

Mecanismos de aterogenicidad del LDL: nuevos enfoques de la captación de LDL en macrófagos

Mechanisms of LDL atherogenicity: new approaches of the process of macrophagic uptake of LDL

Dr. Diego Lucero¹

¹Bioquímico; Doctor, Universidad de Buenos Aires. Postdoctoral fellow en el Lipoprotein Metabolism Laboratory; Translational Vascular Medicine Branch; National Heart, Lung, and Blood Institute; National Institutes of Health, Bethesda, EE.UU.

Resumen

La incorporación de partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en los macrófagos, conducente a la formación de células espumosas, es un punto fundamental en la aparición de la placa aterosclerótica. Históricamente se ha reconocido a la captación de LDL oxidadas por parte de los macrófagos, mediante receptores eliminadores (scavengers), como el mecanismo por excelencia para describir este proceso. Sin embargo, la formación de las células espumosas no sería completamente explicada por este mecanismo. En los últimos años, el papel de otros actores, como la pinocitosis de lipoproteínas por parte de los macrófagos y la intervención de otros receptores, está cobrando importancia como mecanismos de internalización de LDL nativas. En este artículo se abordan estos últimos mecanismos, exponiendo la complejidad del proceso de captación de LDL por parte de los macrófagos.

PALABRAS CLAVE: macrófagos, célula espumosa, lipoproteína de baja densidad, pinocitosis, sortilina1

Abstract

LDL uptake by macrophages, leading to foam cell formation, is a fundamental point in the development of atherosclerotic lesion. The uptake of oxidized LDL by macrophages, through scavenger receptors, has been historically recognized as the main mechanism to explain the formation of foam cells. Nonetheless, foam cell formation would not be entirely explained by this process. Recently, the role of other factors, such as macrophage pinocytosis of lipoproteins and uptake of by different receptors, has gained more importance as mechanisms for cellular internalization of native LDL. This article focuses on these latter mechanisms, highlighting the complexity of the process of macrophagic uptake of LDL.

KEYWORDS: macrophages, foam cells, low-density lipoprotein, pinocytosis, sortilin1

Recibido en abril de 2019 – Aceptado en mayo de 2019
El autor declara no tener conflictos de interés.

Correspondencia:
Diego Lucero. e-mail: diego.lucero3@nih.gov

Financiamiento:

Esta investigación fue financiada por el Intramural Research Program del National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) (HL006095) perteneciente a los National Institutes of Health, Bethesda, EE.UU.

La formación de células espumosas es un factor fundamental en el proceso aterosclerótico. Desde los inicios de la lesión, en la formación de la estría grasa, se observan depósitos de células espumosas en la íntima arterial.¹ Las células espumosas derivan de macrófagos sobrecargados de ésteres

de colesterol,² aunque también se ha descrito la formación de células espumosas a partir de la desdiferenciación de células musculares lisas.³ Los monocitos circulantes son reclutados en la íntima arterial, donde se diferencian a células fagocíticas mononucleares competentes que, por diferentes

mecanismos, captan lipoproteínas, cargándose de ésteres de colesterol y formando las células espumosas. La biología del macrófago cambia completamente, transformándose en una célula que secreta metaloproteinasas, factores protrombóticos y mediadores proinflamatorios.^{2,4} Dentro de este proceso de captación de LDL existen diversos mecanismos que serán abordados en las secciones siguientes.

La teoría históricamente aceptada para explicar la captación de LDL por parte de los macrófagos en la íntima arterial es la teoría de la oxidación de LDL.⁵ Los primeros intentos con el objetivo de generar células espumosas a partir de macrófagos, utilizando LDL nativas, no arrojaron resultados positivos,⁶ mientras que esto sí fue posible de alcanzar al utilizar LDL modificadas por acetilación.⁶ En 1984, Daniel Steinberg y colaboradores describieron por primera vez que LDL modificadas, oxidadas por previa incubación en presencia de células endoteliales, tenían mayor captación por parte de los macrófagos que las LDL sin incubación previa (LDL nativas), incluso a concentraciones bajas.⁷ Resultados similares fueron obtenidos con LDL oxidadas químicamente con Cu²⁺, confirmando la formación de células espumosas a partir de macrófagos.⁸ El CD36 es un receptor *scavenger* de clase B expresado en múltiples tejidos y con acciones específicas para tejido. En tejido adiposo y muscular opera como translocador de ácidos grasos de cadena larga,⁹ mientras que en los macrófagos se ha demostrado que CD36 reconoce LDL oxidadas, con la mediación de su internalización y favoreciendo la formación de células espumosas.⁹⁻¹¹ Resulta interesante que, contrariamente a lo que ocurre con el receptor de LDL, la presencia de LDL oxidada a concentraciones relativamente bajas induce la expresión de CD36.¹¹ De este modo, la inhibición farmacológica de CD36 se presenta como un blanco terapéutico de interés. Se ha demostrado que las estatinas, indirectamente por su acción sobre receptores nucleares PPAR γ , disminuyen la expresión de CD36 en monocitos y macrófagos.⁹

Otros receptores demostraron interactuar con LDL oxidadas, mediando también su internalización en los macrófagos. Como es el caso del SRA, un receptor *scavenger* de clase A que muestra capacidad de unir ligandos polianiónicos, tales como LDL

acetilada, LDL oxidada o albúmina glicada.¹² Se ha demostrado que el SRA en macrófagos es capaz de unir LDL acetilada y oxidada, lo que conduce a la formación de células espumosas.^{12,13} Otro receptor de importancia es el receptor 1 de LDL oxidada de tipo lectina-1 (LOX-1, *lectin-like oxLDL receptor-1*), que pertenece a la familia de receptores *scavenger* tipo E.¹⁴ Como el resto de los receptores *scavenger*, LOX-1 interviene en el reconocimiento, endocitosis y degradación de LDL modificadas.¹⁵ De manera similar a lo que ocurre con CD36, la forma oxidada de las LDL induce la expresión de LOX-1,¹⁶ con lo que establece un ciclo de retroalimentación positivo. LOX-1, además, está vinculado con la disfunción de células endoteliales y la activación de plaquetas.^{17,18} Todos estos representan efectos proaterogénicos. Otros receptores *scavenger* involucrados en la captación de LDL oxidadas son MARCO y SREC-I/II, entre otros.¹⁹ Está claro el papel de la oxidación de LDL en el proceso aterogénico. Sin embargo, existe información que desafía la idea de que este sea el único mecanismo por el cual las LDL son captadas y que esto conduzca a la formación de células espumosas.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, se puede deducir que, en teoría, la administración de antioxidantes (como la vitamina E) podría tener un efecto beneficioso para la prevención de lesiones ateroscleróticas. Sin embargo, la administración de vitamina E mostró beneficios limitados en la reducción de eventos cardiovasculares en los estudios clínicos implementados para demostrar su eficacia.^{20,21} Las causales del fracaso pueden ser varias, pero es notorio que la vitamina E en sí misma puede ser convertida en un radical oxidativo inestable y actuar como sustancia antioxidante. Se ha comprobado que la peroxidación lipídica es más rápida en presencia de concentraciones elevadas de vitamina E, en comparación con concentraciones bajas.²² Por otro lado, otros estudios también cuestionan la teoría de la oxidación al relativizar el papel de los receptores *scavenger*. Estudios realizados en animales hipercolesterolémicos (*Ldlr*-/- y *ApoE*-/-) demostraron que la ausencia de CD36 y SRA, si bien protege contra la inflamación y la formación del núcleo necrótico en la lesión ateromatosa, no evita la formación de células espumosas.^{23,24} Se sugiere entonces que, además de la captación de

LDL modificadas, existen mecanismos de captación de LDL sin modificaciones previas (LDL nativas) por parte de los macrófagos que conducen a la formación de células espumosas.

Cabe preguntarse sobre el papel potencial del receptor de LDL en la captación de LDL nativas por parte de los macrófagos. Sin embargo, tanto animales deficientes en el receptor de LDL como pacientes con hipercolesterolemia familiar, con pérdida de funcionalidad del receptor de LDL, muestran abundante formación de células espumosas y aterosclerosis acelerada.^{25,26} Además, debe considerarse que la expresión del receptor de LDL se encuentra reprimida frente a la sobrecarga celular de colesterol.²⁷ Por lo tanto, el papel del receptor de LDL no sería preponderante en la captación de LDL por parte de los macrófagos localizados en la íntima arterial, lo que abre las posibilidades a otros mecanismos implicados en la internalización de LDL nativas.

En los últimos años se han identificado posibles candidatos para la captación de LDL nativas en los macrófagos, entre ellos sortilina1, codificado por el gen *SORT1*. Esta es una proteína presente tanto en el trans-Golgi, donde opera como reguladora del reciclado y tráfico de proteínas, como en la membrana plasmática, donde actúa como receptor de diferentes ligandos.²⁸ Análisis de GWAS asociaron fuertemente a *SORT1* con los niveles de colesterol asociado con LDL (LDLc) y eventos cardiovasculares.²⁸ Su papel a nivel hepático está dado por la regulación de los niveles de LDLc, a nivel de la modulación negativa de la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL),²⁸ la regulación de la secreción de PCSK929 y, también, mediando la captación de LDL a nivel celular.³⁰ La ausencia de sortilina1 se asoció con aumento neto en los niveles de LDLc circulante.²⁸ Aunque, contrariamente, estudios en modelos murinos completamente deficientes en sortilina1 demostraron reducción del LDLc.³¹ Por otro lado, en un estudio reciente, la implantación de macrófagos deficientes en sortilina1 en ratones deficientes en receptores de LDL previamente irradiados, redujo significativamente la formación de células espumosas en comparación con aquellos implantados con macrófagos sortilina1 positivos.³² Esto sugiere que sortilina1 mediaría la captación de

LDL nativas en los macrófagos. El intrincado papel específico de tejido de sortilina1 en el metabolismo lipídico revela una alta complejidad en las acciones de una misma proteína en diversos tipos celulares y mecanismos, y, a su vez, plantea una paradoja, ya que, si bien la ausencia de sortilina1 a nivel hepático podría traducirse como un aumento de los niveles de LDLc en circulación, al mismo tiempo la ausencia de sortilina1 a nivel de los macrófagos tiene una función ateroprotectora, con menor captación de LDL y menor formación de células espumosas. Aunque se requieren más estudios para entender completamente el papel de la sortilina1 en el metabolismo lipídico, la posible modulación tejido-selectiva de la actividad de la sortilina1 se presenta como una posible estrategia terapéutica interesante en el futuro.

En los últimos años, el papel de la pinocitosis de las lipoproteínas como un mecanismo de formación de células espumosas ha comenzado a cobrar mayor importancia.³³ Todas las células fagocíticas, entre las que se encuentran macrófagos, células dendríticas y células de Kupffer, como también otros tipos celulares como las células endoteliales, las células tumorales y otras, realizan pinocitosis como un mecanismo de endocitosis a gran escala en el que internalizan grandes cantidades de líquido extracelular.³⁴ Este mecanismo permite a estas células fagocíticas examinar el medio que las rodea, detectando patógenos y moléculas asociadas con estos, además de realizar una tarea de limpieza de detritos celulares durante la resolución del proceso inflamatorio.

En el caso de las células tumorales o células en alto grado de desarrollo, la pinocitosis es un proceso que faculta a las células para incorporar grandes cantidades de nutrientes.³⁵

El proceso de pinocitosis es un mecanismo de endocitosis independiente de receptores y, como tal, es inespecífico en cuanto al tipo de cargo que es internalizado. Para su internalización al interior celular, solo es necesario que las sustancias se encuentren en solución o suspensión en el medio intersticial. De esta manera, los macrófagos pueden incorporar inespecíficamente proteínas, glúcidos, lipoproteínas y demás sustancias que se encuentren en el medio que las rodea.

En su mecánica, la pinocitosis es un proceso complejo altamente dependiente de la polimerización y reorganización intracelular de filamentos de actina en el ambiente cercano a la membrana celular.^{35,36} El proceso se inicia con la formación de pliegues en la membrana plasmática, ricos en filamentos de actina. Estos filamentos se extienden y reorganizan para generar proyecciones de la membrana plasmática, y culminan cerrándose en sus extremos y generando una vesícula intracelular que seguirá el camino lisosomal.³⁶ Según el tamaño de las vesículas, el proceso puede denominarse micropinocitosis (< 0.1 μm) o macropinocitosis (0.2 a 0.5 μm). Desde el punto de vista molecular es un proceso intrincado y complejo con múltiples actores intervinientes, entre los cuales se encuentran PI3K/AKT, proteína quinasa C y proteína Ras, entre otros mecanismos. No es el objetivo de esta revisión enfocarse en los mecanismos moleculares que regulan este proceso, los cuales han sido revisados en otras publicaciones.^{35,37} Sin embargo, es importante mencionarlos para tener presente la gran complejidad de los mecanismos que regulan el proceso.

Varios trabajos han demostrado la formación de células espumosas a partir de macrófagos, en un proceso independiente de receptores, mediado por pinocitosis de LDL nativas. Los trabajos más notables al respecto han sido realizados por Howard Kruth y su grupo del *National Heart, Lung, and Blood Institute*, perteneciente a los *National Institutes of Health* (EEUU). Sus estudios demostraron que macrófagos humanos y murinos activados por el factor estimulador de colonias de macrófagos y de granulocitos-macrófagos, internalizan grandes cantidades de LDL nativas mediante pinocitosis, con formación de células espumosas. La cinética muestra que la internalización es no saturable por altas concentraciones de LDL, además de presentar una relación lineal con la concentración de LDL en el medio y el tiempo de incubación,^{38,39} característica de la internalización de solutos mediante pinocitosis.⁴⁰

También, el grupo ha publicado sorprendentes videos *time-lapse* de microscopia de contraste de fase, donde se observa claramente cómo ocurre el proceso de pinocitosis.⁴¹ Asimismo, han demostrado el fenómeno de pinocitosis en

macrófagos *in vivo* en la placa aterosclerótica, utilizando sondas fluorescentes en modelos murinos de aterosclerosis.⁴²

En un trabajo reciente Csányi y colaboradores demuestran que la trombospondina 1 (TSP1), una proteína de matriz extracelular asociada con las placas ateroscleróticas, induce la captación de LDL nativas en macrófagos mediante pinocitosis, en un proceso dependiente de CD47 y Nox1.⁴³ La TSP1 estimula la formación de pliegues en la membrana plasmática y la pinocitosis en los macrófagos mediante la activación de la cofilina1, una proteína asociada con aumento en la recambio de filamentos de actina.⁴³ Resulta interesante que se ha demostrado alta expresión de TSP1 en placas ateroscleróticas humanas en las que, además, ejercería un papel como inhibidor de la proliferación de células endoteliales.⁴⁴

Tanto los factores de crecimiento, como las citoquinas y la TPS1 han demostrado ser capaces de estimular la pinocitosis en los macrófagos y, así, favorecer la captación de LDL nativas por un mecanismo independiente de receptores. Sin embargo, este proceso puede llevarse a cabo de manera espontánea.

En un trabajo realizado con macrófagos murinos se demostró que los macrófagos, de manera espontánea, forman células espumosas al ser expuestos a un medio de cultivo con alta proporción de suero fetal bovino. De manera interesante, este efecto es bloqueado por conocidos inhibidores de pinocitosis, como LY294002 (un inhibidor de PIK3) y citochalasin B (un desorganizador de los filamentos de actina).⁴⁵

Debe considerarse que la concentración de LDL que logra la saturación de los receptores de LDL ronda los 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.⁴⁶ Desde el punto de vista metodológico, los estudios realizados para probar la pinocitosis de LDL nativas por parte de los macrófagos y la consecuente formación de células espumosas, utilizan concentraciones de LDL por encima de este valor, de entre 250 y 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (25 a 50 mg/dl). Para demostrar la pinocitosis, es necesario trabajar con concentraciones de lipoproteínas por encima del umbral de saturación de los receptores que median la internalización

de LDL. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que estas concentraciones son similares o inferiores a las que los macrófagos se encuentran expuestos en el intersticio.

En este punto podemos considerar que la internalización de LDL por parte de los macrófagos podría darse por varios mecanismos que tengan lugar simultáneamente. En trabajos realizados en nuestro laboratorio hemos demostrado que la citoquina antiinflamatoria interleuquina 10 induce la captación de LDL nativas con una cinética dual, compatible con la coexistencia de un mecanismo de internalización de LDL, mediado tanto por pinocitosis como por receptores (datos sin publicar). Estos resultados demuestran la complejidad del proceso de captación de LDL por parte de los macrófagos y ponen de manifiesto que no es un solo tipo de proceso el que tiene lugar en la internalización de LDL, sino que se trata de una sumatoria de mecanismos que llevan a la acumulación de ésteres de colesterol en el interior celular.

Otro punto que resulta interesante es la conexión causal entre oxidación de LDL y la activación de pinocitosis en los macrófagos. Choi y colaboradores encontraron que la LDL mínimamente oxidada era capaz de generar reorganización del citoesqueleto, proyecciones en la membrana plasmática y vacuolización en los macrófagos, características de la pinocitosis.⁴⁷

En el mismo trabajo, demuestran que la exposición de macrófagos a LDL mínimamente oxidadas activa el mecanismo de pinocitosis, dependiente de TLR4, y no solo estimula la captación de sondas de pinocitosis, sino que también estimula la captación de las propias LDL mínimamente oxidadas y de LDL nativas, con acumulación de colesterol intracelular compatible con células espumosas.⁴⁷ Es interesante destacar que, en este mismo trabajo, este mecanismo ha sido comprobado tanto *in vitro* como *in vivo*.⁴⁷ Estos datos sugieren que, lejos de tratarse de procesos independientes, la oxidación de las partículas de LDL no solo favorecería su captación en los macrófagos por receptores *scavenger*, sino que, además, estimularía el proceso de pinocitosis, aumentando considerablemente la cantidad de LDL acumuladas.

Se ha expuesto la gran complejidad de los mecanismos de internalización de LDL en los macrófagos. Se trata de un proceso mediado por múltiples factores, oxidación de LDL y reconocimiento por parte de receptores *scavenger*, reconocimiento y captación de LDL nativas mediante sortilina1 y, también, pinocitosis. Se plantea entonces que este paso de la aterogénesis debe ser abordado teniendo en cuenta su gran complejidad. En este contexto, cualquier estrategia terapéutica que busque reducir la formación de células espumosas deberá tener en cuenta todos los actores intervinientes en el proceso.

BIBLIOGRAFÍA

1. Crowther MA. Pathogenesis of atherosclerosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 1:436-441, 2005.
2. Maguire EM, Pearce SWA, Xiao Q. Foam cell formation: A new target for fighting atherosclerosis and cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol* 112:54-71, 2019.
3. Pryma CS, Ortega C, Dubland JA, Francis GA. Pathways of smooth muscle foam cell formation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2019 [Epub ahead of print].
4. Koelwyn GJ, Corr EM, Erbay E, Moore KJ. Regulation of macrophage immunometabolism in atherosclerosis. *Nat Immunol* 19(6):526-537, 2018.
5. Steinberg D, Witztum JL. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(12):2311-2316, 2010.
6. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low-density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(1):333-337, 1979.
7. Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low-density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(12):3883-3887, 1984.
8. Ball RY, Bindman JP, Carpenter KL, Mitchinson

- MJ. Oxidized low density lipoprotein induces ceroid accumulation by murine peritoneal macrophages in vitro. *Atherosclerosis* 60(2):173-181, 1986.
9. Choromańska B, Myśliwiec P, Choromańska K, Dadan J, Chabowski A. The role of CD36 receptor in the pathogenesis of atherosclerosis. *Adv Clin Exp Med* 26(4):717-722, 2017.
 10. Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. CD36 is a receptor for oxidized low-density lipoprotein. *J Biol Chem* 268(16):11811-11816, 1993.
 11. Han J, Hajjar DP, Febbraio M, Nicholson AC. Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J Biol Chem* 272(34):21654-21659, 1997.
 12. de Winther MP, van Dijk KW, Havekes LM, Hofker MH. Macrophage scavenger receptor class A: A multifunctional receptor in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(2):290-297, 2000.
 13. de Winther MP, van Dijk KW, van Vlijmen BJ, Gijbels MJ, Heus JJ, Wijers ER, van den Bos AC, Breuer M, Frants RR, Havekes LM, Hofker MH. Macrophage specific overexpression of the human macrophage scavenger receptor in transgenic mice, using a 180-kb yeast artificial chromosome, leads to enhanced foam cell formation of isolated peritoneal macrophages. *Atherosclerosis* 147(2):339-347, 1999.
 14. Xu S, Ogura S, Chen J, Little PJ, Moss J, Liu P. LOX-1 in atherosclerosis: biological functions and pharmacological modifiers. *Cell Mol Life Sci* 70(16):2859-2872, 2013.
 15. Pirillo A, Norata GD, Catapano AL. LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. *Mediators Inflamm* 2013:152786, 2013.
 16. Mehta JL, Chen J, Hermonat PL, Romeo F, Novelli G. Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiovasc Res* 69(1):36-45, 2006.
 17. Sakurai K, Cominacini L, Garbin U, Fratta Pasini A, Sasaki N, Takuwa Y, et al. Induction of endothelin-1 production in endothelial cells via co-operative action between CD40 and lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1). *J Cardiovasc Pharmacol* 44 Suppl 1:S173-180, 2004.
 18. Chen M, Kakutani M, Naruko T, Ueda M, Narumiya S, Masaki T, et al. Activation-dependent surface expression of LOX-1 in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 282(1):153-158, 2001.
 19. Kzhyshkowska J, Neyen C, Gordon S. Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis. *Immunobiology* 217(5):492-502, 2012.
 20. Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators, Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med* 342(3):154-160, 2000.
 21. Tardif JC. Antioxidants: the good, the bad and the ugly. *Can J Cardiol* 22 Suppl B:61B-65B, 2006.
 22. Bowry VW, Ingold KU, Stocker R. Vitamin E in human low-density lipoprotein. When and how this antioxidant becomes a pro-oxidant. *Biochem J* 288:341-344, 1992.
 23. Kuchibhotla S, Vanegas D, Kennedy DJ, Guy E, Nimako G, Morton RE, et al. Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A I/II. *Cardiovasc Res* 78(1):185-196, 2008.
 24. Manning-Tobin JJ, Moore KJ, Seimon TA, Bell SA, Sharuk M, Alvarez-Leite JI, et al. Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29(1):19-26, 2009.
 25. Knowles JW, Maeda N. Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(11):2336-2345, 2000.
 26. Buja LM, Kovanen PT, Bilheimer DW. Cellular pathology of homozygous familial hypercholesterolemia. *Am J Pathol* 97(2):327-357, 1979.
 27. Brown MS, Goldstein JL. Regulation of the activity of the low-density lipoprotein receptor in human fibroblasts. *Cell* 6(3):307-316, 1975.

28. Musunuru K, Strong A, Frank-Kamenetsky M, Lee NE, Ahfeldt T, Sachs KV, et al. From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus. *Nature* 466(7307):714-719, 2010.
29. Gustafsen C, Kjolby M, Nyegaard M, Mattheisen M, Lundhede J, Buttenschøn H, et al. The hypercholesterolemia-risk gene SORT1 facilitates PCSK9 secretion. *Cell Metab* 19(2):310-318, 2014.
30. Strong A, Ding Q, Edmondson AC, Millar JS, Sachs KV, Li X, et al. Hepatic sortilin regulates both apolipoprotein B secretion and LDL catabolism. *J Clin Invest* 122(8):2807-2816, 2012.
31. Kjolby M, Andersen OM, Breiderhoff T, Fjorback AW, Pedersen KM, Madsen P, et al. Sort1, encoded by the cardiovascular risk locus 1p13.3, is a regulator of hepatic lipoprotein export. *Cell Metab* 12(3):213-223, 2010.
32. Patel KM, Strong A, Tohyama J, Jin X, Morales CR, Billheimer J, et al. Macrophage sortilin promotes LDL uptake, foam cell formation, and atherosclerosis. *Circ Res* 116(5):789-796, 2015.
33. Kruth HS. Receptor-independent fluid-phase pinocytosis mechanisms for induction of foam cell formation with native low-density lipoprotein particles. *Curr Opin Lipidol* 22(5):386-393, 2011.
34. Buckley CM, King JS. Drinking problems: mechanisms of macropinosome formation and maturation. *FEBS J* 284(22):3778-3790, 2017.
35. Palm W. Metabolic functions of macropinocytosis. *Phil Trans R Soc B* <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0285>, 2019.
36. Bloomfield G, Kay RR. Uses and abuses of macropinocytosis. *J Cell Sci* 129(14):2697-2705, 2016.
37. Levin R, Grinstein S, Schlam D. Phosphoinositides in phagocytosis and macropinocytosis. *Biochim Biophys Acta* 1851(6):805-823, 2015.
38. Anzinger JJ, Chang J, Xu Q, Buono C, Li Y, Leyva FJ, et al. Native low-density lipoprotein uptake by macrophage colony-stimulating factor-differentiated human macrophages is mediated by macropinocytosis and micropinocytosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(10):2022-2031, 2010.
39. Anzinger JJ, Chang J, Xu Q, Barthwal MK, Bohnacker T, Wymann MP, et al. Murine bone marrow-derived macrophages differentiated with GM-CSF become foam cells by PI3K γ -dependent fluid-phase pinocytosis of native LDL. *J Lipid Res* 53(1):34-42, 2012.
40. Kruth HS, Huang W, Ishii I, Zhang WY. Macrophage foam cell formation with native low-density lipoprotein. *J Biol Chem* 277(37):34573-34580, 2002.
41. Barthwal MK, Anzinger JJ, Xu Q, Bohnacker T, Wymann MP, Kruth HS. Fluid-phase pinocytosis of native low-density lipoprotein promotes murine M-CSF differentiated macrophage foam cell formation. *PLoS One* 8(3):e58054, 2013.
42. Buono C, Anzinger JJ, Amar M, Kruth HS. Fluorescent pegylated nanoparticles demonstrate fluid-phase pinocytosis by macrophages in mouse atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 119(5):1373-1381, 2009.
43. Csányi G, Feck DM, Ghoshal P, Singla B, Lin H, Nagarajan S, et al. CD47 and Nox1 Mediate Dynamic Fluid-Phase Macropinocytosis of Native LDL. *Antioxid Redox Signal* 26(16):886-901, 2017.
44. Reed MJ, Iruela-Arispe L, O'Brien ER, Truong T, LaBell T, Bornstein P, et al. Expression of thrombospondins by endothelial cells. Injury is correlated with TSP-1. *Am J Pathol* 147(4):1068-1080, 1995.
45. Yao W, Li K, Liao K. Macropinocytosis contributes to the macrophage foam cell formation in RAW264.7 cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 41(9):773-780, 2009.
46. Goldstein JL, Brown MS. Binding and degradation of low-density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 249(16):5153-5162, 1974.
47. Choi SH, Harkewicz R, Lee JH, Boullier A, Almazan F, Li AC, et al. Lipoprotein accumulation in macrophages via toll-like receptor-4-dependent fluid phase uptake. *Circ Res* 104(12):1355-1363, 2009.