir de los 15 días de tratamiento, mismo que se mantiene constante hasta el día 45 (Fig. 3). En paralelo, se observa una reducción estadísticamente significativa de la actividad de CETP en los conejos que generaron anticuerpos anti CETP en contraste con los conejos HFD ($p=0.0273$) a los 45 días.

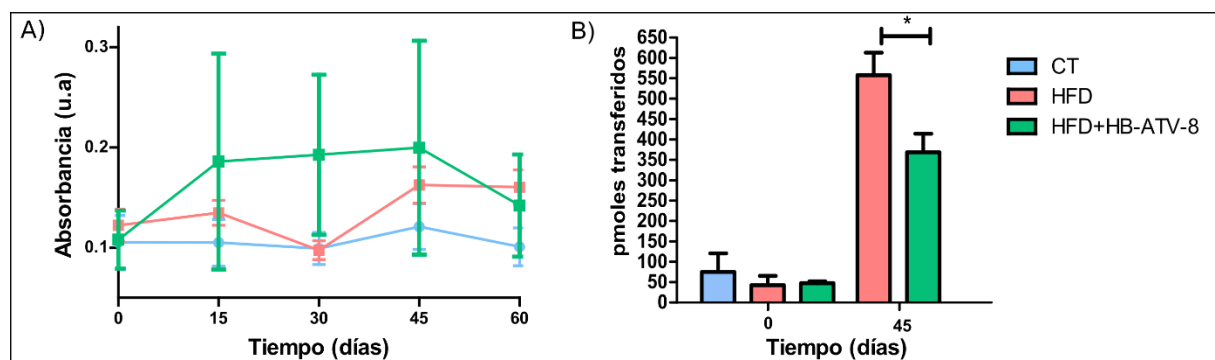


Figura 3. Título de anticuerpos anti-CETP y actividad de CETP en plasma de conejos
A) Niveles de anticuerpos IgG anti CETP en los tres grupos de estudio a lo largo de 60 días.
B) Actividad de CETP al tiempo 0 y a los 45 días con tratamiento en los tres grupos de estudio. Los datos representan la media \pm E.S. CT (n=4), HFD (n=4) y HFD+HB-ATV-8 (n=3). * $p < 0.5$.

5.2 Peso corporal

En la Figura 4 puede observarse que hay un incremento de peso con respecto al tiempo en todos los grupos experimentales. Sin embargo, no hay diferencias significativas entre grupos ($p_{t0}=0.50$, $p_{t15}=0.79$, $p_{t30}=0.59$, $p_{t45}=0.69$ y $p_{t60}=0.17$).

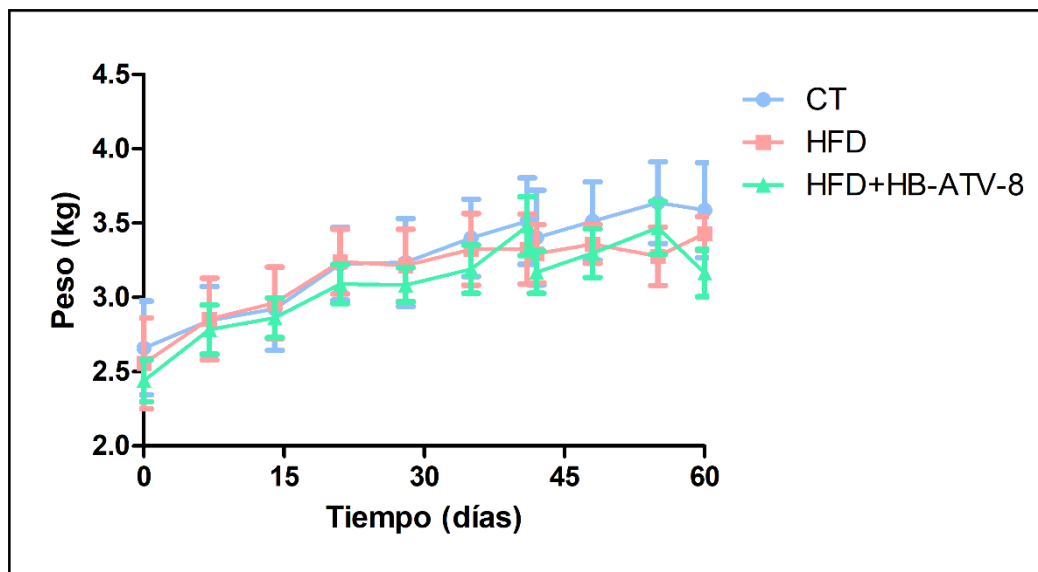


Figura 4. Registro del peso en todos los grupos experimentales a lo largo de 60 días. Peso. Los datos para representar la media \pm E.S. CT (n=4), HFD (n=4) y HFD+HB-ATV-8 (n=3). * $p<0.05$

5.3 La vacuna HB-ATV-8 modifica el perfil de lípidos en conejos con dieta alta en grasa

Para conocer el efecto de la vacuna HB-ATV-8 en el metabolismo lipídico se realizó un perfil de lípidos en suero, en el cual se observa que los grupos alimentados con la dieta alta en grasa presentan concentraciones séricas de colesterol total (Figura 5A), C-HDL (Figura 5B), C-LDL (Figura 5C) y triglicéridos (Figura 5D) elevadas con respecto al control, características propias de un perfil proaterogénico. Siendo

estadísticamente diferentes los niveles de colesterol total del grupo HFD en comparación con el grupo CT en los tiempos 15 y 60 ($p=0.023$ y $p=0.012$, respectivamente) (Figura 5A). De igual forma, la concentración de C-LDL en el grupo HFD presenta aumentos significativos a los 15, 45 y 60 días con respecto al grupo CT ($p=0.032$, $p=0.012$ y $p=0.017$, respectivamente).

En relación con el grupo de conejos vacunados, los niveles de colesterol total (Figura 5A) y C-LDL (Figura 5B) son inferiores en comparación con el grupo HFD (19% y 26%, respectivamente) a los 60 días, aunque tales diferencias no son estadísticamente significativas en ambos casos. Los niveles de C-HDL no se vieron modificados con la aplicación de la vacuna en ningún tiempo de medición en comparación con el grupo HFD ($p_{t0}=0.89$, $p_{t15}=0.10$, $p_{t30}=0.46$, $p_{t45}=0.64$ y $p_{t60}=0.69$). De forma similar a los niveles de colesterol total y C-LDL, la administración de la vacuna HB-ATV-8 reduce de manera notable las concentraciones séricas de triglicéridos ya que se observó una reducción del 41% t_{30} , 53% t_{45} y 57% t_{60} con respecto al grupo HFD. En ese sentido, mientras que el grupo de conejos HFD presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto al control a partir del día 30 ($p_{t30} = 0.017$, $p_{t45} = 0.027$ y $p_{t60}=0.012$), el grupo de conejos con la misma dieta alta en grasa pero que recibieron el tratamiento con la vacuna HB-ATV-8 presenta una tendencia a restablecer los niveles de triglicéridos observados en el grupo control, de tal forma que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p_{t30} = 0.3$, $p_{t45} = 0.578$ y $p_{t60}=0.388$). Este último resultado es particularmente interesante ya que una característica distintiva de la EHGNA es la acumulación de triglicéridos en el citoplasma de los hepatocitos (Kawano & Cohen, 2013) y, además, aunque los triglicéridos no son considerados

directamente aterogénicos, si representan un biomarcador importante del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares debido a su asociación con lipoproteínas pro aterogénicas (Talayero & Sacks, 2011). En conjunto estos resultados muestran que la administración de la vacuna HB-ATV-8 resulta en una reducción del perfil lipídico proaterogénico.

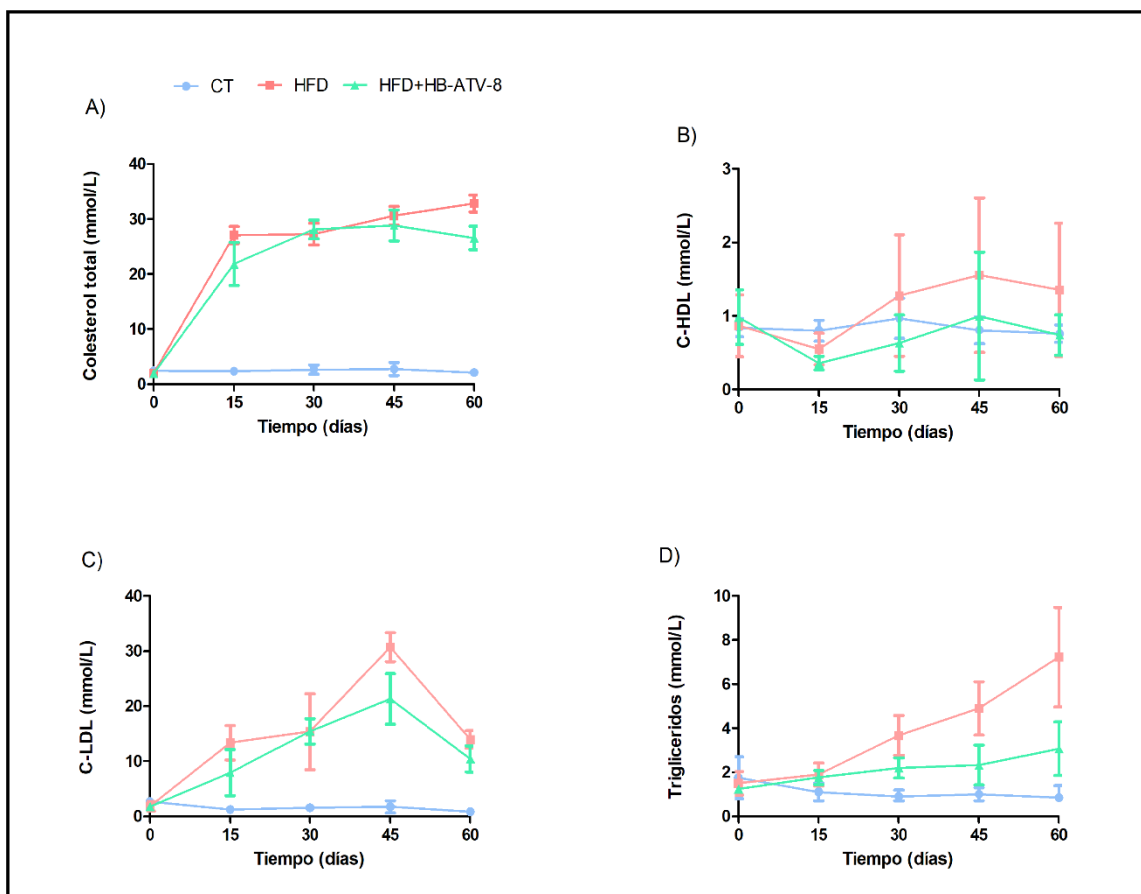


Figura 5. Efecto de la vacuna HB-ATV-8 sobre el perfil sérico de lípidos durante 60 días. **A)** Colesterol total; **B)** C-HDL; **C)** C-LDL y **D)** triglicéridos. Se presentan los tres grupos de estudio CT (n=4), HFD (n=4) y HFD+HB-ATV-8 (n=3). Los datos representan la media \pm E.S. *p<0.05.

5.4 Proteínas asociadas al metabolismo de lípidos

En la figura 6 puede observarse que la dieta alta en grasa provoca una disminución significativa de la concentración de PPAR α con respecto al control ($p= 0.006$). Por otra parte, y de manera interesante, no se observa una reducción estadísticamente significativa ($p= 0.631$) en el grupo de conejos que también fueron alimentados con la dieta alta en grasa, pero fueron tratados la vacuna HB-ATV-8 en contraste con los niveles del grupo control. Además, se observa que los niveles de ABCA1 aumentan considerablemente con la dieta alta en grasa, tanto en el grupo tratado con la vacuna ($p= 0.0044$) como en el que no fue tratado ($p= 0.0002$) con respecto al grupo control. Y, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo HFD y HFD* ($p= 0.4337$).

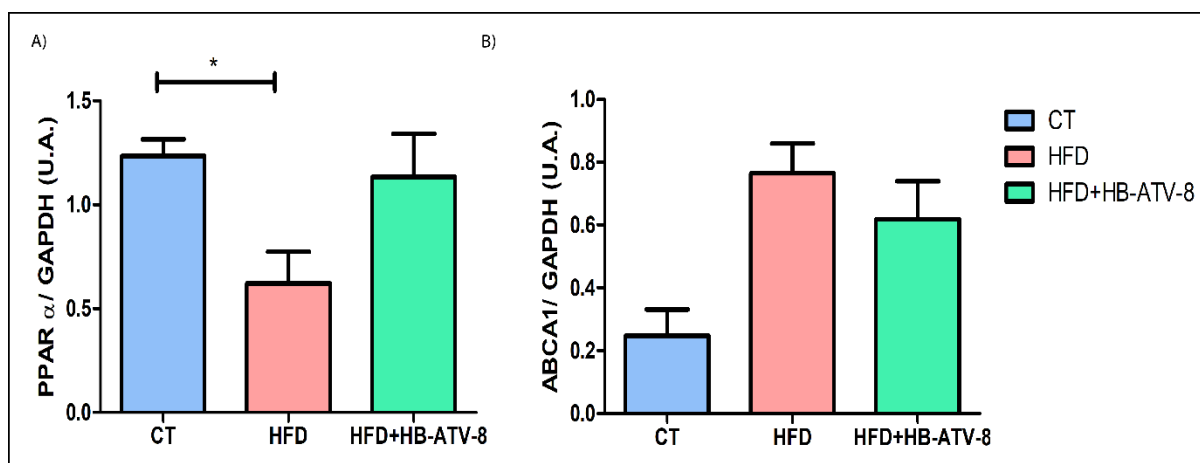


Figura 6. Efecto de la vacuna HB-ATV-8 sobre los niveles hepáticos de las proteínas PPAR α y ABCA1. Relación semicuantitativa entre la concentración de PPAR α y ABCA1 con respecto a GAPDH. Se presentan los tres grupos de estudio CT (n=4), HFD (n=4) y HFD+HB-ATV-8 (n=3). Los datos representan la media \pm E.S. * $p<0.05$.

5.5 La vacuna HB-ATV-8 reduce la lesión aterosclerótica y el desarrollo de hígado graso no alcohólico

Para determinar el efecto de la vacuna HB-ATV-8 en el desarrollo de la aterosclerosis inducida por la dieta alta en grasa se realizó un análisis histológico del cayado aórtico de cada grupo, observando que la vacuna HB-ATV-8 disminuye las lesiones ateroscleróticas.

En primer lugar, los conejos del grupo CT no muestran lesiones (Fig. 7, paneles izquierdos). La figura 7A correspondiente al grupo CT, permite observar características propias de una arteria en condiciones normales tales como, el endotelio conservado, sin presencia de lípidos ni de células espumosas. Mediante microscopía de dos fotones y generación de segundas armónicas es posible distinguir de forma más clara una arquitectura ordenada de las fibras colágenas en la túnica media (Figuras 7B-CT y 7C-CT). Mientras que, las arterias del conejo HFD presentan un desarrollo evidente de la placa ateromatosa, en donde se distingue el incremento de las VSMC en la túnica íntima, con abundante presencia de lípidos y células espumosas (Fig. 7 A-HFD). Además, en los paneles correspondientes a las imágenes tomadas con microscopía de dos fotones y segundas armónicas puede distinguirse que las fibras colágenas están desordenadas (Fig. 7B-HFD y 7C-HFD respectivamente). Con relación a lo anterior, el 50% de los conejos en el grupo HFD muestra una lesión aterosclerótica tipo II y el otro 50 % tipo III (Fig. 7D). En contraste, la arteria del conejo alimentado con la dieta HFD, pero tratado con la vacuna HB-ATV-8 muestra una arquitectura semejante al del grupo CT. También se observa una reducción de la progresión de la placa ateromatosa y en el número de VSMC en comparación con el conejo HFD, el endotelio se encuentra conservado y

se observan pocos depósitos aislados de lípidos y células espumosas (Fig. 7A-HFD+HB-ATV-8). Adicionalmente cabe destacar que las fibras colágenas del grupo vacunado no tienen un grado de desorden similar al del grupo HFD a pesar de haber recibido la misma dieta alta en grasa. El 100 % de los conejos en el grupo HFD + HB-ATV-8 presentan lesión tipo I (Figura 7 D).

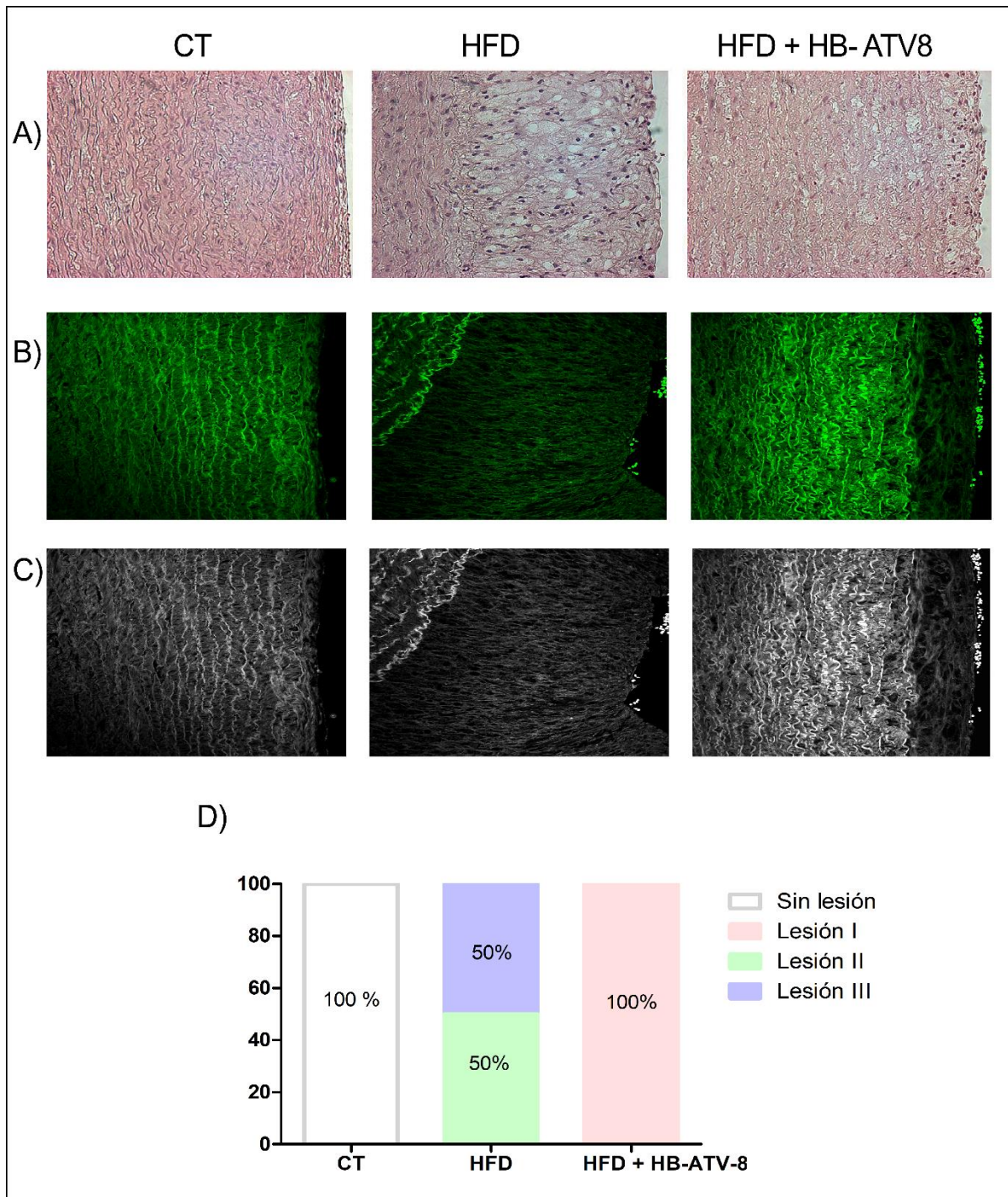


Figura 7. Reducción de la lesión aterosclerótica por la aplicación de la vacuna HFD-ATV-8. La vacuna HB-ATV-8 reduce las lesiones ateroscleróticas en conejos alimentados con una dieta alta en grasa. CT (n=4), HFD (n=4) y HFD+HB-ATV-8 (n=3). Las imágenes del panel A (H&E) fueron tomadas por microscopía óptica. Las imágenes del panel B fueron tomadas por microscopía de excitación dos fotones y las del panel C por microscopía de generación de segundas armónicas. D) Representación en porcentaje del número de conejos con lesión aterosclerótica de acuerdo con la clasificación de la Asociación Americana del Corazón (Stary *et al.* 1994; Stary *et al.* 1995).

También se realizó una evaluación de las alteraciones presentes en el tejido hepático inducidas por la dieta alta en grasa. En la figura 8 pueden observarse tres imágenes representativas de cada grupo con una magnificación 20X para H&E y 40X para la microscopía de dos fotones y generación de segundas armónicas. En las imágenes correspondientes al grupo control se puede apreciar la apariencia de un tejido sano, sin algún tipo de lesión, en donde no hubo acumulación de grasa ni hepatocitos con balonamiento ni inflamación (Fig. 8A-CT). En contraste las imágenes del tejido hepático del conejo HFD denotan esteatosis microvesicular y la mayoría de los hepatocitos que rodean la vena central están balonados (Fig.8A-HFD). En las figuras 8D, 8E, 8F y 8G se aprecia que, al evaluar la mayoría de los parámetros, los conejos del grupo HFD presentaron con mayor severidad la EHGNA, en comparación con los conejos que recibieron la vacuna HB-ATV-8. De forma interesante, la microscopía de dos fotones y segundas armónicas revelan una disminución importante del grado de fibrosis en el grupo de conejos HFD+HB-ATV-8 (Fig. 8B y 8C-HFD+HB-ATV-8).

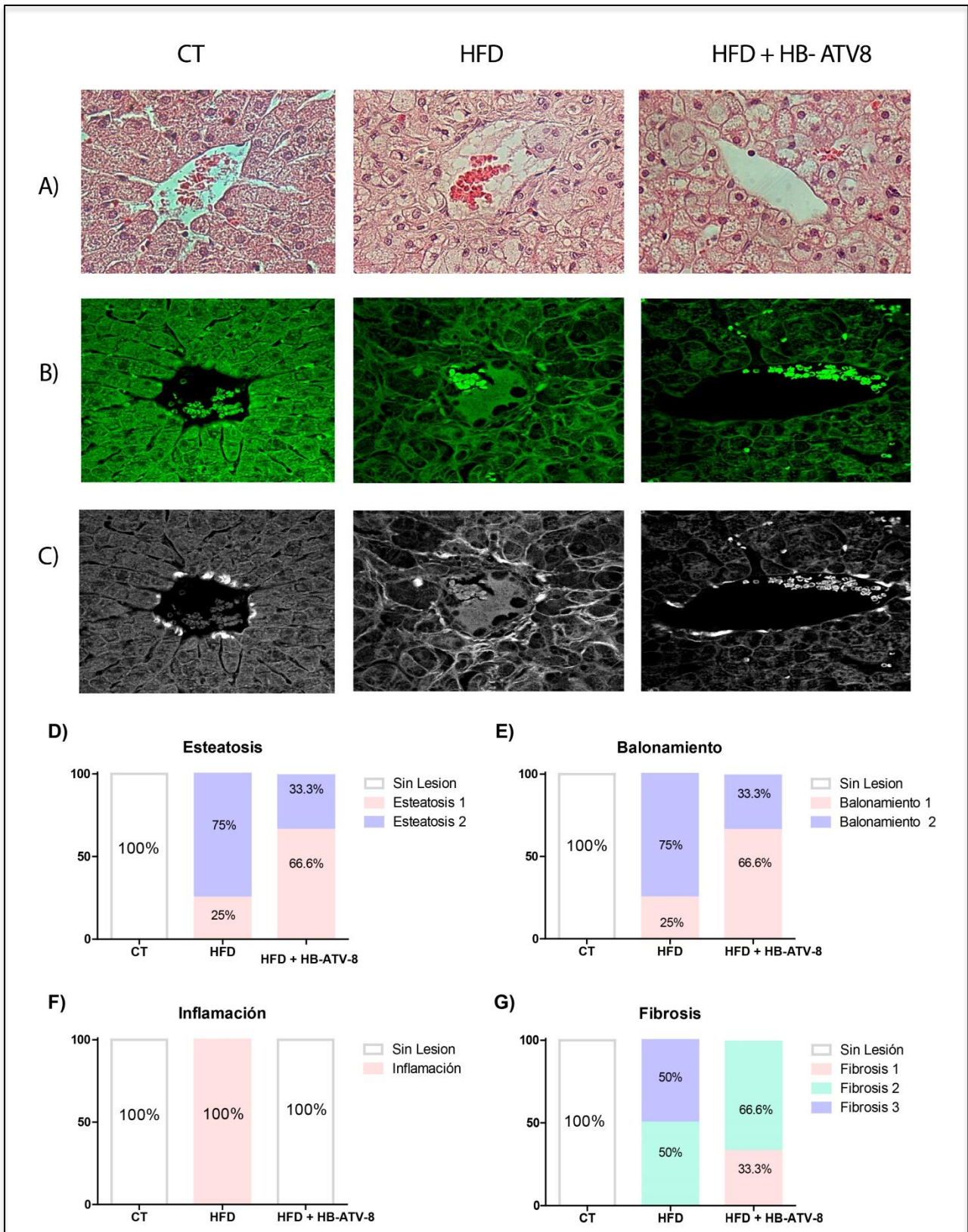


Figura 8. Reducción de la lesión hepática por la aplicación de la vacuna HFD-ATV-8. CT (n=4), HFD (n=4) y HFD+HB-ATV-8 (n=3). Las imágenes del panel A (H&E) fueron tomadas por microscopía óptica. Las imágenes del panel B fueron tomadas por microscopía de excitación dos fotones y las del panel C por microscopía de generación de segundas armónicas. D, E, F y G Representación en porcentaje del número de conejos con lesiones hepáticas: esteatosis, balonamiento, inflamación y fibrosis de acuerdo con la clasificación de Kleiner (Kleiner *et al.* 2005).

6. DISCUSIÓN

En el presente estudio evaluamos el efecto de la vacuna HB-ATV-8, que ha sido diseñada y producida en nuestro laboratorio, en un modelo de aterosclerosis en conejo. Encontramos que la administración de la vacuna es capaz de producir anticuerpos específicos anti CETP, así como una reducción en la actividad de la proteína. También observamos modificaciones en el perfil lipídico y en proteínas involucradas en el metabolismo del mismo, favoreciendo la disminución del perfil proaterogénico. En consecuencia, observamos una disminución evidente a nivel histológico de las lesiones aórtica y hepática.

La vacuna HB-ATV-8 mostró ser eficaz en la producción de anticuerpos anti CETP. Esto puede deberse a que la vacuna consiste en un péptido formado sólo por once residuos de aminoácidos, por lo que presenta únicamente un sitio de reconocimiento por parte del sistema inmunológico. Además, el péptido está conjugado en una nanopartícula micelar formada por lípidos, de los cuales el 54% provienen de las membranas de *Archaeobacteria* y su uso ha demostrado que no sólo funcionan como adyuvantes humorales, sino que también promueven una fuerte respuesta inmune de las células T citotóxicas caracterizadas por la memoria a largo plazo (Krishnan *et al.*, 2000). En conjunto estas características le confieren a la preparación vacunal una alta especificidad contra el blanco terapéutico.

Con respecto a lo anterior, la vacuna está dirigida contra la región (H468 a S496) del carboxilo terminal la cual hemos demostrado que es fundamental en la actividad de transferencia de lípidos de CETP, por lo que se espera que la administración de la misma produzca alteraciones en la actividad de la proteína. Al respecto, observamos una reducción en la actividad de CETP tras la administración de la vacuna.

Dado que existen varios estudios que asocian la inhibición de la actividad de CETP con un estado lipídico antiaterogénico, nosotros decidimos evaluar el efecto que tiene la administración de la vacuna HB-ATV-8 sobre el perfil de lípidos y la concentración de proteínas asociadas al metabolismo lipídico. Encontramos que el grupo de conejos alimentados con la dieta alta en grasa, pero tratados con la vacuna HB-ATV-8 presentan niveles disminuidos de colesterol total, C-LDL y triglicéridos. A pesar de que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos HFD y HFD+HB-ATV-8 en los niveles de colesterol total, C-LDL y C-HDL y triglicéridos, debido posiblemente al tamaño reducido de muestras por grupo, es relevante que hay una clara tendencia a la disminución de los niveles de éstos aún en presencia del reto metabólico que representa la dieta alta en grasa para el organismo de los conejos. En el caso de los triglicéridos, los niveles en el grupo HFD + HB-ATV-8 disminuyeron hasta en un 57% en contraste con el grupo HFD. Estos resultados son importantes debido a que se ha demostrado que la elevación de los niveles posprandiales de triglicéridos está estrechamente relacionada con la acumulación de tejido adiposo visceral, degeneración del tejido hepático por la presencia de grasa, daños en la íntima arterial y disfunción endotelial, así como con la EHGNA (Matsumoto *et al.*, 2014; Fukuda *et al.*, 2013; Kawai *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2013; Sung *et al.*, 2012; Tomizawa *et al.*, 2014). Además, los niveles elevados de triglicéridos son un marcador de la abundante presencia de lipoproteínas y remanentes de lipoproteínas ricas en triglicéridos (LDL y VLDL), y son estas partículas las que están involucradas directamente en el desarrollo de aterosclerosis (Havel, 1990; Krauss, 1998). Por tal motivo, se ha reconocido que el tratamiento contra la hipertrigliceridemia es importante para reducir el riesgo de aterosclerosis y las enfermedades relacionadas (Matsumoto *et al.*, 2014). Tomando en consideración los antecedentes mencionados, podemos

considerar que la vacuna HB-ATV-8 promueve un menor riesgo a la aterosclerosis y posiblemente a la EHGNA debido a la disminución en los niveles de cantidad de lipoproteínas aterogénicas (LDL y VLDL) a través de la reducción significativa de triglicéridos.

Puesto que el proceso aterosclerótico y la EHGNA son patologías caracterizadas por el depósito de lípidos y posterior estado inflamatorio, que generan un daño tisular, se realizó un análisis histológico del impacto de la dieta alta en grasa en el cayado aórtico y el tejido hepático, así como el efecto de la vacuna sobre las lesiones. Encontramos que en tejidos de conejos tratados con la vacuna hay una reducción considerable de la severidad de la lesión aterosclerótica, el resultado más evidente es la disminución del grosor de la túnica íntima, siendo semejante al del grupo CT, incluso hay una reducción de depósitos de lípidos y células espumosas en la placa ateromatosa. Es notorio el contraste de estos resultados con los tejidos de los conejos que únicamente recibieron la dieta alta en grasa, ya que de forma evidente la dieta alta en grasa induce un daño severo en la aorta, hay un aumento significativo del grosor de la túnica íntima y es posible observar un claro depósito de lípidos y la presencia de VSMC en la misma. Además, se sabe que durante la aterogénesis las VSMC migran de la túnica media hacia la íntima y son responsables de la síntesis y aumento de colágeno (Newby & Zaltsman, 1999). Los macrófagos presentes en la lesión liberan metaloproteinasas de la matriz (MMP) que provocan la proteólisis del colágeno y la apoptosis de las VSMC (Newby & Zaltsman, 1999), lo que produce fibras colágenas delgadas y desorganizadas haciendo inestable a la placa (Deguchi *et al.*, 2006). Las imágenes obtenidas por microscopía de excitación de dos fotones y generación de segundas armónicas permiten observar la disposición de las fibras colágenas de los tejidos analizados,

sin necesidad de un marcaje fluorescente. Esto debido a que la estructura fibrilar de las colágenas provoca una variación en la incidencia de luz que generan fluorescencia al ser excitadas con un láser pulsado, propio de este tipo de microscopía. Es destacable que la disposición de las fibras colágenas en los conejos tratados con la vacuna HB-ATV-8 es similar a la de los conejos control, pues se observa una arquitectura ordenada en comparación con el grupo dieta alta en grasa donde es muy evidente el daño en la pared arterial anteriormente descrito.

Con respecto al efecto de la vacuna HB-ATV-8 sobre la progresión de la EHGNA, la microscopía de dos fotones hace evidente la disminución de la fibrosis, lo cual puede estar explicado por varios estudios que indican que la acumulación de colesterol y ácidos grasos libres dentro de los hepatocitos pueden causar directamente toxicidad celular o actuar de manera proinflamatoria o fibrótica (Wobser *et al.*, 2009; Tous *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2008; Kleemann *et al.*, 2007). Basado en lo anterior, el hecho de que en este estudio hubo una disminución significativa de los niveles de triglicéridos, colesterol total y C-LDL en los conejos que recibieron tratamiento con la vacuna, existe la posibilidad de que la vacuna promueva un cambio en la síntesis de colágenas y por ende de fibrosis. Tomando en cuenta estos resultados, es importante realizar una evaluación de los mecanismos moleculares asociados a la síntesis, degradación y remodelación de proteínas de matriz extracelular. Especialmente del colágeno tipo I y III que predominan en los vasos sanguíneos.

Por otra parte, se ha demostrado que una mayor actividad de CETP está estrechamente relacionada con la esteatosis hepática en pacientes con síndrome metabólico (Lucero *et al.*, 2011). Además, la sobreexpresión de CETP en ratones

acelera el desarrollo de hígado graso (Blake *et al.*, 1994). Por lo tanto, en este estudio, demostramos que una reducción de la actividad de CETP, debida posiblemente a la vacuna HB-ATV-8, disminuyó la esteatosis microvesicular inducida por la dieta alta en grasa administrada a conejos.

Ahora bien, se sabe que las dietas altas en grasa y el colesterol juegan un papel importante en la regulación de los genes implicados en el metabolismo lipídico (Recinos *et al.*, 2004). Ya que los ácidos grasos pueden regular la expresión génica controlando la abundancia o la actividad de algunos factores de transcripción (Jump *et al.*, 2005). De hecho, diversos factores de transcripción han sido identificados como blancos en la regulación de ácidos grasos, entre los cuales se encuentran PPAR α (Schoonjans *et al.*, 1996). Su función principal es incrementar la transcripción y expresión de proteínas y enzimas necesarias para el transporte y beta oxidación tales como FABP, FAT, CPT-1, entre otras (Everett *et al.*, 2000). Por lo que fallas en la actividad de PPAR α puede reducir la catabolización de los mismos resultando en esteatosis hepática. En el presente trabajo, observamos que la dieta alta en grasa promueve una reducción en la concentración de PPAR α . En contraste la administración de la vacuna HB-ATV- 8 provocó una tendencia al aumento de los niveles de PPAR α , acercándose a los niveles observados en el grupo control. Además, la importancia de PPAR α en la aterosclerosis es evidente por su regulación transcripcional de las vías involucradas en la dislipidemia aterogénica, la remodelación de la matriz extracelular, el flujo de colesterol, la trombogenicidad y la inflamación (Zandbergen & Plutzky, 2007). Por lo tanto, nuestros datos sugieren que la vacuna HB-ATV-8 puede prevenir la aterosclerosis y la EHGNA inducida por la dieta alta en grasa de una manera dependiente de PPAR α , probablemente a través de un aumento de la oxidación de ácidos grasos

(LP *et al.*, 2003; LP *et al.*, 2004). Por otra parte, se ha demostrado que PPAR α también induce la expresión del gen que codifica para ABCA1, una proteína transportadora que controla el flujo de salida de colesterol mediado por apoAI en los macrófagos e hígado (Chinetti *et al.*, 2001). En concordancia con otros estudios hemos encontrado que los niveles de proteína ABCA1 aumentan significativamente en el hígado de los conejos alimentados con la dieta alta en grasa (HFD y HFD + HB-ATV-8) (Wellington *et al.*, 2002; Singaraja *et al.*, 2001). Para este caso, no observamos influencia alguna de la vacuna HB-ATV-8 en la expresión de ABCA1.

La aterosclerosis es la principal causa de mortalidad y morbilidad en México (Frostegård, 2013; INEGI, 2018). Además del componente genético y del estilo de vida, los desórdenes en el metabolismo de lípidos son uno de sus principales factores de riesgo. De hecho, se ha demostrado que el hígado graso no alcohólico puede estar implicado en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Silaghi *et al.*, 2015). Se ha sugerido que el alto grado de estrés oxidante debido a la oxidación de ácidos grasos estimulada por la esteatosis en el hígado puede provocar la liberación de moléculas pro-aterogénicas y la activación de macrófagos (Bieghs *et al.*, 2012). Además, el papel aterogénico de la inflamación hepática se ve respaldado por el hecho de que los pacientes con hígado graso no alcohólico presentan aterosclerosis aumentada (Adams *et al.* 2005; Ekstedt *et al.* 2006; Targher *et al.*, 2010). En la actualidad, se han buscado blancos terapéuticos con el fin de regular el metabolismo de lípidos. Tratamientos como las estatinas únicamente han alcanzado a reducir hasta un 30% el riesgo de la enfermedad cardiovascular (Brugts. *et al.*, 2009). Por lo que se han diseñado fármacos para modificar la actividad de diversas proteínas asociadas al metabolismo lipídico. Dentro de estas proteínas se encuentra CETP, los inhibidores de CETP han sido

ampliamente utilizados debido a que su inhibición se asocia con un menor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Fernández, 2017). Estas moléculas han sido probadas en estudios clínicos buscando demostrar su eficacia y seguridad. Sin embargo, varios de estos fármacos han presentado efectos adversos graves, incluyendo incremento en la presión arterial e incluso la muerte por lo que han sido prohibidos para el uso humano (Mohammadpour & Akhlaghi, 2015). Algunos de estos fármacos además de inhibir a CETP, también tiene actividad mineralocorticoide que desencadenan hiperaldosteronismo (Barter *et al.*, 2007; Ríos *et al.*, 2015). En este estudio demostramos que la vacuna HB-ATV-8 anti CETP tiene el potencial para reducir el perfil de lípidos proaterogénico. Además de ejercer un efecto sobre la concentración de PPAR α , que como se mencionó anteriormente es un factor de transcripción clave para la beta oxidación de ácidos grasos. En conjunto, estos resultados se ven reflejados de forma evidente en la reducción de las lesiones aórtica y hepática. Y de forma interesante, hemos reconocido el efecto de la vacuna sobre proteínas de matriz extracelular, pues observamos una reducción del daño fibrótico en la EHGNA posiblemente asociado a una modulación de los mecanismos moleculares implicados en la síntesis y degradación de proteínas de matriz extracelular.

Cabe mencionar que la vacuna HB-ATV-8, ha sido probada con éxito en un modelo de aterosclerosis en cerdo, demostrando que la aplicación intranasal de la vacuna reduce de forma importante las lesiones aórtica y hepática, así como una atenuación favorable de la fibrosis (Gutiérrez *et al.*, 2018). Nuestros resultados obtenidos en el presente estudio refuerzan los obtenidos en dicho trabajo. Además, lo observado en los cerdos resulta destacable debido a que la aterogénesis es un proceso lento en dicho modelo y aun así se lograron observar efectos significativos

sobre ambas patologías (Pas *et al.*, 2004). En contraste, en el presente estudio el hecho de haber utilizado al conejo como modelo, ha permitido evaluar los efectos de la vacuna de forma más aguda, pues los conejos son sensibles a las dietas suplementadas con colesterol y desarrollan rápidamente hipercolesterolemia severo (>2000 mg /dL) que conduce a aterosclerosis aórtica prominente y la EHGNA (Fan *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018). Por lo que este estudio confirma el efecto benéfico de la vacuna sobre una dieta alta en grasa. En conclusión, sobre la base de estos hallazgos, se comprobó que la vacuna HB-ATV-8 genera anticuerpos específicos contra el carboxilo terminal de CETP, sitio al que se le ha atribuido la función de transferencia de CETP, disminuyendo las lesiones ateroscleróticas y hepáticas. Por lo tanto, puede ser considerada un agente terapéutico potencial en el proceso de aterogénesis y en el desarrollo de la EHGNA.

Derivado de los resultados de este trabajo se pretende evaluar el efecto de la vacuna sobre proteínas asociadas al metabolismo de lípidos tales como LDLR, SRB1, SREBP1 y CD36. De igual forma, analizaremos los posibles mecanismos del impacto de la vacuna sobre la remodelación de la matriz extracelular y de las proteínas que intervienen en este proceso.

REFERENCIAS.

1. Adams, L. A., Angulo, P., & Lindor, K. D. (2005). Nonalcoholic fatty liver disease. *Cmaj*, 172(7), 899-905.
2. Aizawa, Y. (2015). Chronic hepatitis C virus infection and lipoprotein metabolism. *World Journal of Gastroenterology*, 21(36), 10299. doi:10.3748/wjg.v21.i36.10299
3. Akdim, F., Stroes, E. S., Sijbrands, E. J., Tribble, D. L., Trip, M. D., Jukema, J. W., Flaim, J.D., Su, J., Yu, R., Baker, B.F., Kastelein, W., Kastelein, J.P & Wedel, M. K. (2010). Efficacy and safety of mipomersen, an antisense inhibitor of apolipoprotein B, in hypercholesterolemic subjects receiving stable statin therapy. *Journal of the American College of Cardiology*, 55(15), 1611-1618.
4. Angulo, P. (2002, 04). Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *New England Journal of Medicine*, 346(16), 1221-1231. doi:10.1056/nejmra011775
5. Ansell, B. J., Watson, K. E., Fogelman, A. M., Navab, M., & Fonarow, G. C. (2005). High-Density Lipoprotein Function. *JournFielding, P. E., & Fielding, C. J. (2002). Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. Biochemistry in Lipids, Lipoproteins and Membranes. DE Vance and JE Vance, editors. Elsevier, Boston, 527-552.* *Journal of the American College of Cardiology*, 46(10), 1792-1798. doi:10.1016/j.jacc.2005.06.080
6. Argo, C. K., & Caldwell, S. H. (2009). Epidemiology and Natural History of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Clinics in Liver Disease*, 13(4), 511-531. doi: 10.1016/j.cld.2009.07.005
7. Azen, S. P., Mack, W. J., Cashin-Hemphill, L., LaBree, L., Shircore, A. M., Selzer, R. H. & Hodis, H. N. (1996). Progression of coronary artery disease predicts clinical coronary events: long-term follow-up from the Cholesterol Lowering Atherosclerosis Study. *Circulation*, 93(1), 34-41.
8. Badimon, J. J., Ibanez, B., & Cimmino, G. (2009). Genesis and Dynamics of Atherosclerotic Lesions: Implications for Early Detection. *Cerebrovascular Diseases*, 27(1), 38-47. doi:10.1159/000200440
9. Badimon, L., & Vilahur, G. (2014). Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *Journal of Internal Medicine*, 276(6), 618-632. doi:10.1111/joim.12296
10. Bally, R. A., & Gribnau, T. C. J. (1989). Some aspects of the chromogen 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine as hydrogen donor in a horseradish peroxidase assay. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 27(10), 791-796.
11. Bang, C. N., & Okin, P. M. (2014). Statin treatment, new-onset diabetes, and other adverse effects: a systematic review. *Current cardiology reports*, 16(3), 461.
12. Barter, P. J., Brewer Jr, H. B., Chapman, M. J., Hennekens, C. H., Rader, D. J., & Tall, A. R. (2003). Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(2), 160-167
13. Barter, P. J., Caulfield, M., Eriksson, M., Grundy, S. M., Kastelein, J. J., Komajda, M. & Shear, C. L. (2007). Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *New England journal of medicine*, 357(21), 2109-2122.
14. Bentzon, J. F., Otsuka, F., Virmani, R., & Falk, E. (2014). Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circulation research*, 114(12), 1852-1866.
15. Bieghs, V., Rensen, P. C., Hofker, M. H., & Shiri-Sverdlov, R. (2012). NASH and atherosclerosis are two aspects of a shared disease: central role for macrophages. *Atherosclerosis*, 220(2), 287-293.

16. Bitounis, D., Fanciullino, R., Iliadis, A., & Ciccolini, J. (2012). Optimizing druggability through liposomal formulations: new approaches to an old concept. *ISRN pharmaceuticals*, 2012.
17. Blake, W. L., Ulrich, R. G., Marotti, K. R., & Melchior, G. W. (1994). The development of fatty liver is accelerated in transgenic mice expressing cynomolgus monkey cholesteryl ester transfer protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 205(2), 1257-1263.
18. Bortolini, M., Wright, M. B., Bopst, M., & Balas, B. (2013). Examining the safety of PPAR agonists—current trends and future prospects. *Expert opinion on drug safety*, 12(1), 65-79.
19. Brousseau, M. E., Schaefer, E. J., Wolfe, M. L., Bloedon, L. T., Digenio, A. G., Clark, R. W. & Rader, D. J. (2004). Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol. *New England Journal of Medicine*, 350(15), 1505-1515.
20. Browning, J. D., & Horton, J. D. (2004). Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *The Journal of clinical investigation*, 114(2), 147-152.
21. Brugts, J. J., Yetgin, T., Hoeks, S. E., Gotto, A. M., Shepherd, J., Westendorp, R. G. J. & Van Domburg, R. (2009). The benefits of statins in people without established cardiovascular disease but with cardiovascular risk factors: meta-analysis of randomised controlled trials. *Bmj*, 338, b2376.
22. Byrne, C. D. (2013). Ectopic fat, insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease. *Proceedings of the Nutrition Society*, 72(4), 412-419.
23. Cannon, C. P., Shah, S., Dansky, H. M., Davidson, M., Brinton, E. A., Gotto Jr, A. M. & Zafarino, J. (2010). Safety of anacetrapib in patients with or at high risk for coronary heart disease. *New England Journal of Medicine*, 363(25), 2406-2415.
24. Cao, G., Beyer, T. P., Zhang, Y., Schmidt, R. J., Chen, Y. Q., Cockerham, S. L. & Mantlo, N. B. (2011). Evacetrapib is a novel, potent, and selective inhibitor of cholesteryl ester transfer protein that elevates HDL cholesterol without inducing aldosterone or increasing blood pressure. *Journal of lipid research*, 52(12), 2169-2176.
25. Cederberg, H., Stančáková, A., Yaluri, N., Modi, S., Kuusisto, J., & Laakso, M. (2015). Increased risk of diabetes with statin treatment is associated with impaired insulin sensitivity and insulin secretion: a 6-year follow-up study of the METSIM cohort. *Diabetologia*, 58(5), 1109-1117.
26. Charles, M. A., & Kane, J. P. (2012). New molecular insights into CETP structure and function: A review. *Journal of Lipid Research*, 53(8), 1451-1458. doi:10.1194/jlr.r027011
27. Chinetti, G., Lestavel, S., Bocher, V., Remaley, A. T., Neve, B., Torra, I. P. & Brewer, H. B. (2001). PPAR- α and PPAR- γ activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nature medicine*, 7(1), 53.
28. Clark, R. W., Sutfin, T. A., Ruggeri, R. B., Willauer, A. T., Sugarman, E. D., Magnus-Aryitey, G. & Perlman, M. E. (2004). Raising high-density lipoprotein in humans through inhibition of cholesteryl ester transfer protein: an initial multidose study of torcetrapib. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(3), 490-497.
29. Cohen DE. (2002). Pathogenesis of gallstones. In: Zakim D, Boyer TD, editors. *Hepatology: A Textbook of Liver Disease*. 4 ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders. pp. 1713–1743.
30. Cox, R. A. (1990). Cholesterol, Triglycerides, and Associated Lipoproteins.
31. Cuchel, M., Meagher, E. A., du Toit Theron, H., Blom, D. J., Marais, A. D., Hegele, R. A. & Stefanutti, C. (2013). Efficacy and safety of a microsomal triglyceride transfer protein inhibitor in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a single-arm, open-label, phase 3 study. *the Lancet*, 381(9860), 40-46.
32. Davis, R. A. (1999). Cell and molecular biology of the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins by the liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1440(1), 1-31.

33. Deguchi, J., Aikawa, M., Tung, C., Aikawa, E., Kim, D., Ntziachristos, V., . . . Libby, P. (2006). Inflammation in Atherosclerosis. *Circulation*, *114*(1), 55-62. doi:10.1161/circulationaha.106.61
34. Donnelly, K. L., Smith, C. I., Schwarzenberg, S. J., Jessurun, J., Boldt, M. D., & Parks, E. J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of clinical investigation*, *115*(5), 1343-1351.
35. Ekstedt, M., Franzén, L. E., Mathiesen, U. L., Holmqvist, M., Bodemar, G., & Kechagias, S. (2007). Statins in non-alcoholic fatty liver disease and chronically elevated liver enzymes: a histopathological follow-up study. *Journal of hepatology*, *47*(1), 135-141.
36. Endo, A. (2010). A historical perspective on the discovery of statins. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, *86*(5), 484-493. doi:10.2183/pjab.86.484
37. Everett, L., Galli, A., & Crabb, D. (2000). The role of hepatic peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in health and disease. *Liver: Review Article*, *20*(3), 191-199.
38. Fadaei, R., Poustchi, H., Meshkani, R., Moradi, N., Golmohammadi, T., & Merat, S. (2018). Impaired HDL cholesterol efflux capacity in patients with non-alcoholic fatty liver disease is associated with subclinical atherosclerosis. *Scientific reports*, *8*(1), 11691.
39. Fan, J., Kitajima, S., Watanabe, T., Xu, J., Zhang, J., Liu, E., & Chen, Y. E. (2015). Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine. *Pharmacology & therapeutics*, *146*, 104-119.
40. Feingold, K. R., & Grunfeld, C. (2000). Introduction to Lipids and Lipoproteins.
41. Feingold, K. R., & Grunfeld, C. (2018). Introduction to lipids and lipoproteins. In *Endotext [Internet]*. MDText. com, Inc.
42. Fernandez-Ruiz, I. (2017). Dyslipidaemia: Is CETP inhibition a viable therapeutic strategy?. *Nature Reviews Cardiology*, *14*(7), 382.
43. Fielding, P. E., & Fielding, C. J. (2002). Dynamics of lipoprotein transport in the human circulatory system. In *New Comprehensive Biochemistry* (Vol. 36, pp. 527-552). Elsevier.
44. Filippatos, T. D., & Elisaf, M. S. (2017). Evacetrapib and cardiovascular outcomes: reasons for lack of efficacy. *Journal of thoracic disease*, *9*(8), 2308.
45. Francis, M. C., & Frohlich, J. J. (2001). Coronary artery disease in patients at low risk—apolipoprotein AI as an independent risk factor. *Atherosclerosis*, *155*(1), 165-170.
46. Freeman, M. W., & Walford, G. A. (2016). Lipoprotein Metabolism and the Treatment of Lipid Disorders. *Endocrinology: Adult and Pediatric*. doi:10.1016/b978-0-323-18907-1.00041-x
47. Frostegård, J. (2013). Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. *BMC Medicine*, *11*(1). doi:10.1186/1741-7015-11-117
48. Fukuda, N., Ito, T., Ohwada, K., & Fujii, J. (2013). Upregulation of fatty acid synthesis and the suppression of hepatic triglyceride lipase as a direct cause of hereditary postprandial hypertriglyceridemia in rabbits. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, *53*(2), 114-121. doi:10.3164/jcbrn.13-21
49. Gaist, D., Jeppesen, U., Andersen, M., Rodriguez, L. G., Hallas, J., & Sindrup, S. H. (2002). Statins and risk of polyneuropathy: a case-control study. *Neurology*, *58*(9), 1333-1337.
50. Garcia-Gonzalez, V., Delgado-Coello, B., Pérez-Torres, A., & Mas-Oliva, J. (2015). Reality of a vaccine in the prevention and treatment of atherosclerosis. *Archives of Medical Research*, *46*(5), 427-437.
51. García-González, V., Gutiérrez-Quintanar, N., Mendoza-Espinosa, P., Brocos, P., Piñero, Á., & Mas-Oliva, J. (2014). Key structural arrangements at the C-terminus domain of CETP suggest a potential mechanism for lipid-transfer activity. *Journal of structural biology*, *186*(1), 19-27.

52. Gaudio, E., Nobili, V., Franchitto, A., Onori, P., & Carpino, G. (2012). Nonalcoholic fatty liver disease and atherosclerosis. *Internal and Emergency Medicine*, 7(S3), 297-305. doi:10.1007/s11739-012-0826-5
53. Gauthier, A., Lau, P., Zha, X., Milne, R., & McPherson, R. (2005). Cholesteryl ester transfer protein directly mediates selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters by the liver. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 25(10), 2177-2184.
54. Giammanco, A., Cefalà¹, A. B., Noto, D., & Aversa, M. R. (2015). The pathophysiology of intestinal lipoprotein production. *Frontiers in Physiology*, 6. doi:10.3389/fphys.2015.00061
55. Gisterå, A., & Hansson, G. K. (2017). The immunology of atherosclerosis. *Nature Reviews Nephrology*, 13(6), 368-380. doi:10.1038/nrneph.2017.51
56. Gomez-Dominguez, E., Gisbert, J. P., Moreno-Monteaquedo, J. A., Garcia-Buey, L., & Moreno-Otero, R. (2006). A pilot study of atorvastatin treatment in dyslipidemic, non-alcoholic fatty liver patients. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 23(11), 1643-1647.
57. Gotto Jr, A. M. (2001). Low high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor in coronary heart disease: a working group report. *Circulation*, 103(17), 2213-2218.
58. Griffin, B. A. (2013). Lipid metabolism. *Surgery (Oxford)*, 31(6), 267-272. doi:10.1016/j.mpsur.2013.04.006
59. Gurfinkel, R., & Joy, T. R. (2011). Anacetrapib: hope for CETP inhibitors?. *Cardiovascular therapeutics*, 29(5), 327-339.
60. Gutiérrez-Vidal, R., Delgado-Coello, B., Méndez-Acevedo, K. M., Calixto-Tlacomulco, S., Damián-Zamacona, S., & Mas-Oliva, J. (2018). Therapeutic intranasal vaccine HB-ATV-8 prevents atherogenesis and non-alcoholic fatty liver disease in a pig model of atherosclerosis. *Archives of medical research*, 49(7), 456-470.
61. Haas, J. T., Francque, S., & Staels, B. (2016). Pathophysiology and mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. *Annual review of physiology*, 78, 181-205.
62. Hamilton, J. A., & Deckelbaum, R. J. (2007). Crystal structure of CETP: New hopes for raising HDL to decrease risk of cardiovascular disease? *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(2), 95-97. doi:10.1038/nsmb0207-95
63. Havel, R. J. (1990). Approach to the patient with hyperlipidemia. *The medical clinics of North America*, 66(2), 319-333.
64. Hegele, R. A. (1997). The genetic basis of atherosclerosis. *International Journal of Clinical and Laboratory Research*, 27(1), 2-13.
65. Hesler, C. B., Swenson, T. L., & Tall, A. R. (1987). Purification and characterization of a human plasma cholesteryl ester transfer protein. *Journal of Biological Chemistry*, 262(5), 2275-2282.
66. Inazu, A., Brown, M. L., Hesler, C. B., Agellon, L. B., Koizumi, J., Takata, K. & Tall, A. R. (1990). Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *New England Journal of Medicine*, 323(18), 1234-1238.
67. INEGI. (2018). Características de las defunciones registradas en México durante 2017. Comunicado de prensa núm. 525/18 31 de octubre de 2018.
68. Insull Jr, W. (2009). The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *The American journal of medicine*, 122(1), S3-S14.
69. Ip, E., Farrell, G. C., Robertson, G., Hall, P., Kirsch, R., & Leclercq, I. (2003). Central role of PPAR α -dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology*, 38(1), 123-132.
70. Ip, E., Farrell, G., Hall, P., Robertson, G., & Leclercq, I. (2004). Administration of the potent PPAR α agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology*, 39(5), 1286-1296.

71. Iqbal, J., Qarni, A. A., Hawwari, A., Alghanem, A. F., & Ahmed, G. (2018). Metabolic Syndrome, Dyslipidemia and Regulation of Lipoprotein Metabolism. *Current Diabetes Reviews*, 14(5), 427-433. doi:10.2174/1573399813666170
72. Jump, D. B., Botolin, D., Wang, Y., Xu, J., Christian, B., & Demeure, O. (2005). Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *The Journal of nutrition*, 135(11), 2503-2506.
73. Jun, M., Zhu, B., Tonelli, M., Jardine, M. J., Patel, A., Neal, B. & Perkovic, V. (2012). Effects of fibrates in kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American College of Cardiology*, 60(20), 2061-2071.
74. Kawai, T., Ito, T., Ohwada, K., Mera, Y., Matsushita, M., & Tomoike, H. (2006). Hereditary Postprandial Hypertriglyceridemic Rabbit Exhibits Insulin Resistance and Central Obesity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(12), 2752-2757. doi: 10.1161/01.atv.0000245808.1
75. Kawano, Y., & Cohen, D. E. (2013). Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology*, 48(4), 434-441. doi:10.1007/s00535-013-0758-5
76. Kim, D., Kim, W. R., Kim, H. J., & Therneau, T. M. (2013). Association between noninvasive fibrosis markers and mortality among adults with nonalcoholic fatty liver disease in the United States. *Hepatology*, 57(4), 1357-1365.
77. Kindel, T., Lee, D. M., & Tso, P. (2010). The mechanism of the formation and secretion of chylomicrons. *Atherosclerosis Supplements*, 11(1), 11-16.
78. Kleemann R, Verschuren L, van Erk MJ, Nikolsky Y, Cnubben NH, et al. (2007) Atherosclerosis and liver inflammation induced by increased dietary cholesterol intake: a combined transcriptomics and metabolomics analysis. *Genome Biol* 8: R200.
79. Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W. & Yeh, M. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 41(6), 1313-1321.
80. Koivuniemi, A., Vuorela, T., Kovanen, P. T., Vattulainen, I., & Hyvönen, M. T. (2012). Lipid exchange mechanism of the cholesteryl ester transfer protein clarified by atomistic and coarse-grained simulations. *PLoS computational biology*, 8(1), e1002299.
81. Koizumi, J., Mabuchi, H., Yoshimura, A., Michishita, I., Takeda, M., Itoh, H. & Takeda, R. (1985). Deficiency of serum cholesteryl-ester transfer activity in patients with familial hyperalphalipoproteinaemia. *Atherosclerosis*, 58(1-3), 175-186.
82. Kosmas, C. E., & Frishman, W. H. (2015). New and Emerging LDL Cholesterol-Lowering Drugs. *American journal of therapeutics*, 22(3), 234-241.
83. Krauss, R. M. (1998). Atherogenicity of triglyceride-rich lipoproteins. *The American journal of cardiology*, 81(4), 13B-17B.
84. Krishnan, L., Sad, S., Patel, G. B., & Sprott, G. D. (2000). Archaeosomes induce long-term CD8+ cytotoxic T cell response to entrapped soluble protein by the exogenous cytosolic pathway, in the absence of CD4+ T cell help. *The Journal of Immunology*, 165(9), 5177-5185.
85. Kwak, M. S., & Kim, D. (2018). Non-alcoholic fatty liver disease and lifestyle modifications, focusing on physical activity. *The Korean journal of internal medicine*, 33(1), 64.
86. Lewis, G. F., & Rader, D. J. (2005). New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circulation research*, 96(12), 1221-1232
87. Lieber, C. S., & Rubin, E. (1969). Alcoholic Fatty Liver. *New England Journal of Medicine*, 280(13), 705-708. doi:10.1056/nejm196903272801306
88. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.
89. Luc, G., Bard, J. M., Ferrieres, J., Evans, A., Amouyel, P., Arveiler, D. & Ducimetière, P. (2002). Value of HDL cholesterol, apolipoprotein AI, lipoprotein AI, and lipoprotein

- AI/A-II in prediction of coronary heart disease: the PRIME study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 22(7), 1155-1161.
90. Lucero, D., Zago, V., López, G. I., Graffigna, M., López, G. H., Fainboim, H. & Schreier, L. (2011, 03). Does non-alcoholic fatty liver impair alterations of plasma lipoproteins and associated factors in metabolic syndrome? *Clinica Chimica Acta*, 412(7-8), 587-592. doi: 10.1016/j.cca.2010.12.012
 91. Ludwig, J., McGILL, D. B., & Lindor, K. D. (1997). Nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 12(5), 398-403.
 92. Ludwig, J., Viggiano, T. R., McGill, D. B., & Oh, B. J. (1980). Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 55, No. 7, pp. 434-438).
 93. Lüscher, T. F., Taddei, S., Kaski, J. C., Jukema, J. W., Kallend, D., Münzel, T. & Deanfield, J. E. (2012). Vascular effects and safety of dalcetrapib in patients with or at risk of coronary heart disease: the dal-VESEL randomized clinical trial. *European heart journal*, 33(7), 857-865.
 94. Lüscher, T. F., & Lüscher, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, 407(6801), 233-241. doi:10.1038/35025203
 95. Ma KL, Ruan XZ, Powis SH, Chen Y, Moorhead JF, et al. (2008) Inflammatory stress exacerbates lipid accumulation in hepatic cells and fatty livers of apolipoprotein E knockout mice. *Hepatology* 48: 770–781.
 96. Madhu, K., Manjunath, C., Rawal, J., & Irani, P. (2013). Atherogenic dyslipidemia. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 17(6), 969. doi:10.4103/2230-8210.122600
 97. Maranhao, R., & Leite, A. (2015). Development of anti-atherosclerosis therapy based on the inflammatory and proliferative aspects of the disease. *Current pharmaceutical design*, 21(9), 1196-1204.
 98. Mas-Oliva, J., Alonso, A.L., 2010. System for the quantification of the cholesterol ester transfer protein in biological and synthetic samples. US patent 7,749,721.
 99. Matsumoto, S., Gotoh, N., Hishinuma, S., Abe, Y., Shimizu, Y., Katano, Y., & Ishihata, A. (2014). The role of hypertriglyceridemia in the development of atherosclerosis and endothelial dysfunction. *Nutrients*, 6(3), 1236-1250.
 100. Matsuzawa, Y., Yamashita, S., Kameda, K., Kubo, M., Tarui, S., & Hara, I. (1984). Marked hyper-HDL2-cholesterolemia associated with premature corneal opacity: a case report. *Atherosclerosis*, 53(2), 207-212.
 101. Matteoni, C. A., Younossi, Z. M., Gramlich, T., Boparai, N., Liu, Y. C., & McCullough, A. J. (1999). Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*, 116(6), 1413-1419.
 102. Mendez-Sanchez, N., Cruz-Ramon, V., Ramirez-Perez, O., Hwang, J., Barranco-Fragoso, B., & Cordova-Gallardo, J. (2018). New aspects of lipotoxicity in nonalcoholic steatohepatitis. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 2034.
 103. Mohammadpour, A. H., & Akhlaghi, F. (2013). Future of cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibitors: a pharmacological perspective. *Clinical pharmacokinetics*, 52(8), 615-626.
 104. Morehouse, L. A., Sugarman, E. D., Bourassa, P. A., Sand, T. M., Zimetti, F., Gao, F. & Milici, A. J. (2007). Inhibition of CETP activity by torcetrapib reduces susceptibility to diet-induced atherosclerosis in New Zealand White rabbits. *Journal of lipid research*, 48(6), 1263-1272.
 105. Neuschwander-Tetri, B. A., & Caldwell, S. H. (2003). Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology*, 37(5), 1202-1219. doi:10.1053/jhep.2003.50193
 106. Newby, A. C., & Zaltsman, A. B. (1999). Fibrous cap formation or destruction—the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovascular research*, 41(2), 345-360.
 107. Nicholls, S. J., Brewer, H. B., Kastelein, J. J., Krueger, K. A., Wang, M. D., Shao, M. & Nissen, S. E. (2011). Effects of the CETP inhibitor evacetrapib administered as

- monotherapy or in combination with statins on HDL and LDL cholesterol: a randomized controlled trial. *Jama*, 306(19), 2099-2109.
108. Nissen, S. E., & Wolski, K. (2007). Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *New England Journal of Medicine*, 356(24), 2457-2471.
 109. Novo, S., Failla, G., Liquori, M., Longo, B., Gennaro, C., Corda, M. & Strano, A. (1991). Vascular damage in arterial hypertension: its noninvasive assessment. *Cardiologia (Rome, Italy)*, 36(12 Suppl 1), 323-337.
 110. Odden, M. C., Pletcher, M. J., Coxson, P. G., Thekkethala, D., Guzman, D., Heller, D. & Bibbins-Domingo, K. (2015). Cost-effectiveness and population impact of statins for primary prevention in adults aged 75 years or older in the United States. *Annals of internal medicine*, 162(8), 533-541.
 111. Oliveira, H. C., & de Faria, E. C. (2011). Cholesteryl ester transfer protein: the controversial relation to atherosclerosis and emerging new biological roles. *IUBMB life*, 63(4), 248-257.
 112. Pas, M. F., Visscher, A. H., & Greef, K. H. (2004). Molecular genetic and physiologic background of the growth hormone–IGF-I axis in relation to breeding for growth rate and leanness in pigs. *Domestic Animal Endocrinology*, 27(3), 287-301. doi: 10.1016/j.domaniend.2004.06.00
 113. Pawlak, M., Lefebvre, P., & Staels, B. (2015). Molecular mechanism of PPAR α action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 62(3), 720-733. doi: 10.1016/j.jhep.2014.10.039
 114. Porstmann, T., Porstmann, B., Wietschke, R., Von Baehr, R., & Egger, E. (1985). Stabilization of the substrate reaction of horseradish peroxidase with o-phenylenediamine in the enzyme immunoassay. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 23(1), 41-44.
 115. Rashid, S., Sniderman, A., Melone, M., Brown, P. E., Otvos, J. D., Mente, A., Yusuf, S. (2014). Elevated cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity, a major determinant of the atherogenic dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease in South Asians. *European Journal of Preventive Cardiology*, 22(4), 468-477. doi:10.1177/2047487314528461
 116. Recinos III, A., Carr, B. K., Bartos, D. B., Boldogh, I., Carmical, J. R., Belalcazar, L. M., & Brasier, A. R. (2004). Liver gene expression associated with diet and lesion development in atherosclerosis-prone mice: induction of components of alternative complement pathway. *Physiological genomics*.
 117. Rensen, P. C., & Havekes, L. M. (2006). Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(4), 681-684. doi: 10.1161/01.atv.0000214979.
 118. Rios, F. J., Neves, K. B., Cat, A. N. D., Even, S., Palacios, R., Montezano, A. C., & Touyz, R. M. (2015). Cholesteryl ester-transfer protein inhibitors stimulate aldosterone biosynthesis in adipocytes through Nox-dependent processes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 353(1), 27-34.
 119. Rivera, V. J. (2001). Aspectos inmunológicos y moleculares de la arteriosclerosis. *Acta Med Colomb*, 26(4), 183-184.
 120. Robinson, J. G., Farnier, M., Krempf, M., Bergeron, J., Luc, G., Aversa, M. & Koren, M. J. (2015). Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *New England Journal of Medicine*, 372(16), 1489-1499.
 121. Rosenson, R. S. (2004). Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. *Atherosclerosis*, 173(1), 1-12.
 122. Russo, M. W., Hoofnagle, J. H., Gu, J., Fontana, R. J., Barnhart, H., Kleiner, D. E. & Bonkovsky, H. L. (2014). Spectrum of statin hepatotoxicity: Experience of the drug-induced liver injury network. *Hepatology*, 60(2), 679-686.
 123. Sabatine, M. S., Giugliano, R. P., Wiviott, S. D., Raal, F. J., Blom, D. J., Robinson, J. & Scott, R. (2015). Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *New England Journal of Medicine*, 372(16), 1500-1509.

124. Sakai, N., Yamashita, S., Hirano, K. I., Ishigami, M., Arai, T., Kobayashi, K. & Matsuzawa, Y. (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.
125. Saku, K., Zhang, B., Noda, K., & PATROL Trial Investigators. (2011). Randomized head-to-head comparison of pitavastatin, atorvastatin, and rosuvastatin for safety and efficacy (quantity and quality of LDL). *Circulation Journal*, 1104131198-1104131198.
126. Samuel, V. T., Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2010). Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *The Lancet*, 375(9733), 2267-2277.
127. Schomberg, D., Salzman, M., & Stephan, D. (1993). *Enzyme handbook* 7. EC, 1(1.7), 1-6.
128. Schoonjans, K., Staels, B., & Auwerx, J. (1996). The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1302(2), 93-109.
129. Schulze, P. C., & Lee, R. T. (2005). Oxidative stress and atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports*, 7(3), 242-248.
130. Shapiro, M. D., & Fazio, S. (2017). PCSK9 and atherosclerosis-lipids and beyond. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, RV17003.
131. Silaghi, C. A., Silaghi, H., Craciun, A. E., Farcas, A., Colosi, H. A., Cosma, D. T. & Georgescu, C. E. (2015). Age, abdominal obesity, and glycated hemoglobin are associated with carotid atherosclerosis in type 2 diabetes patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Medical ultrasonography*, 17(3), 300-307.
132. Singaraja, R. R., Bocher, V., James, E. R., Clee, S. M., Zhang, L. H., Leavitt, B. R. & Yang, Y. Z. (2001). Human ABCA1 BAC transgenic mice show increased high density lipoprotein cholesterol and ApoA1-dependent efflux stimulated by an internal promoter containing liver X receptor response elements in intron 1. *Journal of biological chemistry*, 276(36), 33969-33979.
133. Singh, R. B., Mengi, S. A., Xu, Y. J., Arneja, A. S., & Dhalla, N. S. (2002). Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process. *Experimental & Clinical Cardiology*, 7(1), 40.
134. Sørensen, H. T., Thulstrup, A. M., Mellempkjar, L., Jepsen, P., Christensen, E., Olsen, J. H., & Vilstrup, H. (2003). Long-term survival and cause-specific mortality in patients with cirrhosis of the liver: a nationwide cohort study in Denmark. *Journal of clinical epidemiology*, 56(1), 88-93.
135. Soumian, S., Albrecht, C., Davies, A., & Gibbs, R. (2005). ABCA1 and atherosclerosis. *Vascular Medicine*, 10(2), 109-119. doi:10.1191/1358863x05vm593ra
136. Speliotes, E. K., Massaro, J. M., Hoffmann, U., Vasan, R. S., Meigs, J. B., Sahani, D. V. & Fox, C. S. (2010). Fatty liver is associated with dyslipidemia and dysglycemia independent of visceral fat: the Framingham Heart Study. *Hepatology*, 51(6), 1979-1987.
137. Starley, B. Q., Calcagno, C. J., & Harrison, S. A. (2010). Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: A weighty connection. *Hepatology*, 51(5), 1820-1832. doi:10.1002/hep.23594
138. Stary, H. C. (1994). Changes in components and structure of atherosclerotic lesions developing from childhood to middle age in coronary arteries. In *Arteriosclerosis* (pp. 17-32). Steinkopff.
139. Stary, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull Jr, W. & Wissler, R. W. (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 92(5), 1355-1374.
140. Stary, H. C., Chandler, A. B., Glagov, S., Guyton, J. R., Insull Jr, W., Rosenfeld, M. E., ... & Wissler, R. W. (1994). A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the

- Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 89(5), 2462-2478.
141. Stein, E. A., Dufour, R., Gagne, C., Gaudet, D., East, C., Donovan, J. M. & McGowan, M. (2012). Apolipoprotein B synthesis inhibition with mipomersen in heterozygous familial hypercholesterolemia: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial to assess efficacy and safety as add-on therapy in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 126(19), 2283-2292.
 142. Stein, E. A., Stroes, E. S., Steiner, G., Buckley, B. M., Capponi, A. M., Burgess, T. & Kastelein, J. J. (2009). Safety and tolerability of dalcetrapib. *The American journal of cardiology*, 104(1), 82-91.
 143. Sung, K. C., Wild, S. H., Kwag, H. J., & Byrne, C. D. (2012). Fatty liver, insulin resistance, and features of metabolic syndrome: relationships with coronary artery calcium in 10,153 people. *Diabetes care*, 35(11), 2359-2364.
 144. Tabas, I. (2000). Cholesterol and phospholipid metabolism in macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1529(1-3), 164-174.
 145. Talayero, B. G., & Sacks, F. M. (2011). The Role of Triglycerides in Atherosclerosis. *Current Cardiology Reports*, 13(6), 544-552. doi:10.1007/s11886-011-0220-3
 146. Tardif, J. C., Gregoire, J., L'Allier, P. L., Anderson, T. J., Bertrand, O., & Reeves, F. Title LM, Alfonso F, Schampaert E, Hassan A. (2004) Effects of the acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibitor avasimibe on human atherosclerotic lesions. *Circulation*, 110, 3372-3377.
 147. Targher, G., Day, C. P., & Bonora, E. (2010). Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *New England Journal of Medicine*, 363(14), 1341-1350.
 148. Tavafi, M. (2013). Complexity of diabetic nephropathy pathogenesis and design of investigations. *Journal of renal injury prevention*, 2(2), 59.
 149. Taylor, F., Huffman, M. D., Macedo, A. F., Moore, T. H., Burke, M., Smith, G. D. & Ebrahim, S. (2013). Statins for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi:10.1002/14651858.cd004816
 150. Tomizawa, M., Kawanabe, Y., Shinozaki, F., Sato, S., Motoyoshi, Y., Sugiyama, T. & Sueishi, M. (2014). Elevated levels of alanine transaminase and triglycerides within normal limits are associated with fatty liver. *Experimental and therapeutic medicine*, 8(3), 759-762.
 151. Tomizawa, M., Kawanabe, Y., Shinozaki, F., Sato, S., Motoyoshi, Y., Sugiyama, T. & Sueishi, M. (2014). Triglyceride is strongly associated with nonalcoholic fatty liver disease among markers of hyperlipidemia and diabetes. *Biomedical reports*, 2(5), 633-636.
 152. Tous M, Ferre N, Camps J, Riu F, Joven J (2005) Feeding apolipoprotein E-knockout mice with cholesterol and fat enriched diets may be a model of non-alcoholic steatohepatitis. *Mol. Cell Biochem* 268: 53–58.
 153. Trieb, M., Horvath, A., Birner-Gruenberger, R., Spindelboeck, W., Stadlbauer, V., Taschler, U. & Marsche, G. (2016, 07). Liver disease alters high-density lipoprotein composition, metabolism and function. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(7), 630-638. doi:10.1016/j.bbalip.2016.04.013
 154. Tsimihodimos, V., Bairaktari, E., Elisaf, M., Bargman, J. M., & Lipscombe, J. (2002). Fibrate-induced increase in serum urea and creatinine levels. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 17(4), 682-682.
 155. Vaziri, N. D. (2009). Innovation in the Treatment of Uremia: Proceedings from the Cleveland Clinic Workshop: Causes of Dysregulation of Lipid Metabolism in Chronic Renal Failure. In *Seminars in dialysis* (Vol. 22, No. 6, pp. 644-651). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
 156. Verbeek, R., Stoekenbroek, R. M., & Hovingh, G. K. (2015). PCSK9 inhibitors: Novel therapeutic agents for the treatment of hypercholesterolemia. *European journal of pharmacology*, 763, 38-47.

157. Visser, M. E., Akdim, F., Tribble, D. L., Nederveen, A. J., Kwoh, T. J., Kastelein, J. J. & Stroes, E. S. (2010). Effect of apolipoprotein-B synthesis inhibition on liver triglyceride content in patients with familial hypercholesterolemia. *Journal of lipid research*, 51(5), 1057-1062.
158. Walldius, G., & Jungner, I. (2006). The apoB/apoA-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy—a review of the evidence. *Journal of internal medicine*, 259(5), 493-519.
159. Wang, Y., Zhang, P., Su, X., Yu, Q., Chen, Y., Guan, H. & Fan, J. (2018). Establishment of a novel non-alcoholic fatty liver disease model using cholesterol-fed rabbits with reference to the potential role of endoplasmic reticulum stress. *Molecular medicine reports*, 18(3), 2898-2904.
160. Waters, D., Craven, T. E., & Lespérance, J. (1993). Prognostic significance of progression of coronary atherosclerosis. *Circulation*, 87(4), 1067-1075.
161. Wellington, C. L., Walker, E. K., Suarez, A., Kwok, A., Bissada, N., Singaraja, R. & Francone, O. (2002). ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. *Laboratory investigation*, 82(3), 273.
162. Williams, C. D., Stengel, J., Asike, M. I., Torres, D. M., Shaw, J., Contreras, M. & Harrison, S. A. (2011). Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology*, 140(1), 124-131.
163. Wobser, H., Dorn, C., Weiss, T. S., Amann, T., Bollheimer, C., Büttner, R. & Hellerbrand, C. (2009). Lipid accumulation in hepatocytes induces fibrogenic activation of hepatic stellate cells. *Cell research*, 19(8), 996.
164. Yasui, K., Hashimoto, E., Komorizono, Y., Koike, K., Arai, S., Imai, Y. & Kawata, S. (2011). Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 9(5), 428-433.
165. Zandbergen, F., & Plutzky, J. (2007). PPAR α in atherosclerosis and inflammation. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1771(8), 972-982. doi:10.1016/j.bbalip.2007.04.021
166. Zannis, V. I., Chroni, A., & Krieger, M. (2006). Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *Journal of molecular medicine*, 84(4), 276-294
167. Zárate, A., Manuel-Apolinar, L., Basurto, L., De la Chesnaye, E., & Saldívar, I. (2016). Colesterol y aterosclerosis. Consideraciones históricas y tratamiento. *Archivos de cardiología de México*, 86(2), 163-169.

BIOMEDICAL

Therapeutic Intranasal Vaccine HB-ATV-8 Prevents Atherogenesis and Non-alcoholic Fatty Liver Disease in a Pig Model of Atherosclerosis

Roxana Gutiérrez-Vidal,^a Blanca Delgado-Coello,^a Kevin Manuel Méndez-Acevedo,^{a,b} Sandra Calixto-Tlacomulco,^a Salvador Damián-Zamacona,^c and Jaime Mas-Oliva^a

^aDepartamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

^bMax Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin, Germany

^cBioextracto, S.A. de C.V., Ciudad de México, México

Received for publication June 13, 2018; accepted January 22, 2019 (ARCMED_2018_143).

Background and Aims. Atherosclerosis as an inflammatory disease involved in the etiology of cardiovascular disease worldwide, in our days demands an array of different therapeutic approaches in order to soon be able to visualize an effective prevention. Based on an immunotherapeutic approach, we designed a non-invasive vaccine (HB-ATV-8), contained in a micellar nanoparticle composed of lipids and a peptide segment derived from the C-terminus of the cholesterol-ester transfer protein (CETP). Now we extend our successful proof of concept from the rabbit to a porcine model and investigated its effect in an attempt to undoubtedly establish the efficacy of vaccination in a model closer to the human.

Methods. A preclinical trial was designed to study the efficacy of vaccine HB-ATV-8 in pigs (Large White × Landrace). Male experimental animals were fed with standard diet (control), high fat diet (HFD) or the same HFD but treated with HB-ATV-8 (HFD + Vaccine) applied nasally for up to 7 months. All biochemical and enzymatic analyses were performed in peripheral venous blood and thoracic aorta and liver samples examined using conventional, two-photon excitation and second harmonic generation microscopy to identify atherosclerotic and hepatic lesions. mRNA concentrations for *KLF2*, *ACTA2*, *SOD1*, *COL1A1* genes and protein levels for PPAR α and ABCA1 were quantified in aorta and liver respectively using qPCR and Western blot analysis.

Results. The administration of vaccine HB-ATV-8 induced anti-CETP IgG antibodies and reduced atherosclerotic and hepatic lesions promoted by the high fat diet. In addition, plasma triglyceride levels of vaccine treated pigs fed the HFD were similar to those of control group, in contrast to high concentrations reached with animals exclusively fed with HFD. Moreover, HFD promotes a tendency to decrease hepatic PPAR α levels and increase in aorta gene expression of *KLF2*, *ACTA2*, *SOD1* and *COL1A1*, while vaccine application promotes recovery close to control values.

Conclusions. Vaccine HB-ATV-8 administration constitutes a promissory preventive approach useful in the control of atherogenesis and fatty liver disease. The positive results obtained, the non-invasive characteristics of the vaccine, the simple design employed in its conception and its low production cost, support the novelty of this therapeutic strategy designed to prevent the process of atherogenesis and control the development of fatty liver disease.

© 2019 IMSS. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Key Words: Atherogenesis, NAFLD, CETP, Nasal therapeutic vaccine, Porcine model.

Address reprint requests to: Jaime Mas-Oliva, Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-243, 04510 Ciudad de

México, México; Phone: (+52) (55) 5622-5584; FAX: (+52) (55) 5622-5611; E-mail: jmas@ifc.unam.mx

Introduction

Atherosclerosis is considered an inflammatory disease of the arterial wall that leads to cardiovascular disease (CVD), a common cause of death in the world according to WHO (1). Epidemiological studies have indicated that among the main risk factors associated with atherosclerosis there is an increased plasma level of low density lipoproteins cholesterol (LDL-C) associated to a decreased plasma concentration of high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) (2–4). Nevertheless, the relationship between the concentration of the different plasma lipoproteins and its probability to develop atherosclerosis, is still unclear (5,6). Considering that a reduction of CVD nowadays should be directed towards prevention rather than treatment, there has been an important effort to reinforce measures mainly directed to a change in lifestyle and eating habits in order to impede the onset of atherosclerosis (7,8). Although this approach should be considered central in all prevention efforts, it has contributed little to the prevention of CVD in most countries of the western world (9,10).

From the pharmacologic point of view, although statins for years have offered a way to decrease the plasma concentration of LDL-C by acting upon the biosynthesis pathway of cholesterol, this approach has not been successful enough based on the fact that the number of deaths related to CVD associated with atherosclerosis continues to increase (11,12). Therefore, treatment of atherosclerosis exclusively based on a cholesterol lowering therapy still has to prove a significant efficacy in reducing CVD.

In consequence, considering this process is characterized by the accumulation of fat in the intima of arteries where innate and adaptive immunity play an important role in the process of atherogenesis (13,14), modulation of the immune response has attracted attention as a strategy for its prevention and treatment helping to restore the homeostasis of lipid metabolism and counteract an inflammatory state (15,16). In this sense, the study of several possibilities that contemplate potential proteins have been identified for their ability to decrease morbidity and mortality associated with the progression of atherosclerosis (17,18). Among the diverse strategies employed, the cholesteryl-ester transfer protein (CETP) has been studied as a potential therapeutic target (19–21). CETP promotes the mobilization of cholesteryl-esters, triglycerides and phospholipids between HDL and lipoproteins containing apolipoprotein B (ApoB) (LDL and VLDL) (22). Corresponds to a 66–74 kDa plasma glycoprotein that is mainly expressed in the liver and secreted into the bloodstream where it becomes associated to lipoproteins (23). Population studies have shown that a decreased concentration and/or reduced CETP activity are associated with increased HDL-C levels (23–25), and although several studies present a less clear correlation (26,27), most of them show that subjects presenting a low plasma CETP concentration show a lower probability to

develop a cardiovascular event. In support of these findings, there are several reports indicating that a group of Japanese subjects while lacking CETP, present high HDL-C levels, low LDL-C levels and a low incidence of CVD (21,28).

The nasal administration of vaccine HB-ATV-8 composed of a micellar nanoparticle preparation has been designed as an immunotherapy to decrease CETP activity *in vivo*. Vaccine nanoparticles incorporate a 12 amino acid synthetic peptide corresponding to the C-terminal domain of CETP added of an N-terminal cysteine and a key mixture of lipids including caldarchaeol (29,30). As previously reported by us, the use of lysophosphatidylcholine allows the peptide to be kept in a key α -helical conformation (31,32), achieving at the same time structural stability and immunogenicity (33,34). Therefore, here we present an easy, cheap and efficient way to produce immunogenicity by applying a nanoparticulate preparation on the surface of the nasal mucosa.

Previous work from our group employing cholesterol-fed rabbits demonstrated that the nasal administration of vaccine HB-ATV-8 significantly reduces atherosclerotic lesions in the aorta, decreasing in parallel the presence of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in association with liver fibrotic lesions (16). This data might be considered important taking into account that CVD has been shown to be the leading cause of death in patients with NAFLD (35,36).

Now, before initiating the clinical phases for vaccine HB-ATV-8 to define safety and efficacy, we have extended our proof of concept to an animal model closer to human and studied the effect of therapeutic vaccine HB-ATV-8 in the pig as the experimental animal. Since the pig closely resembles the human in many traits including its anatomy, physiology, biochemistry and ultimately lifestyle (37–39), it has been considered for years an excellent non-primate model to study atherosclerosis. Therefore, the present study has been conducted for seven months employing pigs in an attempt to closely resemble conditions for the development of atherogenesis and fatty liver in the human.

Materials and Methods

Vaccine HB-ATV-8

Vaccine HB-ATV-8 (Patents US9539312, MX347400 B) contains as immunogen a synthetic peptide that corresponds to the carboxy-end amino acids H486–S496 of CETP (29,30). This peptide conjugated into a micellar nanoparticle system includes three of the four key residues that support lipid binding and transfer capacity (40). Micelles are composed of lipids derived from the cell membrane of *Thermus aquaticus*, mainly caldarchaeol. L- α -Phosphatidylcholine (PC) and 1-lauroyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine (lyso-C₁₂PC) (31,32). These components

have been shown function as humoral adjuvants promoting a strong cytotoxic T-cell immune response characterized by a long-term memory (41–43).

Experimental Animal Procedures

The present study includes fifteen castrated male pigs (Large White x Landrace) housed at the Specific Pig facility (Barcelona, Spain). All animal procedures and experiments were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH) and approved by the Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural, de la Generalitat de Catalunya, and the Specific Pig Ethics Committee. The qualified staff of Specific Pig fed the animals, nasally administered the vaccine, collected blood samples, monitored their well-being, sacrificed the animals and collected tissues at the end of the experiment.

Pigs were housed at 10–24°C on a 12:12 h light/dark cycle in 3.32 m² pens (3–4 animals/pen) with a dry, non-toxic, absorbent and pathogen-free bed. The animals had free access to water and fed once daily. At the beginning of the protocol the average weight of animals corresponded to 40 kg. The study was based on three experimental groups: *Control group* (CT, $n = 3$) corresponds to pigs fed a standard diet (Porcs creixement 1, Pinallet) composed of 15.8% calories from protein, 3.5% from carbohydrates, and 3.7% from fat were kept for 4 ($n = 1$) and 7 months ($n = 2$). *High-Fat Diet group* (HFD, $n = 6$) corresponds to pigs fed a high-fat atherogenic diet (HFD) (SDS, 824100 Porcine Western, Dietex, France) for 4 ($n = 4$) and 7 months ($n = 2$). The diet contained 44% calories from fat (15% lard and 2% cholesterol), 16% calories from protein, and 40% calories from carbohydrates. *High-Fat Diet + Vaccine HB-ATV-8 group* (HFD + Vaccine, $n = 6$) corresponds to pigs fed the high-fat atherogenic diet that received vaccine HB-ATV-8 (300 µg) nasally administered twice a week for 4 ($n = 4$) and 7 months ($n = 2$). Blood samples from each experimental animal were taken

every four weeks, and the experiment followed in two stages (4 and 7 months) as mentioned above where a certain number of animals at these specific times were anesthetized by intramuscular administration of ketamine (10–33 mg/kg) and midazolam (0.3–0.5 mg/kg), and euthanized with a sodium pentobarbital overdose (50–80 mg/kg, IV). Figure 1 summarizes the experimental protocol followed.

Plasma Lipid Profile and Enzyme Activity Measurements

Fifteen milliliters of peripheral venous blood were collected from the cranial vena cava at the beginning of the study and in a monthly basis till the end of the experiment. Serum and plasma-EDTA samples were used for biochemical and enzyme activity measurements, and the remaining biological material stored at –80°C until analysis. Zoologic Veterinaris laboratory (Barcelona, Spain) performed all lipid and enzymatic measurements. The lipid profile was measured by enzymatic methods following the manufacturers' instructions (Gernon platform, Ral, Spain). Plasma enzyme activity for aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase and total protein concentration were measured by standardized and commercially available colorimetric assays (Gernon platform).

Histological Examination

At the time of euthanasia, the thoracic aorta and liver samples from the right lobule were collected and a portion of these samples fixed in 10% formaldehyde. Samples were embedded in paraffin and stained with hematoxylin-eosin (H&E) and Masson's trichrome stain. The remaining tissue was frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C until further analysis. Histological results were obtained by reviewing five different optical fields of view where percentages represent the frequency of the characteristics observed within each group.

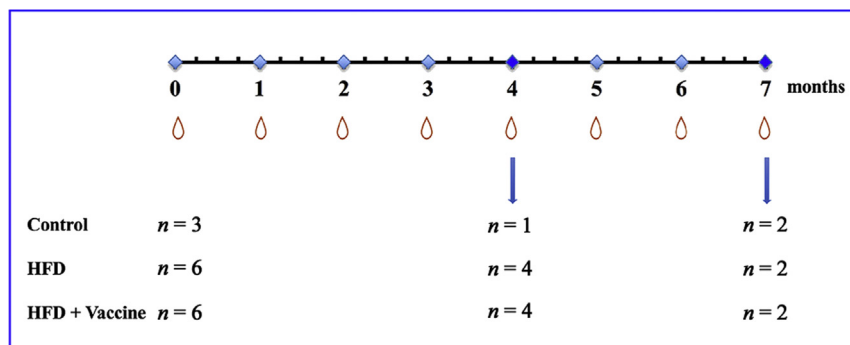


Figure 1. Experimental design. Control group (CT, $n = 3$); one animal from this group sacrificed at month 4 and the remaining two at month 7. High-fat diet group (HFD, $n = 6$); four animals from this group sacrificed at month 4 and the remaining two at month 7. High fat diet + vaccine treatment group (HFD + Vaccine, $n = 6$); four animals from this group sacrificed at month 4 and the remaining two at month 7. Blood samples were taken every month. HFD + vaccine group were administered with vaccine HB-ATV-8 twice a week.

Classification of atherosclerotic lesions was performed according to the guidelines of the American Heart Association (AHA) (44). The six aortic lesion types defined by the AHA are: (type I) isolated macrophage foam cells; (type II) intracellular lipid accumulation; (type III) type II changes and small extracellular lipid pools; (type IV) type III changes and presence of an extracellular lipid core; (type V) presence of a lipid core and a fibrotic layer or multiple lipid cores and fibrotic layers, areas of calcification; (type VI) all previous findings plus the presence of areas of hematoma/hemorrhage and thrombus.

Liver sections were evaluated considering histopathological characteristics for NAFLD: steatosis, inflammation, ballooning, and fibrosis (45,46) and data reported as presence or absence of these characteristics.

Two-photon Excitation Microscopy and Second-harmonic Generation Microscopy

Two-photon imaging was performed using a galvanometer-based scanning system LSM 710-Zeiss and a Ti: sapphire laser (Coherent) employing a wavelength of 850 nm (2.5% of laser power) for H&E stained aorta and liver slides. Second-harmonic generation imaging was performed using a wavelength of 900 nm (12% of laser power) and a BP 420–480 nm filter (Zeiss). Images were acquired using water immersion objectives; C-Apochromat 10x and W Plan-Apochromat 20x, with a 40x optical zoom for liver slices.

Anti-CETP Titer Determination

IgG antibody titer for CETP was measured by ELISA. Briefly, plates were coated with CETP synthetic peptide H486-S496, blocked and incubated with pig serum (1:100), a goat horseradish peroxidase-conjugate anti-pig IgG, and tetramethylbenzidine. OD was measured at 450 nm.

Protein Expression Analysis

Liver samples were homogenized in cold RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) supplemented with protease inhibitors (Roche, Rotkreuz, Switzerland). Total protein concentration (serum and liver extracts) was measured using the DC Protein Assay (Bio-Rad, CA, USA). Serum proteins were separated by SDS-PAGE using 8% gels and transferred to PVDF membranes (Immobilon-P, Millipore, MA, USA) to be analyzed by Western blot. Blots were incubated overnight with rabbit anti-CETP (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) or mouse anti-ACTB antibodies (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Also, membranes for liver extracts were incubated with mouse anti-PPAR α , anti-ABCA1 and anti-GAPDH antibodies (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Immunoreactive proteins were visualized with the Immobilon

Western Chemiluminiscent HRP reagent (Millipore, MA, USA). Blots were quantified using the Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) and results presented as the CETP/ACTB (β -actin) ratio for serum protein and PPAR α or ABCA1/GAPDH ratio for liver extracts.

Quantitative PCR Measurements

Total RNA was extracted from the thoracic aortas with Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). 1 μ g of total RNA was used to synthesize cDNA using the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, CA, USA) and cDNA diluted to perform qPCR experiments. Expression of Krüppel-like factor-2 (*KLF2*), smooth muscle alpha (α)-2 actin (*ACTA2*), superoxide dismutase 1 (*SOD1*), collagen type I alpha 1 (*COL1A1*) and the housekeeping gene *ACTB* was determined by qPCR using the PowerUp Sybr Green Master Mix 2X (Applied Biosystems, CA, USA) on an ABI PRISM 7000 Sequence Detection cyclor. Primer sequences are reported as supplementary material as well as relative levels of mRNA calculated as $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Supplementary Table 1).

Statistical Analysis

Data are expressed as mean \pm S.E.M. Statistical differences among study groups were calculated using ANOVA or Kruskal-Wallis tests, depending on the distribution of variables. *p* values ≤ 0.05 were considered significant. Analysis of data was performed with the SPSS v20 program (SPSS, Chicago, USA).

Results

The nasal administration of vaccine HB-ATV-8 induced the formation of anti-CETP IgG antibodies in the group of pigs fed a HFD where the rise in antibody titer became evident after the fourth month of treatment and remained at a high level until the end of the study (Figure 2A). Although the CETP serum concentration was kept at the same level throughout the study in the three groups of experimental animals (Figure 2B), the body weight of pigs fed a HFD was higher compared to those fed a standard diet regardless of whether they received the treatment or not (Figure 2C).

Since it is known that CETP is able to modify the serum level of the different types of lipoproteins by mobilizing cholesteryl-esters and triglycerides, we evaluated if the administration of vaccine HB-ATV-8 altered the serum level for these lipids. As expected, it was found that HFD fed pigs showed a steady increase of total cholesterol, LDL, HDL cholesterol and triglycerides (Figure 3). Interestingly, the only parameter that was significantly modified by the administration of vaccine HB-ATV-8 corresponds to triglycerides that remained at levels similar to the control group (Figure 3D). The serum level for total proteins and

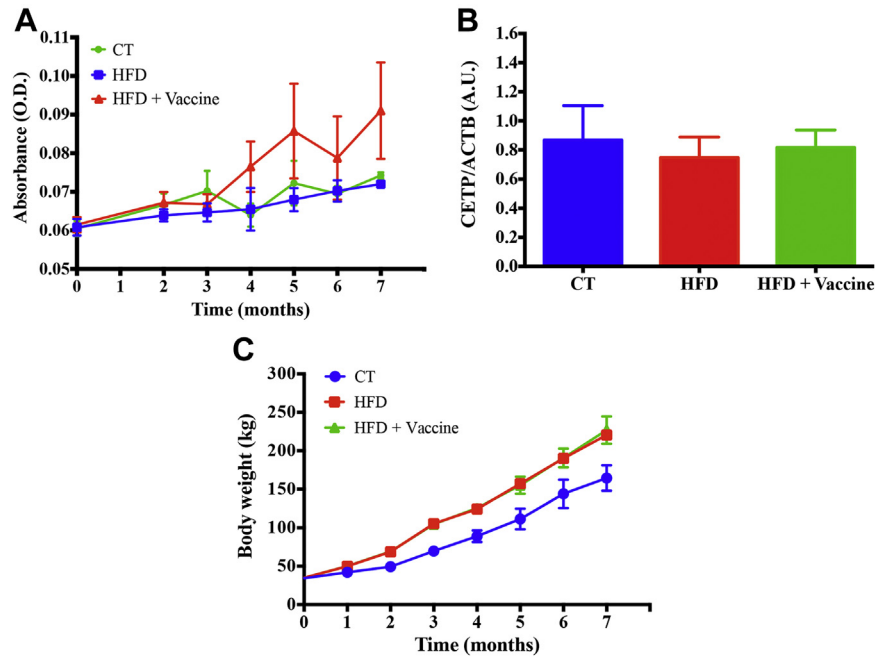


Figure 2. Effect of vaccine HB-ATV-8 administration on IgG anti-CETP antibody production and CETP plasma concentration. (A) Plasma IgG anti-CETP level of pigs from the three experimental groups. (B) Serum CETP concentration from the three experimental groups using Western blot analysis (data expressed as CETP/ACTB ratio). (A) and (B) Data represented as mean \pm S.D. (C) Body weight. Control group (CT, $n = 3$); high-fat diet group (HFD, $n = 6$); and high-fat diet group + vaccine (HFD + Vaccine, $n = 6$). Data represented as mean \pm S.E.

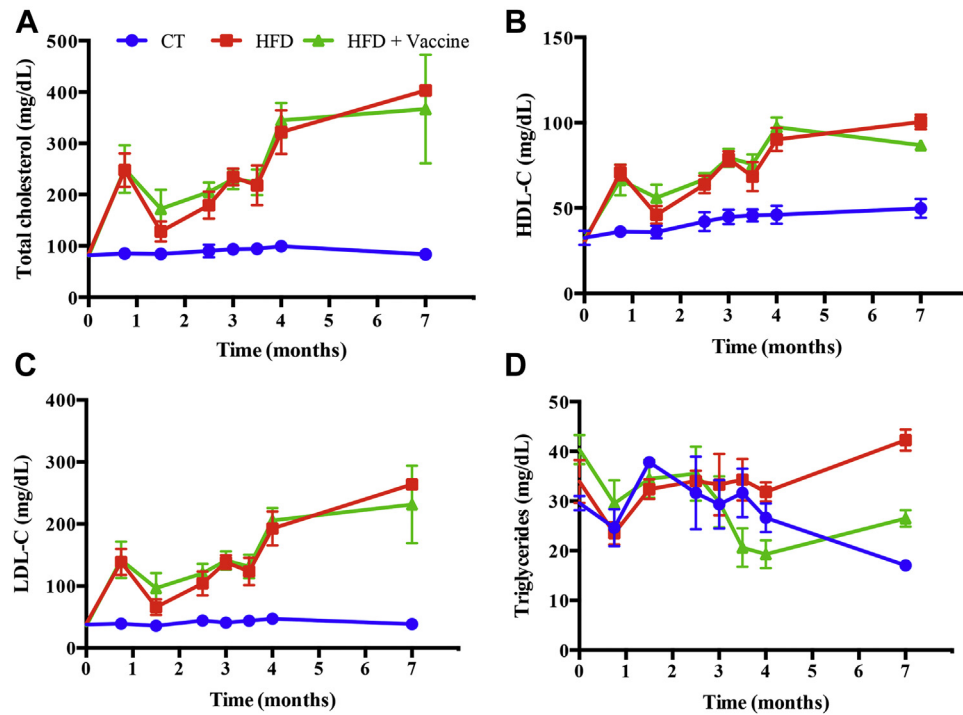


Figure 3. Effect of vaccine HB-ATV-8 administration on serum lipid profiles during the 7 months of treatment. (A) Total cholesterol; (B) HDL-C; (C) LDL-C, and (D) Triglycerides. Control group (CT, $n = 3$); one animal from this group sacrificed at month 4 and the remaining two at month 7. High fat diet group (HFD, $n = 6$); four animals from this group sacrificed at month 4 and the remaining two at month 7. High fat diet + vaccine treatment group (HFD + Vaccine, $n = 6$); four animals from this group sacrificed at month 4 and the remaining two at month 7. Data represented as mean \pm S.E.

the activity for liver function enzymes such as transaminases and alkaline phosphatase remained stable without statistically significant differences among groups (Supplementary Table 2).

At the end of the experiment, thoracic aorta and liver samples were prepared and examined by conventional light microscopy together with two-photon excitation and second harmonic generation microscopy. Figure 4 shows

representative images for samples of the thoracic aorta of pigs belonging to each one of the three experimental groups studied. As expected, aortas from pigs fed the standard diet showed a normal vessel structure. In contrast, pigs fed a HFD show lipid droplets and foam cells in the media and the intima layers of the aorta and an increase of vascular smooth muscle cells (VSMC) in the intima layer (Figure 4A and B) and present type II and III atherosclerotic

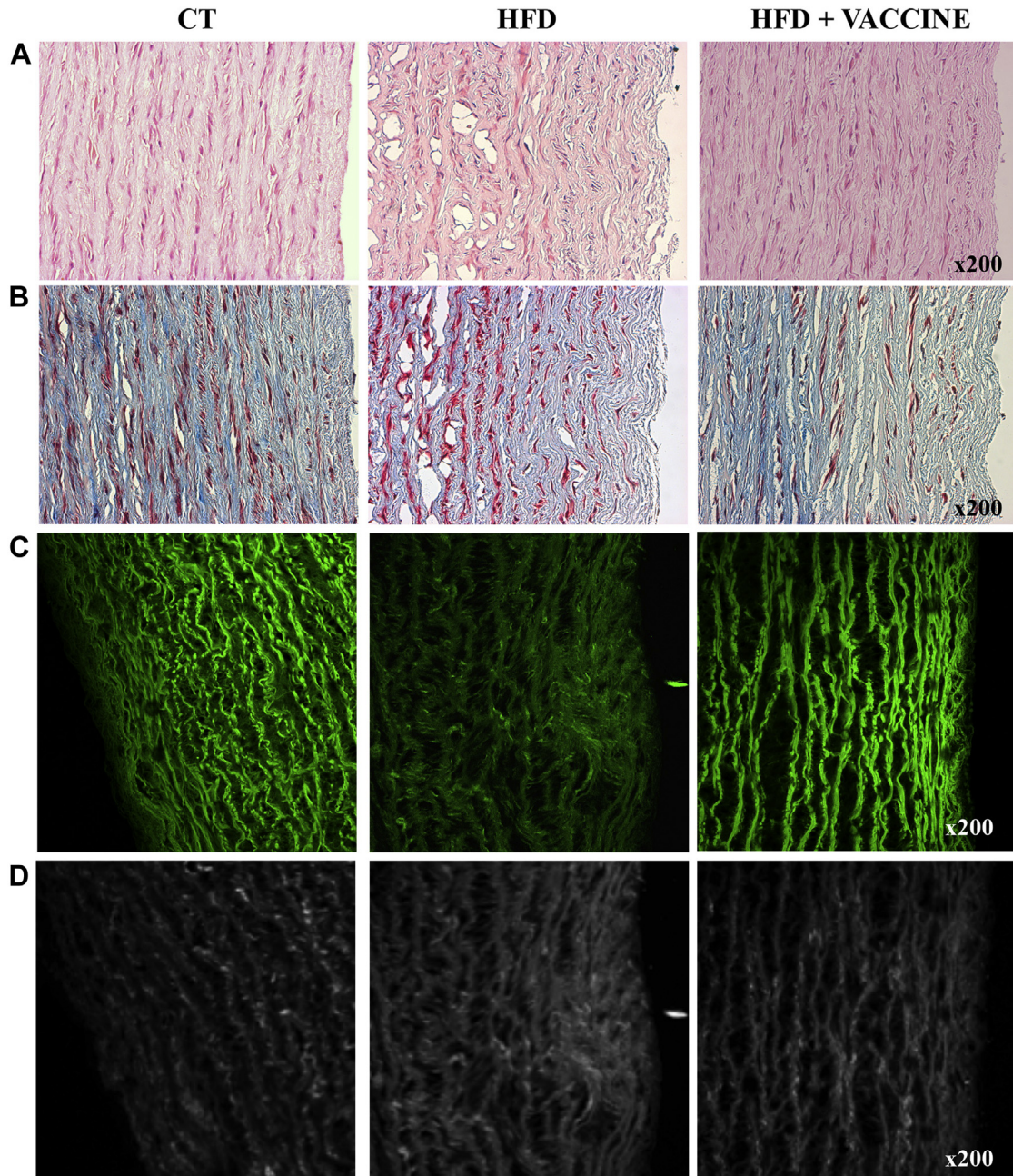


Figure 4. Vaccine HB-ATV-8 prevents the formation of atherosclerotic lesions induced by a HFD. Microscopic analysis of tissue sections from the thoracic aorta of a representative pig from each experimental group. Control group (CT), high fat diet group (HFD), and high fat diet + vaccine group (HFD + Vaccine). (A) Hematoxylin-eosin stain. (B) Masson's trichrome stain. (C) Two-photon excitation microscopy images. (D) Second-harmonic generation microscopy images.

lesions (Table 1). Moreover, collagen sheets observed in a widely distributed and spaced fashion, when studied with Masson's trichrome stain show a disordered and unevenly spaced arrangement. This can be clearly observed when the same samples are analyzed by two-photon excitation and second harmonic generation microscopy (Figure 4C and D). Using these imaging techniques, the connective fiber disorder found in aortas of pigs fed a HFD becomes evident denoting an important disarray among the different cell types that compose the vessel wall (Figure 4C and D). In contrast, the group of pigs that received the same HFD but was treated with vaccine HB-ATV-8 exhibit a decreased presence of lipid droplets and foam cells in the intima and media layers, and a smaller number of VSMC in the intima layer, similar to that shown in animals from the control group. More importantly, by two-photon excitation and second harmonic generation microscopy, a better ordered and a less spaced collagen fiber array together with a close to normal cellular architecture is observed (Figure 4C and D). Moreover, 50% of HB-ATV-8 treated pigs do not show any atherosclerotic lesions in their aortas and the remaining 50% only presented type I atherosclerotic lesions, in contrast to animals from the HFD group that showed type II or type III lesions (Table 1).

In order to obtain a better understanding at the molecular level of the histology changes observed with treatment, we analyzed the aortic expression of several genes known to be involved in vascular function such as the Krüppel-like factor-2 (*KLF2*), smooth muscle alpha-actin-2 (*ACTA2*), superoxide dismutase 1 (*SOD1*) and collagen type I alpha 1 (*COL1A1*) (Figure 5). *KLF2* corresponds to an atheroprotective transcription factor that regulates expression of several vasoactive endothelial genes involved in the regulation of normal constriction/dilation of VSMCs (47), whereas *SOD1* protects cells against cytotoxicity by scavenging superoxide radicals while being also involved in endothelial function by protecting nitric oxide release (48). *COL1A1* has been studied on the fact that corresponds to the most abundant protein associated to collagen fibrils (49). Furthermore, *ACTA2* has been employed as a cell marker for smooth muscle and associated to several

occlusive diseases (50,51). So, consistent with tissue damage observed in our histology analysis associated to the HFD, there is a tendency for mRNA levels of these four genes to be upregulated in the aorta when compared to tissue from the control group (Figure 5). Interestingly, in all cases when gene expression is studied in the HFD group that received vaccine HB-ATV-8, the tendency is to go back to levels found associated to aortas from the control group (Figure 5).

We next assessed whether pigs fed a HFD present the typical hepatic alterations observed in NAFLD. Figure 6 shows sections of liver tissue from experimental animals of each group, displaying areas of hepatocytes around the central lobular vein. Hepatic tissue from control pigs presents the normal lobular histological characteristics. In contrast, hepatocytes from livers coming from pigs fed a HFD show microvesicular fat accumulation and signs of ballooning and inflammation. Interestingly, when the HFD + Vaccine group was examined, the frequency of these pathological features was considerably reduced (Table 2). It is important to mention that when compared to our previous findings employing a rabbit model (16), the current results show a less dramatic effect that might be related to the fact that the porcine model is considered refractory to develop not only fatty liver disease but also atherosclerosis in the same way as humans do (52). Nevertheless, when liver slides are studied by two-photon excitation and second harmonic generation microscopy, experimental animals from the HFD + Vaccine group, in comparison to the group that did not receive the vaccine, showed a decreased collagen deposition around the perisinusoidal and periportal areas and in general less fibrosis showing images close to the ones found in control tissue (Figure 6C and D).

Again, in order to initiate the exploration at the molecular of events that might be taking place with the administration of vaccine HB-ATV-8, we measured in liver tissue protein expression for the ATP-binding cassette transporter (*ABCA1*) defined as a cholesterol transporter that plays an important role in the homeostasis of cholesterol in the liver (53), and *PPAR α* , reported to mediate fatty acid metabolism

Table 1. Effectiveness of vaccine HB-ATV-8 in decreasing aortic atherosclerotic lesions induced by a high fat diet measured at 4 and 7 months of treatment

| Lesion type | CT | | | HF | | | HF + VACCINE | | |
|-------------|---------------------|---------------------|------------------|---------------------|---------------------|------------------|---------------------|---------------------|------------------|
| | 4 months (n = 1) | 7 months (n = 2) | Total (n = 3) | 4 months (n = 4) | 7 months (n = 2) | Total (n = 6) | 4 months (n = 4) | 7 months (n = 2) | Total (n = 6) |
| TI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 (75) | 0 | 3 (50) |
| III | 0 | 0 | 0 | 3 (75) | 1 (50) | 4 (66.6) | 0 | 0 | 0 |
| TIII | 0 | 0 | 0 | 1 (25) | 0 | 1 (16.7) | 0 | 0 | 0 |

CT, control group fed a standard diet; HFD, group fed a high fat diet; HFD + Vaccine, group fed a high fat diet + nasal administration of vaccine. The histological classification of atherosclerotic lesions was carried out according to the American Heart Association guidelines (44). Data in parenthesis represent percentage frequency within the specific number of experimental animals studied in each group.

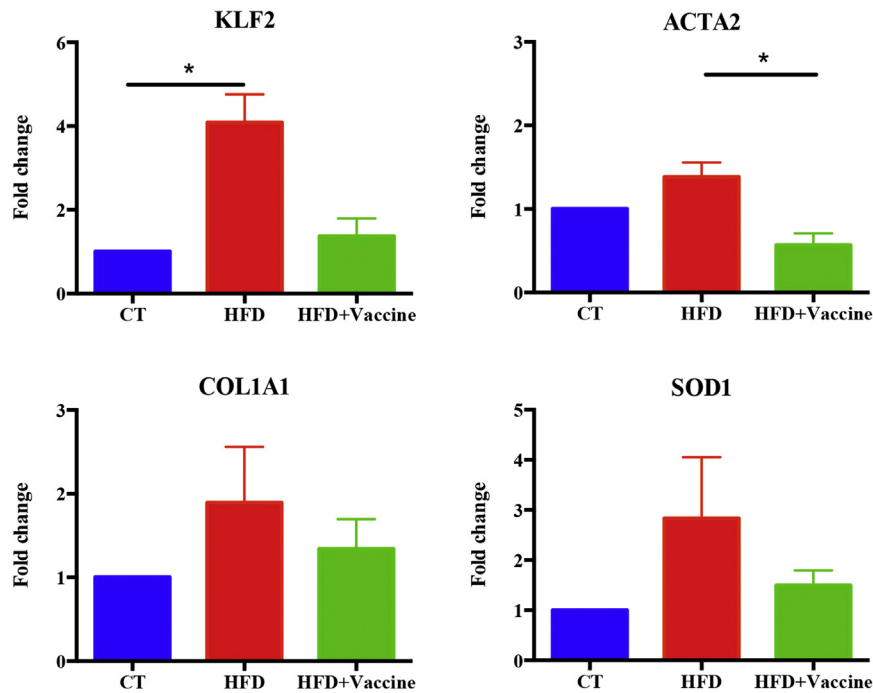


Figure 5. Vaccine HB-ATV-8 global effect on gene expression of *KLF2*, *ACTA2*, *COL1A1* and *SOD1* measured by qPCR in thoracic aorta samples. Control group (CT, $n = 3$), high fat diet group (HFD, $n = 6$), and high fat diet + vaccine treatment group (HFD + Vaccine, $n = 6$). Data presented as fold change with respect to actin expression. Data represented as mean \pm S.E. * $p < 0.05$.

in the hepatocyte (54). Our analysis shows that although ABCA1 apparently is not significantly modified neither on animals fed with a HFD nor animals fed the HFD plus vaccine administration, there is a tendency for PPAR α to increase in pigs fed a HFD that received the vaccine when compared to the HFD and control groups (Figure 7). These findings might support the possibility that a molecular compensatory effect at the cellular level might not only be carried out by the anti-CETP antibody but also by the peptide itself or one of the lipid components of vaccine HB-ATV-8.

Discussion

Since immunomodulation of key proteins that control the metabolism of cholesterol has been proposed as a prophylactic tool to treat atherosclerosis, vaccine HB-ATV-8 has been designed as a therapeutic strategy to reduce the development of atherosclerosis by generating autoantibodies against CETP. With support on our successful proof of concept carried out in the rabbit, vaccine HB-ATV-8 now has been tested in a porcine model. The pig as an experimental animal has gained interest in recent years since it has been shown that the evolutionary distance among many animal models used today, especially between rodents and humans, is a distant one (37). Preclinical studies performed in murine models can be useful in identifying new biochemical mechanisms or molecules and provide a

platform for pharmacological development; nevertheless, as shown in the literature in many cases translation to a clinical setting has proven to be a difficult one. In contrast, the pig and the human share many characteristics, such as a similar anatomy and cardiovascular physiology, a situation that explains why cardiac output, mean arterial pressure and stroke volume are almost equivalent (55). Although the process of atherogenesis in pigs is difficult to develop given that many strains of farm pigs along time have been normally selected for an increase in protein deposition rather than fat accumulation (56), a HFD supplemented with cholesterol eventually promotes the development of artery lesions similar to those observed in the atherosclerotic disease in the human (5,57,58). Therefore, taking into account these considerations, the pig model can be considered an optimal model for the study of atherosclerosis and associated diseases such as NAFLD (59). Employing this experimental model and the use of a novel nanoparticle composition that serves as an immunogen when placed in the nasal mucosa, our study shows that modulation of the immune response continues to be a promising approach in the prevention of atherogenesis.

The present study shows that intranasal administration of vaccine HB-ATV-8 induces anti-CETP IgG antibodies, in turn reducing in parallel the presence of atherosclerotic lesions and hepatic damage in pigs fed a HFD. These results are also related to the fact that serum triglycerides remain at control values, in contrast to the not treated animal group fed a HFD. Even though triglycerides are not considered

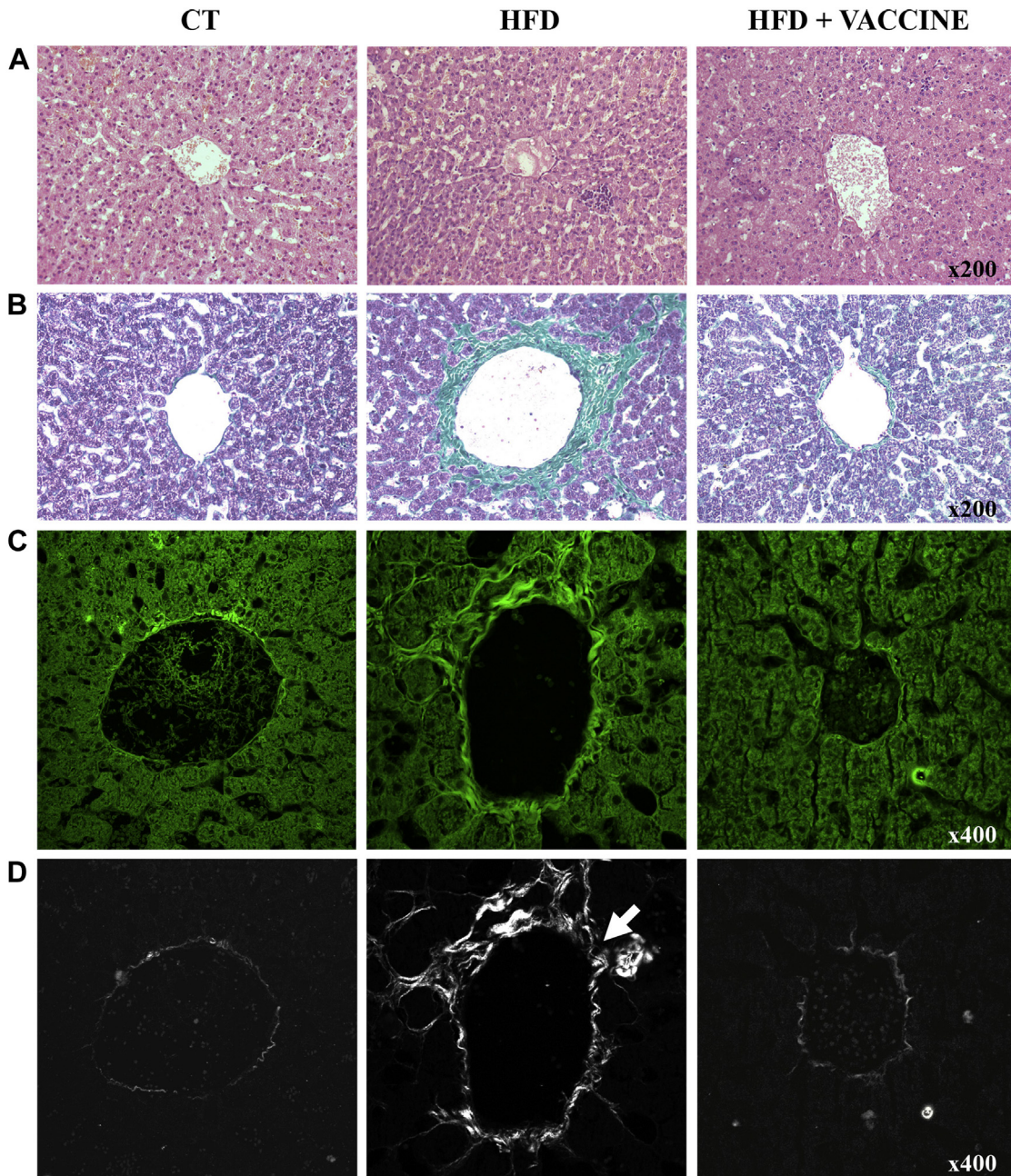


Figure 6. Vaccine HB-ATV-8 reduces hepatic inflammation and fibrosis induced by a HFD. Images show the central lobular vein from a liver sample of a representative pig from each experimental group. Control group (CT), high fat diet group (HFD), and high-fat diet + vaccine group (HFD + Vaccine). (A) Hematoxylin-eosin stain. (B) Masson's trichrome stain. (C) Two-photon excitation microscopy images. (D) Second-harmonic generation microscopy images. Arrow shows the presence of fibrosis.

atherogenic, it is well known that serum levels for this family of lipids are considered as a biomarker for CVD risk. This can be partially explained by their direct association with remnant lipoproteins and ApoCIII, a proinflammatory and proatherogenic apolipoprotein that inhibits the binding of ApoE and ApoB to proteoglycans and hepatic receptors, preventing clearance of these type of lipoproteins and therefore favoring their accumulation in the endothelium (60–63).

During an early stage of atherogenesis, cholesterol and other lipids penetrate the intima of arteries where their accumulation induce an inflammatory state and the activation of the immune system. As a consequence, macrophages infiltrate the tissue, start internalizing cholesterol and originate the formation of foam cells (44). Subsequently, foam cells are lysed, releasing lipids that further accumulate in the extracellular matrix. To decrease toxicity due to the extracellular deposition of lipids (64,65), VSMCs

Table 2. Vaccine HB-ATV-8 reduced hepatic inflammation and fibrosis induced by a high fat diet measured at 4 and 7 months of treatment

| Histologic lesion | CT | | | HF | | | HF + vaccine | | |
|------------------------|---------------------|---------------------|------------------|---------------------|---------------------|------------------|---------------------|---------------------|------------------|
| | 4 months (n = 1) | 7 months (n = 2) | Total (n = 3) | 4 months (n = 4) | 7 months (n = 2) | Total (n = 6) | 4 months (n = 4) | 7 months (n = 2) | Total (n = 6) |
| Steatosis ^a | 0 | 0 | 0 | 1 (25) | 1 (50) | 2 (33.3) | 1 (25) | 1 (50) | 2 (33.3) |
| Ballooning | 0 | 1 | 1 (33.3) | 3 (75) | 1 (50) | 4 (66.7) | 1 (25) | 2 (50) | 3 (50) |
| Inflammation | 0 | 0 | 0 | 4 (100) | 2 (100) | 6 (100) | 1 (25) | 2 (100) | 3 (50) |
| Fibrosis | 0 | 0 | 0 | 4 (100) | 2 (100) | 6 (100) | 2 (50) | 1 (50) | 3 (50) |

CT, Control group fed a standard diet; HF, group fed a high-fat diet; HFD + Vaccine, group fed a high fat diet + nasal administration of vaccine.

Data represent number of cases by each category and data in parenthesis percentage frequencies.

Fibrosis reported in these samples was mainly portal or perisinusoidal and portal/periportal fibrosis.

^aMicrovesicular steatosis.

migrate and begin internalizing excess lipid in support of macrophage function. Although VSMCs are responsible for remodeling the arterial wall, a prolonged state of oxidative stress causes their trans-differentiation to macrophage-type cells (66). These cells are able to phagocytize and present antigens, favoring the inflammatory state (67,68). Moreover, the structure of the arterial wall specifically depends on a delicate equilibrium between the synthesis and degradation of extracellular matrix proteins such as collagen and elastin, where an acute change in this equilibrium might play an important role during the process of atherogenesis. In this sense, an uncontrolled degradation of proteins of the extracellular matrix carried out by proteases such as metalloproteinase-1 and -9, might induce further vascular damage. This in turn promotes atherogenesis through the trans-endothelial migration of leukocytes, migration and proliferation of VSMCs, neovascularization, vascular cell apoptosis, and finally the formation of a neointima that might progress until the rupture of the aortic

wall takes place (69). Together with cells of the immune system involved in atherosclerosis such as monocytes converted into macrophages, new studies have pointed to mast cells and stellate cells as critical cell types important in collagen degradation and smooth muscle survival (70). Mast cells produce and release matrix metalloproteases together with proinflammatory molecules such as interferon and interleukin-6 inhibiting the proliferation of smooth muscle cells and also promoting the process of apoptosis (70–73).

Since the use of two-photon excitation and second harmonic generation microscopy has been extremely useful to study the extracellular matrix and to visualize collagen fibers in association to a classical light microscopy, the study of viable arteries *ex vivo* gives us a better understanding of the functionality and dynamic behavior of the artery wall (74,75). During the course of our study, we observed that vaccinated animals fed a HFD did not show the clear disarray of extracellular matrix observed in the aortas of

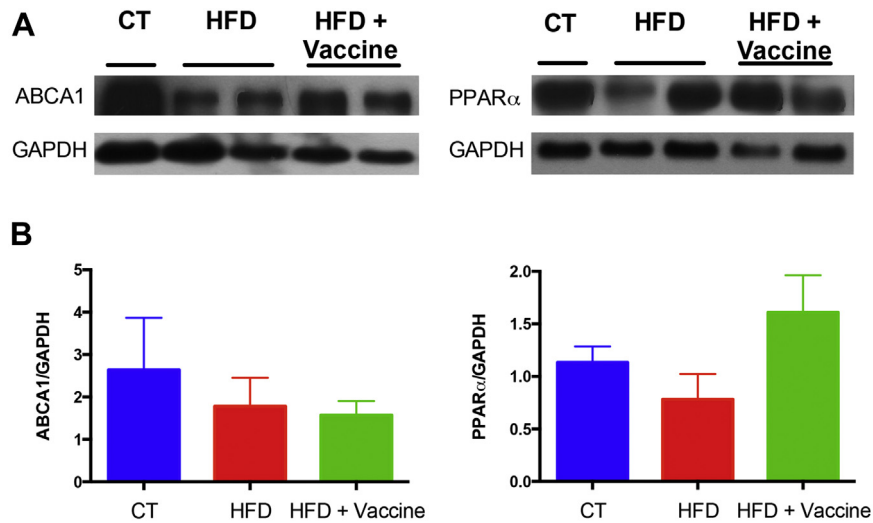


Figure 7. Vaccine HB-ATV-8 effect on hepatic PPAR α and ABCA1 concentration. (A) Western blot analysis of samples obtained from one representative control animal and two representative samples from the HFD and HFD + vaccine groups. (B) Semicuantitative protein correlation between expression of ABCA1 and PPAR α with GAPDH. Control group (CT, $n = 3$), high fat diet group (HFD, $n = 6$), and high fat diet + vaccine treatment group (HFD + Vaccine, $n = 6$). Data represented as mean \pm S.E.

animals that were only fed a HFD without vaccination. This phenomenon is shown to be accompanied by an increased expression of *KLF2*, *ACTA2*, *COL1A1* and *SOD1* mRNA's in the aortas of animals fed exclusively the HFD. Interestingly, this increase in mRNA levels is reversed close to control values in animals fed a normal diet when the HFD plus vaccination group is studied, suggesting that vaccine HB-ATV-8 might be also considered as a modulator of anti-atherosclerotic signals. It is well known that a HFD induces vascular dysfunction upregulating pathways associated to the production of reactive oxygen species (ROS), oxidative stress, and release of proinflammatory adipokynes/cytokynes (76–78). KLF2 inhibits both the expression of inflammatory cytokynes and the production of adhesion molecules such as VCAM-1 and E-selectin, known to be critical for leukocytes recruitment and extravasation (79,80). In addition, aortas from pigs fed a HFD show a disordered pattern of collagen fibrils, that to a certain extent, is less apparent in aortas isolated from animals fed the HFD plus vaccination, also in agreement with results showing a tendency to present a lower mRNA concentration and synthesis of type I collagen. Interestingly, during the development of an atherosclerotic plaque, the extracellular matrix composition of a vessel undergoes pronounced changes, where VSMCs initially showing a contractile phenotype are transformed to present a synthetic phenotype with the consequent increase in the deposit of types I and III collagen, elastin and fibronectin (49).

On the other hand, steatohepatitis and atherosclerosis share several characteristics such as lipid accumulation and the development of an inflammatory state (45,81). During the present study, pigs fed a HFD in addition to the presence of atherosclerotic changes, also developed hepatic disease characterized by microvesicular steatosis, ballooning, cellular inflammation, and fibrosis. Two-photon and second harmonic generation imaging clearly show the enormous difference in collagen deposition observed in liver tissue obtained from the group of animals exclusively fed the HFD and those treated simultaneously with vaccine HB-ATV-8. In general, experimental animals fed the HFD independently if they received or not the vaccine, do not show macrovesicular steatosis. This phenomenon is most probably due to the relatively short period of time used to carry out the study before animal sacrifice (56). Nevertheless, the presence of inflammation and fibrosis was less evident in the HFD + Vaccine group in comparison to HFD fed pigs.

The tendency for PPAR α to increase in liver cells of animals fed a HFD that received the vaccine supports an explanation for the reduced level of plasma triglycerides found in this group of animals. PPAR α considered a transcription factor that regulates the expression of genes involved in VLDL production, lipid trafficking and triglyceride-rich lipoprotein clearance, apparently helps suppress the acute-phase response and inflammation in

the liver (82–84) and in conjunction with PPAR β/δ , shown to improve steatosis, inflammation and fibrosis in pre-clinical models of NAFLD (83,85).

Since our findings show that vaccine HB-ATV-8 decreases fat accumulation and most probably an inflammatory state in the artery wall and liver, it is important to point out that even though an auto-anti-CETP antibody titer was clearly detected around 4 months of treatment, at this time the effect was already observed. We also hypothesize that in addition to the regulation of lipid transport carried out by CETP due to the effect of the auto-anti-CETP antibody, there might be additional protective mechanisms that could be also related to a direct effect given by one of the components of the vaccine preparation, such as the peptide itself. This possibility is supported by studies of a series of peptides that promote the efflux of cholesterol from cells (86). Our group has also shown using cultured macrophages, a decrease in foam cell formation and down-regulation of CD36 and ACAT-1 when the peptide itself is tested (87,88). Evidence also shows that several other peptides interacting with endothelial cells, VSMCs, monocytes and/or macrophages, might be used for therapeutic purposes in the control of atherosclerosis (89–91). Since the HFD group independently if vaccinated or not maintain the same gain in body weight along the study, we speculate that vaccine HB-ATV-8 might also promote the accumulation of lipids in other tissues such as the adipose tissue. Current experiments are being carried out to establish this possibility.

Among the series of drugs offering to decrease the risk of cardiovascular disease by increasing the serum concentration of HDL-C, several CETP inhibitors obtained by chemical synthesis have been studied (92). Several other strategies include the use of fibrates (93) and antioxidants (94), but at the end also apparently ineffective to decrease the risk of CVD. Considering CETP as a plasma protein that transfers cholesteryl-esters among lipoproteins, specifically HDL to VLDL and LDL, it has been described as a molecule that promotes atherogenesis; therefore, the potential inhibition of its activity by new molecules has attracted attention in an effort to increase HDL-C and decrease coronary artery disease (95). Nevertheless, the use of these chemically synthesized compounds in the strategy to inhibit CETP has shown to be troublesome (92,95,96). Torcetrapib was the first CETP inhibitor to be tested in Phase 3 clinical trials, but had to be prematurely terminated due to a series of cardiovascular problems and mortality associated with non-cardiovascular events (97–100) such as infection and off-target aldosteronism as presented in the ILLUMINATE, RADIANCE and ILLUSTRATE trials (97,100,101). These studies showed an increase in HDL-C and a decrease in LDL-C but no impact in the presence of atheroma lesions (100,102).

During the Phase 2 clinical trial of CETP inhibitor dalcetrapib, the study had to be stopped due to off-target side

effects and ineffectiveness shown by a non-significant effect on plasma LDL-C levels despite a moderate increase in HDL-C (103). Also, the OUTCOMES phase 3 trial had to be halted due to a lack of clinically meaningful efficacy (104). Although evacetrapib also improved lipoprotein biomarker distribution, treatment did not result in a lower rate of cardiovascular events among patients with high-risk vascular disease (105). So far, anacetrapib seems to show a better effect on various coronary events studying patients presenting atherosclerotic vascular disease but only under intensive statin therapy (106). Taken these data together, due to the presence of side effects and off-target activity, there seems that chemically synthesized CETP inhibitors need more time to be completely understood.

The example of torcetrapib could be considered a prototypical one since we now know that CETP binding sites for this molecule are shared with proteins of the Plunc family including an isoform of CETP named by our group as CET-PI and identified as a lipopolysaccharide binding protein (107). According to our results, a non-specific binding phenomenon might have been directly related to sepsis and the mortality rate shown in the ILLUMINATE trial (108–110) since torcetrapib might have had an unknown secondary effect disabling the main function of CETPI directly related with the inactivation of LPS in plasma.

In contrast to the several strategies discussed in this study used to inhibit the function of CETP, the induction of an immune response by self-generating anti-CETP antibodies shows many advantages above other approaches to treat the process of atherogenesis (20,111–113). The present investigation studying a porcine model corroborates our previous reports showing that intranasal therapeutic vaccine HB-ATV-8 is effective in the control of the process of atherogenesis and the development of fatty liver disease, associated to important advantages such as simplicity of design and application combined to a low production cost.

Conclusion

Considering that for many years no new synthesis of lipid metabolism modulator molecules have been successfully introduced into clinical practice, the immunological approach using the generation of autoantibodies against key proteins involved in the pathophysiology of atherosclerosis have come into play. Among the several immunological approaches used to inhibit CETP function, vaccine HB-ATV-8 seems to be the only one that offers non-invasive intranasal vaccination employing a micellar nanoparticle preparation composed of a mixture of common lipids and a peptide together with the use of a simple delivery device. Since vaccination ameliorates atherosclerotic and hepatic lesions caused by a HFD improving triglyceride metabolism and promoting atheroprotective and anti-inflammatory signals, vaccine HB-ATV-8 offers a brand

new approach to prevent the process of atherogenesis and associated NAFLD in the human.

Acknowledgments

This study was supported by grants from CONACyT, Mexico (255778) and PAPIIT-UNAM (IN205717), Mexico awarded to J.M-O. Support also came from CONACyT (grants 219327, 222227 and 233172) awarded to Bioextracto S.A. de C.V. and development grant HB08 received from Hamol Biosolutions LLC. R.G-V received a postdoctoral fellowship from UNAM. Authors thank Yazmín Ramiro-Cortés for expert advice with microscopy techniques, the Molecular Biology Unit at IFC, UNAM; members of the Oligonucleotide and DNA Sequencing Unit at IBT, UNAM; and Jorge Bravo-Martínez for fruitful discussions and help with graphical art. We appreciate the generous donation of several monoclonal antibodies from Santa Cruz Biotechnology. This study is dedicated to the memory of Ale.

Supplementary Data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2019.01.007>.

References

1. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart disease and stroke statistics-2016 update a report from the American Heart Association. *Circulation* 2016;133:e38–e48.
2. Sharrett AR, Ballantyne CM, Coady SA, et al. Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein(a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: The atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Circulation* 2001;104:1108–1113.
3. Goldbourt U, Yaari S, Medalie JH. Isolated low HDL cholesterol as a risk factor for coronary heart disease mortality: A 21-year follow-up of 8000 men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:107–113.
4. Franceschini G. Epidemiologic evidence for high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2001;88:9–13.
5. Padró T, Cubedo J, Camino S, et al. Detrimental effect of hypercholesterolemia on high-density lipoprotein particle remodeling in pigs. *J Am Coll Cardiol* 2017;70:165–178.
6. Niesor EJ. Different effects of compounds decreasing cholesteryl ester transfer protein activity on lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2011;22:288–295.
7. Amy SM. Expanding the therapeutic frontier in atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 2013;62:237–238.
8. Thompson PD, Buchner D, Piña IL, et al. Exercise and Physical Activity in the Prevention and Treatment of Atherosclerotic Cardiovascular Disease: A Statement From the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). *Circulation* 2003;107:3109–3116.
9. Dalen JE, Devries S. Diets to prevent coronary heart disease 1957–2013: What have we learned? *Am J Med* 2014;127:364–369.
10. Pater C. The current status of primary prevention in coronary heart disease. *Curr Control Trials Cardiovasc Med* 2001;2:24–37.
11. Okuyama H, Langsjoen PH, Hamazaki T, et al. Statins stimulate atherosclerosis and heart failure: pharmacological mechanisms. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2015;8:189–199.
12. Shapiro MD, Fazio S. From lipids to inflammation: New approaches to reducing atherosclerotic risk. *Circ Res* 2016;118:732–749.

13. Witztum JL, Lichtman AH. The influence of innate and adaptive immune responses on atherosclerosis. *Annu Rev Pathol* 2014;9:73–102.
14. Libby P, Lichtman AH, Hansson GK. Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: from mice to humans. *Immunity* 2013;38:1092–1104.
15. Kimura T, Tse K, Sette A, et al. Vaccination to modulate atherosclerosis. *Autoimmunity* 2015;48:152–160.
16. García-González V, Delgado-Coello B, Pérez-Torres A, et al. Reality of a vaccine in the prevention and treatment of atherosclerosis. *Arch Med Res* 2015;46:427–437.
17. Chyu KY, Shah PK. Advances in immune-modulating therapies to treat atherosclerotic cardiovascular diseases. *Ther Adv Vaccines* 2014;2:56–66.
18. de Jager SCA, Kuiper J. Vaccination strategies in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2011;106:796–803.
19. Chyu KY, Dimayuga PC, Shah PK. Vaccine against arteriosclerosis: an update. *Ther Adv Vaccines* 2017;5:39–47.
20. Liaw YW, Lin CY, Lai YS, et al. A vaccine targeted at CETP alleviates high fat and high cholesterol diet-induced atherosclerosis and non-alcoholic steatohepatitis in rabbit. *PLoS One* 2014;9:e111529.
21. Mabuchi H, Nohara A, Inazu A. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) deficiency and CETP inhibitors. *Mol Cells* 2014;37:777–784.
22. Barter PJ, Rye K-A. Cholesteryl ester transfer protein inhibition as a strategy to reduce cardiovascular risk. *J Lipid Res* 2012;53:1755–1766.
23. Barter PJ, Brewer HB, Chapman MJ, et al. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:160–167.
24. Inazu A, Brown ML, Hesler CB, et al. Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med* 1990;323:1234–1238.
25. Brown ML, Inazu A, Hesler CB, et al. Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins. *Nature* 1989;342:448–451.
26. Ritsch A, Scharnagl H, Eller P, et al. Cholesteryl ester transfer protein and mortality in patients undergoing coronary angiography: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study. *Circulation* 2010;121:366–374.
27. Vasan RS, Pencina MJ, Robins SJ, et al. Association of circulating cholesteryl ester transfer protein activity with incidence of cardiovascular disease in the community. *Circulation* 2009;120:2414–2420.
28. Inazu A, Mabuchi H. Therapeutic implications of cholesteryl ester transfer protein inhibitors in hyperlipidemia and low high-density lipoprotein-cholesterolemia. *Curr Opin Investig Drugs* 2003;4:291–297.
29. Mas-Oliva J, Delgado-Coello BA, Gonzalez-García VG, et al, Inventors. Universidad Nacional Autónoma de México, assignee. Vacuna de aplicación nasal contra el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica y el hígado graso. MX Patent 2017;347:400B.
30. Mas-Oliva J, Delgado-Coello BA, Gonzalez-García VG, et al, Inventors. Universidad Nacional Autónoma de México, assignee. Nasal vaccine against the development of atherosclerosis disease and fatty liver. US Patent 9 2017;539:312B2.
31. García-González V, Gutiérrez-Quintanar N, Mendoza-Espinosa P, et al. Key structural arrangements at the C-terminus domain of CETP suggest a potential mechanism for lipid-transfer activity. *J Struct Biol* 2014;186:19–27.
32. García-González V, Mas-Oliva J. Amyloid fibril formation of peptides derived from the C-terminus of CETP modulated by lipids. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;434:54–59.
33. Kaur G, Garg T, Rath G, et al. Archaeosomes: an excellent carrier for drug and cell delivery. *Drug Deliv* 2016;23:2497–2512.
34. Benvegna T, Lemiègre L, Cammas-Marion S. New generation of liposomes called archaeosomes based on natural or synthetic archaeal lipids as innovative formulations for drug delivery. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2009;3:206–220.
35. DeFilippis AP, Blaha MJ, Martin SS, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and serum lipoproteins: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2013;227:429–436.
36. Fleischman MW, Budoff M, Zeb I, et al. NAFLD prevalence differs among hispanic subgroups: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *World J Gastroenterol* 2014;20:4987–4993.
37. Getz GS, Reardon CA. Animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:1104–1115.
38. Davis SS, Illum L, Hinchcliffe M. Gastrointestinal transit of dosage forms in the pig. *J Pharm Pharmacol* 2001;53:33–39.
39. Kobayashi E, Hishikawa S, Teratani T, et al. The pig as a model for translational research: overview of porcine animal models at Jichi Medical University. *Transplant Res* 2012;1:8.
40. Alonso-García AL, Mas-Oliva J; Inventors. Universidad Nacional Autónoma de México; assignee. Immunoenzymatic method for cholesterol-ester transfer protein (CETP). US Patent 7,749,721.
41. Krishnan L, Sad S, Patel GB, et al. Archaeosomes induce long-term CD8+ cytotoxic T cell response to entrapped soluble protein by the exogenous cytosolic pathway, in the absence of CD4+ T cell help. *J Immunol* 2000;165:5177–5185.
42. Patel GB, Sprott GD. Archaeobacterial ether lipid liposomes (archaeosomes) as novel vaccine and drug delivery systems. *Crit Rev Biotechnol* 1999;19:317–357.
43. Sprott GD, Brisson J, Dicaire CJ, et al. A structural comparison of the total polar lipids from the human archaea *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae* and its relevance to the adjuvant activities of their liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1999;1440:275–288.
44. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council of arteriosclerosis. American Heart Association. *Circulation* 1994;89:2462–2478.
45. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313–1321.
46. Lee L, Alloosh M, Saxena R, et al. Nutritional model of steatohepatitis and metabolic syndrome in the Ossabaw miniature swine. *Hepatology* 2009;50:56–67.
47. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. *Acta Physiol* 2015;214:33–50.
48. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal* 2011;15:1583–1606.
49. Adiguzel E, Ahmad PJ, Franco C, et al. Collagens in the progression and complications of atherosclerosis. *Vasc Med* 2009;14:73–89.
50. Yuan SM. α -Smooth muscle actin and ACTA2 gene expressions in vasculopathies. *Braz J Cardiovasc Surg* 2015;30:644–649.
51. Azuma K, Ichimura K, Mita T, et al. Presence of alpha-smooth muscle actin-positive endothelial cells in the luminal surface of adult aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;380:620–626.
52. Lenfant C, Savage PJ. The early natural history of atherosclerosis and hypertension in the young: National Institutes of Health perspectives. *Am J Med Sci* 1995;310:S3–S7.
53. Basso F, Freeman L, Knapper CL, et al. Role of the hepatic ABCA1 transporter in modulating intrahepatic cholesterol and plasma HDL cholesterol concentrations. *J Lipid Res* 2003;44:296–302.
54. Mandard S, Müller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:393–416.
55. Verma N, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S. Recent advances in the use of *Sus scrofa* (pig) as a model system for proteomic studies. *Proteomics* 2011;11:776–793.

56. te Pas MFW, Visscher AH, de Greef KH. Molecular genetic and physiologic background of the growth hormone-IGF-I axis in relation to breeding for growth rate and leanness in pigs. *Domest Anim Endocrinol* 2004;27:287–301.
57. Reitman JS, Mahley RW, Fry DL. Yucatan miniature swine as a model for diet-induced atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1982;43:119–132.
58. Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol* 1981;103:181–190.
59. Daugherty A, Tall AR, Daemen MJAP, et al. Recommendation on design, execution, and reporting of animal atherosclerosis studies: a scientific statement from the American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017;37:e131–e157.
60. Talayero BG, Sacks FM. The role of triglycerides in atherosclerosis. *Curr Cardiol Rep* 2011;13:544–552.
61. Rapp JH, Lespine A, Hamilton RL, et al. Triglyceride-rich lipoproteins isolated by selected-affinity anti-apolipoprotein B immunosorption from human atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb J Vasc Biol* 1994;14:1767–1774.
62. Zheng C, Khoo C, Furtado J, et al. Apolipoprotein C-III and the metabolic basis for hypertriglyceridemia and the dense low-density lipoprotein phenotype. *Circulation* 2010;121:1722–1734.
63. Luo M, Peng D. The emerging role of apolipoprotein C-III: beyond effects on triglyceride metabolism. *Lipids Health Dis* 2016;15:184.
64. Louis SF, Zahradka P. Vascular smooth muscle cell motility: From migration to invasion. *Exp Clin Cardiol* 2010;15:e75–e85.
65. Ionita MG, Arslan F, de Kleijn DPV, et al. Endogenous inflammatory molecules engage Toll-like receptors in cardiovascular disease. *J Innate Immun* 2010;2:307–315.
66. Damián-Zamacona S, Toledo-Ibelle P, Ibarra-Abundis MZ, et al. Early Transcriptomic Response to LDL and oxLDL in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *PLoS One* 2016;11:e0163924.
67. Feil S, Fehrenbacher B, Lukowski R, et al. Transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to macrophage-like cells during atherogenesis. *Circ Res* 2014;115:662–667.
68. Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Circ Res* 2016;118:692–702.
69. Xu J, Shi G-P. Vascular wall extracellular matrix proteins and vascular diseases. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842:2106–2119.
70. Libby P, Shi G-P. Mast cells as mediators and modulators of atherogenesis. *Circulation* 2007;115:2471–2473.
71. Kovanen PT. Mast cells and degradation of pericellular and extracellular matrices: potential contributions to erosion, rupture and intraplaque haemorrhage of atherosclerotic plaques. *Biochem Soc Trans* 2007;35:857–861.
72. Johnson JL, Jackson CL, Angelini GD, et al. Activation of matrix-degrading metalloproteinases by mast cell proteases in atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1707–1715.
73. Sun J, Sukhova GK, Wolters PJ, et al. Mast cells promote atherosclerosis by releasing proinflammatory cytokines. *Nat Med* 2007;13:719–724.
74. Campagnola P. Second harmonic generation imaging microscopy: applications to diseases diagnostics. *Anal Chem* 2011;83:3224–3231.
75. Zoumi A, Lu X, Kassab GS, et al. Imaging coronary artery microstructure using second-harmonic and two-photon fluorescence microscopy. *Biophys J* 2004;87:2778–2786.
76. Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, et al. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism* 2008;57:1071–1077.
77. Yida Z, Imam MU, Ismail M, et al. High fat diet-induced inflammation and oxidative stress are attenuated by N-acetylneuraminic acid in rats. *J Biomed Sci* 2015;22:96.
78. Alcalá M, Calderon-Dominguez M, et al. Increased inflammation, oxidative stress and mitochondrial respiration in brown adipose tissue from obese mice. *Sci Rep* 2017;7:16082.
79. Sweet DR, Fan L, Hsieh PN, et al. Krüppel-Like Factors in Vascular Inflammation: Mechanistic Insights and Therapeutic Potential. *Front Cardiovasc Med* 2018;5:6.
80. Bhattacharya R, Senbanerjee S, Lin Z, et al. Inhibition of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by the Kruppel-like factor KLF2. *J Biol Chem* 2005;280:28848–28851.
81. Fargion S, Porzio M, Fracanzani AL. Nonalcoholic fatty liver disease and vascular disease: State-of-the-art. *World J Gastroenterol* 2014;20:13306–13324.
82. Cheng PTW, Mukherjee R. PPARs as targets for metabolic and cardiovascular diseases. *Mini Rev Med Chem* 2005;5:741–753.
83. Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. Molecular mechanism of PPAR α action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2015;62:720–733.
84. Kersten S, Stienstra R. The role and regulation of the peroxisome proliferator activated receptor alpha in human liver. *Biochimie* 2017;136:75–84.
85. Larter CZ, Yeh MM, Van Rooyen DM, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist, Wy 14,643, improves metabolic indices, steatosis and ballooning in diabetic mice with non-alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2012;27:341–350.
86. Amar MJA, D'Souza W, Turner S, et al. 5A apolipoprotein mimetic peptide promotes cholesterol efflux and reduces atherosclerosis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;334:634–641.
87. Nagashima M, Watanabe T, Terasaki M, et al. Native incretins prevent the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Diabetologia* 2011;54:2649.
88. Mas-Oliva J, Delgado-Coello B, Méndez-Acevedo K, et al. Preclinical evidence studying intranasal HB-ATV-8 vaccine in a porcine model of atherosclerosis shows high efficiency in the prevention of atherogenesis and fatty liver disease. *Atherosclerosis* 2017;263:e52.
89. Chung EJ. Targeting and therapeutic peptides in nanomedicine for atherosclerosis. *Exp Biol Med* 2016;24:891–898.
90. McLeod O, Silveira A, Fredrikson GN, et al. Plasma autoantibodies against apolipoprotein B-100 peptide 210 in subclinical atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2014;232:242–248.
91. Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, et al. Apolipoprotein A-I mimetic peptides and their role in atherosclerosis prevention. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;3:540–547.
92. Mohammadpour AH, Akhlaghi F. Future of cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibitors: a pharmacological perspective. *Clin Pharmacokinet* 2013;52:615–626.
93. Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, et al. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* 1998;98:2088–2093.
94. Toledo-Ibelle P, Mas-Oliva J. Antioxidants in the fight against atherosclerosis: is this a dead end? *Curr Atheroscler Rep* 2018;20:36.
95. Kosmas CE, DeJesus E, Rosario D, et al. CETP inhibition: past failures and future hopes. *Clin Med Insights Cardiol* 2016;10:37–42.
96. Di Bartolo BA, Duong M, Nicholls SJ. Clinical trials with cholesteryl ester transfer protein inhibitors. *Curr Opin Lipidol* 2016;27:545–559.
97. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med* 2007;357:2109–2122.
98. Tanne JH. Pfizer stops clinical trials of heart drug. *Brit Med J* 2006;333:1237.
99. Kastelein JJP, van Leuven SI, Burgess L, et al. Effect of torcetrapib on carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 2007;356:1620–1630.

100. Nissen SE, Tardif J-C, Nicholls SJ, et al. Effect of torcetrapib on the progression of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med* 2007;356:1304–1316.
101. Bots ML, Visseren FL, Evans GW, et al. Torcetrapib and carotid intima-media thickness in mixed dyslipidaemia (RADIANCE 2 study): a randomised, double-blind trial. *Lancet Lond* 2007;370:153–160.
102. Joy TR, Hegele RA. The failure of torcetrapib: what have we learned? *Br J Pharmacol* 2008;154:1379–1381.
103. Lüscher TF, Taddei S, Kaski J-C, et al. Vascular effects and safety of dalcetrapib in patients with or at risk of coronary heart disease: the dal-VESSEL randomized clinical trial. *Eur Heart J* 2012;33:857–865.
104. Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, et al. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med* 2012;367:2089–2099.
105. Lincoff AM, Nicholls SJ, Riesmeyer JS, et al. Evacetrapib and Cardiovascular Outcomes in High-Risk Vascular Disease. *N Engl J Med* 2017;376:1933–1942.
106. Group TH-RC. Effects of anacetrapib in patients with atherosclerotic vascular disease. *N Engl J Med* 2017;377:1217–1227.
107. Alonso-García AL, Zentella-Dehesa A, Mas-Oliva J. Characterization of a naturally occurring new version of the cholesterol ester transfer protein (CETP) from small intestine. *Mol Cell Biochem* 2003;245:173–182.
108. Barter P. Lessons learned from the investigation of lipid level management to understand its impact in atherosclerotic events (ILLUMINATE) trial. *Am J Cardiol* 2009;104:10E–15E.
109. Clark RW, Cunningham D, Cong Y, et al. Assessment of cholesteryl ester transfer protein inhibitors for interaction with proteins involved in the immune response to infection. *J Lipid Res* 2010;51:967–974.
110. García-González V, Gutiérrez-Quintanar N, Mas-Oliva J. The C-terminal Domain supports a novel function for CETPI as a new plasma lipopolysaccharide-binding protein. *Sci Rep* 2015;5:16091.
111. Rittershaus CW, Miller DP, Thomas LJ, et al. Vaccine-induced antibodies inhibit CETP activity in vivo and reduce aortic lesions in a rabbit model of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2106–2112.
112. Gaofu Q, Jun L, Xiuyun Z, et al. Antibody against cholesteryl ester transfer protein (CETP) elicited by a recombinant chimeric enzyme vaccine attenuated atherosclerosis in a rabbit model. *Life Sci* 2005;77:2690–2702.
113. Mao D, Kai G, Gaofu Q, et al. Intramuscular immunization with a DNA vaccine encoding a 26-amino acid CETP epitope displayed by HBe protein and containing CpG DNA inhibits atherosclerosis in a rabbit model of atherosclerosis. *Vaccine* 2006;24:4942–4950.