

La Aterosclerosis y el Hígado Graso No Alcohólico: Enfermedades Prevenibles por la Vacuna Terapéutica Hb-Atv-8 que las Vincula con la Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol (CETP)

Kevin Manuel Méndez-Acevedo

Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Bioquímica y Biología Estructural. Ciudad de México, México.

Juana Virginia Tapia-Vieyra

Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Bioquímica y Biología Estructural. Ciudad de México, México.

Jaime Mas-Oliva

Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Bioquímica y Biología Estructural. Ciudad de México, México.

Correspondencia: jmas@ifc.unam.mx

Teléfono: (52 55) 5622 5584

Resumen

En el ser humano, la aterogénesis es un proceso que generalmente se extiende muchos años, es común observar su desarrollo en el transcurso de toda la vida. Los factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad conocida como aterosclerosis son, entre otros, la dislipidemia, el tabaquismo, la diabetes, la obesidad, los antecedentes familiares y la hipertensión arterial.

La Aterosclerosis y el Hígado Graso No Alcohólico: Enfermedades Prevenibles por la Vacuna Terapéutica Hb-Atv-8 que las Vincula con la Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol (CETP)

Asociada directamente con la dislipidemia, la esteatosis hepática no alcohólica, conocida como hígado graso, afecta a 30 % de la población general y hasta 70 % de pacientes con obesidad o diabetes tipo 2, aumentando significativamente el riesgo de desarrollar esta enfermedad. Si bien en los llamados países desarrollados las complicaciones cardio y cerebrovasculares dadas por el proceso aterogénico han sido bien establecidas, en los países en vías de desarrollo, también son conocidas y su incidencia aumenta rápidamente.

La presente revisión busca poner en contexto ambos padecimientos con un novedoso concepto que se relaciona directamente con los niveles plasmáticos de la proteína transferidora de ésteres de colesterol, CETP, por sus siglas en idioma inglés. Esta proteína lleva a cabo un heterointercambio de ésteres de colesterol y triglicéridos entre lipoproteínas de alta (HDL), baja (LDL) y baja densidad (VLDL); y presenta un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis.

Con el trabajo desarrollado en nuestro laboratorio durante los últimos años, hemos podido definir su participación también en el desarrollo del hígado graso. En este sentido empezamos a entender los mecanismos moleculares por los que la vacuna terapéutica de aplicación nasal HB-ATV-8, diseñada en nuestro laboratorio con fundamento en la estructura tridimensional de CETP, ha resultado ser exitosa en estudios preclínicos desarrollados en el conejo y en el cerdo, como preventiva tanto en la formación de lesiones arteriales como en el desarrollo del hígado graso durante la ingesta de altas concentraciones de colesterol y triglicéridos. Consideramos que la vacuna HB-ATV-8, dentro de un protocolo de estudio clínico, definirá las posibilidades reales de su utilización de manera preventiva no solo en el proceso de aterogénesis en el humano, sino también como protectora del desarrollo de hígado graso.

La Aterosclerosis y el Hígado Graso No Alcohólico: Enfermedades Prevenibles por la Vacuna Terapéutica Hb-Atv-8 que las Vincula con la Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol (CETP)

Introducción

El metabolismo de lípidos y su regulación está involucrado en muchas patologías desde la obesidad hasta la enfermedad del hígado graso no alcohólica, diabetes mellitus, aterosclerosis y enfermedad cardiovascular. En estos mecanismos interviene el hígado, como órgano fundamental del metabolismo lipídico que está en estrecha comunicación con los órganos extrahepáticos. La vinculación entre estos es a través de los complejos macromoleculares de lípidos y proteínas, denominados lipoproteínas, entre las que se encuentran los quilomicrones, lipoproteínas de muy baja (VLDLs), baja (LDLs), intermedia (IDLs) y alta densidad (HDLs). Las apolipoproteínas que componen las diferentes lipoproteínas juegan un importante papel de reconocimiento para llevar a cabo el intercambio lipídico.

Existen otras proteínas que también participan en el metabolismo de lípidos, aunque no forman parte de estos complejos macromoleculares, entre ellas se encuentra la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) como un importante intercambiador lipídico, cuyos niveles elevados se correlacionan directamente con el desarrollo de las patologías del metabolismo lipídico. Aquí presentamos un análisis acerca de la función de CETP y cómo participa en el desarrollo de dos importantes patologías relacionadas con el metabolismo de lípidos: la aterosclerosis y la enfermedad del hígado graso no alcohólica; así como otras proteínas involucradas y estrategias encaminadas al control de estas enfermedades, incluyendo el desarrollo de la vacuna terapéutica de aplicación nasal HB-ATV-8 en nuestro laboratorio.

Hígado graso no alcohólico

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) es uno de los padecimientos hepáticos más comunes a nivel mundial.¹ Actualmente el hígado graso en cualquiera de sus etapas puede considerarse la manifestación hepática del síndrome

La Aterosclerosis y el Hígado Graso No Alcohólico: Enfermedades Prevenibles por la Vacuna Terapéutica Hb-Atv-8 que las Vincula con la Proteína Transferidora de Esteres de Colesterol (CETP)

metabólico, caracterizado por resistencia a la insulina con un elevado riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2, padecimientos cardiovasculares como enfermedades coronarias o arterosclerosis, hipertensión y dislipidemias.²

En los hepatocitos la acumulación descontrolada y excesiva de lípidos aparece principalmente en triglicéridos (TG), conocida como esteatosis hepática.¹⁻⁵ Sin embargo, el avance de estas alteraciones pudiera progresar hasta dar lugar a esteatohepatitis no alcohólica (NASH), estado en el que adicionalmente ocurren procesos inflamatorios, daño tisular y fibrosis donde su desarrollo progresivo produce cirrosis e incluso hepatocarcinoma, para finalmente culminar en falla hepática aguda, causando la muerte.¹

En condiciones normales las principales fuentes de donde provienen los ácidos grasos (FA) que llegan a acumularse en el hígado son los ácidos grasos libres (FFA), provenientes de los adipocitos por acción de la lipasa de triglicéridos (ATGL) que libera FFA al torrente sanguíneo para ser transportados hacia el hígado. Una segunda vía de donde provienen los FA es la síntesis *de novo* en los hepatocitos que contribuyen a la formación de TG (lipogénesis hepática); y la tercera vía mediante la cual se concentran los TG en el hígado es directamente de la dieta por absorción intestinal que deriva en la formación de remanente de quilomicrones en la circulación.^{3,4}

La desregulación del metabolismo de lípidos en el hígado conduce a la sobreproducción de lipoproteínas de densidad muy baja (VLDLs) de gran tamaño, a la disminución en el tamaño promedio de las LDLs con un aumento en su densidad (sdLDL) y al descenso de las concentraciones de HDLs y de su tamaño, correlacionando con signos de obesidad y síndrome metabólico.⁴

Las HDLs tienen gran importancia en la homeostasis de lípidos a nivel sistémico, ya que son mediadoras del transporte reverso de colesterol desde los tejidos periféricos hacia el hígado para excretarlo posteriormente como ácidos biliares. El inicio de este proceso ocurre cuando las HDLs interactúan con las células periféricas

La Aterosclerosis y el Hígado Graso No Alcohólico: Enfermedades Prevenibles por la Vacuna Terapéutica Hb-Atv-8 que las Vincula con la Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol (CETP)

(como macrófagos o fibroblastos) que, mediante procesos de difusión de lípidos libres y la participación del receptor basurero o *Scavenger Receptor Class B1* (SR-BI), secretan colesterol a las HDLs. Una vez que el colesterol se encuentra en las HDLs es esterificado por la acción de la lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT). Posteriormente la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) promueve su intercambio (CE) por TAG, provenientes de otros tipos de lipoproteínas como VLDL, IDL y LDL. Las LDLs e IDL son catabolizadas en el hígado mediante su internalización mediada por receptores específicos (LDLR), mientras que los remanentes de CE en las HDLs son internalizadas vía SR-BI y los TAG son hidrolizados en el hígado por la lipasa hepática.⁶

El NAFLD promueve la detección en plasma de niveles elevados de enzimas hepáticas principalmente aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT), que son indicadores del daño hepático, así como una elevada acumulación de TAG en el hígado (> 55 mg/g de tejido hepático) mayor a 5 % en hepatocitos.⁴

Algunos otros factores adicionales al desarrollo de NAFLD son la acumulación de grasa periférica previa (obesidad), disminución en la tasa de secreción de partículas lipoproteicas o por la reducción del contenido de TAG en las lipoproteínas secretadas por el hígado. Del contenido total de triglicéridos en el hígado, 60 % es proveniente de ácidos grasos libres (FFA), 25 % de lipogénesis *de novo* y 15 % de la dieta. En NAFLD la expresión de la translocasa de ácidos grasos (FA) o *cluster differentiation protein 36* (CD36) se encuentra incrementada del mismo modo que la expresión de la sintasa de ácidos grasos (FAS).⁴

En el NAFLD está presente una acumulación de triglicéridos (TAG) y colesterol libre (FC) sin incremento en la esterificación del colesterol.⁵ También se encuentran altos niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y triglicéridos, así como niveles disminuidos de lipoproteínas de alta densidad (HDLs).¹

Además, se ha reportado que en pacientes con NASH la tasa de secreción de

La Aterosclerosis y el Hígado Graso No Alcohólico: Enfermedades Prevenibles por la Vacuna Terapéutica Hb-Atv-8 que las Vincula con la Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol (CETP)

lipoproteínas del hígado puede estar disminuida y, por lo tanto, los TAG secretados y asociados a las partículas lipoproteicas no son suficientes para compensar su elevada concentración en el hígado. Al mismo tiempo, el hígado es incapaz de regular la lipogénesis en respuesta a las señales producidas durante los diferentes estados metabólicos, como la transición entre estado de ayuno y consumo de alimentos o a la señalización hormonal, por ejemplo, el caso de insulina.³

Aunado a esto, la afinidad de los receptores LDL se encuentra disminuida y también los niveles de apo-C3, que es un inhibidor de la lipoproteína lipasa (LPL). La proteína *Microsomal Triglyceride Transfer Protein* (MTTP) es esencial para la formación de VLDL en el hígado y se ha visto que en individuos con dietas ricas en grasas estos genes se silencian por metilación.³ Otras proteínas importantes son las sortilinas que actúan como receptores intracelulares de apo-B100 en el aparato de Golgi y facilitan el ensamblaje y exportación de LDL y la *Proprotein convertase subtilisin/kexintype 9* (PCSK9), favoreciendo la degradación de los receptores LDL.^{4,7} La lipasa (LPL) y los receptores de LDL son los responsables en gran medida de disminuir el contenido de LDL en circulación, la presencia de sdLDL pudiera estar mediada por acción de CETP al intercambiar TAG de las VLDL a LDL por ésteres de colesterol (CE) y viceversa. La actividad de CETP se ha visto incrementada en los pacientes con esteatosis hepática.^{3,6}

En NAFLD se encuentra un incremento de la síntesis *de novo* y asimilación de ácidos grasos (FA) que promueven su acumulación en los hepatocitos, misma que se asocia a una oxidación mitocondrial de FA sobrestimulada. Con la finalidad de disminuir la acumulación de FA debido a la alta tasa de oxidación por los mecanismos antes mencionados, las vías antioxidantes se encuentran activadas incluyendo la sobreexpresión de enzimas como la superóxido dismutasa y la catalasa. Además, la formación de adiposomas (*lipid droplets*) se ve favorecida por el incremento en la expresión de la *diglyceride acyl-transferase* (DGAT) y la disminución de la expresión de la *hormone sensitive lipase* (HSL).⁸

La Aterosclerosis y el Hígado Graso No Alcohólico: Enfermedades Prevenibles por la Vacuna Terapéutica Hb-Atv-8 que las Vincula con la Proteína Transferidora de Esteres de Colesterol (CETP)

Utilizando ratones con gen suprimido o *knockout* (KO) se ha observado que la ausencia de acetil CoA-carboxilasa 2 (ACC2) promueve resistencia a la obesidad con un incremento en la actividad de la *Carnitine palmitoyl transferase 1* (CPT-1) y promueve la oxidación de FA, del mismo modo que la supresión de la *Diacylglycerol acyltransferase 2* (DGAT2) interrumpe el último paso en la síntesis de FA y revierte la resistencia a insulina inducida por dietas altas en grasas, también atenúa la hiperlipidemia.⁴ En ratones deficientes de la *medium-chain acyl-CoA dehydrogenase* (MCAD) y *very long-chain acyl-CoA dehydrogenase* (VLCAD) también se observó un desarrollo prematuro de esteatosis hepática.⁷

En el NAFLD se ha observado que hay una disminución en la expresión de los genes *Cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1* (CYP7A1) y de la *Mitochondrial cytochrome P450 enzyme, sterol 27-hydroxylase* (CYP27A) que permiten el catabolismo de colesterol hacia ácidos biliares. Así como también *ATP binding cassette subfamily G member 1* (ABCG1) y *ATP-binding cassette sub-family G member 8* (ABCG8) que se encargan de transportar específicamente al colesterol.⁵ Además, otros genes llamados colesterogénicos se encuentran expresados o sobreexpresados con una disminución en la expresión de la *Sterol regulatory element-binding protein* (SREBP-2).⁴ Por otro lado, se ha visto que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es necesario para desarrollar NAFLD, pues activa la síntesis de colesterol e inhibe su eliminación mediante excreción por sales biliares. De igual forma, la *diacylglycerol acyltransferase-2* SREBP-2 y el receptor hepático X (LXR) se encuentran mayormente expresados, estos ejercen un control positivo sobre una gran variedad de genes involucrados en el metabolismo de lípidos en hepatocitos, como es el caso de *Acil-CoA-cholesterol aciltransferase* ACAT2, promoviendo la esterificación de colesterol para su incorporación en VLDL4. (Tabla 1)

Tabla 1. Alteraciones en la expresión de genes involucrados en el desarrollo y la progresión del NAFLD con una posible correlación en la expresión aumentada de CETP

La Aterosclerosis y el Hígado Graso No Alcohólico: Enfermedades Prevenibles por la Vacuna Terapéutica Hb-Atv-8 que las Vincula con la Proteína Transferidora de Esteres de Colesterol (CETP)

Gen	Proceso celular o metabólico involucrado	Expresión
AcetylCoAcarboxilasa	Síntesis <i>de novo</i> e internalización de ácidos grasos ^{2,8}	Aumentada
FattyAcidSynthase (FAS)		Aumentada
SREBP-1C		Aumentada
Adipophilin		Aumentada
CD36		Aumentada
CarnitinePalmitoyltransferase 1a (CPT1a)	B-ox en mitocondria ⁸	Disminuida
Long Chain acyl-CoA dehydrogenase (LCAD)		Aumentada
HADHa		Aumentada
ACOX	Otros genes de oxidación de ácidos grasos ^{2,8}	Aumentada
BOX		Aumentada
CYP2E1		Aumentada
CYP4A11		Aumentada
PPARα		Disminuida
PNPLA3		*
SuperoxideDismutase	Vías antioxidantes ^{2,8}	Aumentada
Cathalase		Aumentada
GlutathioneSynthetase		*
Diacylglycerol O-acyltransferase (DGAT1)	Formación de adiposomas (<i>lipid droplets</i>) ^{2,46}	Aumentada
PPARγ		Aumentada
Hormone sensitiveLipase		Disminuida
ChERBP	Metabolismo de carbohidratos ^{2,47,48}	Aumentada
ACAT2	Metabolismo de lipoproteínas ⁵	Aumentada
MTTP		Disminuida
ApoA1		Aumentada
ApoC3		Disminuida

La Aterosclerosis y el Hígado Graso No Alcohólico: Enfermedades Prevenibles por la Vacuna Terapéutica Hb-Atv-8 que las Vincula con la Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol (CETP)

ABCG1	Homeostasis de colesterol ²	Disminuida
ABCG8		Disminuida
HMGCoAR		Aumentada
SREBP2		Disminuida
LXR		Aumentada
*La expresión del gen se ve aumentada o disminuida dependiendo del estado metabólico		

La obesidad como parte del síndrome metabólico provoca que el tejido adiposo no sea capaz de almacenar niveles altos de grasas causando una acumulación desproporcionada en hígado lo que produce fibrosis y acumulación de lípidos en compartimentos extracelulares (matriz extracelular) e incluso en otros órganos como músculo y páncreas (células β), causando lipotoxicidad asociada a procesos intracelulares, por ejemplo, el estrés oxidativo y el desarrollo de autofagia.^{7,9} Una alta concentración de glucosa en el hígado también activa al factor de transcripción *Carbohydrate-responsive element-binding protein* (ChERBP) incrementando la expresión de la piruvato cinasa y una amplia gama de genes involucrados en la lipogénesis.²

Uno de los factores que empieza a asociarse de manera importante en el desarrollo de NAFLD es la resistencia a insulina (IR), esto debido a la incidencia de esteatosis en pacientes con diabetes mellitus 2, cercana a 50 % y que puede aumentar hasta 90 % en individuos adicionalmente obesos. La acumulación de FA en el hígado puede desencadenar la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a nivel mitocondrial, causando peroxidación lipídica, producción de citocinas y necrosis. Esto se ha asociado directamente a la IR y al bajo contenido de ácidos grasos ω -3.² Existe evidencia de que cuando los hepatocitos son expuestos a altas concentraciones de ácidos grasos saturados (SFA) por intervalos de tiempo prolongados se producen respuestas inflamatorias mediadas por receptores tipo Toll (TLR) y el proceso de apoptosis es activado al presentarse estrés a nivel de retículo

La Aterosclerosis y el Hígado Graso No Alcohólico: Enfermedades Prevenibles por la Vacuna Terapéutica Hb-Atv-8 que las Vincula con la Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol (CETP)

endoplásmico.³

La proteína *patatin-like phospholipase domain-containing protein 3* (PNPLA3) tiene un papel importante en cuanto a la distribución de TAG en los hepatocitos, pues la expresión de la proteína mutada conduce a una acumulación neta de TAG, ya que se ha visto que la mutante se encuentra en mayor medida localizada en adiposomas (*lipid droplets*). Además PNPLA3 induce una redistribución de los FA entre los TAG y los fosfolípidos membranales.¹⁰⁻¹²

Otro gen que tiene relación con el metabolismo de triglicéridos en el hígado es el de la proteína NPC1, denominada así por provocar una lipidosis autosómica recesiva denominada *Niemann-Pick Disease type 1* (NPC1), que se caracteriza por causar degeneración neurológica y falla hepática en infantes. La proteína NPC1 está integrada a la membrana de los organelos endocíticos, se ha propuesto que está involucrada en la exportación de colesterol desde estos organelos hacia diversos compartimentos celulares. La ausencia de esta proteína causa un desbalance en la homeostasis de colesterol en el retículo endoplásmico al no poder detectar aumentos en los niveles de colesterol, provocando un incremento en la biosíntesis y la incorporación de más moléculas de colesterol. En pacientes con esta enfermedad se han encontrado disminuciones en los niveles de HDL circulantes.¹³

En ratones KO para esta proteína, se ha observado una disminución en el contenido de TAG en hepatocitos y suero, por lo que se propone que aumenta la biosíntesis *de novo* de colesterol en estos a partir de moléculas de acetil-CoA, ya que al inhibir la síntesis de colesterol en este tipo celular, se recuperan los valores normales del contenido de TAG. Debido a estas evidencias parece que NPC1 empieza a formar parte de los factores clave que regulan el metabolismo de los TAG y la obesidad.¹³

La apolipoproteína A5 (APOA5) identificada se encuentra expresada predominantemente en el hígado y reside en las HDL y VLDL. Se ha observado que en ratones KO para ApoA5 los niveles de TAG en plasma se encuentran elevados hasta 400 % respecto a los valores normales. Y de manera contraria, ratones transgénicos que sobreexpresan ApoA5 muestran niveles de TAG en plasma, que

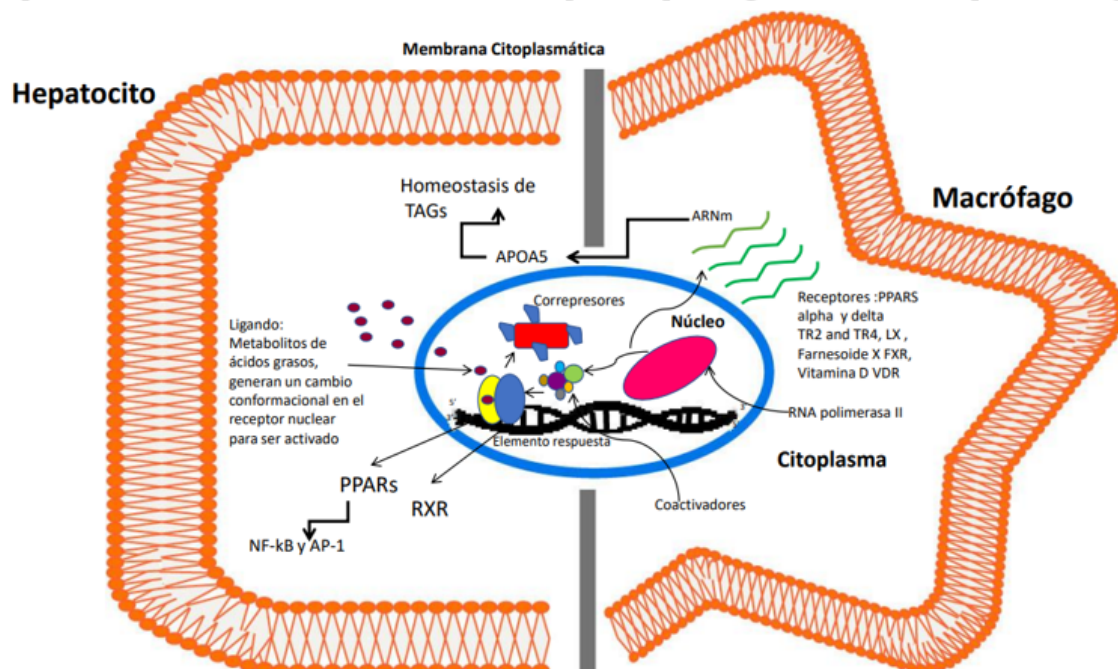
La Aterosclerosis y el Hígado Graso No Alcohólico: Enfermedades Prevenibles por la Vacuna Terapéutica Hb-Atv-8 que las Vincula con la Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol (CETP)

corresponden a la tercera parte con respecto a los valores en animales control.¹⁴

Es muy importante mencionar que los receptores nucleares, como el receptor activado por el proliferador del peroxisoma (PPARs, se activan uniéndose con el receptor retinoide X, promoviendo la transcripción de los genes reguladores de la homeostasis de TAG e incluyendo ApoA 5.¹⁴ Estos receptores, así como otros entre los que podemos incluir a RXR, TR2 y TR4, participan activamente en el metabolismo de lípidos en enfermedades como hígado graso y aterosclerosis. (Figura 1)

Figura 1.

Receptores nucleares del metabolismo de lípidos que regulan la transcripción de genes



Son comunes en los hepatocitos y los macrófagos están involucrados con la enfermedad de hígado graso no alcohólico y la aterosclerosis. Receptores nucleares activados por ligando PPAR: PPAR- α es activado por leucotrieno Beta 4 y ácido 8S-

La Aterosclerosis y el Hígado Graso No Alcohólico: Enfermedades Prevenibles por la Vacuna Terapéutica Hb-Atv-8 que las Vincula con la Proteína Transferidora de Esteres de Colesterol (CETP)

hidroxieicosatetraenoico (HETE), PPAR- γ por 15 HETE y ácido -13 hidroxioctadecadienoico.^{46,47} Miembros de la familia de PPAR pueden dimerizar con RXR para ejercer su efecto sobre la transcripción de genes reguladores de la homeostasis de TAG. PPAR α y δ son receptores nucleares involucrados en inflamación, así como los receptores TR2 y TR4.⁴⁸⁻⁵⁰ Estos receptores nucleares dependientes de ligando generan que las proteínas correpressoras sean disociadas del ADN, permitiendo que las proteínas coactivadoras sean reclutadas y por último la ARN polimerasa II, dando inicio a la transcripción de genes específicos.⁵¹

Aterosclerosis

La enfermedad de hígado graso como ya lo hemos analizado resulta de la alteración del metabolismo de lípidos, sin embargo, existen factores homólogos a los involucrados en el desarrollo de aterosclerosis, enfermedad inflamatoria crónica y progresiva, causada por la acumulación de colesterol en la capa íntima de las arterias y una de las principales causas de muerte en países del primer mundo y en vías de desarrollo, la cual progresa a lo largo de varios años y cursa diferentes etapas.¹⁵⁻¹⁷ La aterosclerosis es promovida por diferentes estímulos como sedentarismo, dieta, tabaquismo, obesidad, dislipidemias, por ejemplo, del tipo de trigliceridemias e hipercolesterolemia.¹⁷

A nivel celular la aterosclerosis involucra numerosos mecanismos, entre los que podemos mencionar proliferación descontrolada, apoptosis, procesos inflamatorios, estrés oxidativo, angiogénesis y regulación epigenética.^{17,18} El endotelio vascular tiene importantes funciones de carácter homeostático en la fisiología vascular como la regulación del tono vasomotor al enviar señales a la capa muscular en la capa media arterial, el mantenimiento de una superficie anticoagulante al interior de los vasos, que provoca que las plaquetas no se adhieran; posee propiedades

La Aterosclerosis y el Hígado Graso No Alcohólico: Enfermedades Prevenibles por la Vacuna Terapéutica Hb-Atv-8 que las Vincula con la Proteína Transferidora de Esteres de Colesterol (CETP)

fibrinolíticas, en tanto que puede promover la disolución de fibrina formada previamente, mantiene una superficie interior de los vasos en la que los monocitos circulantes no se adhieren, es una barrera efectiva para inhibir el paso de elementos sanguíneos, como el colesterol LDL, hacia el endotelio. Considerando la importancia de las diferentes funciones del endotelio hay evidencias suficientes de que la disfunción endotelial es el fenómeno inicial en el desarrollo de aterosclerosis.¹⁹

Los ateromas son lesiones focales (características de la aterosclerosis) que inician en la capa más interna de una arteria. El exceso de LDL en el torrente sanguíneo es insertado en la pared de la arteria, lo que provoca en gran medida la disfunción endotelial. En respuesta, los monocitos llegan al sitio de la lesión, uniéndose a las moléculas por adhesión. Este complejo nuevo es llevado al interior de la pared de la arteria por las quimiocinas, una vez dentro, los monocitos envuelven a las LDL intentando eliminarlas.²⁰

El desarrollo de la placa está dado por un aumento de la permeabilidad a las lipoproteínas, sobre todo del tipo LDL, las cuales atraviesan el endotelio acompañadas de monocitos que se adhieren a la capa íntima de las arterias. Esta capa se inflama por la conversión de los monocitos en macrófagos. Si no hay muchas lipoproteínas, los macrófagos captan todas las que se han oxidado y se modera la reacción inflamatoria; si, por el contrario, son muchas, las LDL que se han congregado en la zona los macrófagos se transforman en las células espumosas; estas estallan y forman una masa de macrófagos muertos, colesterol, ácidos grasos, triglicéridos y restos de las lipoproteínas de color amarillento que, unidos a la inflamación local de la íntima, reducen mucho la luz de la arteria, esto se define como *estenosis*. Todo ello, más la aparición de colágeno en el punto de lesión, que atrapa la masa formada, es lo que termina formando la placa. Estos eventos pudieran causar el cierre parcial o total de las arterias, causando isquemia en ese sitio específico o desprendiéndose en forma de émbolo y bloqueando cualquier otra arteria del cuerpo que puede derivar en su manifestación más crítica, en un infarto agudo al miocardio o en un infarto cerebral.²¹

La Aterosclerosis y el Hígado Graso No Alcohólico: Enfermedades Prevenibles por la Vacuna Terapéutica Hb-Atv-8 que las Vincula con la Proteína Transferidora de Esteres de Colesterol (CETP)

En la aterogénesis hay dos eventos iniciales fundamentales: primero, la internalización de LDL circulantes; y segundo, la internalización de monocitos circulantes, que al migrar al interior de la arteria se transforman en macrófagos. Ambos procesos son favorecidos por la disfunción endotelial.

Las LDL en estado nativo no tienen propiedades especialmente tóxicas para el microambiente subendotelial. Sin embargo, ciertas modificaciones pueden transformarlas en moléculas altamente dañinas para el endotelio y para la capa muscular. Las LDL se modifican por oxidación, glicosilación (sobre todo en la diabetes) y agregación: asociación a proteoglicanos o a complejos inmunes. Cuando las partículas de LDL son atrapadas en el subendotelio, pueden sufrir oxidación en diferentes grados, siendo internalizadas por los macrófagos a través de los receptores basurero (*scavenger receptors*) que existen en la superficie de estas células. Las LDL oxidadas no son degradadas con facilidad en los lisosomas, como lo son las nativas, y tienden a acumularse en el citoplasma. Esto lleva a una sobrecarga de colesterol esterificado intracelular y a la formación de células espumosas, generando las estrías grasas.

Además de la agresión causada a los macrófagos, las LDL oxidadas tienen acción quimiotáctica para otros monocitos y activan genes que en el endotelio promueven la síntesis de proteínas, por ejemplo, el factor estimulador de colonias de macrófagos. Por lo tanto, pueden contribuir a expandir la reacción inflamatoria al estimular el reclutamiento de macrófagos derivados de monocitos, y la entrada de nuevos monocitos a la lesión²²

Adicionalmente a la elevada concentración de LDL y la reducción en las HDL circulantes, los elevados niveles de TAG constituyen otro factor de riesgo independiente para las enfermedades coronarias *Coronary heart disease* (CHD), que a su vez está asociado al síndrome metabólico (principalmente diabetes y obesidad)²³

Otro receptor descubierto recientemente que ubica las LDL oxidadas, denominado *oxidized low-density lipoprotein receptor-1* (LOX-1), se expresa en el tejido

La Aterosclerosis y el Hígado Graso No Alcohólico: Enfermedades Prevenibles por la Vacuna Terapéutica Hb-Atv-8 que las Vincula con la Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol (CETP)

vascular, capta el LDL oxidado, y es regulado por la Angiotensina II. Esto es consistente con reciente investigación experimental y clínica que sugiere que tanto los inhibidores de ECA como los antagonistas del receptor A1 de la Angiotensina II tienen un efecto antiateroesclerótico.²⁴

Las proteínas participantes en cada uno de los mecanismos mencionados constituyen eventos moleculares organizados y han sido estudiados. Sin embargo, también existen proteínas que a su vez participan en el desarrollo de las dislipidemias, contribuyendo indirectamente en el desarrollo de aterosclerosis; entre estas proteínas se encuentra la transferidora de ésteres de colesterol (CETP), cuya función es de importante relevancia, debido a que CETP es una glicoproteína de plasma que facilita la transferencia de ésteres de colesterol proveniente de las HDL a las LDL y VLDL (ricas en triglicéridos, originando niveles más bajos de HDL, aumentando los niveles de LDL y VLDL).²⁵

CETP intercambia ésteres de colesterol a lipoproteínas que contienen ApoB por triglicéridos. Algunas otras propiedades de las lipoproteínas HDL del tipo cardioprotector es que son antioxidantes, antiinflamatorias, antiapoptóticas, antitrombóticas, vasodilatorias, antiinfecciosas y antidiabéticas²⁶ Se sabe que CETP es expresado principalmente en hígado, tejido adiposo e intestino. Los niveles de expresión hepática de CETP aumentan en respuesta a dietas altas en colesterol y grasas o por hipercolesterolemia endógena.²⁷

Las VLDLs ricas en triglicéridos son convertidas en LDL en la circulación por la acción de CETP. Los incrementos de lipoproteínas del tipo LDL y VLDL son considerados de carácter proaterogénico, por lo que CETP juega un importante papel en el desarrollo de aterosclerosis.^{28,29}

El hígado es el órgano con mayores niveles de mRNA para la expresión de CETP, sin embargo, el tejido adiposo contribuye en mayor medida a la cantidad de proteína CETP circulante debido a la mayor proporción de dicho tejido en el organismo. Se ha encontrado una relación entre dietas ricas en colesterol con el aumento de la

La Aterosclerosis y el Hígado Graso No Alcohólico: Enfermedades Prevenibles por la Vacuna Terapéutica Hb-Atv-8 que las Vincula con la Proteína Transferidora de Esteres de Colesterol (CETP)

expresión de CETP en hígado y plasma. Esta relación directa ha sido confirmada en estudios en poblaciones de japoneses, que presentan mutaciones en el gen de CETP, provocando que haya una mayor concentración de HDL en plasma respecto a individuos control, lo cual ha llevado a proponer que la inhibición de CETP aumenta los niveles de HDL circulantes.³⁰

Por lo tanto, CETP podría considerarse un importante potenciador para el desarrollo de enfermedades como hígado graso no alcohólico y aterosclerosis, por estar involucrada en el desbalance lipídico en cuanto a los niveles de lipoproteínas circulantes se refiere. El gen que codifica para la proteína CETP se encuentra flanqueado por secuencias reconocidas con elementos de respuesta a colesterol, lo cual sugiere qué proteínas involucradas en la modulación de la síntesis de colesterol podrían ejercer acción directa sobre los niveles de expresión de CETP. También se encontró que los ácidos grasos pueden regular la expresión de CETP de acuerdo con el grado de insaturaciones que presentan, tal como se ha demostrado en cultivos de células HepG2 donde se midieron los niveles de mRNA para CETP después de la incubación con distintos tipos de ácidos grasos (ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico o ácido decosahexanoico,) encontrando niveles por debajo de 50 % al ser comparados con las células control.³¹

En condiciones de NASH los niveles de HDL se encuentran reducidos, mientras que los niveles de CETP se encuentran por encima de lo normal. Siendo los *polyunsaturated fatty acids* (PUFA) los que reducen los niveles de expresión de CETP, mientras que las dietas altas en grasas y colesterol provocan un aumento en su expresión.³²

Los niveles de mRNA correspondientes a CETP están modulados por diversos factores de transcripción que reconocen la secuencia CCAAT presente en el promotor del gen, C/EBP- α y SREBP-1 que puede ser modulado por la presencia de diversos ácidos grasos, particularmente por la disponibilidad de ácidos grasos ω -3.² Los órganos que contienen mayores niveles de mRNA de CETP son el hígado, el bazo y el tejido adiposo, mientras que los órganos con menores niveles presentes

La Aterosclerosis y el Hígado Graso No Alcohólico: Enfermedades Prevenibles por la Vacuna Terapéutica Hb-Atv-8 que las Vincula con la Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol (CETP)

son intestino delgado, glándulas adrenales, riñones y corazón.³²

CETP

La proteína CETP está compuesta por 476 residuos, tiene un peso molecular de 66 kDa, presenta residuos glicosilados, contiene cinco cisteínas libres y un alto porcentaje de residuos hidrofóbicos en comparación con otras proteínas plasmáticas (aproximadamente 44 %). A principios del año 2007 fue reportada la estructura tridimensional de CETP con una resolución de 2.2 Å.

De manera general, el cristal refleja una estructura alargada en forma de boomerang, con dimensiones de 135x30x35 Å, y un plegamiento homólogo a la proteína BPI (*bactericidal/permeability-increasing protein*). La descripción estructural de CETP se puede definir en cuatro dominios: un barril en cada lado de la proteína, denominados barril N y C, una hoja-β central conectada entre los dos barriles y una extensión C-terminal, llamada hélice-X, la cual no está presente en la proteína BPI; cada barril contiene hojas-β altamente empaquetadas junto a dos hélices (A y B en el barril N, A' y B' en el barril C).³³

La estructura cristalográfica revela un túnel de 60 Å de longitud que puede acomodar dos moléculas de ésteres de colesterol en el interior y una molécula de fosfolípido asociada a cada puerta del túnel, orientadas de tal manera que las cadenas de ácidos grasos se encuentran hacia el interior del túnel y los grupos de cabeza polar localizados en la interfase con el agua. Las puertas del túnel son lo suficientemente grandes para permitir el acceso de lípidos, una de ellas está protegida por la hélice-X en la región del barril N y la otra mediante dos estructuras denominadas *solapas móviles* ($\Omega 1$ y $\Omega 2$) en la parte del barril C. Asimismo, estudios estructurales y de mutagénesis sugieren que las moléculas de ésteres de colesterol y triglicéridos (lípidos neutros) se mueven a lo largo del túnel pasando por la estrecha región central con dimensiones de 10 Å de amplitud y 5 Å de alto.³³

La Aterosclerosis y el Hígado Graso No Alcohólico: Enfermedades Prevenibles por la Vacuna Terapéutica Hb-Atv-8 que las Vincula con la Proteína Transferidora de Esteres de Colesterol (CETP)

Actualmente, en nuestro laboratorio hemos encontrado que una solución alterna o simultánea de facilitación del transporte de lípidos entre partículas lipoproteicas puede ser a través de la formación de estructuras micelares asociadas a la región carboxilo terminal de CETP (hélice-X) cuando esta región se encuentra estructurada en hélice- α .^{34, 35}

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 libera en las lipoproteínas receptoras.³⁶

Estudios bioquímicos han mostrado que CETP presenta una alta afinidad por las partículas HDL discoidales nacientes de 10 nm de diámetro ($K_d = 20-20$ nM), este tamaño coincide con el observado en la curvatura cóncava de CETP, sugiriendo que puede unirse a una partícula individual de HDL a través de su superficie cóncava con un modesto movimiento de la hélice- α y de la solapa $\Omega 1$. Para que se adapte a lipoproteínas de diámetros mayores, como LDL y VLDL, debe ocurrir un cambio conformacional en las hélices de los barriles N y C. De igual forma, la superficie de la proteína contiene numerosos residuos polares e hidrofóbicos distribuidos uniformemente, lo cual sugiere que las interacciones con la superficie de las lipoproteínas están distribuidas de igual forma.^{37,38} Desde el punto de vista de la expresión génica de CETP, se sabe que cuando esta se ve aumentada, correlaciona con la expresión alterada de genes involucrados en el desarrollo de NAFLD. La tabla 1, mostrada anteriormente, representa esto último.

De manera que uno de los objetivos de nuestro laboratorio, utilizando la secuencia de aminoácidos H486 al S496, últimos once residuos de CETP,^{39,42} fue el crear una vacuna que inhibiera la actividad de la misma y elevara los niveles de HDL.

Esta secuencia incluye tres de los cuatro residuos claves para mantener la capacidad de unión y transferencia de lípidos, estos son L₄₈₈, F₄₉₁ y L₄₉₅. La secuencia

La Aterosclerosis y el Hígado Graso No Alcohólico: Enfermedades Prevenibles por la Vacuna Terapéutica Hb-Atv-8 que las Vincula con la Proteína Transferidora de Esteres de Colesterol (CETP)

del péptido sintético no tiene homología con otros epitopes de CETP ni con otras proteínas de mamífero, en cambio es alta con el carboxilo terminal de CETP de varias especies: 100 % con conejo, humano y mono, y 90 % con hámster. Debido a que el péptido está conformado por sólo once residuos, presenta solo una ventana de reconocimiento al sistema inmunológico.³⁴

La eficacia de la respuesta inmune también está determinada por la vía de su administración. En general, las ventajas de una vacuna radican en que son de bajo costo, altamente específicas con pocos efectos secundarios. Sin embargo, una vacuna de aplicación intramuscular provoca riesgos de contaminación y lesiones por la utilización de agujas; además, requiere personal capacitado para su administración, provocando mayores costos.

Nuestra vacuna terapéutica HB-ATV-8 utiliza la administración nasal, de manera que, al no necesitar de personal capacitado para su administración, no aumenta sus costos. Por otro lado, al ser un medio no invasivo, se evitan las lesiones y los riesgos de contaminación. Además, es más práctica e indolora, lo que provee mayor aceptación por parte de los usuarios, ya que puede ser administrada en personas de cualquier edad de una manera rápida y sin el estrés generado por la inyección.

La vacuna terapéutica HB-ATV-8 de administración nasal está constituida por una preparación de nanopartículas micelares que incluyen el péptido carboxilo terminal de CETP como inmunógeno, fosfatidilcolina, lisofosfolípido y lípidos; provenientes de la membrana celular de la arqueobacteria *Thermus aquaticus* como una exitosa mezcla promotora de una respuesta inmune adaptativa en el mamífero.

Uno de los aspectos novedosos en el diseño de la vacuna fue el empleo de la lisofosfatidilcolina, una molécula que identificamos que induce la formación y estabilización de la estructura secundaria funcional hélice- α en el péptido hélice-Y (antígeno de la composición vacunal).^{34,39}

El hallazgo más importante con el uso de la vacuna terapéutica HB-ATV-8 en el modelo experimental del conejo y del cerdo, se relaciona a que, con niveles altos de lípidos en plasma, cuando se lleva a cabo el tratamiento con la composición vacunal,

La Aterosclerosis y el Hígado Graso No Alcohólico: Enfermedades Prevenibles por la Vacuna Terapéutica Hb-Atv-8 que las Vincula con la Proteína Transferidora de Esteres de Colesterol (CETP)

claramente se observa una importante disminución en el engrosamiento de la túnica íntima de la aorta abdominal, directamente relacionada con una disminución en la formación de una neoíntima y de placas ateroscleróticas.

El engrosamiento de la íntima y el área de lesiones de la aorta se reducen notablemente en los grupos tratados con la composición vacunal al compararlos con las aortas de los animales experimentales que no recibieron la administración de la vacuna. Otro aspecto fundamental de la composición vacunal es la protección contra el desarrollo del hígado graso no alcohólico, relacionada con una disminución en la esteatosis tanto microvesicular, como macrovesicular asociada a una disminución en la fibrosis perisinusoidal y perivenular.

En su conjunto, nuestros datos sugieren que la inmunización intranasal con nanopartículas micelares lípido/CETP inhibe tanto la progresión de la aterosclerosis, como una de sus complicaciones más comunes la presencia de hígado graso.^{39,43-45}

Referencias

1. Fon Tacer K, Rozman D. Nonalcoholic Fatty liver disease: focus on lipoprotein and lipid deregulation. *Lipids* 2011(2011):783976.
2. Pettinelli P, Obregón M, Videla L. Molecular mechanisms of steatosis in nonalcoholic fatty liver disease, *Hosp.* 2001;26(3):441-450.
3. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science.* 2011;332(6037):1519-1523.
4. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, et al. Parks, Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin. Invest.* 2005;115(5):1343-1351.
5. Kerr TA, Davidson NO. Cholesterol and nonalcoholic fatty liver disease:

La Aterosclerosis y el Hígado Graso No Alcohólico: Enfermedades Prevenibles por la Vacuna Terapéutica Hb-Atv-8 que las Vincula con la Proteína Transferidora de Esteres de Colesterol (CETP)

Renewed focus on an old villain. *Hepatology*. 2012;56(5):1995–1998.

6. Yamashita S, Hirano K, Sakai N, et al. Molecular biology and pathophysiological aspects of plasma cholesteryl ester transfer protein. *Biophys*. 2000;1529(1□3):257–275.
7. Koo SH. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Mol. Hepatol*. 2012;19(3);210–5.
8. Kohjima M, et al. Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med*. 2007;20(3):351–358.
9. Duval C, et al. Adipose tissue dysfunction signals progression of hepatic steatosis towards nonalcoholic steatohepatitis in C57Bl/6 mice. *Diabetes*. 2012;59(12):3181□91.
10. Romeo S, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Genet*. 2008;40(12):1461–5.
11. Ray K. NAFLD: PNPLA3 variant and hepatic steatosis. *Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 2014;11(8):455.
12. Ruhanen H, et al. PNPLA3 mediates hepatocyte triacylglycerol remodelling. *Lipid Res*. 2014;55(4):739–46.
13. Uronen RL, et al. Niemann-pick C1 modulates hepatic triglyceride metabolism and its genetic variation contributes to serum triglyceride levels. *Thromb. Vasc. Biol*. 2010;30(8):1614–20.
14. Vu-Dac N, et al. Apolipoprotein A5, a crucial determinant of plasma triglyceride levels, is highly responsive to peroxisome proliferator-activated receptor α . *J. Biol. Chem*. 2003;278(20):17982–5.
15. Vogel RA. Coronary Risk Factors, Endothelial Function, and Atherosclerosis: A Review. *Cardiol*. 1997;20:426–32.

La Aterosclerosis y el Hígado Graso No Alcohólico: Enfermedades Prevenibles por la Vacuna Terapéutica Hb-Atv-8 que las Vincula con la Proteína Transferidora de Esteres de Colesterol (CETP)

16. . Packard RRS, Libby P. Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and Risk Prediction. *Chem.* 2007;54(1)24–38.
17. Tapia-Vieyra JV, Delgado-Coello B, Mas-Oliva J. Atherosclerosis and Cancer; A Resemblance with Far-reaching Implications. *Archives of Medical Research.* 2017;48(1)12–26.
18. Rezzani R, Bonomini F, Tengattini S, et al. Atherosclerosis and oxidative stress, *Histopathol.* 2008;23(3):381–90.
19. Florenzano F. Fisiopatología de la placa ateroesclerótica. *Enfermedades Cardiovasc. Clínica Las Condes Jefe Cardiol. Hosp. Salvador Dep. Of. Oriente, Univ. Chile.* 2000;11(2):11.
20. Thenappan T, Ali Raza J, Movahed A. Aortic atheromas: current concepts and controversies-a review of the literature. *Echocardiography.* 2008;25(2)198–207.
21. Sary HC. et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 1995;15(9):1512–31.
22. E., G. S., D. A., and L. R., 'Aortic atheromas and stroke: Review of literature', *J. Investig. Med.,* vol. 61, no. 6, pp. 956–966, 2013.
23. Nair J, Kakkar VV, Shanker J. Comparative analysis of inflammatory gene expression levels in metabolic syndrome & coronary artery disease. *Indian J. Med. Res.* 2017;145(6)777–85.
24. Paquette M, Dufour R, Baass A. Scavenger Receptor LOX1 Genotype Predicts Coronary Artery Disease in Patients With Familial Hypercholesterolemia. *J. Cardiol.* 2017;33(10):1312–8.
25. Weber O, Bischoff H, Schmeck C, et al. Cholesteryl ester transfer protein and its inhibition. *Mol. Life Sci.* 2010;67(18):3139–49.

La Aterosclerosis y el Hígado Graso No Alcohólico: Enfermedades Prevenibles por la Vacuna Terapéutica Hb-Atv-8 que las Vincula con la Proteína Transferidora de Esteres de Colesterol (CETP)

26. Zakiev ER, Nikiforov NG, Orekhov A. N. Cell-Based Models for Development of Antiatherosclerotic Therapies. *BioMed Research International*. 2017;2017.
27. Luo Y, Liang CP, Tall AR. The Orphan Nuclear Receptor LRH-1 Potentiates the Sterol-mediated Induction of the Human CETP Gene by Liver X Receptor. *Biol. Chem*. 2011;276(27):24767–73.
28. Reccia I, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: A sign of systemic disease. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 2017;72:94–108.
29. Lucero D, et al. Pro-inflammatory and atherogenic circulating factors in non-alcoholic fatty liver disease associated to metabolic syndrome. *Chim*. 2011;412(1–2):143–7.
30. Mabuchi H, Nohara A, Inazu A. Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) Deficiency and CETP Inhibitors. *Cells*. 2014;37(11):777–84.
31. Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *Lipid Res*. 1993;34(8):1255–74.
32. Hirano R, Igarashi O, Kondo K, et al. Regulation by long-chain fatty acids of the expression of cholesteryl ester transfer protein in HepG2 cells. *Lipids*. 2001;36(4):401–406.
33. Qiu X, et al. Crystal structure of cholesteryl ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules. *Struct. Mol. Biol*. 2007;14(2):106–13.
34. 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 *Struct. Biol*. 2014;186(1):19–27.
35. García-González V, Mas-Oliva J. Amyloid fibril formation of peptides derived from the C-terminus of CETP modulated by lipids. *Biophys. Res. Commun*. 2013;434(1):54–9.

La Aterosclerosis y el Hígado Graso No Alcohólico: Enfermedades Prevenibles por la Vacuna Terapéutica Hb-Atv-8 que las Vincula con la Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol (CETP)

36. Hamilton JA, Deckelbaum RJ. Crystal structure of CETP: new hopes for raising HDL to decrease risk of cardiovascular disease? *Struct. Mol. Biol.* 2007;14(2):95–7.
37. Xian-cheng J, Bruce C, Cocke T, et al. Point Mutagenesis of Positively Charged Amino Acids of Cholesteryl Ester Transfer Protein: Conserved Residues within the Lipid Transfer/Lipopolysaccharide Binding Protein Gene Family Essential for Function. *Biochemistry.* 1995;34(21):7258–63.
38. Desrumaux C, Athias D, Masson P, et al. Influence of the electrostatic charge of lipoprotein particles on the activity of the human plasma phospholipid transfer protein. *Lipid Res.* 1998;39(1):131–42.
39. García-González V, Delgado-Coello B, Pérez-Torres A, et al. Reality of a Vaccine in the Prevention and Treatment of Atherosclerosis. *Archives of Medical Research.* 2015;46(5):427–37.
40. Mas-Oliva J, Alonso-Garcia AL. Sistema para la cuantificación de la proteína transferidora de ésteres de colesterol en muestras biológicas y sintéticas. 2007;246945.
41. Mas-Oliva J, Alonso-Garcia AL. System for the Quantification of the cholesteryl ester transfer protein in biological and synthetic samples. 2007;1242446.
42. Mas-Oliva J, Alonso-Garcia AL. Immuno enzymatic quantification method for cholesterol ester transferring protein (CETP). *US.* 2010;7749721 B2.
43. Mas Oliva J, Delgado-Coello BA, García-González VG, Pérez-Torres A. Nasal vaccine against the development of atherosclerosis disease and fatty liver. *US* 2017;9539312 B2.
44. Mas Oliva J, Delgado-Coello BA, García-González VG, Pérez-Torres A. Vacuna de aplicación nasal contra el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica y el hígado graso. 2014;WO2014003531.

La Aterosclerosis y el Hígado Graso No Alcohólico: Enfermedades Prevenibles por la Vacuna Terapéutica Hb-Atv-8 que las Vincula con la Proteína Transferidora de Esteres de Colesterol (CETP)

45. Mas Oliva J, Delgado-Coello BA, García-González VG, Pérez-Torres A. Nasal vaccine against the development of atherosclerosis disease and fatty liver. EP 2015;2868327 A1.
46. Glass CK, Ogawa S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. Rev. Immunol. 2006;6(1)44–55,.
47. Glass CK, Saijo K. Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. Rev. Immunol. 2010;10(5)365–76.
48. Fuchs CD, Traussnigg SA, Trauner M. Nuclear Receptor Modulation for the Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Liver Dis. 2016.36(1)69–86.
49. Arrese M. Nonalcoholic fatty liver disease: liver disease: an overlooked complication of diabetes mellitus. Rev. Endocrinol. 2010;6(12)660–1.
50. Lin SJ, et al. TR2 and TR4 Orphan Nuclear Receptors. 2017;357–73.
51. Wagner M, Zollner G, Trauner M. Nuclear receptors in liver disease. Hepatology. 2011;53(3)1023–34.