
**Participación del receptor de VLDL en la producción de
apolipoproteínas en hepatocitos humanos**

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas
por
Diego Oscar Forcato

Prof. Dra. Silvia Clara Kivatinitz
Directora

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CÓRDOBA, ARGENTINA**

MARZO de 2008

Directora de Tesis: Prof. Dra. Silvia Clara Kivatinitz

Comisión de Tesis: Prof. Dra. Beatriz Caputto

Prof. Dr. Edilberto Rubiolo

Prof. Dr. Rolando Pécora

Abreviaturas

Ab: anticuerpo

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AG: Ácido graso.

Apo: apolipoproteína.

BSA: albúmina de suero bovino.

CETP: acil-colesterol-acil-transferasa (proteína de transferencia de ésteres de colesterol)

Ci: Curie.

CLA: Ácido linolénico conjugado.

CMB: células mononucleares de bazo de ratón.

Da: Dalton.

DHA: ácido docosahexaenoico.

DMEM: medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco.

Dil: 1,1'-dioctadecil-3,3',3',3'-tetrametilindocarbocianina.

EDTA: ácido etilendiaminotetracético.

ELISA: técnica de enzimoimmunoensayo

EPA: ácido eicosapentaenoico

FXR: receptor X de farnesoide.

SFB: suero fetal bovino.

FITC: isotiocianato de fluoresceína.

g: fuerza centrífuga relativa.

HDL: lipoproteína de alta densidad.

HDL-C: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad.

HF: Hipercolesterolemia familiar.

HL: lipasa hepática.

HMG CoA reductasa: 3-hidroxi-3-metil glutaril Coenzima A reductasa.

HSPG: heparan sulfato proteoglicanos.

IgG: inmunoglobulina G.

LCAT: lecitin colesterol acil transferasa.

LDL: lipoproteína de baja densidad.

LDL-C: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad.

LDLR: receptor de lipoproteínas de baja densidad.

LN: ácido linoléico.

LPDS: suero fetal bovino deficiente en lipoproteínas.

LPL: Lipoprotein Lipasa.

LPS: lipopolisacárido.

LRP: proteína relacionada al LDLR.

LXR: receptor X de hígado.

mARN: ácido ribonucleico mensajero.

PAI-1: inhibidor del activador tisular del plasminógeno.

PBS: tampón fosfato salino.

PC: fosfatidilcolina.

PCR: proteína C reactiva.

PI3K: quinasa de 3'fosfatidil inositol.

PLA2: fosfolipasa A2.

PLTP: Proteína de transferencia de fosfolípidos.

PON: Paraoxonasa.

PPAR: receptor activado por el proliferador de peroxisomas.

RAP: Proteína asociada al receptor.

RE: retículo endoplásmico.

RIPA: tampón de recuperación de proteína intracelular.

RCP: reacción en cadena de la polimerasa.

rpm: revoluciones por minuto.

RXR: receptor X de retinoide.

SDS: dodecil sulfato sódico.

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

SAA: amiloide A sérico.

°T: temperatura.

t-PA: activador tisular del plasminógeno.

TC-FITC: Toxina colérica marcada con FITC.

TBS: tampón Tris salino.

TEMED: N,N,N',N', -tetrametiletildiamina.

TLR4: Receptor Toll-like 4.

Tris: tris-hidroximetil-aminometano.

TRC: Transporte reverso del colesterol.

TRL: Lipoproteínas ricas en triglicéridos.

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

VLDL-Alexa: VLDL marcada covalentemente con Alexa 488.

VLDLR: receptor de lipoproteínas de muy baja densidad.

RESUMEN

El hígado es un órgano que cumple múltiples funciones, controlando continuamente la sangre y reaccionando a distintos estímulos para lograr mantener la homeostasis en el cuerpo humano. Cuando se produce una inflamación, este órgano participa en el inicio, el desarrollo y resolución de este proceso. El hígado detecta, mediante la expresión de receptores de membrana específicos, la concentración de moléculas proinflamatorias en el torrente sanguíneo y en respuesta sintetiza y libera un conjunto de proteínas llamadas proteínas de fase aguda, las cuales proveen los medios para la remoción de patógenos y la defensa inmune.

Dado que el hígado también es el órgano principal del metabolismo de los lípidos, es lógico intuir que él asegure una regulación recíproca entre la inflamación y el metabolismo lipídico.

En este sentido, el objetivo del trabajo desarrollado durante esta Tesis fue determinar si la síntesis de apolipoproteína AI (principal constituyente de las HDL y además proteína de fase aguda negativa), está relacionada con la expresión del receptor de VLDL (VLDLR), cuya expresión en hígado humano es controversial. Nuestra hipótesis consideró que la controversia podría deberse a la fuerte regulación que algunos receptores nucleares ejercen sobre su expresión.

Para ello se caracterizó la regulación de la expresión de VLDLR en subpoblaciones celulares de un modelo experimental de células hepatocitarias humanas (línea celular HepG2) y de la acumulación de Apo AI en el medio en respuesta a moléculas involucradas en la regulación del metabolismo lipídico y/o la respuesta inflamatoria. Además se comparó la regulación del VLDLR ejercida por algunas de estas moléculas en esta línea celular con la observada en células monocíticas humanas (línea celular THP-1) y en células mononucleares de bazo de ratón enfrentadas a dichas moléculas.

Se comprobó que las células HepG2 son buen un modelo de hepatocitos humanos normales, ya que se encuentran en un estado de diferenciación avanzado y responden tanto a estímulos hipo o hiperlipemiantes como a estresores inflamatorios en forma similar al hígado humano. Utilizando citometría de flujo se logró caracterizar las distintas subpoblaciones según el estadio en el ciclo celular y así se pudo analizar como los tratamientos probados modifican la proporción de células en los distintos estadios. Se determinó que aproximadamente el 60% de las células se encontraron en fase G0/G1 cuando superaron el 80% de confluencia. Este porcentaje no varió significativamente cuando el medio se suplementó con SFB 50%, tampoco con 24 horas de privación de SFB.

La acumulación de Apo AI en el medio condicionado, determinada por técnicas de ELISA y Western Blot utilizando un anticuerpo específico producido en nuestro laboratorio, mostró una gran variabilidad según la molécula efectora ensayada. Se observó un aumento de la acumulación con respecto al control, cuando se co-cultivó células HepG2 en presencia de distintos lípidos: LN, PC y una mezcla lipídica conteniendo ácidos grasos omega 3. Se observó que la producción de Apo AI en el medio en respuesta a los ácidos omega 3 fue saturable y dependiente de la dosis. Un resultado importante fue que luego de ser oxidados, los ácidos grasos omega 3 no producen este efecto por lo tanto no es atribuible a un mayor contenido calórico o debido a un aumento en el contenido de ácidos grasos en el cultivo, sino que es dependiente del grado de insaturación. LN y PC produjeron además aumento en la acumulación de proteínas totales. También se observó un aumento importante de la Apo AI en sobrenadantes de células tratadas con gemfibrozil, indicando un efecto directo de este fármaco hipolipemiente sobre estas células. Otro fármaco muy utilizado para disminuir las concentraciones de colesterol plasmático, atorvastatina, produjo una ligera disminución de la acumulación de Apo AI. La coincubación con LPS, el cual es un potente iniciador de la respuesta inflamatoria, disminuyo a valores no detectables la acumulación de Apo AI luego de 24 horas de cultivo, confirmando la cualidad de proteína de fase aguda de la Apo AI y de los efectos directos del LPS sobre el hepatocito sin que medien citoquinas proinflamatorias.

Finalmente, una observación novedosa fue que la incubación con dosis altas de VLDL humana no produjo cambios en los niveles de Apo AI en el medio.

Para caracterizar la expresión de VLDLR en los distintos tipos de células se realizaron experimentos de inhibición de la unión de VLDL-Alexa con anticuerpo anti-VLDLR y de marcación directa mediante anticuerpo anti-VLDLR teñido con un anticuerpo secundario fluorescente, ambos utilizando la técnica de citometría de flujo. Se determinó que la subpoblación de células VLDLR+ no se modifica significativamente por co-cultivo con PC pero disminuyen significativamente (alrededor de un 40%) en presencia de LN y de DHA/EPA. En cambio, atorvastatina y gemfibrozil, fármacos hipolipemiantes pero que también poseen efectos antiinflamatorios, aumentaron las subpoblaciones celulares VLDLR+ en fase G0 y en fase G2/M. Llamativamente, el co-cultivo con gemfibrozil de células THP-1 (línea celular monocítica humana) produjo un aumento de más del 100% en la población VLDLR+, indicando que el efecto de esta droga se produce vía un mecanismo presente en varios tipos de células y conservado entre distintas especies de mamíferos, ya que experimentos comparables realizados con linfocitos de ratón indican que esta droga también produce un aumento muy importante (casi 2.5 veces) en la expresión de VLDLR en estas células. Otra observación interesante fue que el co-cultivo con gemfibrozil en presencia de VLDL produjo un aumento de más de 5 veces en la población linfocitaria VLDLR+.

Por otra parte, el co-cultivo con LPS de distintos microorganismos mostró que estas moléculas proinflamatorias regulan negativamente la expresión de receptor de VLDL, produciendo una disminución más notable en el caso del LPS de *E. coli*. Experimentos similares con células THP-1 mostraron que en esta línea celular el co-cultivo con LPS también regula negativamente la expresión de VLDLR.

El co-cultivo de ambas líneas celulares con VLDL produjo una disminución en las poblaciones VLDLR+, en el caso de HepG2 tanto a 24 como a 48 horas, el cual es más evidente en las células THP-1, produciendo una retroregulación negativa similar a la que produce la LDL sobre el LDLR en los hepatocitos humanos.

Tomados en conjunto, estos datos confirman la hipótesis que el VLDLR expresado en hígado es una molécula integradora de señales tanto inflamatorias como antiinflamatorias con las provenientes del metabolismo lipídico de la célula y la participación de diversos receptores nucleares en la regulación de este receptor y en la producción de Apo AI.

Parte de los resultados aquí descriptos fueron publicados bajo los siguientes títulos:

Trabajos publicados:

- “Respuesta del receptor de VLDL a estresores inflamatorios en hepatocitos y células de bazo de ratón” (2007) Forcato DO, Sampedro MC, Artola R, Pécora RP y Kivatinitz SC. En prensa en la revista Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.
- “Milk Fat Content Measurement by a Simple UV Spectrophotometric Method. An Alternative Screening Method”. D. O. Forcato, M. P. Carmine, G. E. Echeverría, R. P. Pécora y S. C. Kivatinitz. J Dairy Sci. (2005) 88, 478 - 481.
- “On-line Biomass Monitoring in Bench-Scale Stirred Bioreactors Using Parts of a Chromatography System”. Diego O. Forcato, Rolando P. Pécora y Silvia C. Kivatinitz. Biotechnology Letters ISSN 0141-5482 (2002) 24, 1999-2003.

Comunicaciones a congreso:

- “Expresión del receptor de VLDL y su relación con el metabolismo lipídico en células HEPG2”. Forcato Diego Oscar, Verónica Mary y Silvia Clara Kivatinitz. LI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica y LIV Reunión Científica Anual de

la Sociedad Argentina de Inmunología Mar del Plata, 8 al 11 de noviembre de 2006.

- “Regulación de la expresión del receptor de VLDL y de la proliferación en células linfocitarias por drogas hipolipemiantes (Atorvastatina y Gemfibrozil)” María Cecilia Sampedro, Verónica Mary, Diego Forcato y Silvia Clara Kivatinitz. LI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica y LIV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología Mar del Plata, 8 al 11 de noviembre de 2006.
- “Producción de apolipoproteína AI y unión de VLDL en células HepG2 en cultivo” Forcato DO; Sampedro MC y Kivatinitz, SC. III Jornadas de Bioquímica y Biología molecular de Lípidos y Lipoproteínas. Bahía Blanca, 17 al 19 de Agosto de 2005. Presentación oral.
- “Efectos de las lipoproteínas sobre la proliferación y activación de linfocitos B y líneas celulares” Sampedro, MC; Forcato, DO; Gruppi, A y Kivatinitz, SC. Congreso Conjunto de Sociedades Biomédicas SAIC-SAI-SAFE-SAB-SAB-SAN-SAF, 16 al 20 de Noviembre de 2004, Mar del Plata, Argentina.
- “Conjugated Diene Generation in Thermically Processed Milk”. Forcato, Diego O., Pécora, Rolando P., and Kivatinitz, Silvia C. XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Carlos Paz Córdoba, Noviembre 2002.

1. Introducción	13
1.1 Lípidos, lipoproteínas y sus receptores	13
1.1.1 Estructura y función de las lipoproteínas	13
1.1.1.1 Quilomicrones	18
1.1.1.2 La VLDL y lipoproteínas derivadas	18
1.1.1.3 HDL	19
1.1.2 Estructura y función de receptores de lipoproteínas de hepatocitos ..	20
1.1.2.1 El receptor de LDL (LDLR)	22
1.1.2.2 La proteína relacionada al LDLR (LRP)	23
1.1.2.3 El receptor barrador tipo B1 (SR-B1)	23
1.1.2.4 El receptor de VLDL (VLDLR)	24
1.1.2.4.1 Estructura del VLDLR	26
1.1.2.4.2 Estructura del gen del VLDLR	27
1.1.2.4.3 Unión de ligandos al VLDLR	27
1.2 La inflamación y la Respuesta de Fase Aguda (RFA)	28
1.3 Relación entre metabolismo lipídico hepático e inflamación	29
1.3.1 Lípidos involucrados en la inflamación	30
1.3.2 Lipoproteínas e Inflamación	33
1.3.3 Los receptores de lipoproteínas hepáticos y la inflamación	38
2. Hipótesis de trabajo y objetivos	40
2.1 Hipótesis de trabajo	40
2.2 Objetivos	40
3. Resultados	41
3.1 Caracterización del modelo propuesto	41
3.1.1 Caracterización de la acumulación de Apo AI en el medio condicionado	41
3.1.1.1 Regulación de la producción de Apo AI por ácidos grasos Ω -3	41
3.1.1.2 Regulación de la producción de Apo AI por agentes inflamatorios	45
3.1.1.3 Regulación de la producción de Apo AI por fármacos hipolipemiantes ..	46
3.1.1.4 Marcación metabólica de Apo AI	47
3.1.1.5 Conclusiones	48
3.1.2 Caracterización morfológica de células hepatocitarias en cultivo	49
3.1.3 Caracterización de las variaciones morfológicas y en el ciclo celular de células HepG2 por los distintos tratamientos	53
3.1.3.1 Monosialo gangliósido (GM1)	53
3.1.3.2 Suero fetal bovino	54
3.1.3.3 Hipolipemiantes sintéticos	55

3.1.4 Determinación de dominios de membrana denominados “balsas lipídicas”	57
3.1.5 Conclusiones	58
3.2 Caracterización y cuantificación de la expresión del VLDLR	59
3.2.1 Unión de VLDL marcada fluorescentemente	60
3.2.2 Caracterización de la regulación de la expresión de VLDLR por moléculas involucradas en el metabolismo lipídico y la respuesta inflamatoria	63
3.2.2.1 No co-localización de VLDLR y balsas lipídicas en la superficie celular de los hepatocitos	66
3.2.3 Regulación del VLDLR en monocitos por gemfibrozil, LPS y VLDL	67
3.2.4 Regulación del VLDLR en linfocitos por moléculas hipolipemiantes/ inflamatorias	70
3.2.5 Conclusiones	70
4. Conclusiones generales	72
5. Discusión	76
6. Materiales y Métodos.....	80
6.1 Materiales	80
6.1.1 Drogas y reactivos utilizados	80
6.2 Métodos	80
6.2.1 Aislamiento de VLDL humana	80
6.2.2 Obtención de VLDL marcada con sondas fluorescentes	81
6.2.3 Preparación de suero fetal bovino deficiente en lipoproteínas (LPDS) 82	
6.2.4 Obtención de la proteína asociada al receptor (RAP)	82
6.2.5 Determinaciones por citometría de flujo.	83
6.2.5.1 Análisis del ciclo celular por el método de Ioduro de Propidio.....	83
6.2.6 Análisis de la expresión del VLDLR en HepG2, THP-1 y linfocitos	84
6.2.7 Medición de Apo AI y Apo B mediante enzimoimmunoensayo (ELISA) 84	
6.2.8 Electroforesis en geles de poliacrilamida	85
6.2.9 Microscopia de fluorescencia y confocal	86
6.2.10 Incorporación de [³⁵S]metionina en la Apo AI	86
6.2.11 Western Blot	87
6.2.12 Detección de mRNA de VLDLR mediante RT-PCR en células THP-1 .	88
6.2.12.1 Extracción de RNA total a partir de cultivos celulares	88
6.2.12.2 Cuantificación del ARN total	89
6.2.12.3 Síntesis del cADN	89
6.2.12.4 PCR de los cADN producidos.....	90

6.3 Anticuerpos	90
6.3.1 Obtención del anticuerpo policlonal anti-Apo AI	90
6.3.2 Otros anticuerpos utilizados	91
6.4 Otras determinaciones.....	92
6.4.1 Determinación de proteínas	92
6.4.2 Determinación de colesterol	92
6.4.3 Análisis Estadístico	92
6.5 Cultivos celulares.....	93
6.5.1 Esquema experimental general	93
6.5.2 Cultivos celulares de células hepatocitarias	94
6.5.3 Cultivos celulares de células monocíticas THP-1	94
6.5.4 Purificación de células mononucleares de bazo de ratón (CMB)	95
7. Referencias.....	96

1.Introducción

1.1 Lípidos, lipoproteínas y sus receptores

Los lípidos transportados por lipoproteínas son los triglicéridos, el colesterol, los ésteres de colesterol y los fosfolípidos. Los triglicéridos permiten el almacenamiento eficaz de la energía, el colesterol es un constituyente de las membranas celulares además de servir de precursor para la biosíntesis de hormonas esteroideas y ácidos biliares, y los fosfolípidos, al ser moléculas anfipáticas, son los componentes mayoritarios de las membranas celulares (1). Los lípidos son insolubles en plasma por ello circulan asociados con ciertas proteínas (apolipoproteínas) que permiten su transporte hacia las células (1). Estos complejos macromoleculares se denominan lipoproteínas. Los lípidos hidrofóbicos (triglicéridos, colesterol esterificado) se ubican en el interior de la lipoproteína, recubiertos por las apolipoproteínas y una monocapa de lípidos anfipáticos (fosfolípidos y colesterol libre). Las lipoproteínas son clasificadas según su densidad, la cual está relacionada con la composición cualitativa y cuantitativa en proteínas y lípidos.

1.1.1 Estructura y función de las lipoproteínas

Las lipoproteínas son agregados macromoleculares de lípidos y proteínas específicas, denominadas apolipoproteínas, de forma aproximadamente esférica. Todas las lipoproteínas tienen una estructura común: un núcleo lipídico hidrofóbico, compuesto de triglicéridos y ésteres de colesterol, recubierto con un capa anfifílica cuyos componentes principales son los fosfolípidos, el colesterol no esterificado y las apolipoproteínas. Estas últimas confieren a cada lipoproteína sus características funcionales y destino metabólico.

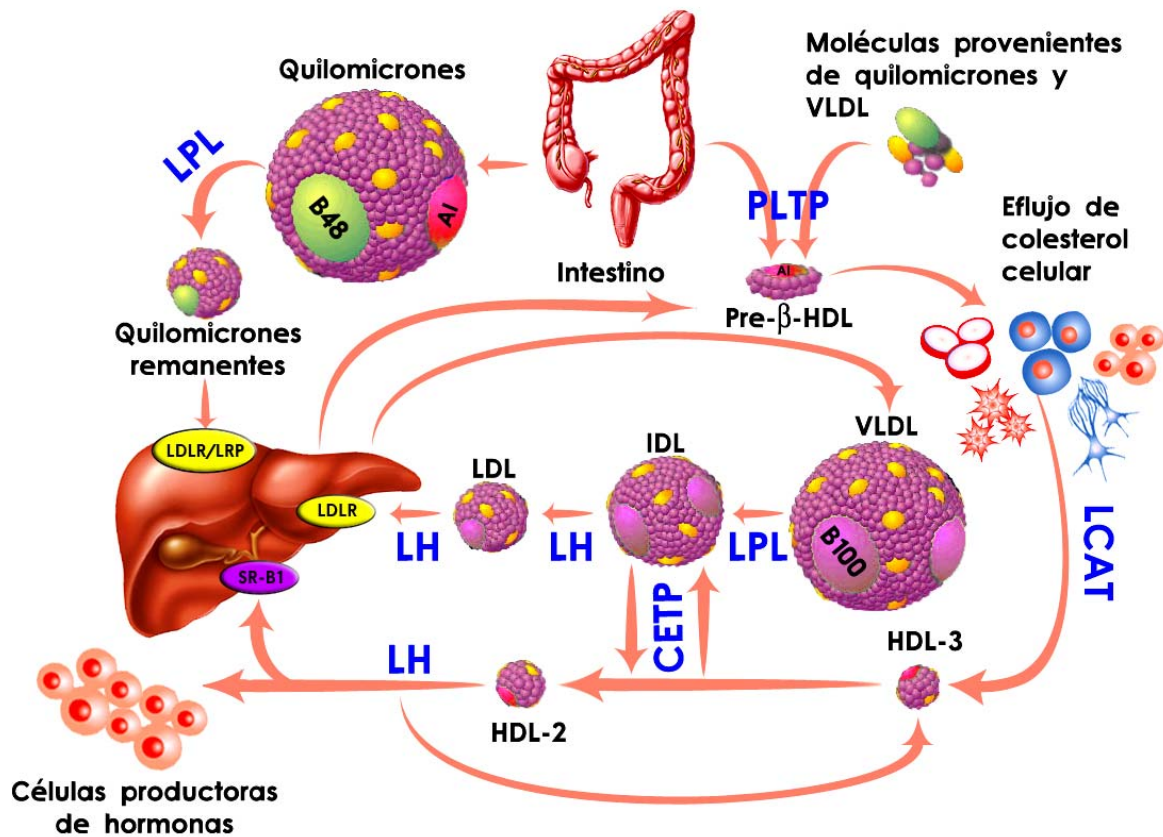


Figura 1: Esquema general del metabolismo de las lipoproteínas. Adaptado de

El metabolismo de las lipoproteínas que se presenta en la Figura 1, intenta resumir el transporte de lípidos biosintetizados en el hígado o provenientes de la ingesta alimentaria desde el intestino (2,3). En el ser humano aproximadamente el 80% del colesterol proviene de la síntesis hepática mientras que el 20% restante es aportado por la dieta.

Las lipoproteínas a diferencia del resto de las proteínas del plasma flotan cuando son sometidas a ultracentrifugación, propiedad que se utiliza para aislarlas, ya que la recuperación por otro tipo de técnicas de separación es mucho menor. Considerando la densidad de las lipoproteínas hidratadas, ésta es inversamente proporcional a la cantidad de lípidos (densidad menor a 1 g/ml). En la mayoría de los vertebrados se clasifican en: quilomicrón, lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), lipoproteína de densidad intermedia (IDL), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL), y lipoproteína de alta densidad de migración pre β (Pre- β -HDL) (Tabla 1)

Tabla 1. Características físicas y químicas de las lipoproteínas plasmáticas humanas.

Tipo de lipoproteína	Movilidad electroforética	Densidad (g/ml)	Tamaño (nm)	Relación Ésteres de colesterol/ Triglicéridos	Apolipoproteínas principales
Quilomicrones	No migra	0,93	75-1 200	1/19	B48, E, C
VLDL	Pre-b	0,93-1,006	30-80	1/3,3	B100, E, C
IDL	Pre-b lenta	1,006-1,019	27-5	1/3,5	B100, E
LDL	b	1,019-1,063	18-27	1/0,23	B100
HDL2	a	1,063-1,125	9-12	1/0,22	AI, AII, C
HDL3	a	1,125-1,210	7-9	1/0,19	AI, AII, C
Pre-b-HDL	Pre b	1,210-1,250	<7 (discos)	nd	AI

Las distintas subpoblaciones de lipoproteínas varían en composición lipídica, particularmente del núcleo hidrofóbico. Las lipoproteínas menos densas (los quilomicrones y la VLDL) contienen mayoritariamente triglicéridos. La LDL transporta colesterol esterificado mientras que la HDL transporta colesterol libre y fosfolípidos principalmente.

Las apolipoproteínas fueron inicialmente clasificadas en tres subfamilias distintas: A, B y C, la Apo A se asocia principalmente a la HDL, la Apo B con la LDL y la Apo C con la VLDL y la HDL (cita alaupovic). Aunque todavía se utiliza, esta nomenclatura se amplió en estas últimas décadas, debido a descubrimientos de nuevas apolipoproteínas y de perfiles específicos de distribución dentro de las lipoproteínas plasmáticas (Tablas 1 y 2). Por ejemplo, mientras que las Apo AI y AII se localizan exclusivamente en la HDL, la Apo AIV puede también encontrarse en las lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL). De la familia de la Apo B, la Apo B100 se encuentra tanto en la VLDL como en la IDL y la LDL, mientras que la Apo B48 es exclusiva de los quilomicrones. La Apo E, como la Apo C, no se asocian solamente a un tipo de lipoproteínas, sino que se encuentran tanto en la VLDL como en la HDL (Tabla 1).

Tabla 2. Nombre, expresión tisular, distribución plasmática y función de las principales apolipoproteínas humanas.

Nombre	Tejido de expresión	Distribución	Función
Apo AI	hígado, intestino	quilomicrones, HDL	Estructural ; activadora fisiológica de la LCAT ; eflujo de colesterol
Apo AII	hígado (intestino)	HDL	Estructural ; activadora/inhibidora de la LH ; eflujo de colesterol
Apo AIV	hígado, intestino	quilomicrones, HDL	Transporte reverso del colesterol; activadora de la LCAT; metabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos
Apo AV	hígado		Metabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos
Apo B100	hígado	VLDL, IDL, LDL	Estructural : síntesis y secreción de las VLDL ; ligando del LDLR
Apo B48	intestino	quilomicrones	Estructural ; síntesis y secreción de quilomicrones ; ligando del receptor B48R
Apo CI	hígado (intestino)	quilomicrones, VLDL, HDL	Inhibidora fisiológica de la CETP ; activadora de la LCAT ; Inhibidora de la unión a LDLR, LRP y VLDLR
Apo CII	hígado (intestino)	quilomicrones, VLDL, HDL	Activadora fisiológica de la LPL
Apo CIII	hígado (intestino)	quilomicrones, VLDL, HDL	Inhibidora fisiológica de la LPL ; Inhibidora de la captación hepática de las lipoproteínas ricas en triglicéridos
Apo D (Apo AIII)	hígado, intestino, páncreas, cerebro, riñón	HDL, LDL, VLDL	Transporte reverso del colesterol (?)
Apo E	hígado, macrófagos, cerebro	quilomicrones, VLDL, IDL, HDL	Ligando de LDLR, LRP y VLDLR
Apo F	hígado	LDL (VLDL, HDL)	Inhibidora de la CETP

Apo G	HDL	?
Apo H (β2 glico-proteína I)	HDL	?
Apo J (Clusterina)	HDL	Antiinflamatoria
Apo L	HDL	?
Apo SAA	HDL, quilomicrones	Fase aguda de la inflamación

Las interacciones de las lipoproteínas con receptores celulares específicos y enzimas implicadas en el metabolismo son las que determinan las funciones biológicas de las mismas (Tabla 2).

En lo que se refiere al metabolismo de las lipoproteínas, están implicados distintos órganos: el intestino, el hígado y los tejidos periféricos. En el intestino ocurre la absorción de los lípidos de los alimentos y se produce la incorporación de estos en quilomicrones, sintetizados por el enterocito. Durante el transporte entero-hepático los lípidos son hidrolizados y los ácidos grasos libres son captados por los tejidos periféricos donde se almacenan (tejido adiposo), o son catabolizados para obtención de energía (músculo estriado).

El hígado constituye el órgano central del metabolismo de los lípidos. Capta los lípidos de origen intestinal y los integra en nuevas lipoproteínas para redistribuirlas en los tejidos periféricos. Esta vía involucra a las lipoproteínas VLDL, IDL y LDL.

Finalmente, los tejidos periféricos recogen los lípidos (principalmente el colesterol no esterificado y los ácidos grasos libres) mediante endocitosis e hidrólisis de las lipoproteínas de origen hepático o intestinal. Con respecto al colesterol, la mayoría de los tejidos periféricos no puede metabolizarlo y, vía la HDL, lo descarga hacia el hígado, el único órgano del cuerpo capaz de **eliminarlo por el conducto biliar, constituyendo el mecanismo denominado Transporte reverso del colesterol (TRC)(4).**

1.1.1.1 Quilomicrones

Los quilomicrones son sintetizados al nivel del intestino en respuesta a la ingestión de grasas, por lo que sólo transportan lípidos de origen exógeno. Contienen varias clases de apolipoproteínas como AI, AII, AIV, CII, CIII y E, pero la Apo B48 es la principal. Los quilomicrones forman parte de las lipoproteínas denominadas "ricas en triglicéridos" (TRLs) por el alto contenido de éstos y el contenido relativamente pobre de colesterol. Luego de ensamblarse, los quilomicrones entran en el torrente sanguíneo. Los triglicéridos de los quilomicrones son hidrolizados por una lipasa unida al endotelio vascular, la lipoprotein lipasa (LPL) (2). La hidrólisis de triglicéridos libera ácidos grasos que servirán a nivel del tejido adiposo como reservas de energía una vez reesterificados a triglicéridos.

Captados a nivel del músculo, los ácidos grasos libres sirven como de fuente de energía. Los constituyentes de la superficie del quilomicroón liberados en respuesta a la acción del LPL son captados por las HDL (Apo AI, fosfolípidos, colesterol) (Figura 1), mientras que los quilomicrones remanentes (pobres en triglicéridos y proporcionalmente enriquecidos en colesterol) son eliminados por el hígado a través de dos receptores, el receptor de LDL (LDLR) y la proteína relacionada al LDLR (LRP), que reconocen a la Apo E del quilomicroón (2) (Figura 1).

1.1.1.2 La VLDL y lipoproteínas derivadas

Las VLDL contienen, al igual que los quilomicrones, una gran proporción de triglicéridos y apolipoproteínas de la clase C y E. Difieren sin embargo de los quilomicrones en que son sintetizadas por los hepatocitos y la principal apolipoproteína es la B100 (2). Las VLDL secretadas a circulación son también sustrato de la LPL. Los ácidos grasos liberados por la hidrólisis siguen el mismo destino que aquellos liberados por los quilomicrones. La hidrólisis continua de los triglicéridos de las VLDL circulantes reduce su contenido lipídico, lo que resulta en una reducción del diámetro y en un aumento de la densidad. Cuando la VLDL alcanza un cierto tamaño (300 Å), son consideradas

lipoproteínas de densidad intermedia o IDL, también conocidas como VLDL remanentes (2). La hidrólisis subsiguiente de la IDL, por la acción conjunta de la LPL y de la lipasa hepática (LH), lleva a la formación de lipoproteínas de tamaño todavía más reducido llamadas lipoproteínas de baja densidad o LDL (diámetro inferior a 270 Å). La LDL se caracteriza por un contenido relativamente elevado en colesterol en comparación con el contenido de triglicéridos (2). De hecho, la LDL es la que transporta la mayor parte del colesterol que se encuentra circulante en sangre. Finalmente, la mayoría de las LDL en circulación terminan su viaje intravascular en el hígado, donde son captadas por los hepatocitos. Esto se efectúa mediante distintos receptores como el LDLR que recoge la mayor parte de las LDL a través de su unión a la Apo B100 (Figura 1). En respuesta a su reconocimiento, la LDL es internalizada y luego degradada dentro del lisosoma. Una parte del colesterol recuperado sirve de precursor para la elaboración de las sales biliares que luego son secretadas al intestino mientras que otra parte es esterificado a nivel del citosol por la enzima acil-colesterol-acil-transferasa (LCAT) para ser almacenado luego en la célula (2).

Además, una proporción de las VLDL secretada es captada por el LDLR; por el receptor LRP (5), o incluso por el receptor estimulado por la lipólisis (6), antes de que su contenido de triglicéridos haya sido hidrolizado para alcanzar el tamaño y la densidad de las LDL.

1.1.1.3 HDL

Esta clase de lipoproteínas, compuesta por partículas de diámetro pequeño (entre 50 y 150 Å) y de densidad elevada (>1.063 g/ml) es muy heterogénea debido al contenido variable en lípidos, enzimas y apolipoproteínas. La apolipoproteína más importante es la Apo AI (70% del contenido proteico) y, en menor proporción, la Apo AII (20%), ambas sintetizadas por el hígado y el intestino. La HDL también puede contener Apo E y Apo CIII en baja proporción. Las HDL se dividen en β -HDL y pre- β -HDL que se distinguen según la migración electroforética en geles de agarosa. La mayoría del colesterol transportado por la HDL (HDL-C) se encuentra en la

fracción β -HDL, la cual se compone de partículas relativamente grandes, de forma globular y ricas en lípidos. A su vez esta subfracción de HDL puede ser separada en HDL2 y en HDL3, que también se distinguen según su tamaño y densidad, siendo HDL3 más pequeña y más densa que la HDL2 (Tabla 1).

Las pre- β -HDL pueden ser consideradas HDL inmaduras. Son de forma discoidal, relativamente más pequeñas que las β -HDL y pobres en lípidos, estando compuestas simplemente por una o dos moléculas de Apo A1 y algunas moléculas de lípidos (CITA). El metabolismo de las HDL está íntimamente relacionado al metabolismo de los lípidos contenidos en otras clases de lipoproteínas de densidad menor y mayor contenido de triglicéridos. En efecto, existe un intenso intercambio de constituyentes, tanto proteicos como lipídicos, entre la HDL y los Quilomicrones, la VLDL y la IDL (7).

1.1.2 Estructura y función de receptores de lipoproteínas de hepatocitos

Existen descritos hasta el presente siete receptores transmembrana de la familia del receptor de LDL (LDLR) estructuralmente relacionados, de los cuales 3 pueden detectarse en hígado (Figura 2 y Tabla 1) (8,9). Estos receptores comparten propiedades estructurales y funcionales. Unen una amplia variedad de ligandos que son internalizados y degradados en los lisosomas. Estos receptores poseen los siguientes dominios proteicos: 1) Sitio de unión de ligandos, con varias repeticiones (alrededor de siete) de 40 residuos de aminoácidos ricas en cisteína; 2) región homóloga del precursor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), formado por repeticiones tipo B; 3) dominio de 50 residuos formado por repeticiones del tetrapéptido Tyr-Trp-Thr-Asp (YWTD), que funcionan como aceptor para azúcares por uniones O-glicosiladas; 4) una región corta de transmembrana de aproximadamente 20 amino ácidos y 5) porción citoplasmática con una región de señal Asn-Pro-xaa-Tyr (NPXY) para la internalización del receptor por vesículas cubiertas. El receptor de LDL fue el primer miembro de la familia en ser identificado y exhaustivamente estudiado, sobre todo en relación a su papel en la homeostasis del colesterol.

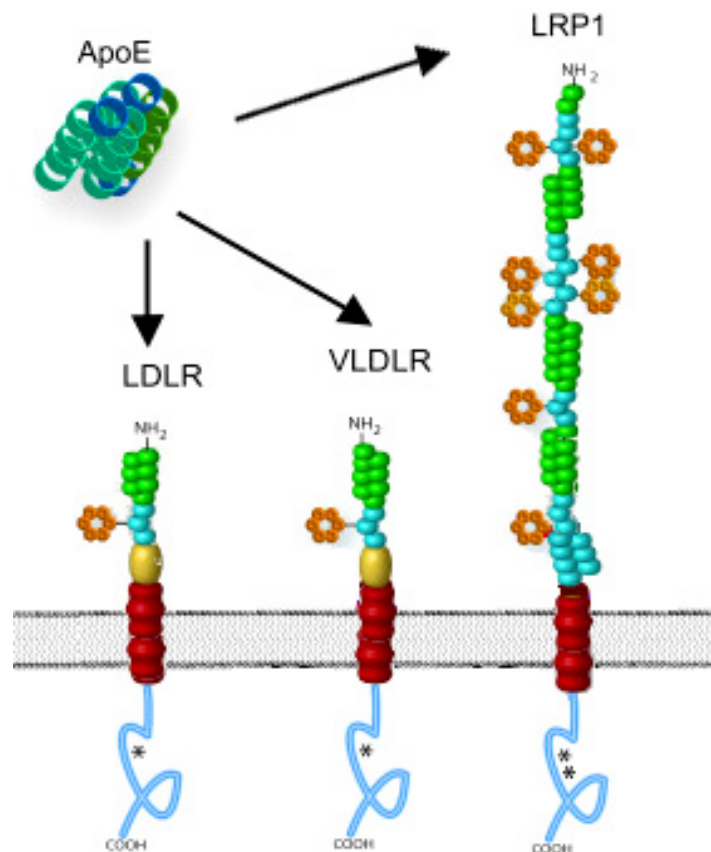


Figura 2: Estructura de los miembros de la familia del receptor de LDL que se expresan en hepatocitos

Los miembros de esta familia participan en un gran número de funciones biológicas, incluyendo la regulación de la actividad de las proteasas de superficie, transporte y activación de hormonas esteroideas, regulación de la homeostasis del calcio y en la señalización para la migración celular en el desarrollo embrionario (CITAS).

Tabla 3: Ligandos de los receptores de la familia del LDLR que se expresan en hepatocitos.

Receptor	Ligandos de los receptores de la familia del LDLR
LDLR	Apo B100, Apo E
VLDLR	Apo E, Reelina, RAP, Quilomicrón, Activadores del plasminógeno, lactoferrina, LPL, exotoxina A de <i>P. Aeruginosa</i> , Uroquinasa
LRP	Quilomicrón, LPL, α 2-macroglobulina, Activadores del plasminógeno, Complejos proteasa\inhibidor, LH, APP, RAP, TCS, Uroquinasa

1.1.2.1 El receptor de LDL (LDLR)

El LDLR es una glicoproteína de trasmembrana de 839 amino ácidos, con un peso molecular aproximado de 155-165 KDa. Este receptor regula el transporte de colesterol unido a la LDL circulante y de esta forma cumple un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del colesterol. Este hecho está bien documentado en la Hipercolesterolemia familiar, en donde mutaciones del gen que codifica para el receptor de LDL lleva a una disrupción de las vías de regulación concomitantemente a un dramático incremento en los niveles de colesterol plasmático.

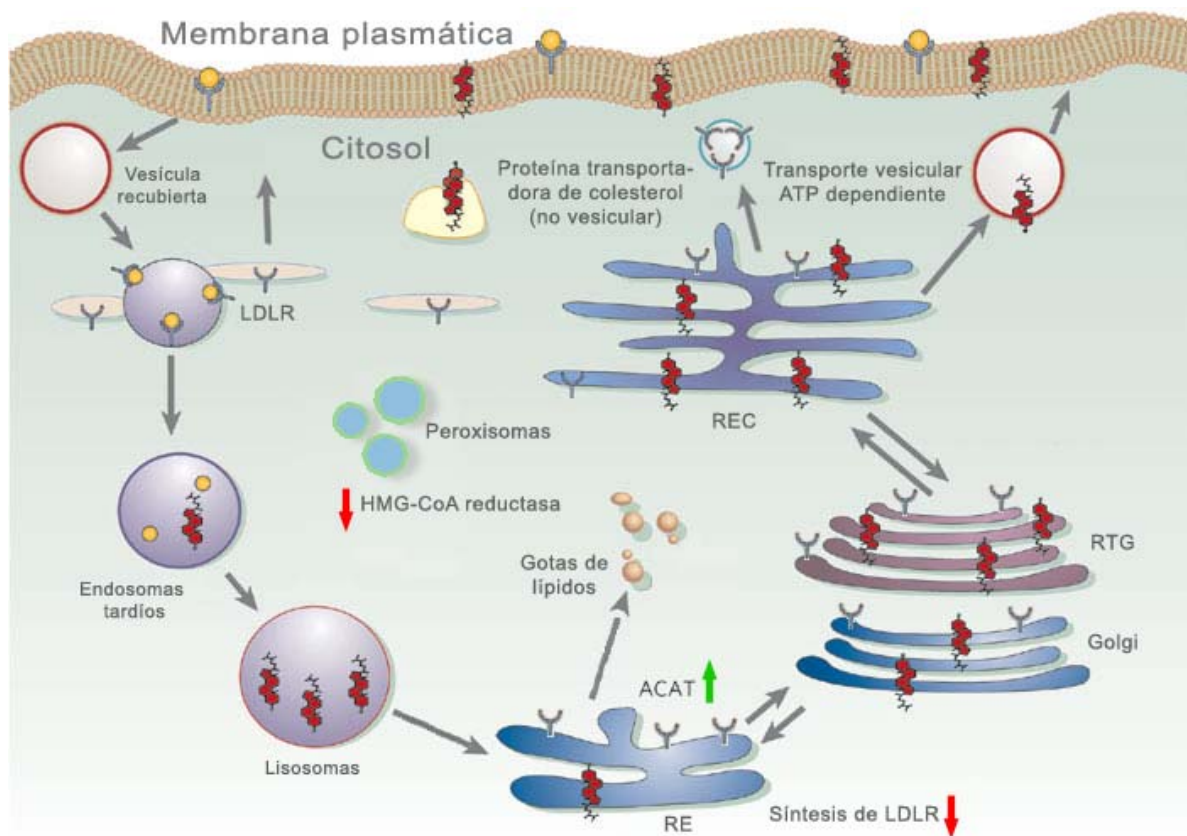


Figura 3: Transporte y regulación de la síntesis de colesterol y del LDLR

Cuando el hepatocito endocita partículas de LDL a través del LDLR, se activan tres mecanismos para estabilizar el contenido de colesterol de la célula: el gen de la enzima HMG-CoA es suprimido (enzima clave en la síntesis del colesterol) y se acelera la degradación de ésta enzima, se activa la síntesis de Acetil-CoA:colesterol acetiltransferasa (ACAT), enzima que esterifica al

colesterol protegiendo a la célula del colesterol libre, y se inhibe la expresión del gen del LDLR. (Figura 3)

1.1.2.2 La proteína relacionada al LDLR (LRP)

La LRP es una proteína heterodimérica constituida por dos subunidades de 515 KDa y 85 KDa. Las dos subunidades permanecen unidas en forma no-covalente y tienen funciones independientes. La subunidad de 85 KDa contiene los dominios citoplasmático y de transmembrana. En el hígado este receptor coopera con el LDLR en la remoción de las lipoproteínas remanentes (10,11). El LRP se expresa, en los hepatocitos, **en la superficie de los sinusoides en el espacio de Disse**, y como el LDLR une lipoproteínas que contienen Apo E *in vitro* y media su endocitosis en las células en cultivo. LRP no une LDL, por lo que es incapaz de compensar la falta de LDLR en los individuos con deficiencia de este receptor (12). El rol de la LRP en el metabolismo lipoprotéico está más restringido que el de LDLR, este último puede compensar completamente la falta del LRP funcional en el hígado (11). La LRP es un receptor multifuncional que interactúa con una amplia variedad de proteínas de secreción, así como con moléculas residentes de la superficie celular. Algunas de las funciones incluyen además de la participación en el metabolismo lipídico, entrada celular de virus y toxinas, activación de enzimas lisosomales, transducción de señales intracelulares y neurotransmisión (13). Ligandos solubles de la LRP son la proteína asociada al receptor (RAP), complejos proteasas-inhibidores de proteasas, como el activador del plasminógeno y el inhibidor 1 del activador del plasminógeno; α 2-macroglobulina (12), la HSP-96 y la proteína HIV-1 Tat, proteína transactivadora para genes virales que es secretada por las células infectadas en donde se replica el virus de HIV (14).

1.1.2.3 El receptor barredor tipo B1 (SR-B1)

Los receptores barredores (SR) son receptores que median la captación selectiva de los lípidos de las lipoproteínas hacia las células (15,16). Fueron descritos primero en macrófagos como receptores alternativos al LDLR para la captación de colesterol y lípidos, llevando al desarrollo de las células

espumosas. El nombre se debe a su amplia variedad de ligandos que reconocen (17). Los receptores SR unen ligandos muy diversos, pero están particularmente involucrados en la remoción de lipoproteínas modificadas oxidadas, glicosiladas, etc. Algunos de éstos SR (SR-B1 y CD36) también unen lipoproteínas no modificadas como la HDL y la LDL (Figura 4).

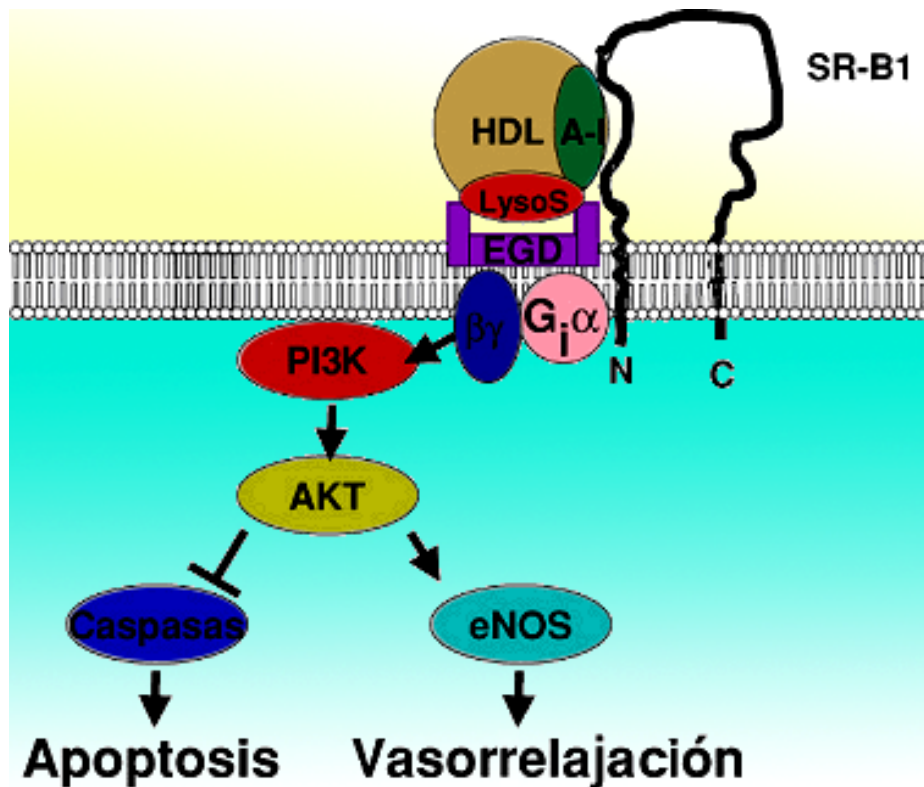


Figura 4: vías de señalización del SR-B1 y efectos de la unión de HDL.

1.1.2.4 El receptor de VLDL (VLDLR)

A diferencia del LDLR y de LRP que se expresan en condiciones normales en el hepatocito, la expresión de VLDLR está fuertemente inhibida en condiciones normales (18-20). Experimentos elegantes y complejos han mostrado en ratones que no tienen el gen del receptor de LDL que existe relación entre ligandos del receptor activado por el proliferador de peroxisomas alfa (PPAR- α) como el ácido linolénico conjugado (CLA), y el aumento de la expresión de VLDLR en el hígado (21) y que el mRNA que codifica para VLDLR no se detecta en el hígado del adulto pero si en el hígado del neonato (22).

En líneas celulares de hepatocitos humanos se ha demostrado que VLDLR no es regulado por inhibidores de proteasas (23), a diferencia del LDLR y LRP. También se ha demostrado recientemente (19) que agonistas de los LXR regulan positivamente al VLDLR en cultivos primarios de hepatocitos humanos. Estos hechos podrían explicar porqué la presencia de VLDLR en hígado de mamíferos es controversial actualmente.

En otro tipo celular (monocitos humanos), se conoce que la expresión de VLDLR aumenta en condiciones de hipoxia (24) y que, a pesar de la existencia de secuencias similares a elementos regulados por esterol en el gen de VLDLR, no es regulado por esteroides, como si ocurre en el caso del LDLR (25). También se conoce que en estas células el gen del VLDLR es regulado por el receptor de glucocorticoides (26).

La función del VLDLR parece variar según el tipo celular (27); la alta expresión del receptor en tejidos donde hay un metabolismo activo de ácidos grasos como corazón y tejido adiposo sugiere que la principal función de este receptor estaría relacionada con el metabolismo de TRL y los ácidos grasos (28-31). Esta teoría está de acuerdo con la distribución similar pero no idéntica del gen de LPL en esos tejidos (32) cuya actividad es imprescindible para la hidrólisis de los triglicéridos.

Una característica distintiva de VLDLR es que actúa en la transducción de señales no relacionadas directamente con el metabolismo lipídico (33). La interacción con VLDL produce la fosforilación de la proteína Disabled-1 (Dab-1) (34), proteína adaptadora intracelular que se une a los motivos NPxY presentes en el dominio citosólico del VLDLR (35). La fosforilación mediada por tirosinkinasa dispara la cascada de kinasas que intervienen en el control de la movilidad y forma celular (Figura 5). Otras vías de señalización del VLDLR involucran la desfosforilación del factor nuclear NFAT con la consiguiente activación de genes involucrados en la proliferación celular (Figura 5).

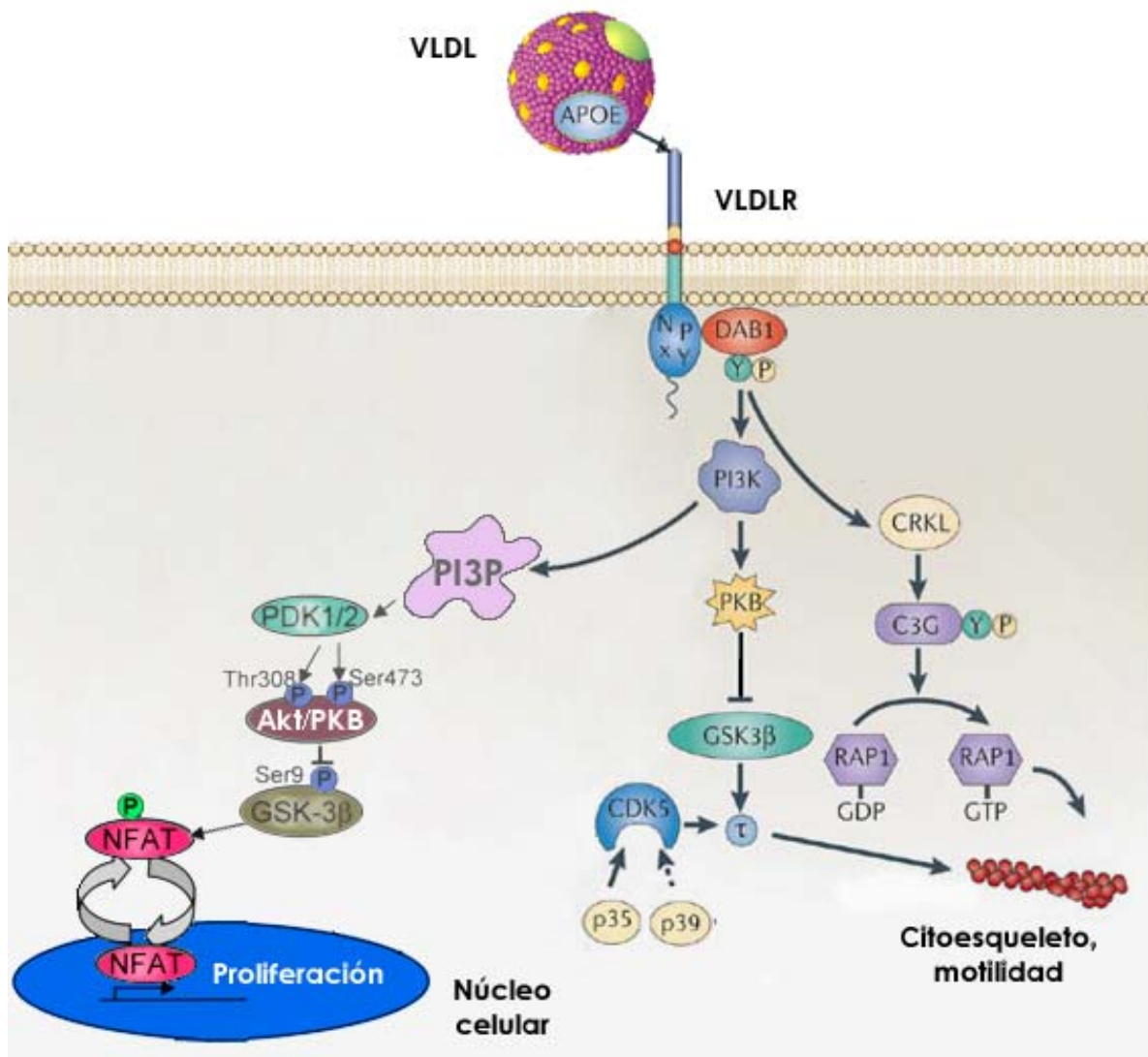


Figura 5: vías de señalización propuestas para la acción del VLDLR. DAB1: Disabled-1; PI3K: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato kinasa; PI3P: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato; PDK1/2: Protein kinasas 1 y 2 dependientes de fosfoinosítido; PKB: protein kinasa B; GSK-3β: glucógeno sintetasa kinasa 3β; NFAT: factor nuclear de linfocitos T activados; τ: proteína Tau asociada a microtubulos; Cdk5:- kinasa ciclina-dependiente 5, CRKL: proteína adaptadora crkl, C3G: proteína de intercambio de guanina, RAP1 y RAP2: proteínas G.

1.1.2.4.1 Estructura del VLDLR

En mamíferos el VLDLR existe en dos isoformas de distintos pesos moleculares que se originan mediante el mecanismo de empalme alternativo del pre-mARN (29,36,31). El receptor tipo I contiene un dominio de unión-O a carbohidratos y un peso molecular aparente de 130 KDa bajo condiciones no desnaturalizantes, mientras que el receptor tipo II carece de este dominio y

tiene un peso molecular aparente de 95-100 KDa. Se sabe además que ambas formas del receptor unen RAP con afinidades similares (37).

Usando lipoproteínas marcadas fluorescentemente se ha demostrado que VLDLR une VLDL pero no LDL, indicando que VLDLR es específico para la Apo E (28,38).

1.1.2.4.2 Estructura del gen del VLDLR

Se conoce que existen diferencias a nivel de los intrones del gen de VLDLR, además de las diferencias en la secuencia primaria de la proteína. Se ha demostrado asociación entre estos polimorfismos y distintas patologías como la obesidad (39), degeneración macular (40) y el Alzheimer (41).

En relación a esto, un estudio demostró una modesta asociación entre los polimorfismos genéticos del VLDLR y los niveles plasmáticos de los triglicéridos y una disminución en la complejidad de la corteza cerebral y retardo mental (42).

1.1.2.4.3 Unión de ligandos al VLDLR

Se ha demostrado recientemente que VLDLR une con mayor afinidad que LDLR y LRP las tres isoformas de Apo E existentes (Apo E2, E3 y E4), ya sea unida a lípidos o libre de estos (43). También es conocido que la actividad y la unión de las lipoproteínas que contienen Apo E al VLDLR es modulada por un complejo de proteínas que incluye a la LPL (44). Existen 3 mecanismos por los cuales la unión de VLDL al VLDLR es incrementada por la LPL: mediante la unión directa a través de la LPL, mediante la unión a LPL unida a su vez a proteoglicanos heparan sulfato (HSPG) o mediante la actividad lipolítica de la LPL sobre la partícula de VLDL, convirtiéndola en VLDL remanente (25).

VLDLR al igual que LRP reconoce una amplia variedad de ligandos no relacionados con las lipoproteínas, como por ejemplo la uroquinasa, el PAI y la proteína RAP (Tabla 3).

Es conocido que en varios tipos celulares humanos el dominio citoplasmático del VLDLR es fosforilado por PKC y que esta fosforilación

disminuye la unión de RAP y de uPAI/PAI. El VLDLR de pacientes con cardiopatías avanzadas se encuentran más fosforilados debido a que en estas patologías hay aumento de PKC- β II (45), lo que llevaría a una disminución de la hidrólisis de VLDL en los cardiomiocitos.

1.2 La inflamación y la Respuesta de Fase Aguda (RFA)

La inflamación es un mecanismo de defensa a diversas injurias: infección bacteriana, sangrado excesivo, necrosis, etc. Además de los efectos locales de la inflamación, se produce una reacción sistémica conocida como Respuesta de Fase Aguda (RFA) caracterizada por cambios pronunciados en la concentración de algunas proteínas denominadas Proteínas de Fase Aguda (PFA). Las PFA generalmente aumentan su concentración en plasma y son denominadas PFA positivas, pero algunas, como algunos tipos de albúmina y la apolipoproteína AI (Apo AI) disminuyen su concentración plasmática y son denominadas PFA negativas (46). Las PFA son sintetizadas en el hígado y su producción es estimulada por citoquinas características de la respuesta inmune innata, principalmente la interleuquina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Estas citoquinas se sintetizan en macrófagos, células endoteliales y fibroblastos y actúan en los órganos blancos a través de receptores específicos. Estas citoquinas, junto con la LDL oxidada, moléculas de adhesión (moléculas de adhesión intercelular 1), y otros productos de la estimulación hepáticas tales como la PCR, SAA y demás reactantes de fase aguda son útiles para identificar y monitorear el proceso inflamatorio y han sido propuestos como marcadores inflamatorios de uso clínico para predecir inflamación causada por obesidad, probabilidad de sufrir infarto agudo de miocardio, gravedad de la sepsis, etc. (47).

Durante la infección/inflamación, además de los cambios en las concentraciones de las PFA, se producen alteraciones en el metabolismo de los lípidos, principalmente de los triglicéridos y del colesterol. En adición a los cambios en los niveles de lípidos y lipoproteínas circulantes, se observan alteraciones en la composición de las lipoproteínas y cambios en los niveles y

actividades de varias proteínas plasmáticas implicadas en el metabolismo y el funcionamiento de las lipoproteínas (Tabla 4).

1.3 Relación entre metabolismo lipídico hepático e inflamación

La inflamación es la respuesta protectora local ante un daño al tejido. La palabra inflamación significa originalmente “en llamas”. Los síntomas característicos, enrojecimiento, hinchazón, calor y dolor, descritos por Celsus en el 1er siglo dC. y por Galeno alrededor del año 200 dC. Microscópicamente, estas características se deben a la vasodilatación, acumulación de leucocitos, incremento de la permeabilidad capilar y por lo tanto acumulación del fluido intersticial y estimulación de las terminaciones nerviosas por neurotransmisores como la sustancia P que provocan el dolor. Recién a fines del siglo veinte se comenzaron a develar los mecanismos moleculares por los cuales la inflamación produce los signos macroscópicos descritos.

Uno de los hallazgos principales fue el papel protagónico del hígado tanto en el inicio como en el desarrollo y resolución de los eventos inflamatorios. El hígado detecta, mediante la expresión de receptores de membrana específicos, la concentración de moléculas proinflamatorias en el torrente sanguíneo y en respuesta sintetiza y libera un conjunto de proteínas llamadas proteínas de fase aguda, las cuales proveen los medios para la remoción de patógenos y la defensa inmune. El hígado, además, modula el desarrollo de las reacciones inmunes atrayendo a los linfocitos activados, los cuales son destruidos en su interior (48).

Dado que el hígado también es el órgano principal del metabolismo de los lípidos, es lógico intuir que él asegure una regulación recíproca entre la inflamación y el metabolismo lipídico. En relación a esto hay investigadores que han encontrado que la administración de lipopolisacárido bacteriano (LPS), un potente iniciador de la respuesta inflamatoria y de citoquinas proinflamatorias a ratones, reduce los niveles de mRNA de los receptores nucleares PPAR- α y γ , receptor X de retinoide (RXR) y receptor X de farnesoide (FXR) en el hígado. Estos receptores están involucrados en la regulación de proteínas relacionadas con el metabolismo lipídico (49). De esta manera, moléculas que actúan como

ligandos de estos receptores nucleares afectan tanto el metabolismo celular lipídico como la respuesta inflamatoria cuando actúan sobre los hepatocitos. Dentro de esta clase de moléculas se encuentran los fibratos, derivados del ácido fibrico que son ligandos específicos de los receptores PPARs (50,51) Estos exhiben otros efectos pleiotrópicos tales como efectos antiinflamatorios, (51,52), antioxidantes, y propiedades antitrombóticas e incluso mejoran la función endotelial (53,54). También se ha reportado que disminuyen la producción de citoquinas y moléculas proinflamatorias como TNF- α (55,56); de VCAM-1 (57); interferon- γ e IL-2 (58). A través de su acción antiinflamatoria, los fibratos reducen los niveles plasmáticos de marcadores de inflamación y hemostasia, incluyendo los considerados factores de riesgo cardiovasculares como la PCR, la IL-6, el fibrinógeno, y el PAI-1 (55, 57, 59-61).

Otros fármacos con efecto dual sobre el metabolismo lipídico y la inflamación son las estatinas, que actúan bloqueando la acción de la HMG-CoA reductasa, enzima peroxisomal que cataliza la reacción inicial y limitante de la cascada que conduce a la síntesis de colesterol endógeno. Se ha demostrado que las estatinas reducen la morbilidad y la mortalidad cardiovascular y, recientemente, que éstas modulan varios de los mecanismos de la inflamación, tanto *in vitro* como *in vivo*, incluyendo la reducción de marcadores de la inflamación en pruebas clínicas (62, 63).

A pesar de los importantes avances que se han logrado en el estudio de esta interrelación en los últimos años, aun falta mucho por develar en relación a los mecanismos moleculares que median los efectos de los lípidos sobre la expresión de genes inflamatorios.

1.3.1 Lípidos involucrados en la inflamación

Del universo de moléculas clasificadas como lípidos, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés) son quizás los más involucrados tanto en el desarrollo de la inflamación como en su resolución (efectos antiinflamatorios) son componentes del aceite de pescado muy utilizado en la prevención de la inflamación. Los PUFAs se nombran según el número de carbonos que los componen, la cantidad de dobles enlaces y la

posición del primer doble enlace en la cadena de carbono, contado a partir de la extremidad metilo (donde la extremidad metilo es el carbono número uno). Por lo tanto, una cadena de 18 carbonos, con dos doble enlaces, el primero en la en posición seis a partir de la extremidad metilo se denomina 18:2n-6 (Figura 6). El nombre común de este ácido graso es ácido linoléico, mientras que el 18:3n-3 es llamado ácido α -linoléico. Estos dos ácidos grasos son esenciales ya que no pueden ser sintetizados por los mamíferos (64). Por otra parte, estos ácidos grasos pueden ser transformados mediante la adición de dobles enlaces y por alargamiento de la cadena mediante enzimas elongasas. Así pues, el ácido linoléico puede convertirse en ácido γ -linoléico (18:3n-6) y en ácido dihomo- γ -linoléico (20:3n-6), el cual puede ser convertido en ácido araquidónico (20:4n-6). Mediante las mismas elongasas, el ácido α -linoléico puede ser convertido en ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) el cual puede convertirse en ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) por la adición de dos carbonos (Figura 6).

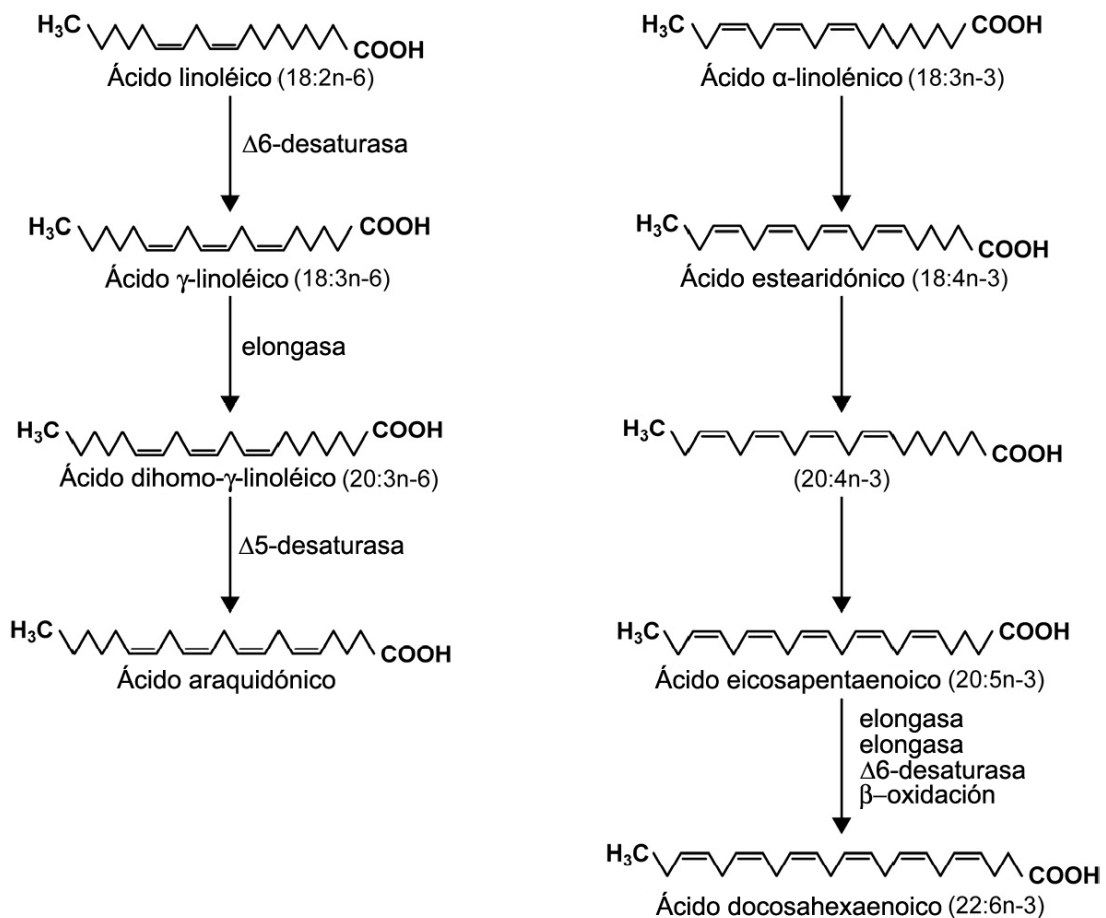


Figura 6: Estructura y metabolismo de los ácidos grasos n-3 y n-6.

Aunque el sustrato preferido de la $\Delta 6$ -desaturasa es el ácido α -linolénico, el ácido linoléico es el más abundante en la alimentación occidental (64). Uno de los primeros vínculos en ser develado entre los ácidos grasos y la inflamación es que los eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, lipoxinas, etc.), cuya función es ser mediadores inflamatorios, son producidos a partir de ácidos grasos poliinsaturados de 20 carbonos por acción de la fosfolipasa pancreática (PLA₂) sobre los fosfolípidos de las membranas celulares (65). Se sabe que las células inflamatorias contienen más ácidos grasos de tipo n-6 que de tipo n-3 por lo que el ácido araquidónico es el sustrato dominante para la síntesis de los eicosanoides por las ciclooxigenasas (COX) y las lipoxigenasas (LOX), que generan las prostaglandinas (PGs), los tromboxanos (TXs), los leucotrienos (LTs) y el ácido hidroxieicosatetraenoico (HETEs). En la Figura 7 se detalla la síntesis de eicosanoides a partir del ácido araquidónico. La prostaglandina E2 (PGE2) posee diversos efectos inflamatorios: produce el aumento de la temperatura corpórea, de la permeabilidad vascular, la vasodilatación, y el dolor (65).

El leucotrieno B4 (LTB4) aumenta la permeabilidad vascular y atrae a las células leucocitarias provocando la liberación de las enzimas lisosomales y de citoquinas inflamatorias como el TNF- α y la producción de especies oxigenadas reactivada (ROS) (65). El efecto último del consumo de aceites de pescado es el aumento de la proporción de ácidos grasos n-3 en los fosfolípidos de las células inflamatorias, lo que produce una disminución de la producción de PGE2, (66) de TXB2 (67), de LTB4, de 5HETE y de LTE4 (68). Los ácidos grasos omega-3 tienen otros efectos antiinflamatorios además de antagonizar el metabolismo del ácido araquidónico. En efecto, estudios realizados con cultivos celulares demostraron que el EPA y el DHA podían inhibir la producción de IL-6 y de TNF- α en monocitos (64) y la producción de IL-6 y de IL-8 por las células endoteliales venosas (65).

Finalmente, existen numerosos ejemplos de estudios en los que se demuestran regulaciones del genoma realizadas por DHA. Algunos miembros de la superfamilia de receptores nucleares, entre los que se encuentran los PPAR α y γ , el LXR y el RXR, son regulados por ácidos grasos o sus

metabolitos, por lo que parte de su acción antiinflamatoria podría estar relacionada con la activación de ciertos genes antiinflamatorios regulada por este receptor nuclear (65-67).

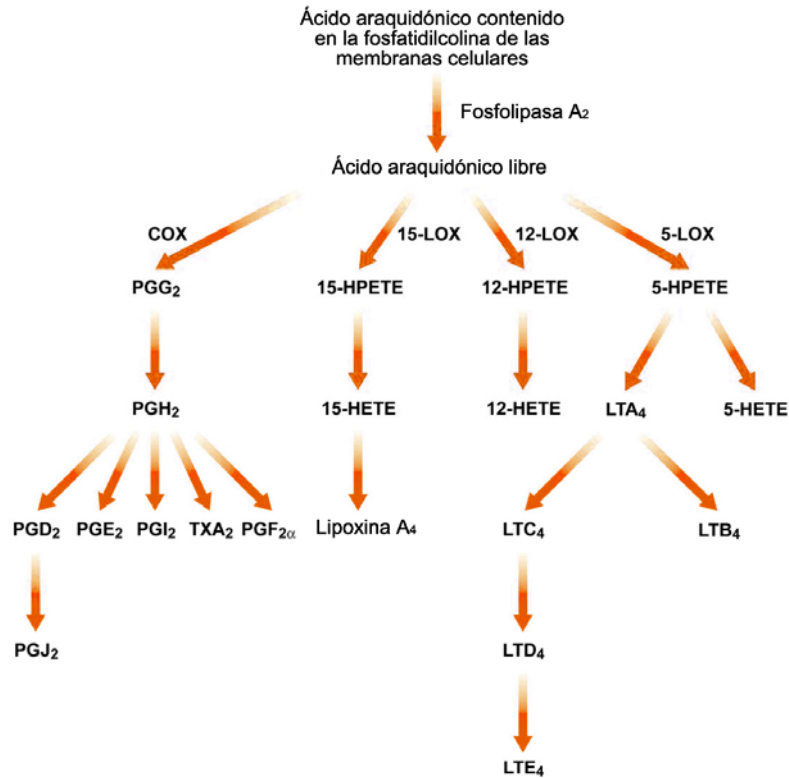


Figura 7: síntesis de eicosanoides a partir del ácido araquidónico.

1.3.2 Lipoproteínas e Inflamación

Las lipoproteínas, conjuntamente con sus receptores y con otras proteínas relacionadas, además de participar en el transporte de lípidos en sangre y en el metabolismo lipídico, exhiben propiedades inflamatorias (Tabla 3) o antiinflamatorias.

Tabla 3. Niveles de lipoproteínas y enzimas involucradas en el transporte de lípidos relacionados con la infección y la inflamación.

Cambios	Efectos
VLDL	
Niveles de VLDL incrementados en la septicemia	Activación de macrófagos
Aumento producción de VLDL hepática en modelo experimental de ratones con dieta aterogénica	Aumento de VLDL y de marcadores de Inflamación
LPL y HL disminuidas	Disminuye la remoción de las lipoproteínas ricas en triglicéridos
Contenido de esfingolípidos incrementado	Disminuye la remoción de las lipoproteínas ricas en triglicéridos
Expresión tisular de Apo E disminuida	Disminuye la remoción de lipoproteínas
LDL	
LDL pequeñas densas incrementadas	Incrementa la susceptibilidad a la oxidación; incrementa la penetración de LDL a través del endotelio; incrementa la interacción con los proteoglicanos de la pared arterial y su retención en la pared arterial.
Actividad PAF-AH incrementada	Producción de LPC incrementada
FLA2 soluble incrementada	Libera ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos que pueden oxidarse
Contenido de esfingolípidos incrementado	Facilita la agregación de la LDL y su captación por macrófagos
Ceruloplasmina incrementada	Incrementa la oxidación de la LDL
HDL	
HDL y Apo AI disminuidas	Deteriora la remoción mediada por apolipoproteínas del colesterol celular
LCAT disminuida	Deteriora la remoción mediada por el mecanismo de difusión del colesterol celular
CETP disminuida	Deteriora la transferencia de colesterol a las lipoproteínas ricas en triglicéridos
HL disminuida	Reduce la formación de pre-b HDL

PLTP disminuida	Reduce la formación de pre-b HDL; disminuye el contenido de fosfolípidos en la HDL y deteriora la remoción del colesterol al incrementar su flujo desde la HDL hacia las células
SAA incrementada	Disminuye la disponibilidad del colesterol de HDL para ser metabolizado por los hepatocitos; incrementa la captación de colesterol por los macrófagos
FLA2 soluble incrementada	Disminuye el contenido de fosfolípidos en la HDL y deteriora la remoción del colesterol al incrementar su flujo desde la HDL hacia las células
Actividad PAF-AH incrementada	Producción de LPC incrementada
PON disminuida	Disminuye la capacidad de la HDL de proteger a la LDL contra la oxidación
Transferrina disminuida	Deteriora la capacidad de la HDL de proteger a la LDL contra la oxidación
Apo J incrementada	Induce la diferenciación de las células musculares lisas de la pared arterial

Abreviaturas: Apo, apolipoproteína; CETP, proteína de transferencia de ésteres de colesterol; HDL, lipoproteína de alta densidad; HL, Lipasa Hepática; LCAT, lecitin colesterol acil transferasa; LDL, lipoproteína de baja densidad; LPC, lisofosfatidilcolina; LPL, lipasa lipoprotéica; PAF-AH, Acetil hidrolasa del factor activador plaquetario; FLA2, fosfolipasa A2; PLTP, Proteína de transferencia de fosfolípidos; PON, paraoxonasa; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; SAA, amiloide A sérico.

De estos datos se desprende que existe una fuerte relación entre lípidos e inflamación y que se regulan mutuamente, es decir, una disfunción metabólica relacionada al transporte y/o metabolismo lipídico altera el balance inflamatorio y viceversa, un estímulo inflamatorio se traduce en una alteración en el balance de lipoproteínas y el metabolismo lipídico.

1.3.2.1 VLDL e inflamación

La alteración típica del metabolismo de las lipoproteínas durante la infección/ inflamación es la hipertrigliceridemia (69). El aumento en los niveles plasmáticos de triglicéridos se debe a un aumento de la cantidad de VLDL en plasma, que puede ser el resultado de un aumento en la producción de VLDL o

de una disminución en la remoción de ésta. Se ha observado que existe un aumento en los triglicéridos plasmáticos de la fracción de VLDL en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (70). Tanto el incremento en los niveles de triglicéridos plasmáticos, como el aumento de la lipogénesis hepática y la disminución de la remoción de triglicéridos se correlacionaron con los niveles de interferón- α (IFN)- α (71,72) en estos pacientes. Inyectando LPS y ácido lipoteicoico (LTA) a animales, para simular infecciones producidas por bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, respectivamente, se encontró que dosis bajas de LPS y dosis ligeramente más altas de LTA estimulan la producción de VLDL, mientras que dosis altas de LPS inhiben la remoción de VLDL (73, 74)

Los experimentos en ratas y ratones demostraron que dosis bajas de LPS estimulan rápidamente la producción de VLDL al aumentar la lipólisis del tejido adiposo, la síntesis hepática de novo de ácidos grasos y al disminuir la oxidación hepática de ácidos grasos, todo lo cual proporciona suficientes ácidos grasos libres para la esterificación a triglicérido y su ensamblaje a partículas de VLDL en el hígado (75, 76). Tanto el LTA como el LPS en bajas dosis inducen la hipertrigliceridemia en ratas aumentando la secreción hepática de triglicéridos de VLDL (74). Dosis altas de LPS no aumentan la síntesis hepática de VLDL sino que disminuyen la actividad de la lipasa lipoprotéica (LPL), una enzima responsable de la remoción de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (77). Una reducción concomitante de Apo E durante la infección limita la eliminación de VLDL, dado que la Apo E facilita la unión de ésta al VLDLR y al LRP y su consecuente remoción del plasma por el hígado (78).

Los efectos del LPS y el LTA sobre el metabolismo de los triglicéridos son mediados por citoquinas (Por Ej. TNF- α , IL-1, IL-6, e IFN- γ). Éstas estimulan rápidamente la síntesis hepática de ácidos grasos, dando por resultado un incremento en la producción de VLDL y en la hipertrigliceridemia en ratas y ratones (73,76,79-81). Es de notar que el TNF- α y la IL-1 son las citoquinas predominantes en la infección bacteriana, y la IL-1 es el mediador primario de la inflamación, mientras que el IFN- α es activado sobre todo por la infección viral. A pesar de las diversas vías de activación de las citoquinas, diversos tipos de infección o inflamación resultan en efectos similares sobre el metabolismo de los triglicéridos.

Durante la infección y la inflamación, además de los cambios en los niveles de VLDL y de triglicéridos circulantes, también hay cambios en la composición, tanto lipídica como proteica, de la VLDL. La VLDL producida por el hígado como respuesta al suministro de LPS o TNF- α presenta un tamaño de partícula, composición de apolipoproteínas, triglicéridos, colesterol, y fosfolípidos normales, pero están enriquecidas en esfingolípidos (81-83). Las lipoproteínas enriquecidas en esfingolípidos son proaterogénicas y proinflamatorias (84) ya que retardan la remoción de las TRL, dando lugar a la acumulación de VLDL y remanentes de VLDL que son internalizadas por los monocitos iniciando así la transformación de éstos en células espumosas (85).

Tabla 4: Participación de la VLDL en procesos inflamatorios

Efectos inflamatorios	Modelo experimental	Referencia
Unión de proteína de unión a LPS y LPS	Humano (normal y séptico)	Vreugdenhi y col. 2001 (86)
Unión de proteína C reactiva	Humano	Rowe y col. 1984 (87)
Atorvastatina disminuye TG de la VLDL	Ganso hipercolesterolémico	Dixon y col. 2002 (88)
Alzheimer C esporádico	Humano	Okuizumi y col. 1995 (41)
Efecto inflamatorio debido a lipólisis de VLDL	Macrófago peritoneal de ratón	Saraswathi y col. 2006 (89)

1.3.2.2 HDL e inflamación

La infección y la inflamación se asocian a una disminución de niveles de HDL-C (71,90-93). El mecanismo que lo regula no se ha establecido claramente. Sin embargo, un nivel persistentemente bajo de HDL-C, tanto en la infección como en la inflamación crónica, sugieren que este cambio puede ser perjudicial, puesto que los datos de estudios epidemiológicos han demostrado un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular en individuos con niveles bajos de HDL. Hay varias apolipoproteínas que confieren a HDL funciones específicas. Más aún, el metabolismo de la HDL es regulado por varias enzimas y proteínas de transferencia que afectan estas funciones. Durante la infección y la inflamación, los niveles de HDL-C disminuyen, y se produce una amplia gama de cambios en las apolipoproteínas, enzimas, y proteínas de transferencia. Consecuentemente, hay marcados cambios en la composición de lípidos y de proteínas en la HDL, que alteran su funcionamiento. La HDL que circula durante la infección e inflamación (también llamada HDL de fase aguda) es depletada de ésteres de colesterol y se enriquecen en colesterol libre, triglicéridos y esfingolípidos (82,91,93,94). Además, la Apo A-I de HDL y los niveles de paraoxonasa (PON) disminuyen, pero los niveles de Apo J y los del amiloide sérico A (SAA) del suero aumentan (71,95-97). Otras proteínas del plasma, las cuales tienen un rol clave en el metabolismo de la HDL y en el TRC, incluyendo la lecitina:aciltransferasa de colesterol (LCAT), la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), la lipasa hepática (LH), y la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP) (98-101) también disminuyen en suero. En contraste, los niveles de FLA2 circulante aumentan (102) (Tabla 3). Estos cambios explican porqué durante la RFA, las dos principales funciones de HDL, el control de la oxidación de LDL y el TRC, están disminuidas.

1.3.3 Los receptores de lipoproteínas hepáticos y la inflamación

A pesar de que existe un cuerpo de evidencia importante con respecto al papel de las lipoproteínas en la inflamación, existe escasa evidencia sobre la

relación de los receptores de lipoproteínas con el proceso inflamatorio. Hasta el momento de la escritura de esta tesis, existen solo en la literatura alrededor de 16 trabajos científicos que involucran a estos receptores con la inflamación (Tabla 5).

Tabla 5: Participación de los receptores de lipoproteínas hepáticos en la inflamación.

Receptor	Efecto	Autor
LDLR	La citoquina inflamatoria IL-1 β disrumpe la regulación por retroalimentación mediada por colesterol del LDLR, permitiendo la acumulación intracelular de LDL intacta y causando la formación de células espumosas.	Chen y col. (103)
LDLR	El TNF y la IL-1 incrementan la expresión de LDLR al aumentar la transcripción de estos genes mediante vías de señalización distintas.	Stopeck y col. (104)
LDLR	La vía de señalización de la p38MAPK regula negativamente la expresión de LDLR	Kumar y col. (105)
LDLR	En pacientes con glomerulopatía relacionada a la obesidad la expresión de genes clave del metabolismo lipídico, como LDLR, FABP y SREB1 están incrementados mas de 2 veces al igual que citoquinas inflamatorias como TNF- α , IL-6, INF- γ y sus receptores.	Wu y col. (106)
LDLR	Las endotoxinas suprimen la expresión de LDLR hepático de ratón por una vía independiente del TLR4.	Liao y col. (107)
LDLR	La exposición de monocitos no estimulados a distintas dosis de estatinas resultó en la regulación positiva de mARN de LDLR.	Lindgren y col. (108)
LRP	El TPA y el LRP median la activación de la vía del NFK-B inducida por isquemia	Zhang y col. (109)
LRP	El FT, producido a consecuencia de la presencia de LPS, se une a su receptor y al complejo LRP y es internalizado.	Hamik y col. (110)
LRP	El LRP de macrófagos modula la aterogénesis a través de la regulación de la respuesta inflamatoria.	Overton y col. (111)
LRP	La regulación de la acumulación de lípidos en células THP-1 se correlaciona con la síntesis de Apo E, con la actividad de la LPL y con la expresión de LRP.	Garner y col. (112)
LRP-LDLR	El LRP media la activación de astrocitos inducida por A, mientras que el LDLR media los cambios inducidos por A de los niveles de Apo E. Estos receptores traducen la presencia extracelular de A en respuestas celulares, iniciando y modulando la respuesta inflamatoria.	LaDu y col. (113)
VLDLR	Alteraciones bioquímicas en las retinas de ratones knock-out para el VLDLR genera proliferación angiomasosa retinal.	Li y col. (114)

2. Hipótesis de trabajo y objetivos

2.1 Hipótesis de trabajo

Luego de haber examinado los datos expuestos sobre la regulación de lípidos, lipoproteínas y sus receptores en hepatocitos, nuestra hipótesis de trabajo fue determinar si la síntesis de Apo AI (principal constituyente de las HDL y además proteína de fase aguda negativa), esta relacionada con la expresión del receptor de VLDL, la cual es controversial en hígado humano. Nuestra hipótesis consideró que la controversia podría deberse a la fuerte regulación que el receptor nuclear FXR ejerce en su expresión. Como herramientas se emplearon drogas y moléculas que actúan sobre la vía de activación de los FXR y PPAR- α .

2.2 Objetivos

- Caracterizar un modelo hepático de inflamación utilizando células de hepatoma humano HepG2 en cultivo.
- Evaluar la presencia de VLDLR en el modelo experimental utilizando distintos ligandos de este receptor. Caracterizar y cuantificar.
- Relacionar la expresión celular de VLDLR y acumulación de Apo AI en el medio en respuesta a estímulos inflamatorios.
- Relacionar la expresión celular de VLDLR y acumulación de Apo AI en el medio en respuesta a moléculas antiinflamatorias.
- Relacionar la expresión celular de VLDLR y acumulación de Apo AI en el medio en respuesta a hipolipemiantes.
- Comparar el modelo hepatocitario con un modelo de células monocíticas humanas y con células linfocitarias de ratón. Evaluar el efecto de los estresores inflamatorios sobre la expresión del VLDLR en estas células y su relación con las vías de señalización específica.

3. Resultados

3.1 Caracterización del modelo propuesto

Las líneas celulares provenientes de hepatocarcinomas humanos han sido ampliamente usadas como modelos *in vitro* ya que los hepatocitos, provenientes de hígado de ratas y ratones o de donantes humanos, pierden rápidamente las características de células diferenciadas en la mayoría de las condiciones de cultivo ensayadas hasta ahora (115). La línea celular HepG2 (hepatoma humano) es la más utilizada para este fin, ya que además de exhibir fenotipo de célula diferenciada, conserva la mayoría de las rutas metabólicas del hepatocito normal sobre todo en relación a los lípidos: sintetiza las enzimas del metabolismo y el transporte del colesterol (116,117) secreta apolipoproteínas (118), y expresa varios receptores de lipoproteínas (20,119-121).

3.1.1 Caracterización de la acumulación de Apo AI en el medio condicionado

Se probó la regulación de la producción de Apo AI por moléculas que modifican el metabolismo lipídico. Se cuantificó la Apo AI secretada por estas células cultivadas en presencia de las distintas moléculas por 24 horas empleando la técnica de enzimo-inmuno ensayo directo (ELISA) utilizando anticuerpos policlonales producidos en nuestro laboratorio,.

3.1.1.1 Regulación de la producción de Apo AI por ácidos grasos Ω -3

Se probó el efecto de ácidos omega 3 (Ω -3) y de ácidos Ω -3 peroxidado por exposición a radiación ultravioleta. Se conoce que estos ácidos grasos pierden la capacidad hipolipemiente/antiinflamatoria cuando son sometidos a ese tratamiento. Se determinó el grado de insaturación de DHA + EPA antes y

después de la exposición a UV midiendo los enlaces de dienos y trienos conjugados utilizando una técnica adaptada como parte de esta Tesis (122). Se observó un aumento en la acumulación de Apo AI en el medio dependiente de la dosis, que se satura con un efecto máximo a una concentración 0,25 mM de ácido docosahexaenoico. Una observación original e importante es que DHA + EPA oxidados no producen este efecto por lo tanto no es atribuible a un mayor contenido calórico o debido a un aumento en el contenido de ácidos grasos en el cultivo, sino que es dependiente de la insaturación de los mismos.

Para corroborar que DHA y EPA producen el aumento de Apo AI cuando se producen endógenamente se suministró a los cultivos Ácido linoleico (LN), un precursor metabólico de DHA y EPA (Figura 6) y se comparó con el añadido de otro lípido siempre para igualar el suministro calórico. El ácido linoleico produce un aumento de más del doble en la concentración de Apo AI pero no en la de proteínas totales del medio. Este aumento se produce a 8 horas y se mantiene por lo menos hasta las 24 horas de cultivo que fue el periodo más prolongado que se ensayó.

En HepG2 se sabe que los ácidos grasos también regulan positivamente la enzima CTP (colina fosfato citidiltransferasa), la cual es una enzima regulatoria importante en la biosíntesis de la fosfatidilcolina y que cambios en la concentración de fosfolípidos producen efectos significativos sobre la respuesta biológica, el estado metabólico y proliferativo de las células HepG2 (123), pero no se conocían sus efectos sobre la síntesis de Apo AI.

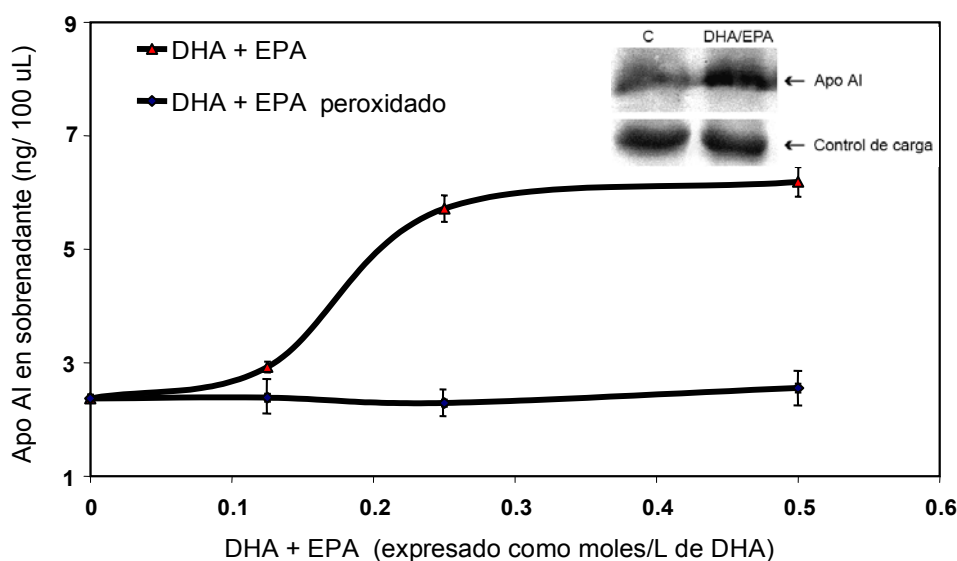


Figura 8: Concentración de Apo AI en el medio condicionado en respuesta al agregado de distintas dosis de DHA/EPA y DHA/EPA peroxidado. n=4. C= control sin el agregado de DHA/EPA. Control de carga= Albúmina medida mediante colorante Rojo Ponceau.

Se procedió a estudiar el efecto de la fosfatidilcolina (PC) exógena en la producción de Apo AI y de proteínas totales. La adición de 2 mM de PC produjo un aumento en la acumulación de Apo AI en el medio mayor que la adición de 2 mM LN pero a diferencia de este continuó creciendo hasta las 24 horas. Además, se observó un aumento en la producción de proteínas totales, sugiriendo que PC y LN actúan a través de rutas metabólicas distintas sobre la producción de Apo AI y de proteínas totales. Para probar esta posibilidad, se realizó un experimento suministrando simultáneamente PC y LN a las células. Se observó que la producción de Apo AI a las 8 horas de cultivo fue igual a la suma de lo observado para LN y PC por separado.

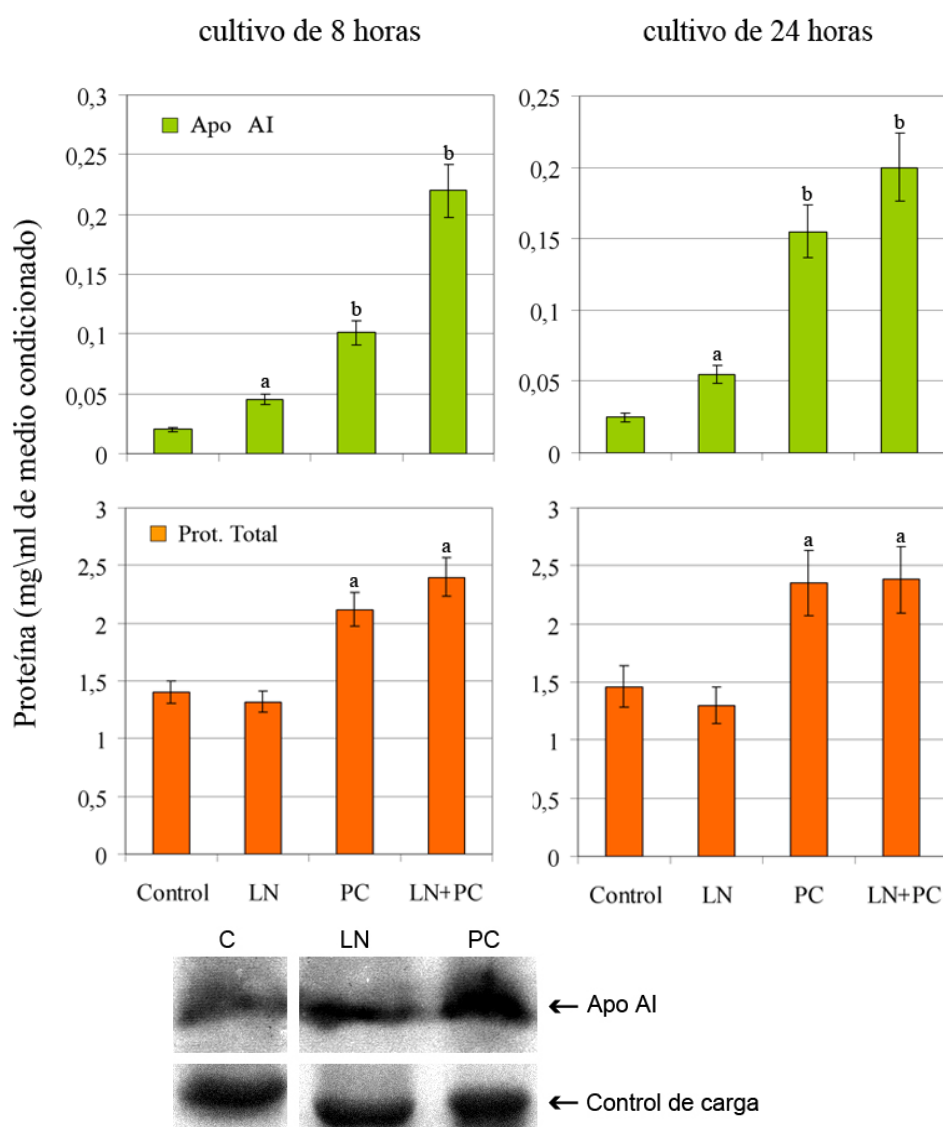


Figura 9: Acumulación en de Apo AI (barras naranjas) y proteínas totales (barras verdes) en el sobrenadante de células HepG2 co-cultivadas en presencia de LN (2 mM) y PC (2 mM) a distintos tiempos. a=p<0.01, b=p<0.1, n=3. Abajo: Western Blot de los sobrenadantes.C= Control. Control de carga= Albúmina medida mediante colorante Rojo Ponceau.

Un posible mecanismo para la acción de la PC adicionada externamente requeriría de la presencia de las proteínas transportadoras de PC que son las encargadas de realizar el transporte de fosfolípidos cuando no están asociados a lipoproteínas. Se ensayó la expresión intracelular de la proteína transportadora de PC StarD7 utilizando la técnica de Western Blot y un anticuerpo anti-StarD7. Se observó que en condiciones controles sin el agregado de PC esta proteína se expresa en estas células y que el nivel de expresión disminuye a las 24 horas (Figura 10) sugiriendo que esta proteína transportadora de fosfolípidos se expresa principalmente en células en fase exponencial (124). La PC aumenta significativamente el nivel de expresión a 8 horas y la disminución de la expresión a 24 horas, indicando que PC acelera el metabolismo en esta línea. El aumento sostenido en la acumulación de Apo AI no se relacionó con el transporte intracelular de la PC sugiriendo que el aumento de la producción de Apo AI por la PC no es mediado por el transporte de PC a través de StarD7. Probablemente el aumento de la acumulación de Apo AI se deba a que PC es necesaria para la secreción de HDL nacientes por los hepatocitos.

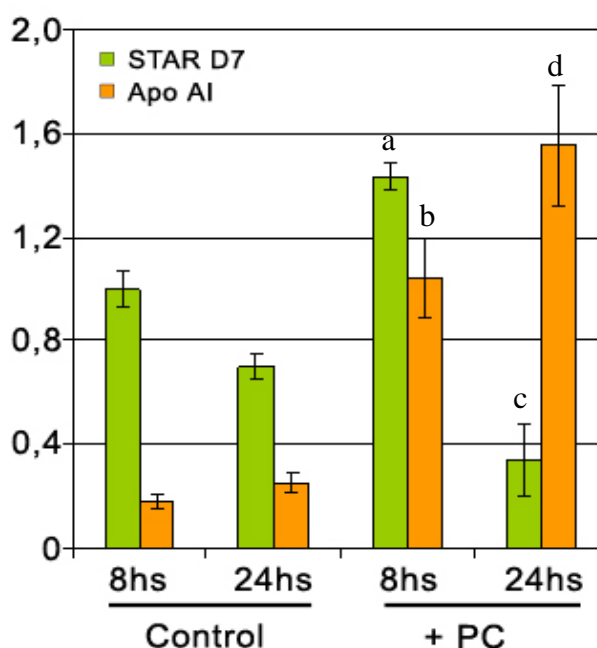


Figura 10 : Producción de Apo AI ($\mu\text{g/ml}$ de medio condicionado) y expresión de STAR D7 en células HepG2 ($\mu\text{g/mg}$ de proteína citosólica) a= $p<0,01$, b= $p<0,1$ con respecto al control de 8 horas, b= $p<0,1$. c= $p<0,01$, d= $p<0,1$ con respecto al control de 24 horas. n=4.

3.1.1.2 Regulación de la producción de Apo AI por agentes inflamatorios

La VLDL y las lipoproteínas ricas en triglicéridos (densidad $<1,009$) son características en las hiperlipemias patológicas (hiperlipemia tipo III y la postprandial en sujetos con deficiencia de hormona de crecimiento). Estas partículas son removidas de la circulación por los hepatocitos, después de concentrarse en el espacio de Disse, por un mecanismo dependiente de Apo E (125). En el periodo postprandial las TGRL son predominantes, se ha sugerido que ellas son la causa de la hiperlipemia post prandial que iniciaría una respuesta inflamatoria (126,127).

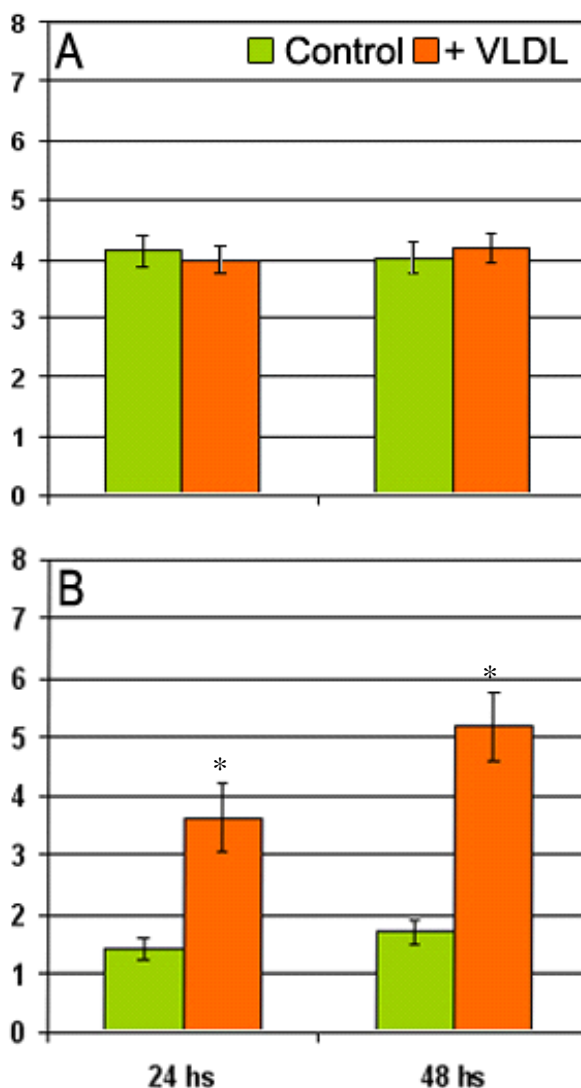


Figura 11: Acumulación en unidades arbitrarias de Apo AI (panel A) y Apo B (panel B) en el sobrenadante de células HepG2 co-cultivadas en presencia de VLDL durante 24 y 48 horas. *= $p < 0,1$, $n=3$.

Se incubaron células HepG2 con VLDL humana de dadores normolipémicos en concentración 2 $\mu\text{g/ml}$ de proteína. En figura 11 se observa que no hay modificaciones en los niveles de Apo AI con respecto al control sin VLDL a ninguno de los 2 tiempos ensayados, sin embargo se observa un aumento en la secreción de Apo B que coincide con los datos de la literatura (128).

Como se explicó en la introducción LPS es utilizado para simular sepsis bacteriana en animales *in vivo* y como modelo de inflamación *in vitro*. Cuando se cultivaron células hepatocitarias con LPS se observó que la cantidad de Apo AI en el medio disminuyó a valores indetectables con la técnica utilizada (Tabla 6). Este experimento demuestra que la disminución de Apo AI; observado por otros autores en modelos *in vivo* ya que Apo AI es una proteína de fase aguda negativa, es un efecto directo del LPS sobre el hepatocito y no mediado por señales de otras células (por ejemplo el macrófago) y constituye la primera evidencia reportada en tal sentido. Este efecto es además específico ya que no se producen cambios morfológicos en las células ni en la cantidad total de proteína liberada, aunque con LPS de *P. Aureuginosa* hay una pequeña disminución (16% significativa $p < 0,02$) en la proteína acumulada en el medio condicionado.

3.1.1.3 Regulación de la producción de Apo AI por fármacos hipolipemiantes

Se probaron dos fármacos que son hipolipemiantes pero que actúan por rutas metabólicas distintas: atorvastatina que inhibe la enzima clave de la síntesis de colesterol, y gemfibrozil, un fibrato activador de los receptores PPAR- α . Gemfibrozil aumentó más de cinco veces la acumulación de Apo AI en el medio ($P \leq 0,01$, $n=3$) como ha sido ya descrito por otros grupos (129,130). En la Tabla 6 se puede apreciar que el co-cultivo de células HepG2

con atorvastatina produjo una disminución significativa en los niveles de Apo AI, en línea con lo reportado por otros autores en modelos animales (62,63).

Tabla 6: Cuantificación de Apo AI y proteínas totales en el sobrenadante de células HepG2 co-cultivadas con distintos efectores.

Efectores	Apo AI	Proteína Total
Control	0,025 ± 0,002	1,46 ± 0,11
Fosfatidilcolina	0,155 ± 0,023*	2,35 ± 0,21*
Ácido linoléico	0,055 ± 0,004*	1,30 ± 0,05
DHA (12%) + EPA (2%)	0,120 ± 0,010*	1,85 ± 0,11*
Gemfibrozil	0,127 ± 0,013*	1,64 ± 0,10*
Atorvastatina	0,016 ± 0,003	1,55 ± 0,08
LPS de <i>E. coli</i>	nd	1,36 ± 0,10
LPS de <i>P. Aeruginosa</i>	nd	1,23 ± 0,09**
VLDL	0,027 ± 0,002	1,46 ± 0,15

En mg/100ul de medio de cultivo. nd= no detectable. Promedios de 3 experimentos. * = valores significativamente distintos de valores control (p<0,01). **= valores significativamente distintos de valores control (p<0,02)

3.1.1.4 Marcación metabólica de Apo AI

Para estudiar si la acumulación de Apo AI en el medio de cultivo estaba relacionada con la actividad biosintética de estas células se realizó un experimento de marcación isotópica utilizando un aminoácido radioactivo como precursor metabólico. Se probaron cuatro condiciones: control, un efector que producía aumento de Apo AI (gemfibrozil), otro que producía disminución de Apo AI (LPS) y uno que no producía ninguna variación (VLDL).

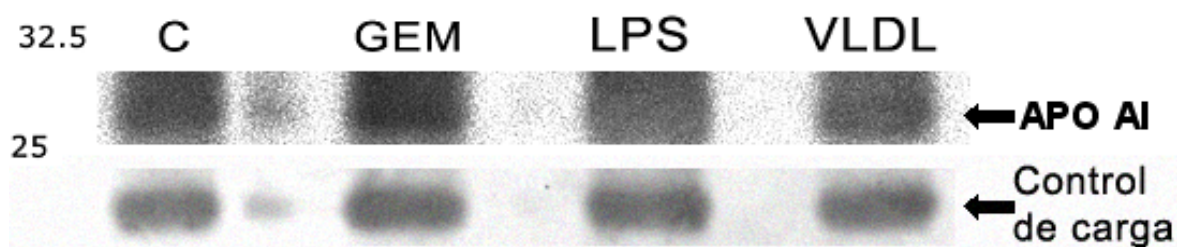


Figura 12 : Incorporación de obtenida de [³⁵S]metionina en Apo AI acumulada en el medio de cultivo. Control de carga= Albúmina. 32,5 y 25= pesos moleculares. C= Control.

Como se observa en la Figura 12 , la incorporación de [³⁵S]metionina en la Apo AI fue mayor en los cultivos tratados con gemfibrozil (aproximadamente 2,1 veces la del control, mientras que la incorporación en cultivos tratados con LPS disminuyó significativamente (0.3 veces la incorporación control, $p < 0.01$, $n=2$) indicando que la biosíntesis de Apo AI es afectada por estos tratamientos. No se evidenciaron cambios significativos en la incorporación del aa radiactivo en Apo AI en el medio condicionado de células co-cultivadas con VLDL. Estos efectores no alteraron significativamente la incorporación de [³⁵S]metionina en la proteína celular total. Indicando que gemfibrozil aumenta la velocidad de biosíntesis de Apo AI específicamente mientras que LPS disminuye la velocidad de biosíntesis.

3.1.1.5 Conclusiones

Se probaron diversos efectores de naturaleza lipídica y se observó que algunos de ellos aumentaron la producción de proteínas totales y todos aumentaron la producción de Apo AI. El efecto de DHA/EPA y de su precursor metabólico LN muy probablemente ocurra por activación de los PPAR- α (131) mientras que la PC produce un efecto metabólico más generalizado probablemente relacionado con la activación metabólica y de progresión en el ciclo celular que produce este lípido en HepG2 (132, 133).

Todos estos resultados tomados en conjunto indican que la principal ruta de regulación de Apo AI es a través de los PPAR- α , ya que DHA, LN y Gemfibrozil son ligandos de estos receptores. También indican que hay una fuerte relación con moléculas que tienen probada acción antiinflamatoria (56, 134) más que con moléculas que actúan regulando el nivel de lípidos (VLDL y atorvastatina) insinuando que al menos algunas pero no todas las rutas del metabolismo lipídico están fuertemente relacionadas con la inflamación. Los experimentos de incorporación de aa radiactivo en la Apo AI mostraron que la biosíntesis de Apo AI es afectada por algunos de estos tratamientos (gemfibrozil y LPS).

3.1.2 Caracterización morfológica de células hepatocitarias en cultivo

La morfología de las células cultivadas se analizó por microscopía y por citometría de flujo. Con estas técnicas se determinó que estas células son muy heterogéneas en cuanto al tamaño, la morfología (presencia concomitante de células redondeadas y fusiformes) y la complejidad celular (lisas y con filopodias) (Figura 13). Además se puede observar que estas células son bastantes diferenciadas, como ha sido descrito por otros autores (135, 136), pudiéndose observar la formación de estructuras similares a canalículos biliares (Figura 14) lo que confirmaría que se encuentran polarizadas. Cabe notar que fue frecuente encontrar imágenes de células en división en donde hay células multinucleadas o células que están en la fase final de la mitosis (separándose) incluso en los cultivos con alto grado de confluencia.

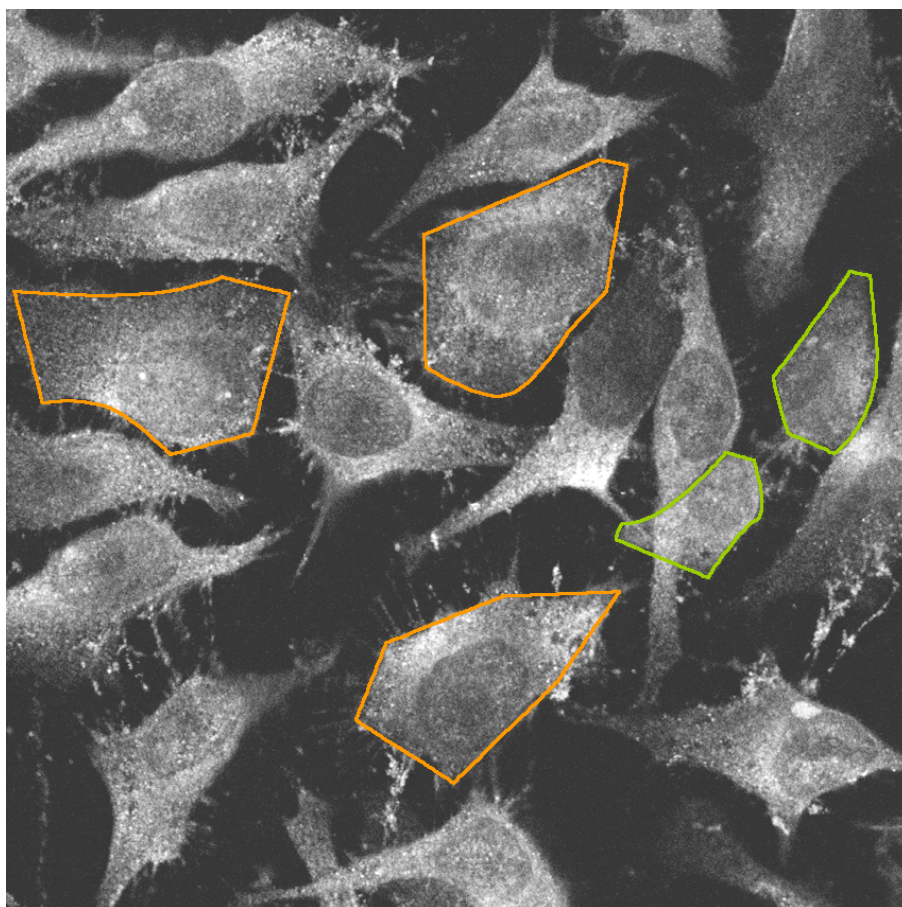


Figura 13: Microscopía confocal de células Hepg2 mostrando células de diversos tamaños (grandes, delineado naranja, pequeñas, delineado verde) y diversas morfologías (fusiformes y trapezoidales).

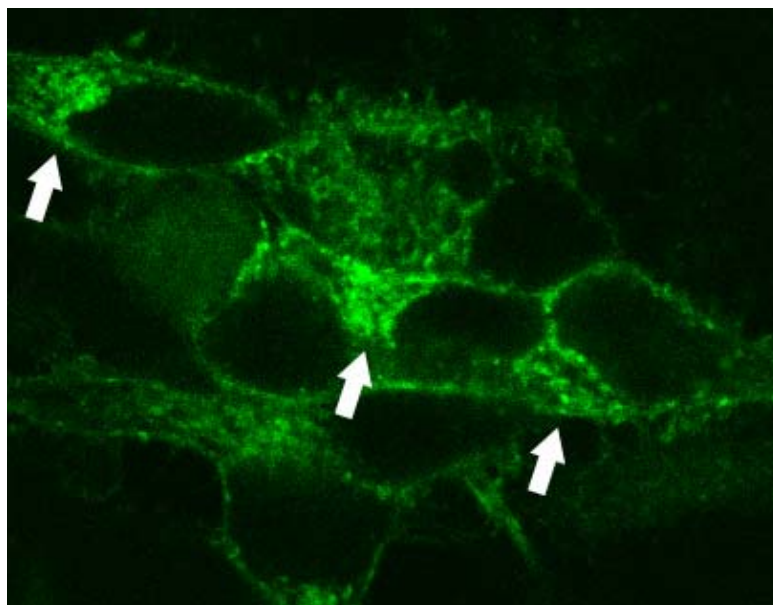


Figura 14 :Microscopía confocal de células Hepg2 estructuras similares a canalículos biliares entre 2 o mas células.

Utilizando ensayos de citometría de flujo se corroboró la heterogeneidad morfológica de estas células (Figura 15). En un grafico donde los ejes representan el tamaño celular (eje X) y la complejidad celular (eje Y) se distinguen 2 poblaciones difusas (Figura 15).

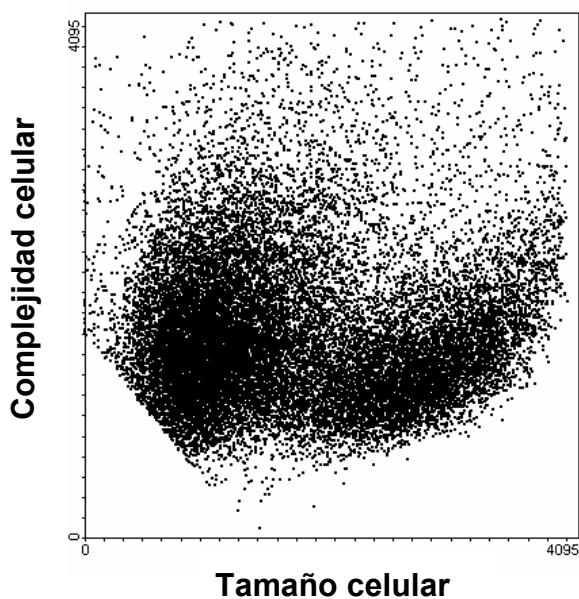


Figura 15 : Citometría de flujo de células HepG2 cultivadas al 70-80% de confluencia. A. En el gráfico (tamaño vs. complejidad celular) se evidencian 2 poblaciones celulares diferenciables por tamaño celular

Otro parámetro que diferencia a las células es la autofluorescencia que esta relacionada con los cambios metabólicos producidos por un estresor. En la Figura 16 se muestra como cambian las poblaciones definidas por 3 parámetros (tamaño, complejidad y autofluorescencia) en función de cambios producidos en el medioambiente celular, en este caso ausencia de suero fetal bovino a distintos tiempos de cultivo. La población en color verde corresponde a las células apoptóticas (tamaño promedio y complejidad celular promedio menor al de una célula Hepg2 quiescente), la población azul corresponde a células quiescentes y la población en color negro a células que han progresado en el ciclo celular, cuyo tamaño es en promedio el doble que el promedio de tamaño de las células quiescentes. Es interesante notar como a medida que aumenta el tiempo de incubación, la población que ha progresado en el ciclo celular va disminuyendo mientras aumenta la población apoptótica.

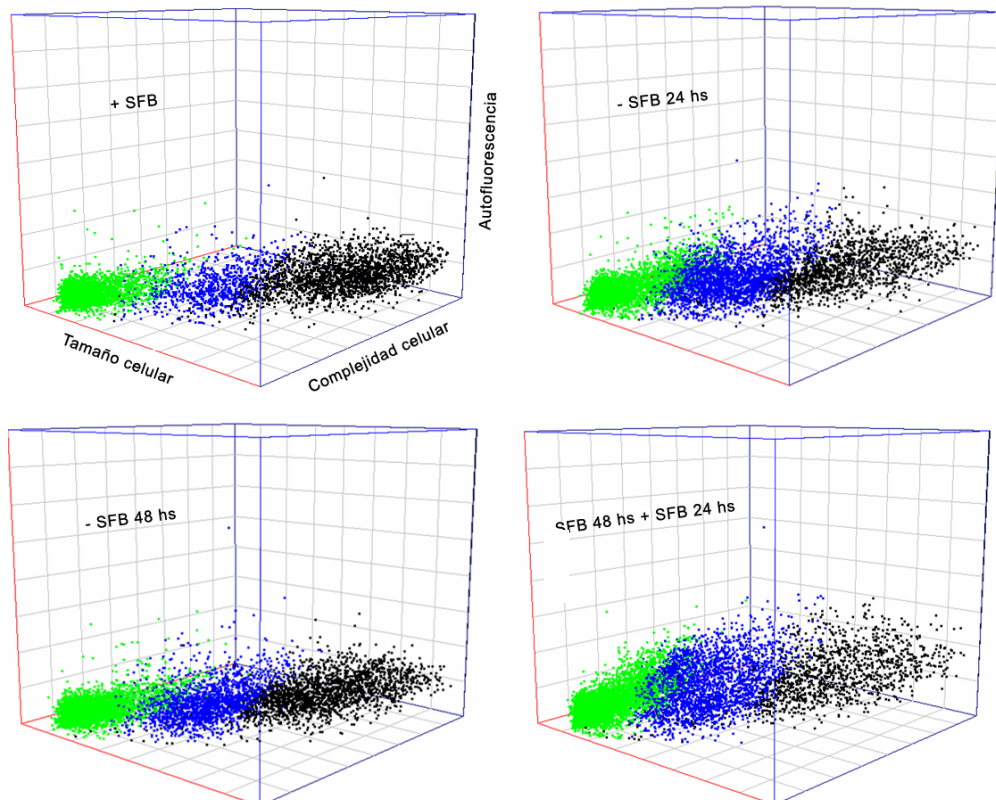


Figura 16: Gráficos de 3 ejes mostrando la distribución según tamaño, complejidad y autofluorescencia de las subpoblaciones de células HepG2 en presencia o ausencia de SFB.

Para tratar de determinar los parámetros de tamaño y complejidad que caracterizan a estas células a lo largo de la progresión del ciclo celular, se realizaron experimentos con un colorante (ioduro de propidio) que fluoresce cuando se incorpora a la doble cadena de ADN. Luego estos resultados fueron analizados con el software libre Cylchred, el cual es utilizado para la identificación y corrección de los picos correspondientes a los distintos estadios del ciclo celular. La técnica del ioduro de propidio demostró que estas poblaciones se encuentran en distintas fases del ciclo celular (Figura 17). La población de tamaño menor está compuesta mayoritariamente por células en la fase G0 (aproximadamente 80% de células quiescentes), mientras que en la de mayor tamaño se encuentran principalmente en fase G2/M (aproximadamente 95% de células mitóticas).

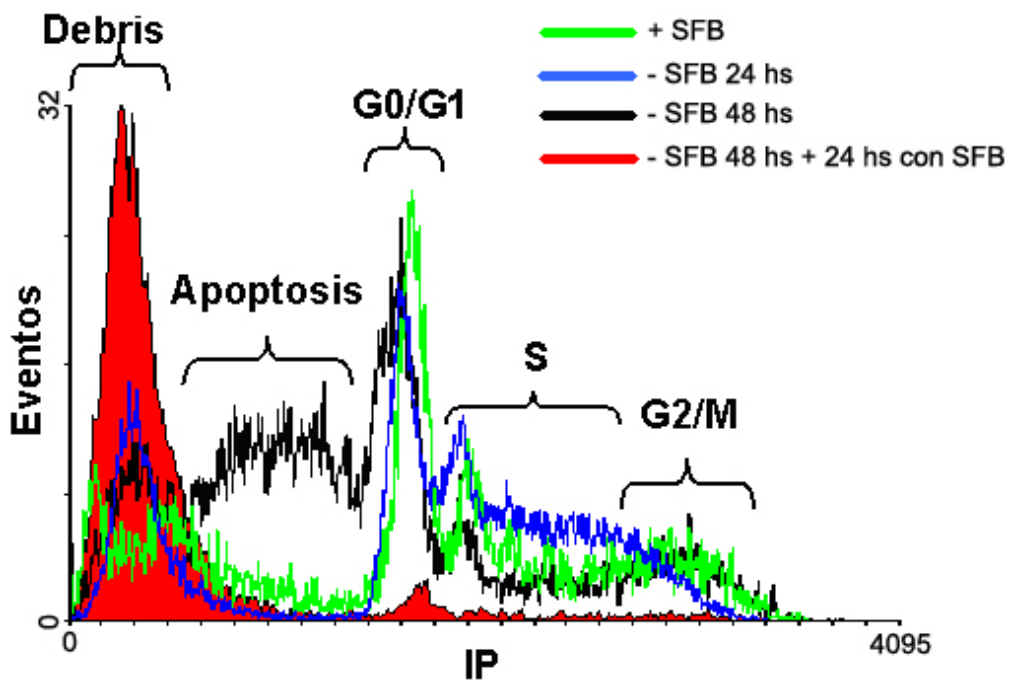


Figura 17 : Histograma de células HepG2 marcadas con IP, mostrando la distribución de las células de acuerdo con las fases del ciclo celular luego de ser incubadas con y sin SFB.

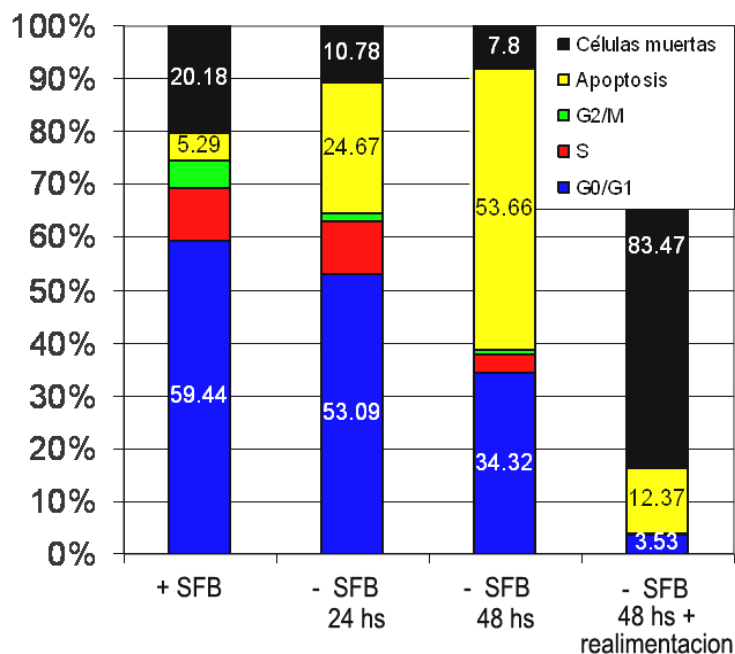


Figura 18 : Gráfico de barras con los porcentajes de células HepG2 en cada estadio del ciclo celular luego del co-cultivo con y sin SFB.

3.1.3 Caracterización de las variaciones morfológicas y en el ciclo celular de células HepG2 por los distintos tratamientos.

A continuación se describen los cambios morfológicos y en el ciclo celular producidos por el co-cultivo en distintas condiciones. Se muestra solo los experimentos mas relevantes para demostrar nuestra hipótesis de trabajo y en los cuales se observaron cambios significativos en algunos de estos parámetros y que no han sido descriptos en la literatura.

3.1.3.1 Monosialo gangliósido (GM1)

Datos bibliográficos señalan que el co-cultivo de células con glicoesfingolípidos favorece la polarización (137). Las células polarizadas se encuentran en la fase G0/G1, con este razonamiento y con la intención de tener cultivos con una población más homogénea se realizaron experimentos de células HepG2 co-cultivadas con gangliosido GM1. En la Figura 19 se puede observar que GM1 indujo la sincronización del ciclo celular (ausencia de población en G0) pero no logró retener a las células en la fase G0.

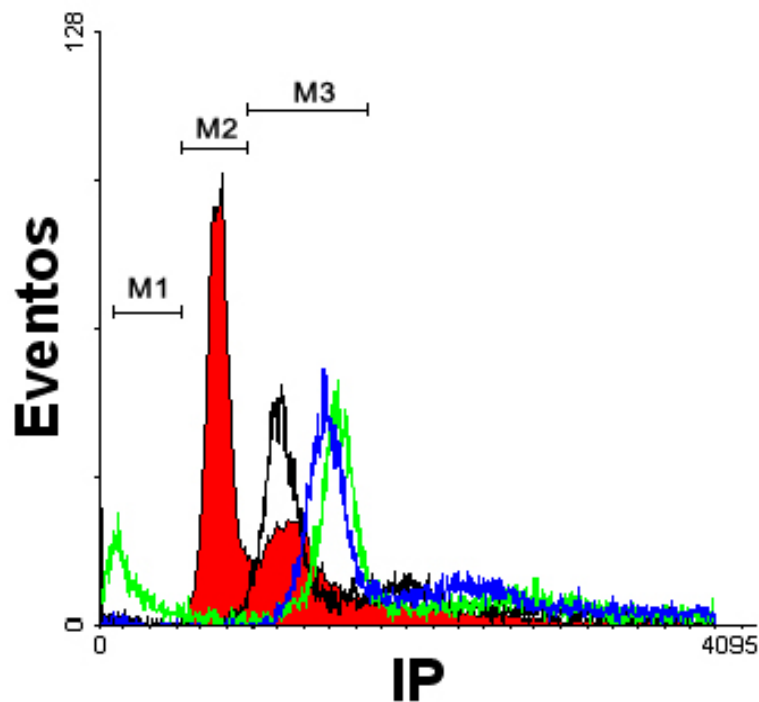


Figura 19: Histograma de células HepG2 marcadas con IP, mostrando la distribución de las células de acuerdo con las fases del ciclo celular. El marcador M1 incluye a las células apoptóticas, el marcador M2 incluye las células en fase G0/G1 y el M3 las células en fase G2/M+S. El eje Y indica el número de eventos y el eje X la fluorescencia correspondiente a la unión de IP al ADN. Curva roja: Cultivo control (10% SFB), curva negra: células co-cultivadas con GM1 durante 15 horas, curva azul: células co-cultivadas con GM1 durante 20 horas, curva verde: células co-cultivadas con GM1 durante 24 horas.

3.1.3.2 Suero fetal bovino

En otro intento de aumentar la proporción de células HepG2 en fase G0 se utilizó la adición de una única dosis de 50% de SFB, el cual es utilizado en otras líneas celulares para lograr este propósito. Como se observa en la Figura 20, la concentración de SFB en el medio de cultivo no afecta el ciclo celular de las HepG2 ni a 5 o 24 horas de cultivo.

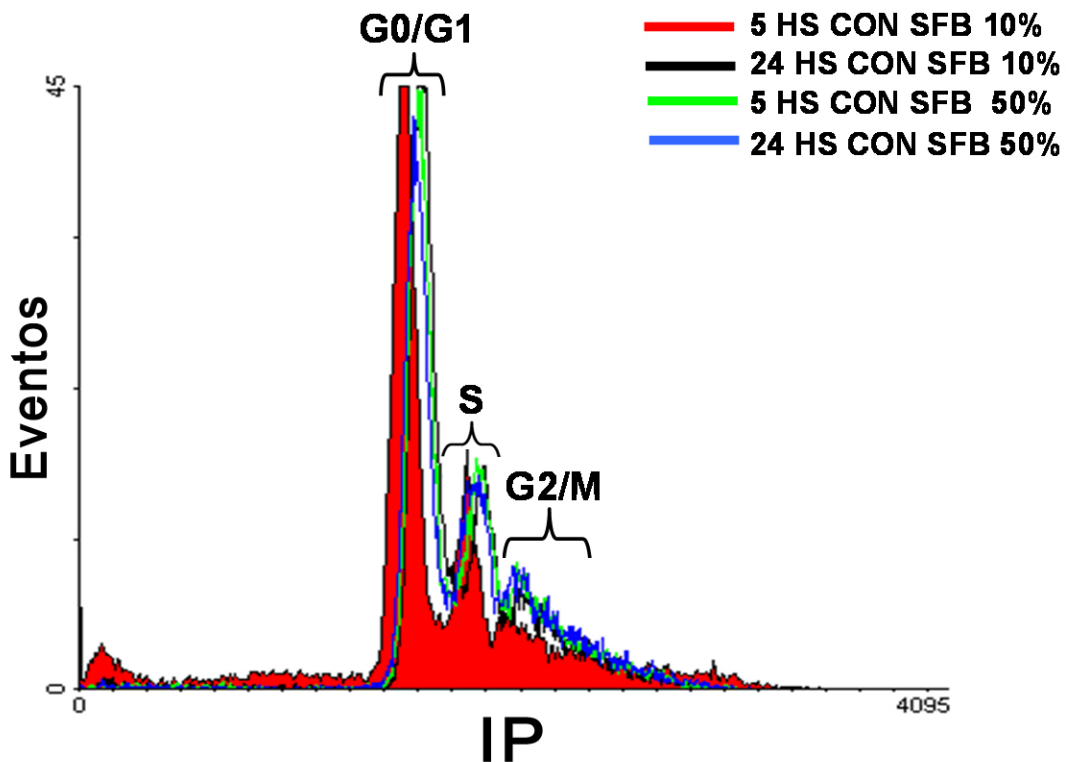


Figura 20: Histograma de células HepG2 marcadas con IP, mostrando la distribución de las células de acuerdo con las fases del ciclo celular luego de ser cultivadas con 10 o 50% de SFB durante 5 o 24 horas.

3.1.3.3 Hipolipemiantes sintéticos

Uno de los fármacos hipolipemiantes probados por nosotros, gemfibrozil, debido a que su ruta de acción es conocida (actúa como ligando de los PPAR- α) produjo cambios significativos tanto en la morfología como en la progresión en el ciclo celular que aumentaron con la dosis. Atorvastatina, otro fármaco hipolipemiante que actúa inhibiendo la enzima HMG-CoA (enzima clave en la síntesis del colesterol), produjo también cambios notorios con las 2 dosis probadas (2.5 y 5 μ M) (Figura 21). Como resultado interesante, el cambio con respecto al control fue principalmente un aumento en la complejidad celular, lo cual es fácilmente evidenciable mediante microscopía (Figura 22). Estos datos son los primeros en la literatura sobre células HepG2 que muestran cambios morfológicos producidos por fármacos hipolipemiantes.

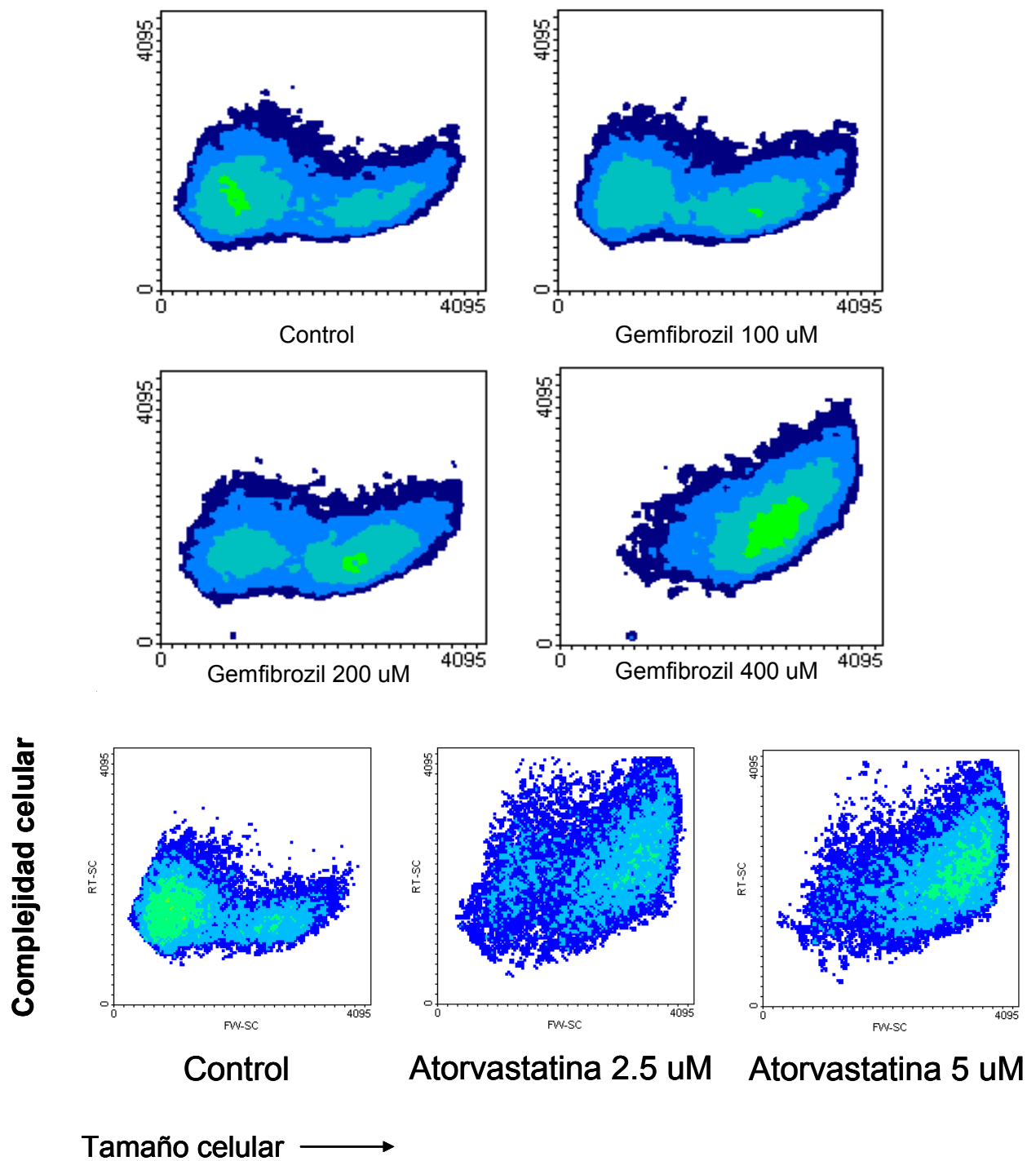


Figura 21: Gráficos de densidad de poblaciones de células HepG2 obtenidas mediante citometría de flujo co-cultivadas con Gemfibrozil 100, 200 y 200 μM y Atorvastatina 2.5 y 5 μM .

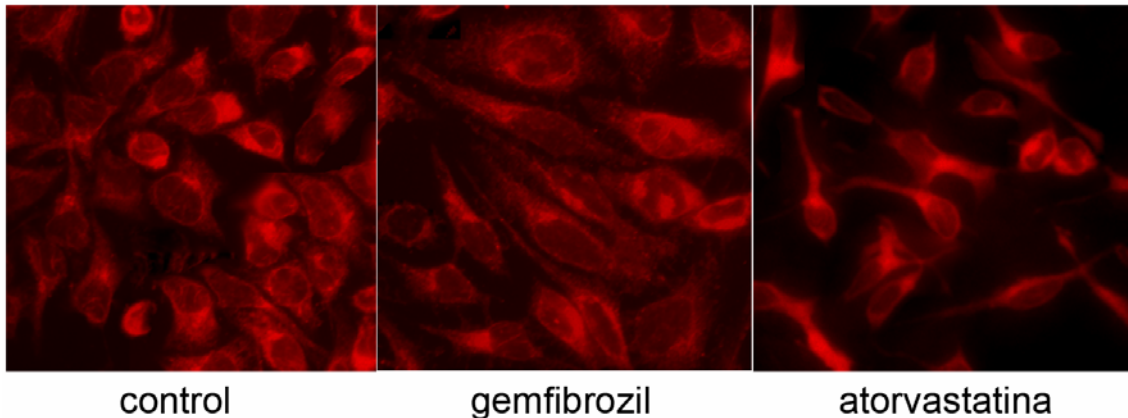


Figura 22: microscopia de fluorescencia de células HepG2 co-cultivadas con gemfibrozil y atorvastatina. La membrana de las células fue teñida de forma directa adicionando Dil en el medio de cultivo.

3.1.4 Determinación de dominios de membrana denominados “balsas lipídicas”

Una característica importante en la funcionalidad de los receptores de membrana, sobre todo en aquellos que pertenecen a la familia del LDLR es su ubicación en dominios de membrana. Uno de los dominios de membrana importantes son los denominados “balsas lipídicas” (RAFTS en ingles). Estos sirven de plataforma integradora de señales al reunir distintos receptores y enzimas en un medioambiente que permanece relativamente estable con una velocidad de difusión lateral muy inferior a la de un fosfolípido de membrana (138). La toxina colérica (TOC) es un marcador de estos dominios, debido a que se une a uno de los componentes distintivos de los mismos (139). La primera observación que se realizó es que sólo algunas células HepG2 eran teñidas con TC-FITC, y que la tinción se halla concentrada en algunas zonas de la membrana plasmática que no corresponde a las microvellosidades y parece concentrarse en estructuras compatibles con **canalículos biliares** (figura 14). Estos datos están de acuerdo con el hecho de que GM1 se expresa preponderantemente en células quiescentes (140,141). Como se observa en la Figura 23, una subpoblación minoritaria de células HepG2 son teñidas con TC-FITC, indicando la presencia de balsas lipídicas en su superficie. Esta imagen es la primera en mostrar la presencia de microdominios de membrana en

HepG2 aunque recientemente se han descrito dominios similares a estos en hepatocitos primarios murinos (140, 141)

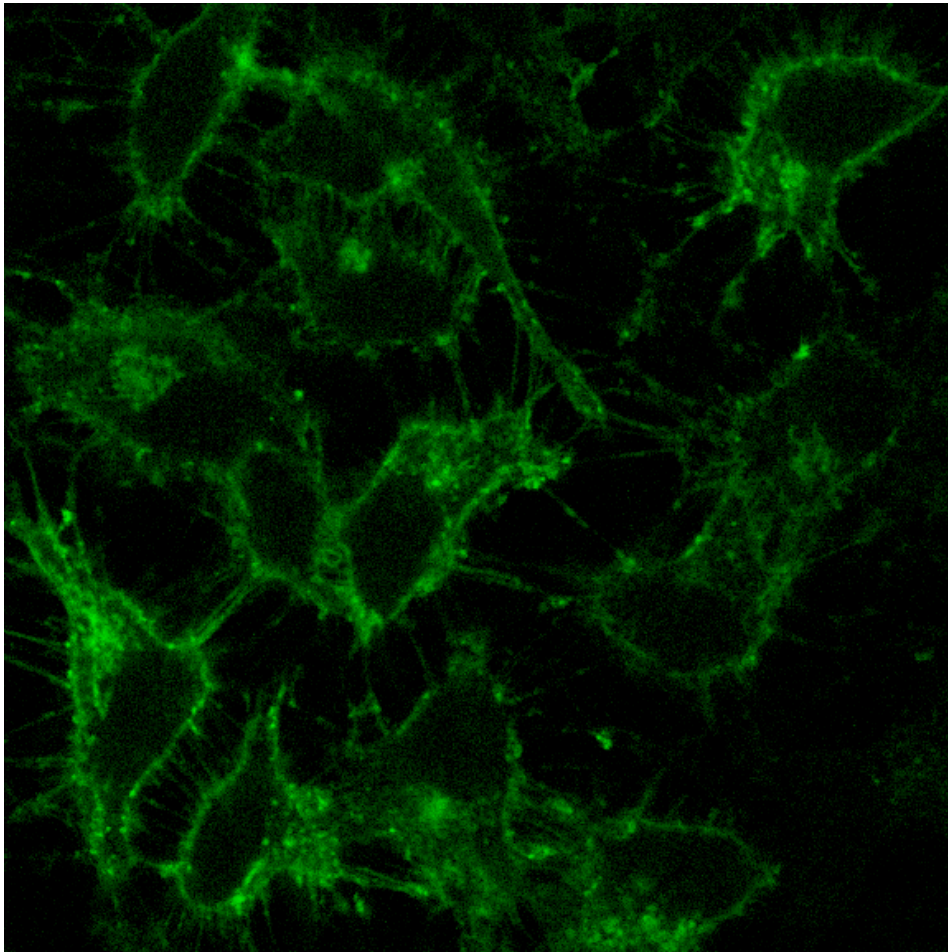


Figura 23: Microscopia confocal de células HepG2 teñidas con TC-FITC. Se muestra un campo con mayor proporción de células positivas que el promedio.

3.1.5 Conclusiones

Se demostró que en cultivos de células HepG2 existen subpoblaciones celulares diferenciables ya que poseen características distintivas de tamaño, complejidad celular y autofluorescencia, además de la expresión de dominios de membrana denominados “balsas lipídicas” y que estas subpoblaciones responden a distintas alteraciones en el metabolismo lipídico producidas por cambios en el medioambiente del cultivo. Las alteraciones morfológicas y en el ciclo celular que acompañan a esta respuesta fueron documentadas eficientemente mediante las técnicas aquí empleadas (microscopía de

fluorescencia, citometría de flujo, ELISA). También se demostró que son un modelo de hepatocito humano que se comporta en forma similar a lo descrito para el hígado humano en condiciones de hiperlipemia o de inflamación.

3.2 Caracterización y cuantificación de la expresión del VLDLR

La presencia del VLDLR en células hepatocitarias ha sido establecida mediante distintos métodos: determinación de mRNA de VLDLR, DNA chip, Western Blot (19, 23, 29); pero hasta la fecha no se ha reportado la detección de la proteína de este receptor en la superficie celular. En la presente Tesis se evaluó la expresión de VLDLR en cultivos de HepG2, THP1 y linfocitos murinos.

Se contó con dos herramientas fundamentales que permitieron la detección de este receptor:

- a) VLDL marcada fluorescentemente con una técnica que no alteró sus propiedades nativas (estado de oxidación, asociaciones macromoleculares de las distintas apolipoproteínas; ver Materiales y Métodos pag. 83).
- b) Un anticuerpo específico contra la proteína VLDLR que pudo ser reconocido por reacción de un anticuerpo secundario marcado convenientemente.

Estas herramientas, sobre todo la primera, es indispensable a la hora de caracterizar VLDLR ya que la mayoría de las técnicas de marcación producen alteraciones en la composición de las lipoproteínas que las transforman en ligandos preferenciales de receptores no específicos, sobre todo de los barredores (SRA, SRBI y LRP). La VLDL no modificada marcada fluorescentemente permite distinguir al receptor funcional ya que es necesario que el sitio de unión este intacto para que VLDLR reconozca a VLDL con preferencia respecto de todos los otros ligandos. El anticuerpo permite asegurar que se detecta la proteína independientemente de si esta funcionalmente disponible para unir VLDL. Además los cambios en la afinidad que pudieran alterar la unión de VLDL no afectan la unión del anticuerpo. El tener las sondas (anticuerpo o VLDL) marcadas fluorescentemente posibilitan la localización de la unión a nivel celular (citometría de flujo) y subcelular (microscopía confocal), lo que no es posible lograr con las sondas radiactivas.

3.2.1 Unión de VLDL marcada fluorescentemente

En hepatocitos, VLDL se une a distintos receptores de membrana pero solamente lo hace con alta afinidad a su receptor específico (VLDLR), a través de las distintas isoformas de apolipoproteína E (43).

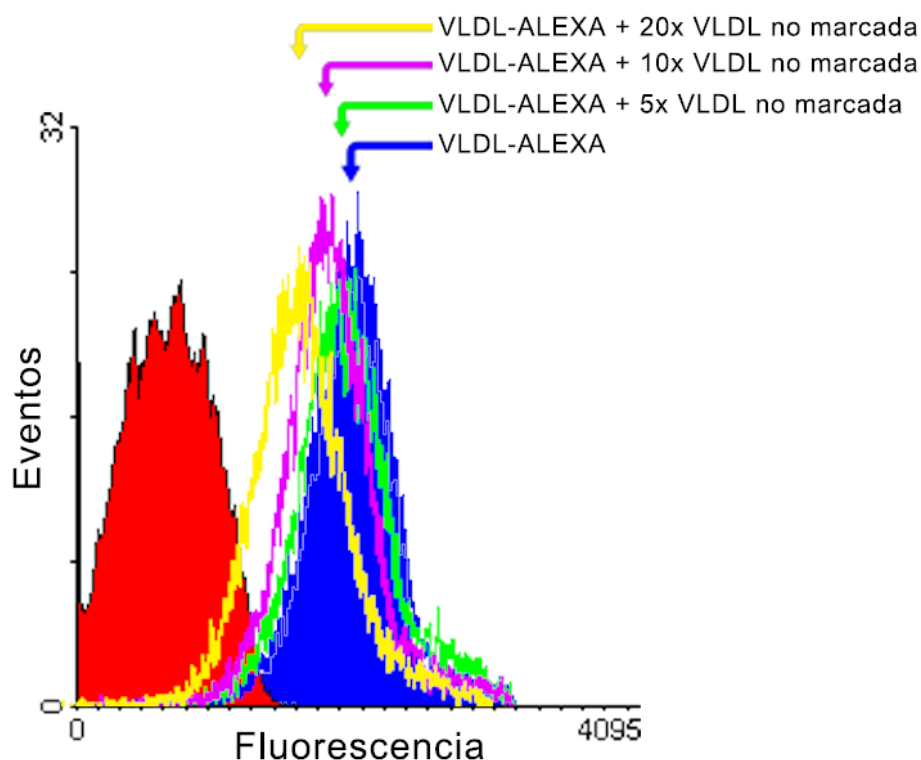


Figura 24: Histograma de fluorescencia de células HepG2 incubadas *in vitro* con VLDL-Alexa o VLDL-Alexa más VLDL sin marca. Nótese como al incrementarse la concentración de VLDL sin marca la intensidad de fluorescencia se desplaza hacia la curva control negativo sin fluorescencia (curva roja).

En la Figura 24 se muestra el histograma de distribución de intensidad de fluorescencia (VLDL unida) en función del número de células. Se observó que el agregado de VLDL no marcada en cantidades crecientes produjo un desplazamiento de la curva hacia valores de menor intensidad de fluorescencia. Esto indica que la unión es desplazable por VLDL (Figura 25). Cuando se calcula la concentración de VLDL no marcada que produjo un 50 % de desplazamiento, una vez descontada el inespecífico se pudo determinar que el Kd_{50} ; que es una medida aproximada de la afinidad, fue de 0.17 nM.

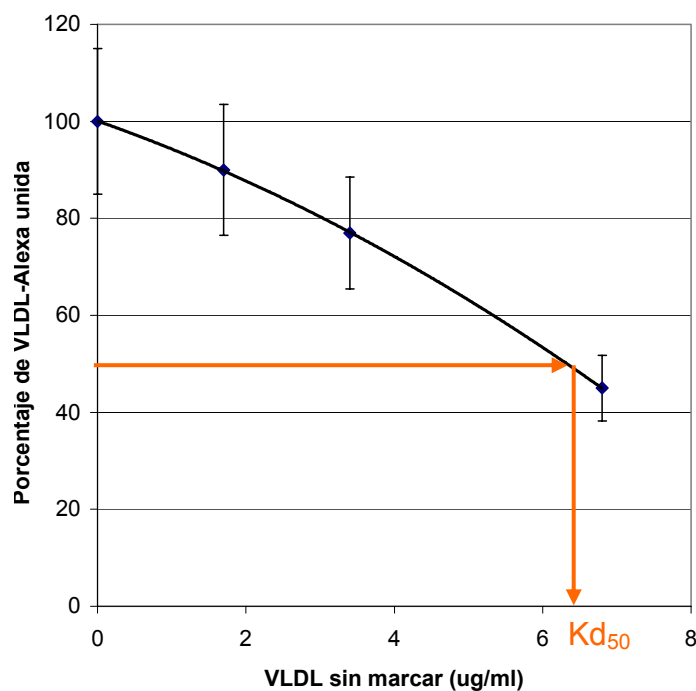


Figura 25: Experimentos de inhibición de la unión de VLDL-Alexa con VLDL sin marcar.

También se ensayó la unión de Proteína asociada al receptor (RAP), la cual fue producida de forma recombinante y purificada en nuestro laboratorio. Esta proteína chaperona se une con alta afinidad a distintos miembros de la familia de receptores de lipoproteínas (VLDLR y LRP, en nuestro caso). La unión de VLDL-Alexa a este receptor de superficie fue desplazada también por RAP (Figura 26), indicando no sólo que el mismo está en la membrana celular sino que además es funcional para unir los ligandos endógenos naturales. Como era esperable la cantidad de VLDL marcada unida en presencia de RAP fue menor que en presencia de anticuerpo anti-VLDLR. También se observó inhibición de la unión de VLDL-Alexa luego de incubar las células con heparina, la cual desplaza la unión inespecífica de LPL y VLDL a heparan sulfato proteoglicano. Como control positivo, se realizaron experimentos de citometría de flujo y de microscopia confocal utilizando un anticuerpo anti-LRP (Figura 27), otro receptor de la familia del receptor de LDL que une RAP y que se expresa en células HepG2.

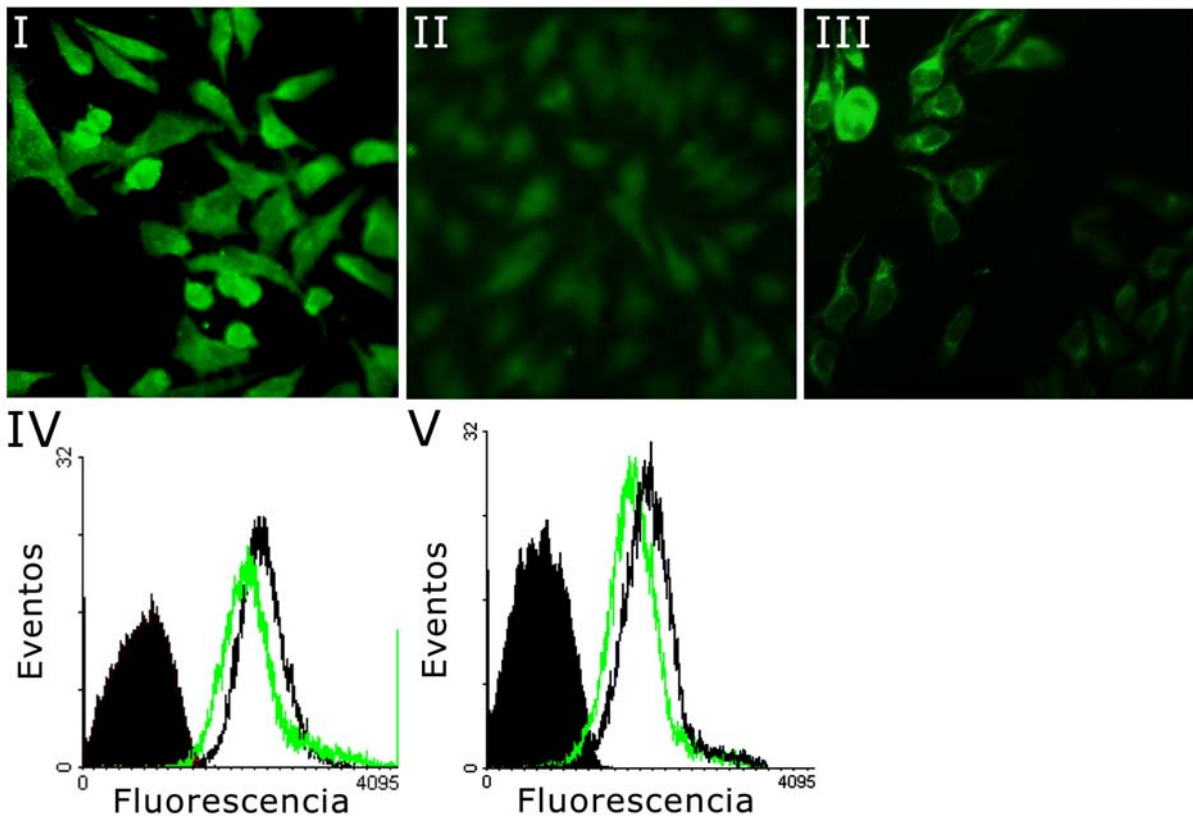


Figura 26: Microscopía de fluorescencia y citometría de flujo de células HepG2 teñidas con VLDL-Alexa. I) Control. II) +RAP. III) + heparina. IV) Curva negra llena: células control; curva negra abierta: células incubadas VLDL-Alexa; curva verde: células incubadas con VLDL-Alexa + Ab anti-LRP. V) Curvas negras: ídem panel IV; curva verde: células incubadas con VLDL-Alexa + Ab anti-VLDLR

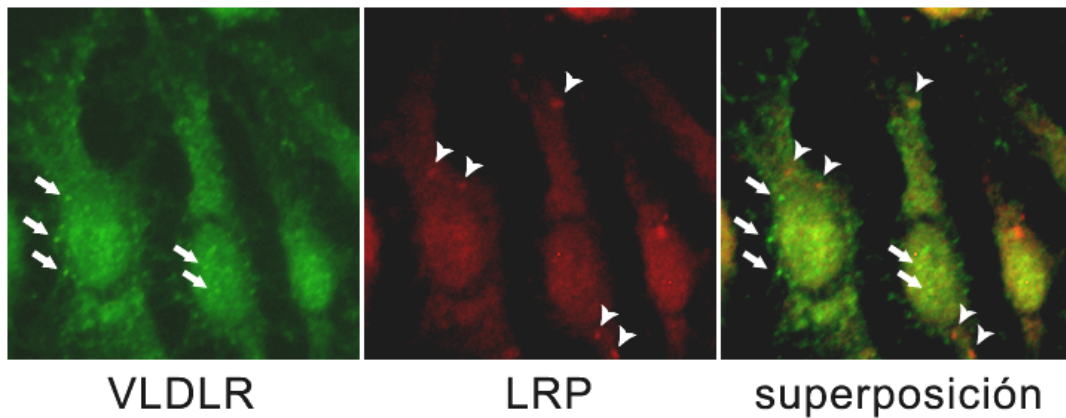


Figura 27: Microscopía de fluorescencia de células HepG2 marcadas con anticuerpos anti-VLDLR y anti-LRP.

3.2.2 Caracterización de la regulación de la expresión de VLDLR por moléculas involucradas en el metabolismo lipídico y la respuesta inflamatoria

Debido a que la utilización y metabolismo de los ácidos grasos cambia con el ciclo celular y afecta la expresión de receptores de lipoproteína (132, 133,142), decidimos analizar la expresión de VLDLR en las células según el estadio del ciclo celular. Los experimentos de inhibición de la unión de VLDL-Alexa por anticuerpo anti-VLDLR demostraron la existencia de al menos tres poblaciones diferenciables según su nivel de expresión de VLDLR (VLDLR+ ó VLDLR-) y su progreso en el ciclo celular: a) una población de células pequeñas, dentro de la cual aproximadamente un 85% de las células se encontraba en fase G0/G1 del ciclo celular, en las cuales existe una mayor proporción de células VLDLR+; b) una pequeña subpoblación (~10%) de células en fase G2/M que son también VLDLR+ y c) una subpoblación heterogénea y mayoritaria que no expresa VLDLR (VLDLR-, Figura 28)

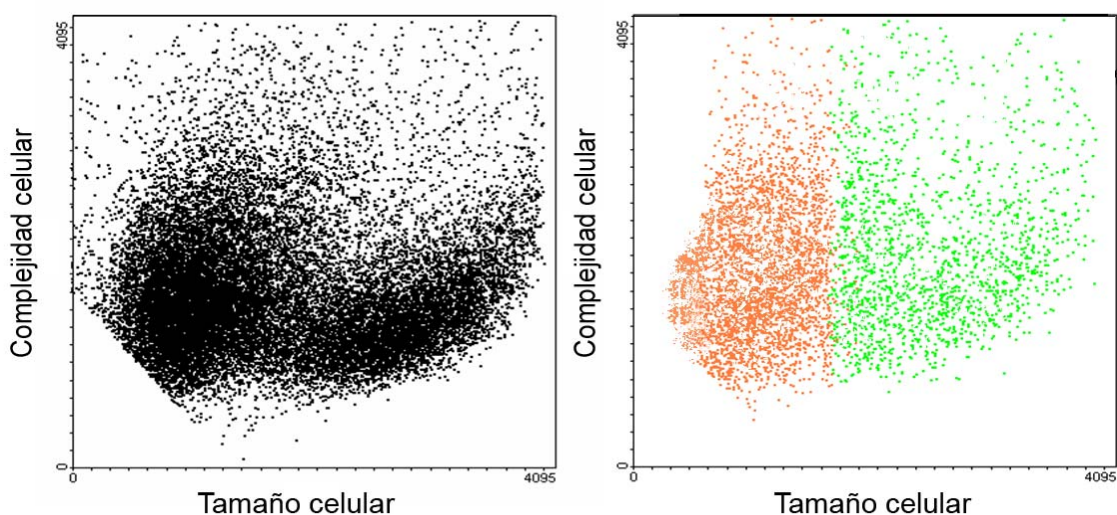


Figura 28: Gráfico de complejidad celular vs. Tamaño celular mostrando células VLDLR- en el gráfico de la izquierda y las 2 poblaciones VLDLR+ a la derecha (células en G0, color naranja, células en G2/M, color verde)

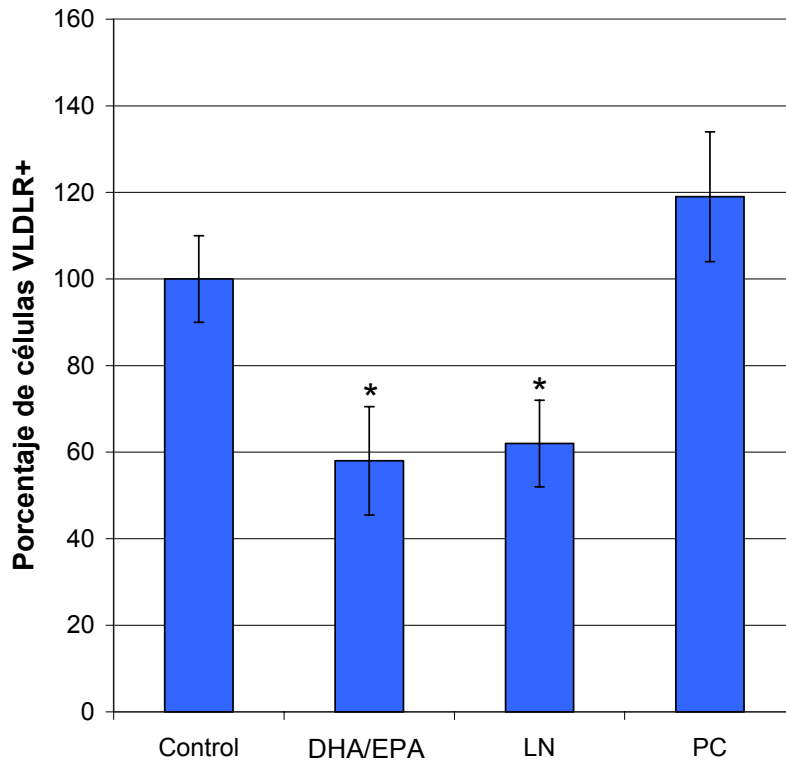


Figura 29 : Efecto de lípidos exógenos sobre las poblaciones que expresan VLDLR. *P < 0,01; n=4.

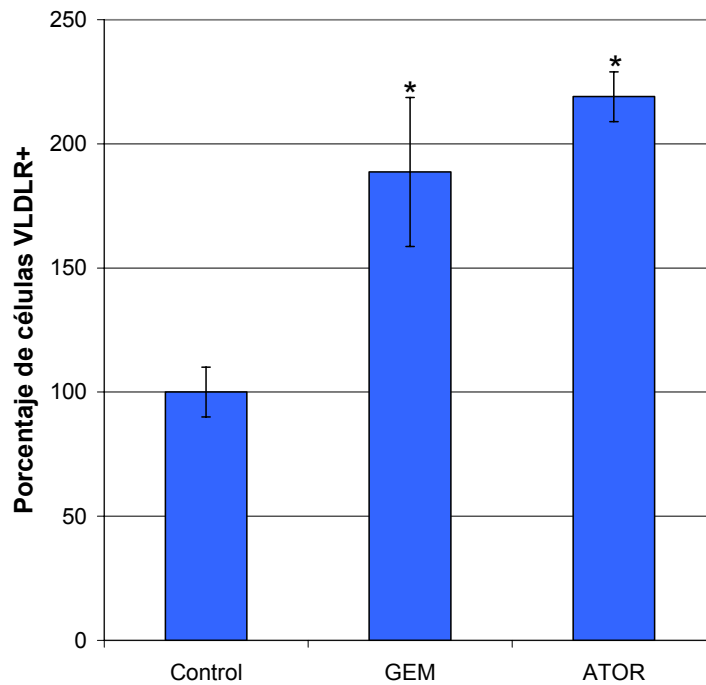


Figura 30: Efecto de agentes hipolipemiantes sobre las poblaciones que expresan VLDLR. *P < 0,01; n=3.

Luego de haber comprobado que la adición de lípidos exógenos aumenta la acumulación de Apo AI en células HepG2, se procedió a determinar si estos lípidos ejercían algún efecto sobre la regulación del VLDLR. Para ello se co-cultivo con 2 mM de DHA/EPA, LN y PC durante 24 horas y se examinó la expresión de VLDLR mediante citometría de flujo. Se determinó que las subpoblación de células VLDLR+ no se modifican significativamente por co-cultivo con PC pero que disminuye significativamente (alrededor de un 40%) en presencia de LN y de DHA/EPA (Figura 29). Por el contrario, atorvastatina y gemfibrozil, fármacos hipolipemiantes, aumentan las subpoblaciones celulares VLDLR+ (Figura 30) aunque el aumento fue más evidente en la población G0.

También se ensayaron moléculas proinflamatorias como el LPS de distintos microorganismos. Mediante experimentos de marcación directa con anticuerpo anti-VLDLR acoplado a un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente se observó que estas moléculas proinflamatorias regulan negativamente la expresión de receptor de VLDL en la población total de células HepG2, con una disminución más notable (alrededor del 40%) en el caso del LPS proveniente de *E. coli*. El co-cultivo con VLDL humana también produjo una importante disminución en las poblaciones VLDLR+ (Figura 30) tanto a 24 como a 48 horas (Figura 31).

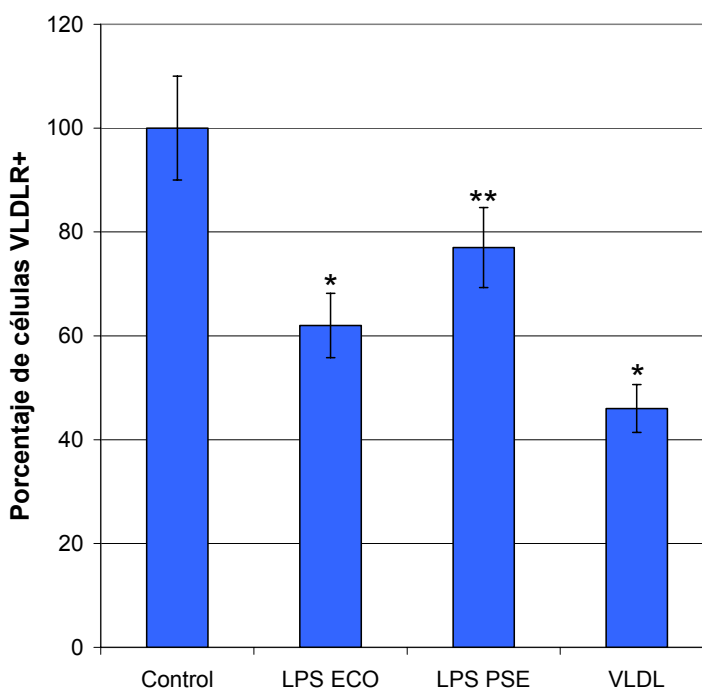


Figura 30 : Efecto de distintos LPS y de VLDL co-cultivados 24 horas sobre las poblaciones que expresan VLDLR. * $P < 0,01$, ** $P < 0,020$. LPS ECO= LPS proveniente de *E. coli*. LPS PSE= LPS proveniente de *P. Aeruginosa*.

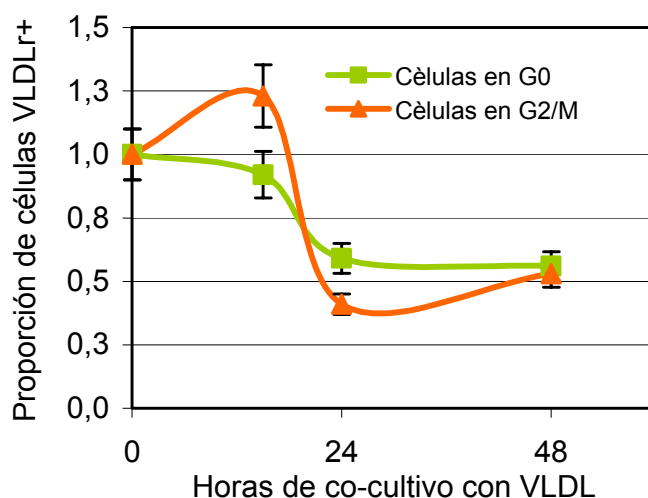


Figura 31: Proporción de células VLDLR+ a distintos tiempos de cultivo con VLDL.n=3.

3.2.2.1 No co-localización de VLDLR y balsas lipídicas en la superficie celular de los hepatocitos

Dado que solo una subpoblación minoritaria de las células HepG2 expresaron VLDLR en su superficie y que además solo una subpoblación de esta línea celular es positiva para balsas lipídicas, se evaluó si ésta se correspondía con la población VLDLR+.

Los estudios de doble marcado y microscopia confocal mostraron que la subpoblación positiva para balsas lipídicas no desarrolló tinción de VLDLR+ (Figura 32). Esta situación no cambió cuando las células fueron co-cultivadas con gemfibrozil, LPS o VLDL mientras que, llamativamente, en las células positivas para ambas tinciones no se observó colocalización significativa. También se pudo observar que hubo aumento de tinción para VLDLR en las células tratadas con gemfibrozil.

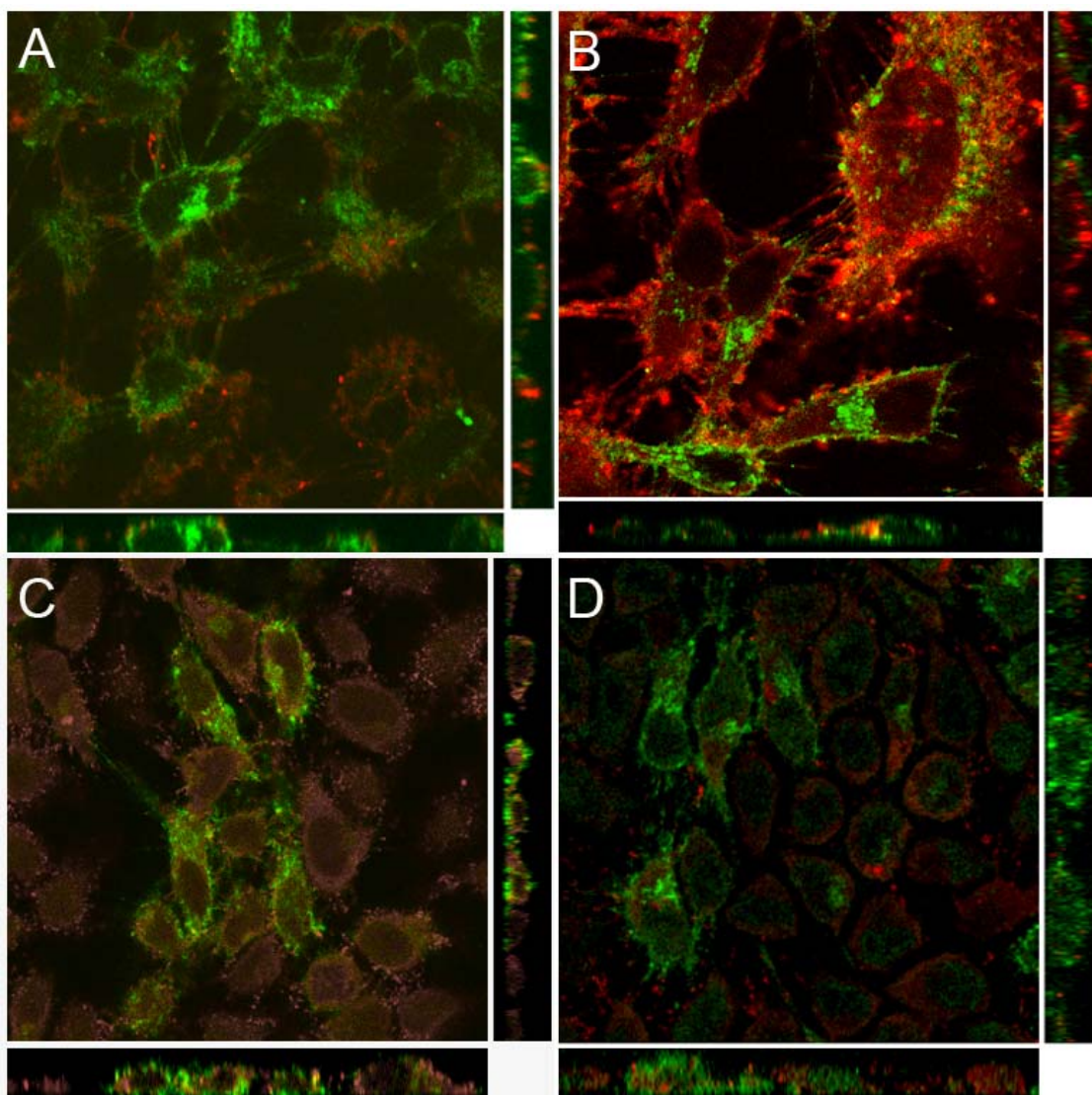


Figura 32: Microscopias confocales de células HepG2 marcadas con TC-FITC (verde) y anticuerpo anti-VLDLR (rojo). A: control; B: + gemfibrozil; C:+LPS; D:+ VLDL.

3.2.3 Regulación del VLDLR en monocitos por gemfibrozil, LPS y VLDL.

Se procedió a investigar si estos estresores inflamatorios, los cuales regulan la expresión de VLDLR en células hepatocitarias, también producían efectos sobre el VLDLR en otras células involucradas en el proceso inflamatorio. Para ello se utilizó la línea celular monocítica humana THP-1, ampliamente utilizada como modelo de células mononucleares y que además expresa en su superficie el receptor de VLDL. En línea con lo observado para HepG2, el co-cultivo de estas células con gemfibrozil produjo un aumento de más del 100% en la población VLDLR+ mientras que el co-cultivo con dosis consideradas hiperlipemiantes de VLDL produjo una disminución muy

significativa (de más del 90%) de la población VLDLR+ (Figura 33). Como puede observarse en la Figura 34, dosis altas de gemfibrozil también produjeron en esta línea celular cambios importantes en la morfología y distribución de las subpoblaciones de THP-1, observándose aumento de la complejidad celular en una subpoblación celular (flecha verde) y disminución de la cantidad de células en la otra (flecha roja). En esta línea celular derivada de células clave en la regulación humoral de la inflamación, el co-cultivo con LPS de distinta fuente produjo una fuerte disminución de la subpoblación VLDLR+, siendo más importante en las células enfrentadas a LPS de *P. Aeruginosa* (Figura 33).

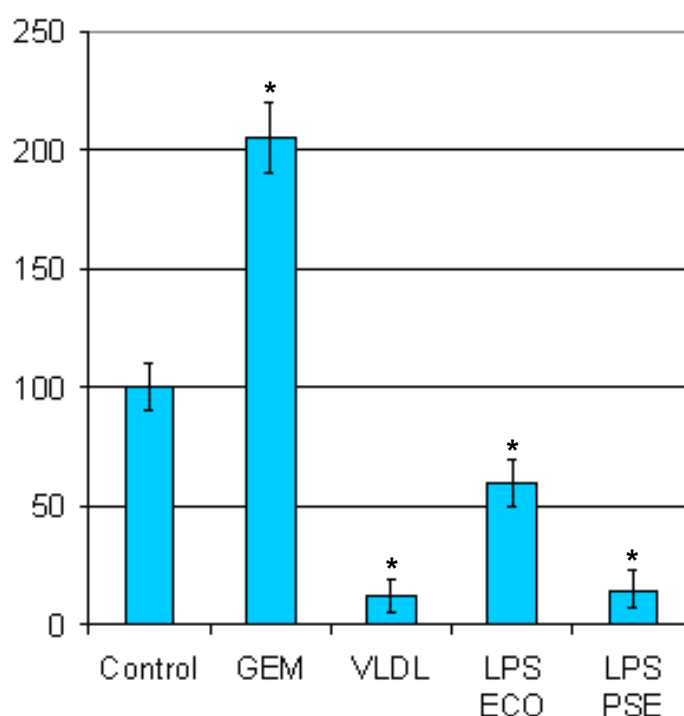


Figura 33: Efecto de las moléculas ensayadas en células THP-1 sobre las poblaciones que expresan VLDLR. *= $P < 0,1$; $n=3$.

En experimentos realizados en colaboración con el laboratorio de la Dra. Adriana Gruppi, se puso a punto la técnica para la detección semicuantitativa de mRNA de VLDLR en esta línea celular. En la Figura 35 se muestran las bandas correspondientes a mRNA de VLDLR obtenidas a diferentes temperaturas de hibridación.

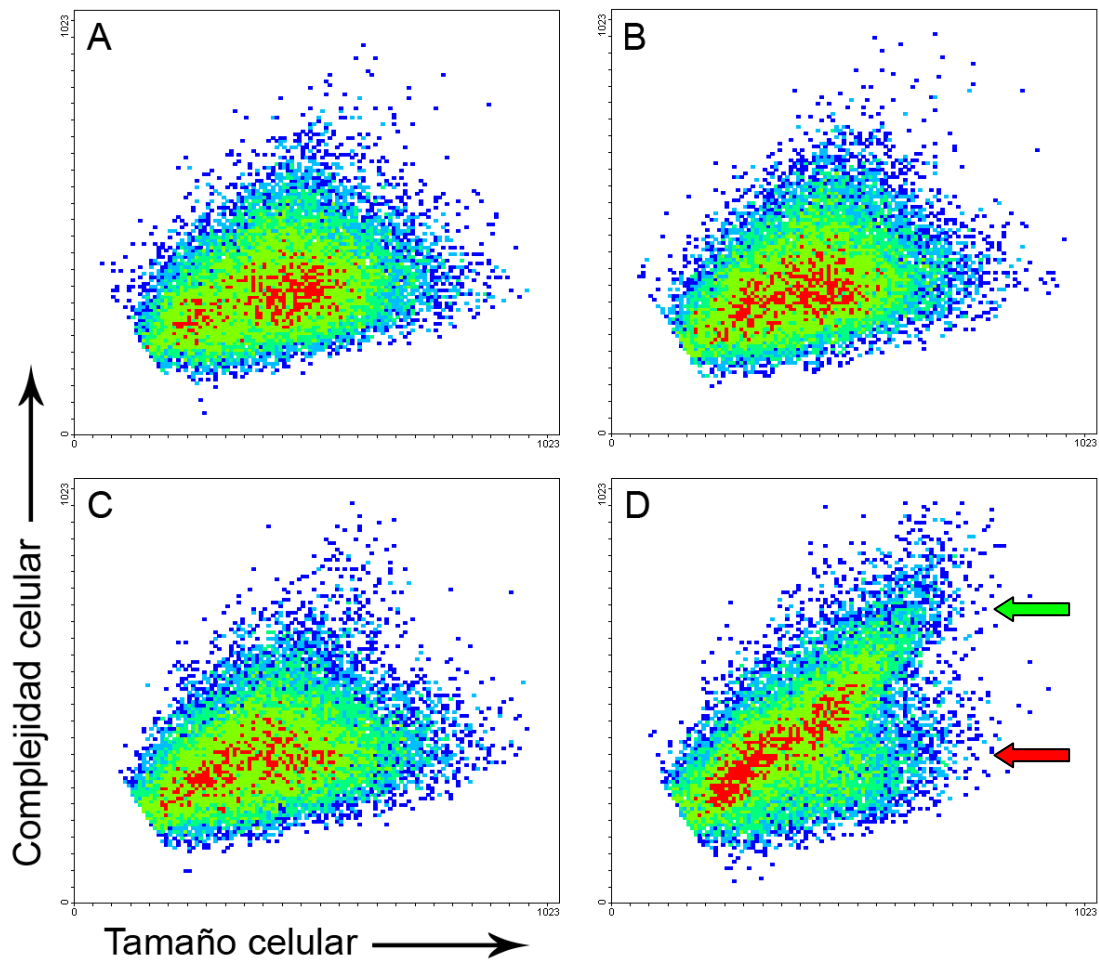


Figura 34: Gráficos de tamaño vs. complejidad celular de células THP-1 co-cultivadas durante 24 horas con: A) LPDS (control), B) VLDL (75 µg/ml de proteína), C) gemfibrozil 200 µM y D) gemfibrozil 400 µM. Nótese como gemfibrozil en la concentración mas alta produce aumento de la complejidad celular en una subpoblación celular (flecha verde) y disminución de la cantidad de células en la otra (flecha roja).

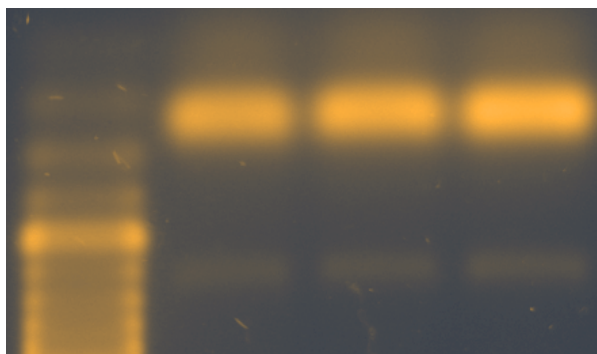


Figura 35: Tinción con bromuro de etidio de productos de RT-PCR obtenidos con cebadores específicos para mRNA de VLDLR aislado de células THP-1. Se muestran los carriles correspondientes a distintas temperaturas de hibridación (50, 52 y 54 °C).

3.2.4 Regulación del VLDLR en linfocitos por moléculas hipolipemiantes/inflamatorias

Se procedió a investigar si los hipolipemiantes atorvastatina y gemfibrozil producían cambios en la regulación de VLDLR en otras células involucradas en la inflamación. Nuestro grupo ha mostrado que las células mononucleares de bazo de ratón (CMB) estimuladas con un mitógeno inespecífico (Concanavalina A) son un modelo de inflamación *in vitro* (143). Los resultados indican que estas drogas producen también un aumento muy importante (casi 2.5 veces) en la expresión de VLDLR. Es interesante notar que el co-cultivo con los hipolipemiantes y VLDL mostró efectos diferenciales con las dos drogas: produjo la inhibición del aumento producido por atorvastatina e intensificó el aumento producido por gemfibrozil (un aumento de más de 5 veces en la población VLDLR+).

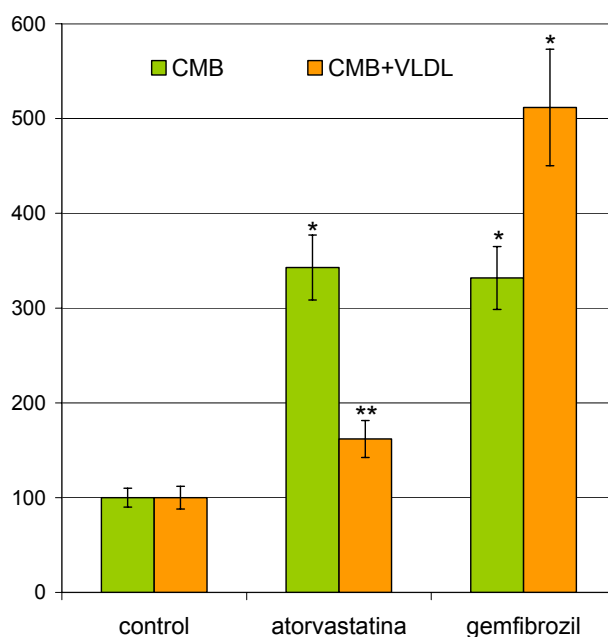


Figura 36: Efecto de las moléculas ensayadas en células mononucleares de bazo de ratón cultivadas en presencia o ausencia de VLDL con atorvastatina (5 μ M) y gemfibrozil (400 μ M) sobre las poblaciones que expresan VLDLR. *= $P < 0,01$; **= $P < 0,02$, $n=3$.

3.2.5 Conclusiones

Los experimentos de inhibición de la unión de VLDL-Alexa con anticuerpo anti-VLDLR y de marcación directa mediante anticuerpo anti-VLDLR

teñido con un anticuerpo secundario fluorescente, demostraron la existencia de al menos tres poblaciones diferenciables por la expresión de VLDLR (VLDLR+ o VLDLR-) y su progreso en el ciclo celular: a) una población de células pequeñas, dentro de la cual aproximadamente un 85% de las células se encontraba en fase G0/G1 del ciclo celular, en las cuales existe una mayor proporción de sitios de unión desplazable por anticuerpo anti-VLDLR y por RAP, lo que indica que expresan el VLDLR en su superficie (células VLDLR+), b) una pequeña subpoblación (~10%) de células en fase G2/M que son también VLDLR+ y c) una subpoblación heterogénea y mayoritaria que no expresa VLDLR (VLDLR-).

Los estudios de la regulación de la expresión de VLDLR por los mismos tratamientos que se emplearon para determinar la producción de apolipoproteína-AI mostraron que la subpoblación de células VLDLR+ no se modifica significativamente por co-cultivo con PC pero disminuyen significativamente (alrededor de un 40%) en presencia de LN y de DHA/EPA. Por el contrario, atorvastatina y gemfibrozil, aumentaron las subpoblaciones celulares VLDLR+ tanto en fase G0 como en fase G2/M.

Por otra parte, el co-cultivo con LPS de distintos microorganismos mostró que estas moléculas proinflamatorias regulan negativamente la expresión de receptor de VLDL, con una disminución más notable en el caso del LPS de *E. coli*. El co-cultivo con VLDL produjo una disminución en las poblaciones VLDLR+ tanto a 24 como a 48 horas.

El ensayo de estos efectores en células THP-1 (línea celular monocítica humana) produjo resultados comparables con los encontrados en HepG2: un aumento de más del 100% en la subpoblación VLDLR+ cuando fueron incubadas con gemfibrozil, y una disminución significativa de esta subpoblación al enfrentarla a LPS y VLDL.

Experimentos realizados con linfocitos de ratón co-cultivados con gemfibrozil y atorvastatina mostraron que estas drogas producen un aumento muy importante (casi 2.5 veces) en la expresión de VLDLR en estas células. Más interesante aun, el co-cultivo con gemfibrozil en presencia de VLDL produjo un aumento de más de 5 veces en la población linfocitaria VLDLR+.

4. Conclusiones generales

Las células HepG2 han probado ser un buen modelo de hepatocitos humanos normales, ya que se encuentran en un estado de diferenciación avanzado y responden tanto a estímulos hipo o hiperlipemiantes como a estresores inflamatorios. Ésta probó ser una línea celular bastante heterogénea en cuanto al tamaño, morfología y complejidad celular, expresión de dominios y receptores de membrana. Mediante técnicas de citometría de flujo se logró caracterizar las distintas subpoblaciones según el estadio en el ciclo celular y así poder analizar si los tratamientos probados modifican la proporción de células en los distintos estadios. Se determinó que aproximadamente el 60% de las células se encontraban en fase G0/G1 cuando superaron el 80% de confluencia. Este porcentaje no varió significativamente cuando el medio se suplementó con SFB 50%, tampoco con 24 horas de privación de SFB.

Con respecto a la acumulación de Apo AI en el medio condicionado, ésta pudo ser determinada mediante un anticuerpo producido en nuestro laboratorio, el cual probó ser específico para Apo AI pero que no reconoce Apo AII ni Apo AI modificada.

Utilizando técnicas de ELISA y Western Blot se observó un aumento con respecto al control cuando se co-cultivó células HepG2 en presencia de distintos lípidos (una mezcla lipídica de DHA/EPA, LN y PC). Se observó que la acumulación de Apo AI en el medio en respuesta a los ácidos omega 3 fue saturable y dependiente de la dosis, observándose un efecto máximo a una concentración 0,25 mM de ácido docosahexaenoico. Una observación importante es que luego de ser oxidados DHA + EPA no producen este efecto por lo tanto no es atribuible a un mayor contenido calórico o debido a un aumento en el contenido de ácidos grasos en el cultivo, sino que es dependiente del grado de insaturación. LN y PC en concentración 2 mM produjeron además aumento en la acumulación de proteínas totales. Éste aumento en la acumulación de Apo AI y de proteínas totales se observó a las 8 horas de cultivo y se mantiene por lo menos por 24 horas. También se observó un aumento importante de la Apo AI en sobrenadantes de células tratadas con

gemfibrozil, igual a lo observado *in vivo* por otros autores (62), e *in vitro* (130, 144) indicando un efecto directo de este fármaco hipolipemiante sobre estas células y no a través de mediadores liberados por otras células (por ejemplo interleuquina 6). Otro fármaco muy utilizado para disminuir las concentraciones de colesterol plasmático, atorvastatina, produjo una ligera disminución de la acumulación de Apo AI, concordando con otros trabajos en los cuales se observó el mismo resultado (62, 63)

La coincubación con LPS, el cual es un potente iniciador de la respuesta inflamatoria, disminuyó a valores no detectables la acumulación de Apo AI luego de 24 horas de cultivo, confirmando la calidad de proteína de fase aguda de la Apo AI y de los efectos directos del LPS sobre el hepatocito sin que medien citoquinas proinflamatorias.

Cuando se incubo las células con dosis altas de VLDL humana, no se observó cambios en los niveles de Apo AI en el medio, lo que constituye una observación novedosa. El aumento de acumulación de Apo B en el medio de cultivo, después de 24 o de 48 horas de co-cultivo, confirmó que la VLDL estaba funcional ya que este efecto es conocido (128).

Para caracterizar la unión de VLDL a estas células se contó con una herramienta adecuada y eficiente, VLDL marcada fluorescentemente en condiciones suaves, lo que permite contar con partículas de VLDL que no han sufrido modificaciones oxidativas. Con esta sonda se pudo observar mediante microscopia de fluorescencia que las células HepG2 cultivadas en presencia de LPDS unen VLDL con distinta intensidad, ya sea por la existencia de múltiples sitios de distinta afinidad en las células o por la existencia de poblaciones celulares con proporciones diferentes de uno u otro sitio. El análisis de los datos obtenidos empleando citometría de flujo mostró que existen poblaciones celulares diferenciables no solo por la densidad de VLDL unida sino que además poseen características propias de tamaño, de complejidad celular y de expresión de dominios de membrana denominados “balsas lipídicas”

Uno de los hallazgos más importantes se obtuvo al realizarse experimentos de inhibición de la unión de VLDL-Alexa con anticuerpo anti-VLDLR y con anticuerpo anti-VLDLR más un anticuerpo secundario fluorescente. En estos ensayos se pudieron definir al menos tres poblaciones, entre las cuales se encontraba una población de células pequeñas, dentro de la

cual aproximadamente un 85% de las células se encontraba en fase G0/G1 del ciclo celular, en las cuales existe una mayor proporción de sitios de unión desplazable por anticuerpo anti-VLDLR y por RAP, lo que indica que expresan el VLDLR en su superficie (células VLDLR+). También se encontró que una pequeña fracción (~ 10%) de las células en la fase G2/M son también VLDLR+.

Los estudios de doble marcado y microscopia confocal mostraron que, aunque este receptor se expresó en una subpoblación minoritaria de las células HepG2 al igual que las “balsas lipídicas”, este receptor no colocalizó con las mismas.

Se estudió además la regulación de la expresión de VLDLR por los mismos tratamientos que se emplearon para determinar la producción de Apo AI. Se determinó que la subpoblación de células VLDLR+ no se modifica significativamente por co-cultivo con PC pero disminuyen significativamente (alrededor de un 40%) en presencia de LN y de DHA/EPA. En cambio, atorvastatina y gemfibrozil, fármacos hipolipemiantes pero que también poseen efectos antiinflamatorios, aumentaron las subpoblaciones celulares VLDLR+ en fase G0 y en fase G2/M. Esta observación junto con aquella que estos fármacos produjeron alteraciones morfológicas y en los estadios del ciclo celular en forma dosis dependiente permiten inferir por primera vez el origen de los efectos secundarios tóxicos **para este tipo celular**.

Interesantemente, el co-cultivo con gemfibrozil de células THP-1 (línea celular monocítica humana) produjo un aumento de más del 100% en la población VLDLR+, indicando que el efecto de esta droga se produce vía un mecanismo presente en varios tipos de células y conservado entre distintas especies de mamíferos, ya que experimentos comparables realizados con linfocitos de ratón indican que esta droga también produce un aumento muy importante (casi 2.5 veces) en la expresión de VLDLR en estas células. Más interesante aun, el cocultivo con gemfibrozil en presencia de VLDL produjo un aumento de más de 5 veces en la población linfocitaria VLDLR+.

Por otra parte, el co-cultivo con LPS de distintos microorganismos mostró que estas moléculas proinflamatorias regulan negativamente la expresión de receptor de VLDL, con una con una disminución más notable en el caso del LPS de *E. coli*. Interesantemente, experimentos similares con

células THP-1 mostraron que en esta línea celular el co-cultivo con LPS también regula negativamente la expresión de VLDLR+.

El co-cultivo de ambas líneas celulares con VLDL produjo una disminución en las poblaciones VLDLR+, en el caso de HepG2 tanto a 24 como a 48 horas, el cual es más evidente en las células THP-1. Esta retroregulación negativa causada por un ligando específico sería similar al que produce la LDL sobre el LDLR en los hepatocitos humanos (103).

Estos datos indican que la producción de apolipoproteína AI y VLDLR son modificados negativa y positivamente por los distintos tratamientos. Gemfibrozil, que en estas células actúa como ligando de PPAR- α , produce aumento en la expresión de VLDLR y en la producción de Apo AI (145), indicando que en hepatocitos humanos existe concomitancia en la regulación de estas dos moléculas. Por otra parte, DHA, también ligando de PPARs, ejerció una regulación positiva sobre Apo AI pero negativa sobre VLDLR indicando que las rutas de acción son distintas a gemfibrozil, lo cual coincide con los efectos que DHA ejerce sobre PPAR β y γ .

Tomados en conjunto, estos datos confirman la hipótesis que el VLDLR en el hígado es una molécula integradora de señales inflamatorias y de las provenientes del metabolismo lipídico de la célula. En esta integración participan los diversos receptores nucleares (FXR; LXR y PPAR) regulando la síntesis de apolipoproteínas, lípidos, lipoproteínas y sus receptores (en nuestro caso en la regulación de VLDLR y en la producción de Apo AI).

5. Discusión

El receptor de VLDL es el miembro menos estudiado de la familia del receptor de LDL. Este se expresa en altas concentraciones en músculo esquelético, corazón, tejido adiposo, cerebro y macrófagos aunque el mRNA para VLDLR solo se encuentra en cantidades mínimas en el hígado (29,146). Trabajos recientes han demostrado que a pesar de estas bajas concentraciones de mRNA de VDLR, este receptor es un gen blanco del FXR en células HepG2 (20) y que la cantidad de mRNA aumenta significativamente cuando se co-cultiva hepatocitos primarios humanos con agonistas de los PPAR- α (19). La presente Tesis es el primer reporte en la literatura en demostrar la presencia de proteína de VLDLR en la membrana de células hepatocitarias, aunque en una pequeña subpoblación de las mismas (aproximadamente un 30%)

Reportes recientes han propuesto muchas posibles funciones para VLDLR en el metabolismo de las lipoproteínas (147), aterosclerosis (148), obesidad y resistencia a la insulina (149), metabolismo cardiaco de los ácidos grasos (150) y migración neuronal (35). A pesar de esto, se sabe muy poco sobre la función del VLDLR en el hígado, aunque la expresión de VLDLR en hígado en ratones deficientes en LDLR mostró una corrección a largo plazo de la hipercolesterolemia (151).

Con respecto a la regulación de este receptor por tratamientos con fármacos u otras moléculas, existen pocos datos en la literatura. En modelos experimentales murinos se ha observado disminución del VLDLR en respuesta a insulina. Esta regulación negativa del receptor se ha observado en modelos de hipotiroidismo (152,31) y en modelos de disfunción renal (153,154). En nuestros modelos celulares, el VLDLR fue regulado diferencialmente por distintas moléculas. Por un lado, gemfibrozil, ligando exclusivo de PPAR- α , aumentó la acumulación y actividad biosintética de Apo AI y la cantidad de células VLDLR+. Los experimentos con células THP-1 y linfocitos murinos enfrentados a gemfibrozil produjo resultados comparables con los encontrados en HepG2: un aumento de más del 100% en la población VLDLR+ en el caso

de las THP-1 y un aumento muy importante (casi 2.5 veces) en los linfocitos murinos, indicando que el efecto del gemfibrozil se produce vía un mecanismo presente en varios tipos celulares y en distintas especies de mamíferos.

En línea con lo observado para gemfibrozil, otro fármaco hipolipemiante, atorvastatina aumentó muy significativamente las subpoblaciones hepatocitarias VLDLR+, aunque produjo una disminución pequeña pero significativa de la acumulación de Apo AI. Dado que se conoce que FXR regula negativamente la síntesis de Apo AI sin necesidad de unirse a RXR, nuestros resultados sugieren que la atorvastatina actuaría a nivel del FXR regulando ambos genes por una vía directa, la cual ha sido demostrada para los ácidos biliares (155).

Para conocer si el efecto de gemfibrozil y atorvastatina era aditivo se realizaron experimentos en los cuales estas drogas se adicionaron en forma conjunta. En el caso de las células HepG2, se produjo muerte celular significativa a las pocas horas luego de la administración, por lo que no se pudo obtener resultados. Aunque se han descrito efectos adversos de la administración conjunta de estas drogas (61), probablemente este efecto podría no deberse sólo a una disminución del catabolismo de la atorvastatina producido por el gemfibrozil, como ha sido sugerido por otros autores en células musculares lisas para otra estatina, la pravastatina (156), sino a un efecto aditivo a través del aumento del TRC mediado por gemfibrozil por un lado y a una disminución del suministro de colesterol sintetizado endógenamente junto con la disminución de la síntesis de Apo B y de LDLR producida por la atorvastatina, lo que llevaría a que el propio hepatocito no tenga la disponibilidad de colesterol necesario para el mantenimiento de las funciones básicas celulares (mantenimiento de dominios de membrana, producción de sales biliares). Por el contrario, la administración conjunta de gemfibrozil y atorvastatina en CMB de ratón no produjo efectos adversos, y el aumento en la subpoblación VLDLR+ en esta condición fue aproximadamente la suma de los aumentos observados con las drogas por separado, apoyando la idea de la existencia de mecanismos distintos, al menos en algunos tipos celulares, por los cuales estos fármacos ejercen algunas de sus acciones.

En línea con los experimentos anteriores se probaron LPS de distintos orígenes ya que se conoce que LPS, además de sus efectos proinflamatorios,

disminuye significativamente el mRNA de FXR en células hepatocitarias a través de su acción vía el receptor Toll-like 4 (157). La disminución de la expresión de VLDLR observada cuando se co-cultivó células HepG2 y THP-1 con LPS está de acuerdo con estos reportes y apoya la idea de que uno de los mecanismos responsables de la regulación del VLDLR es dependiente de FXR, aunque muy probablemente de manera indirecta, ya que el gen de VLDLR no tiene la secuencia de unión para FXR (CITA).

También se observó regulación negativa de las poblaciones VLDLR+ cuando las células fueron cultivadas en presencia de DHA/EPA y LN. Estos ácidos grasos poliinsaturados han sido reportados como agonistas de los PPARs y antagonistas del LXR, produciendo efectos benéficos tales como mejoramiento de la dislipidemia y de la sensibilidad a insulina y disminución de la lipogénesis hepática en modelos animales (CITA). Otro efecto benéfico, aunque *in vitro*, observado en este trabajo es el aumento de la producción de Apo A1 en el medio condicionado. Recientemente un trabajo reportado por Zhao y col. (158) indica que estos lípidos serían ligandos también del FXR. Si así fuera, la disminución en las poblaciones VLDLR+ en presencia de DHA/EPA y LN reportadas aquí serían contradictorias con los datos mostrados más arriba para atorvastatina y LPS. Sin embargo, estos autores aclaran que estos ligandos producen la regulación selectiva de los genes blanco de los FXR, activando preferencialmente algunos genes blanco como se ha reportado para otros moduladores selectivos de este receptor nuclear. Si bien esta posibilidad es digna de ser tomada en cuenta y profundizada, nosotros creemos que es más probable que la regulación negativa del VLDLR por estos ácidos grasos estaría relacionada más bien con su condición de lípidos, ya que se sabe que en distintos modelos murinos las dietas altas en lípidos producen la disminución de la expresión de VLDLR (22). Apoyando aún más esta noción, se ha reportado que en corazón y células musculares lisas murinas se produce regulación negativa del VLDLR+ cuando hay un cambio en la utilización del sustrato lipídico a glucosa para obtención de energía celular (159). Esto es concordante con el hecho de que el VLDLR parece ser regulado negativamente por el receptor de insulina.

La regulación negativa del VLDLR observada en este trabajo tanto en células HepG2 como THP-1 co-cultivadas con VLDL podría ser similar a la

regulación negativa que ejerce la LDL sobre el LDLR en células hepatocitarias (103). Esta observación es original ya que no hay reportes en la literatura sobre la retroregulación negativa producida por VLDL en este modelo celular .

En la figura 37 se hace una síntesis de las rutas implicadas en la regulación de VLDLR y la producción de Apo AI con los diferentes tratamientos empleados en esta Tesis.

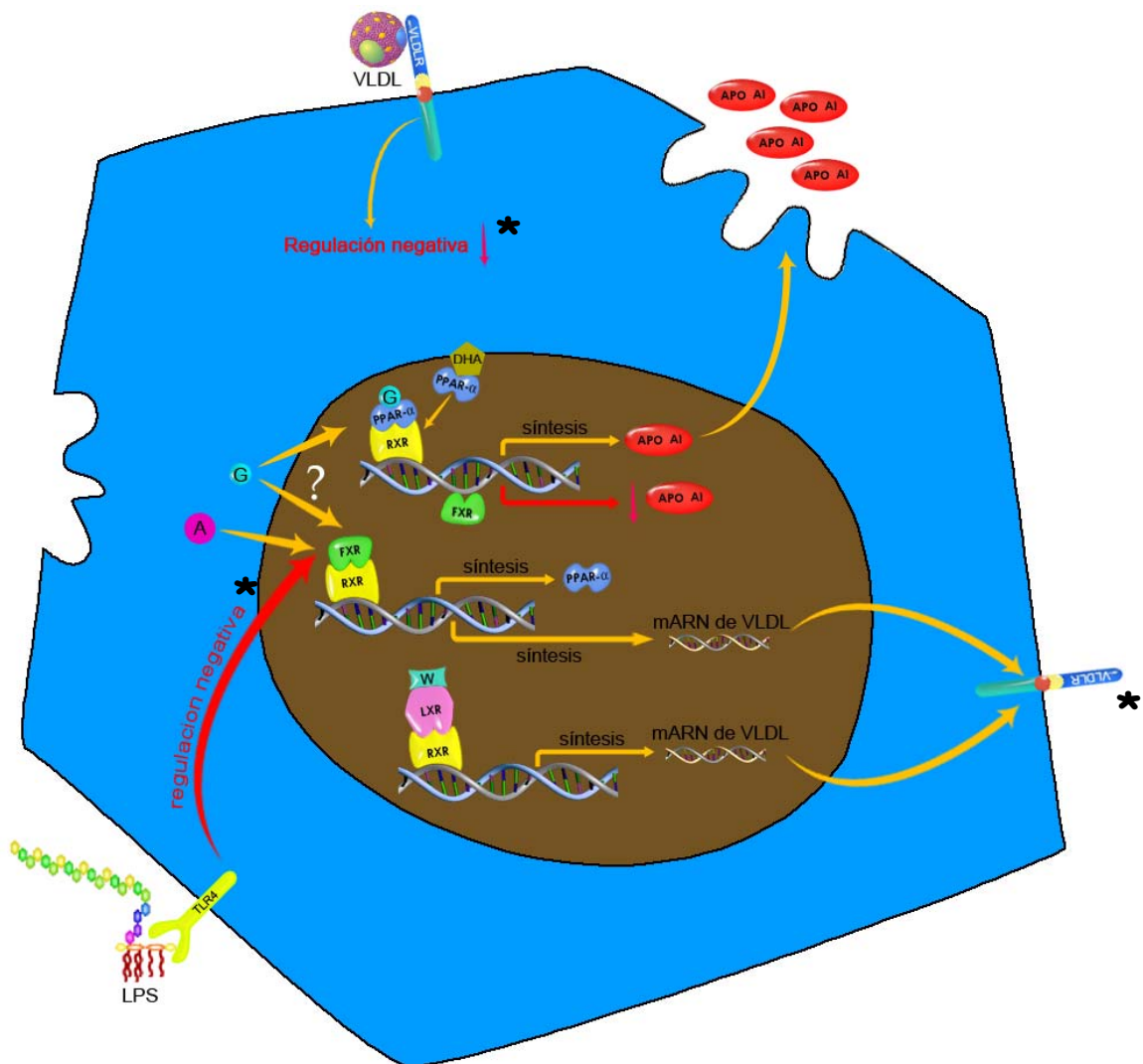


Figura 37: Esquema de las rutas implicadas en la regulación de VLDLR y Apo AI. A=atorvastatina, G=gemfibrozil, W=agonista sintético de LXR. *= esta Tesis

6. Materiales y Métodos

6.1 Materiales

6.1.1 Drogas y reactivos utilizados

El fármaco gemfibrozil, LPS de *E. coli*, Ioduro de propidio, SDS, TRIZMA base, heparina, el 4-cloronaftol así como el cóctel de inhibidores de proteasa conteniendo deoxicolato de Na 0,5% (p/v), Tritón X-100 1% (v/v), SDS 0,1% (p/v), PBS 1X, PMSF 1mM, Leupeptina 5 ug/ml y Aprotinina 10 ug/ml como el fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) fueron comprados a Sigma-Aldrich (USA). La o-fenilendiamina era de Fluka. El conjunto de reactivos para marcar proteínas covalentemente con Alexa 488 fue comprado a Invitrogen (USA) y los reactivos para la medición de colesterol a GTLab (Rosario, Argentina). La atorvastatina fue donada por el laboratorio Pfizer Argentina S.A. El reactivo TRIZOL fue adquirido a Invitrogen, Argentina. La mezcla de ácidos grasos DHA/EPA y el ácido linolénico fueron una generosa donación del Dr. Rolando Pécora. La toxina colérica marcada con FITC fue donación del laboratorio del Dr. Bruno Maggio. Todos los reactivos químicos usados fueron de grado analítico y se emplearon sin ulterior purificación.

6.2 Métodos

6.2.1 Aislamiento de VLDL humana

VLDL humana (conteniendo IDL), se obtuvo de suero de individuos normolipémicos en ayunas siguiendo el protocolo utilizado regularmente en nuestro laboratorio (127). El fraccionamiento fue realizado sembrando el suero ($d < 1,006$ g/ml) sobre una solución de KBr ($d = 1,019$ g/ml) y centrifugado a $300.000 \times g$ en un rotor TLA-100.2 en una ultracentrífuga de mesa Optima-TLX durante 2 horas. Las lipoproteínas de distintos individuos fueron mezcladas y dializadas contra PBS/EDTA·Na₂, 5 mM, pH 7,4, a 4 °C (3 cambios de 1 L)

durante al menos 16 horas y esterilizadas mediante filtración con filtro de poro de 0,2 μm . Esta preparación fue ajustada a 0.145 mg de proteína/ml y se guardó a -20°C hasta su utilización. La pureza y estado oxidativo de las lipoproteínas fue examinado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

6.2.2 Obtención de VLDL marcada con sondas fluorescentes

Se purificó VLDL como se describió arriba, se determinó la concentración de proteínas y de colesterol por las técnicas descritas anteriormente. La lipoproteína se concentró hasta obtener una concentración aproximada de 145 μg de proteína/ ml. Una vez concentrada se la dividió en dos alícuotas de igual volumen (500 μl) para ser marcadas con distintos fluorescentes. A una de las alícuotas de VLDL se le agregó una solución de Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato), el cual fluoresce en las longitudes de onda correspondientes al rojo, en concentración final de 300 μg de Dil/mg de proteína. Se incubó por 18 horas a 37°C . A la alícuota de VLDL restante (500 μl) se le agregó 50 μl de bicarbonato de sodio 1M y la mezcla fue transferida a un vial del reactivo fluorescente Alexa 488, sonda que fluoresce en las longitudes de ondas del verde, e incubada toda la noche a 4°C en agitación constante con una barra magnética. La VLDL marcada covalentemente con Alexa y VLDL marcada con Dil se separaron del fluorescente sin reaccionar (Figura 38) mediante ultracentrifugación en las mismas condiciones que las de su obtención, se dializaron contra PBS sin EDTA y se la guardó alicuotada a -20°C hasta su utilización.

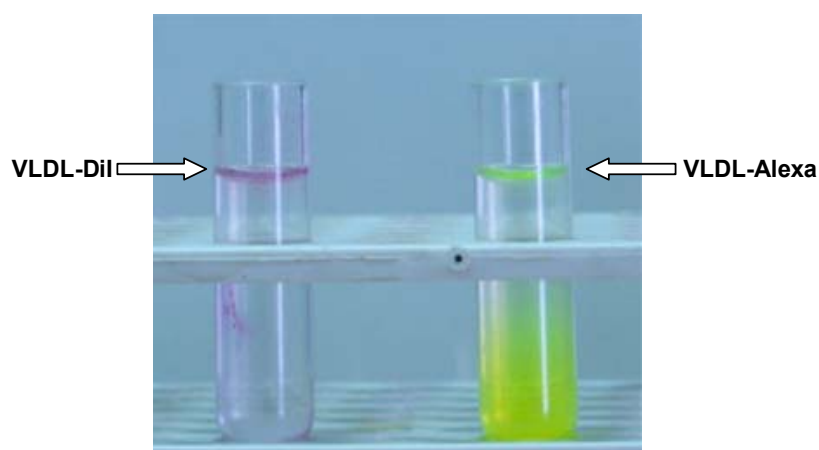


Figura 38: Separación de VLDL-Dil y VLDL-Alexa del fluorescente no unido a VLDL mediante ultracentrifugación. Foto gentileza de la Dra. Sampedro.

6.2.3 Preparación de suero fetal bovino deficiente en lipoproteínas (LPDS)

Se obtuvo suero fetal bovino libre de lipoproteínas, LPDS, mediante ultracentrifugación (300.000 g por 2 horas a 15 °C) ajustando la densidad del suero fetal bovino (Gibco, USA) a 1.250 g/ml por adición de KBr. El LPDS resultante fue dializado contra PBS/EDTA·Na₂, 5 mM, pH 7,4, a 4 °C durante 1 hora y esterilizado mediante filtración con filtro de poro de 0,2 µm. El contenido proteico del LPDS fue de 40 g/l.

6.2.4 Obtención de la proteína asociada al receptor (RAP)

La proteína asociada al receptor humana (RAP) humana se preparó mediante expresión en *E. coli* BL21 cultivada en un bioreactor de mesada de 2 L de capacidad según la técnica usada rutinariamente en el laboratorio (160). La RAP fue expresada como proteína quimérica unida a glutatión S-transferasa a partir de un vector de expresión pGEX-KG en colaboración con el grupo del Dr. Gustavo Chiabrando. La RAP fue separada del resto de las proteínas bacterianas mediante columnas de Sephadex-glutatión.

6.2.5 Determinaciones por citometría de flujo.

Las células HepG2 fueron sembradas en placas de Petri de 35 mm a una densidad de confluencia no menor al 50% en medio de cultivo DMEM adicionado con glutamina (4mM) y gentamicina (1 μ l/ml de medio de cultivo) y 10% de suero fetal bovino (SFB). Las células fueron cultivadas en estufa a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂. Al llegar a un 70-80% de confluencia (aproximadamente 2 días de cultivo) se retiró el medio de cultivo (medio condicionado), se las lavó 3 veces con PBS estéril y se las co-cultivó en DMEM con 10% de LPDS en presencia o ausencia de alguno de los efectores ensayados. Luego del periodo de co-cultivo, las células fueron despegadas de la cápsula de Petri con PBS/EDTA 2 mM estéril, lavadas y resuspendidas en PBS, contadas en un cámara de Neubauer y separadas en cantidades iguales (3 x 10⁵ en 50 μ L) en tubos eppendorf.

6.2.5.1 Análisis del ciclo celular por el método de Ioduro de Propidio

El análisis del ciclo celular se llevó a cabo empleando la técnica descrita por Nicoletti y col. (161) utilizando ioduro de propidio, el cual es un fluorocromo que se intercala en las dobles hebras del DNA. Las células fueron fijadas con 500 μ l/ 1x10⁶ células de Etanol 70% en PBS helado (preparado y guardado a -20° C hasta su utilización). El etanol fija las células y permeabiliza las membranas permitiendo la entrada de PI a las células. La fijación con Etanol 70% es un paso muy crítico ya que se debe agregar a las células mediante goteo y con agitación muy fuerte para evitar la formación de grumos. Las células fueron centrifugadas, lavadas con PBS y se les agregó 500 μ l/ 1x10⁶ células de una solución de ioduro de propidio (50 μ g/ ml) que contenía Ribonucleasa-A (500 unidades/ ml) para eliminar la marcación de las dobles hebras de RNA, y se las incubó durante 2 horas a 4° C y en oscuridad. Luego se lavaron con PBS 2 veces y se resuspendió en el líquido empleado en el citómetro de flujo (ISOTON-II).

6.2.6 Análisis de la expresión del VLDLR en HepG2, THP-1 y linfocitos.

Las distintas líneas celulares fueron incubadas a 4 °C durante 3 horas junto con el agregado de 15 µL VLDL-Alexa (0,145 mg/ml de proteína), o con 15 µL VLDL-Alexa y anticuerpo anti-VLDLR en exceso para inhibir la unión de VLDL-Alexa a su receptor específico. Luego de la incubación, las células fueron lavadas con PBS y analizadas en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Los Ángeles, California, EE.UU) equipado con un láser de argón de 15-mW en el cual se adquirieron datos de no menos de 30.000 células por tubo. Las células positivas para VLDLR fueron seleccionadas analizando los datos obtenidos con el software libre WinMDI 2.8. La expresión del VLDLR se definió por un marcador en el histograma de fluorescencia del canal verde, green MFCh, que abarcó las intensidades suprimidas por la coincubación de VLDL-Alexa con el anticuerpo anti-VLDLR.

Las células THP-1 fueron incubadas con suero libre de lipoproteínas inactivado a 60 °C con el fin de bloquear la unión inespecífica de las inmunoglobulinas a través del receptor Fc (fragmento constante del receptor de la inmunoglobulinas). Luego del bloqueo del receptor Fc, las células fueron lavadas e incubadas con anticuerpo anti VLDLR durante 2 horas a 4 °C.

6.2.7 Medición de Apo AI y Apo B mediante enzimoimmunoensayo (ELISA)

Las distintas apolipoproteínas fueron cuantificadas en el medio de cultivo condicionado mediante la técnica de ELISA competitivo usando anticuerpos policlonales. En el caso de la Apo AI, el antisuero de conejo fue producido en el laboratorio a partir de Apo AI humana purificada. El antisuero de rata anti Apo B fue generosamente provisto por el Dr. Edilberto Rubiolo.

Las placas de Elisa de 96 pocillos fueron activadas con una solución de glutaraldehído 0,05% durante 5 minutos y lavadas extensivamente según la técnica descrita por Stein y col (162). Luego se sensibilizó la placa con HDL humana (Apo AI) o LDL humana (Apo B) durante la noche a 4 °C. Las placas

fueron entonces lavadas con PBS y bloqueadas 1 hora a °T ambiente con 2% BSA en PBS conteniendo 0.05% Tween-20. Luego del lavado con PBS, se incubo con 50 µl de cada medio condicionado por quintuplicado durante 1:30 h a °T ambiente y estándares comerciales de Apo AI (HDL humana) y Apo B (LDL humana) en concentraciones de 0.03 a 30 mg/L de proteína a los cuales se agrego 50 µl del anticuerpo correspondiente diluido (1: 10000 en el caso de la IgG anti-Apo AI, 1:1000 en el caso de la IgG anti-Apo B) para que se produzca la competencia de estos por la apolipoproteína pegada a la placa. En cada determinación se incluyeron pocillos controles sin apolipoproteína sensibilizada y controles sin el agregado de los anticuerpos primarios o secundarios. A continuación se lavó la placa con PBS y se agrego a cada pocillo 100 µl de proteína G-peroxidasa y se incubó durante 1 hora. Luego se lavo la placa con PBS y se agrego una solución que contenía el substrato para la peroxidasa, o-fenilendiamina (0.4 g/L) junto con H₂O₂ (0.5 mL/L) en tampón fosfato 0.2 M/ citrato 0.1 M y se incubo la placa por 30 min. a °T ambiente. Finalmente la reacción de color fue detenida con 100 µl de H₂SO₄ 1 M por pocillo y la absorbencia fue leída a 492 nm en un lector de ELISA automático.

6.2.8 Electroforésis en geles de poliacrilamida

Para realizar electroforésis en geles de poliacrilamida (PAGE) en presencia de SDS se utilizó el sistema descrito por Laemmli (163). La composición del gel separador fue: 10% (p/v) poliacrilamida, 0,27% (p/v) bisacrilamida (N,N-metilen-bis-acrilamida), 0,025% (v/v) TEMED (N, N,N, N, tetra-metilendiamina), 0,09% (p/v) persulfato de amonio, Tris-HCl 0,375M, pH= 8.8 y 0,1% (p/v) de SDS. La composición del gel concentrador fue: 3% (p/v) acrilamida, 0,08% (p/v) de bisacrilamida, 0,1% (v/v) TEMED, 0,15% (p/v) persulfato de amonio, Tris-HCl 0,125 M pH= 6,8 y 0,1% (p/v) SDS. Junto con las muestras se sembraron en el gel marcadores de pesos moleculares conocidos o apolipoproteínas puras comerciales. El buffer de la corrida electroforética consistió en Tris 2.5 mM-Glicina 0,2 M, pH= 8,3, conteniendo SDS al 0,1% (p/v). La electroforesis se desarrolló a temperatura ambiente, a

120 V constantes hasta que el frente de corrida llegó al final del gel. En algunos casos el gel fue teñido con Coomasie (Brillant blue R-250 Sigma) durante 20 minutos a 55° C en baño maría. Posteriormente se lo destiñó con sucesivos cambios de una solución 7,5% metanol y 5% ácido acético. Una vez desteñido el gel se procedió a la digitalización con un escáner, el análisis de las bandas de proteína mediante el software ImageQuant y se determinó: peso molecular por comparación con el marcador de pesos moleculares y la intensidad relativa de las bandas.

6.2.9 Microscopia de fluorescencia y confocal

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos en cápsulas de Petri de 35 mm (no más de 4 cubreobjetos por cápsula) en DMEM con 10% LPDS en presencia o ausencia de los distintos efectores. Finalizado el cultivo, las células fueron lavados con PBS y fijadas con paraformaldehído 10% en PBS conteniendo sucrosa 0,32 M y CIMg 3 mM, reactivo que fue neutralizado con NaOH y filtrado. La adición del reactivo de fijación se realizó paulatinamente con agitación para preservar la estructura celular. Luego de la fijación (30 min a °T ambiente) se incubo las células fijadas en PBS/Glutamina 10 mM para eliminar el paraformaldehído reactivo. Los cubreobjetos fueron transferidos a placas de 12 pocillos donde fueron incubados con anticuerpos primarios y/o VLDL-Alexa y/o Toxina colérica-FITC durante 1 hora a 37 °C en cámara húmeda, luego fueron lavados e incubados durante 1:30 hora con el correspondiente anticuerpo secundario marcado fluorescentemente a 37 °C en cámara húmeda. Finalmente, se lavo los cubreobjetos con PBS, se los enjuago en agua destilada para eliminar las sales y se los montó sobre portaobjetos utilizando Fluorsave.

6.2.10 Incorporación de [³⁵S]metionina en la Apo AI

Las células fueron cultivadas en cápsulas de Petri de 35 mm como se describió anteriormente hasta llegar a un 70-80% de confluencia. Luego fueron

lavadas e incubadas en 1 ml de DMEM libre de metionina (cortesía del laboratorio de la Dra. Beatriz Caputto) durante 4 horas para depletar los pools de metionina endógena, luego de lo cual se recambio el medio condicionado por DMEM libre de metionina al cual se adiciono 1 μ Ci/ml de [³⁵S]metionina (10 μ Ci/mmol) y los efectores ensayados. Luego de 12 horas de cultivo, se cosecharon separadamente las células y los sobrenadantes. Para la obtención de la proteína celular, se agregó a las cápsulas 1 ml del tampón de lisis fuerte RIPA con el agregado de inhibidores de proteasas (Deoxicolato de Na 0,5% (p/v), Tritón X-100 1% (v/v), SDS 0,1% (p/v), PBS 1X, PMSF 1mM, Leupeptina 5 ug/ml, Aprotinina 10 ug/ml). Se las incubó durante 30 minutos en hielo. Al cabo de ese tiempo se centrifugaron a 10000g durante 10 minutos a 4° C, se separó el sobrenadante, se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry y se las guardo a – 70 °C junto con los sobrenadantes hasta su uso. Las proteínas de los sobrenadantes, los cuales mostraron igual cantidad de radioactividad precipitable por ácido tricloroacético fueron separados mediante SDS-Page, transferidos a membrana de nitrocelulosa y se escaneó la membrana utilizando el equipo STORM. Las cantidades relativas de radioactividad en la banda de la Apo AI fue estimada de las imágenes así obtenidas mediante el software ImageQuant, asignándole a la intensidad de la banda correspondiente a Apo AI de la condición control el valor 1,0. Las intensidades de las bandas correspondientes a Apo AI de las restantes condiciones se reportan como intensidad relativa al control.

6.2.11 Western Blot

Las células se cultivaron como se describió anteriormente, al tiempo fijado se cosecho el sobrenadante, se centrifugo para eliminar células y debris celular, se agrego inhibidores de proteasa y se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry. Se preparó un gel de poliacrilamida al 10% y se desarrolló la electroforesis como se describió mas arriba. Cuando fue necesario, alícuotas del sobrenadante fueron concentradas mediante centrifugación al vacío (SpeedVac). Las muestras se sembraron junto con marcadores de peso molecular conocidos. Una vez corrido el gel de separación

se realizó la transferencia a membrana de nitrocelulosa. Se utilizó el método húmedo manteniéndose constante una corriente de 350 mA durante 1 hora. El buffer de transferencia consistió en el buffer de corrida más metanol al 20% (v/v). Para corroborar la eficacia de la transferencia la membrana fue teñida con Ponceau S 0,2% (p/v), ácido acético al 1% (v/v). Se decoloró el gel mediante sucesivos lavados con agua destilada y se estabilizó posteriormente con Tris-HCl 10 mM pH=7,4. La nitrocelulosa fue bloqueada con una solución de Bloqueo compuesta por albúmina humana 3% (BSA, p/v), TBS (Tris 50mM – NaCl 200 mM) durante 2 horas a 4° C. Se lavó con TTBS (TBS, Tween 20 al 0,05%) tres veces durante 15 minutos y se incubó con el anticuerpo primario correspondiente diluido 1:1000 en TBS durante la noche a 4° C. Luego de lavar el anticuerpo primario con TTBS tres veces durante 15 minutos, se incubó con proteína A-peroxidasa diluida 1:1000 en TBS durante 1:30 horas a °T ambiente. Luego de lavar la peroxidasa con TTBS tres veces durante 15 minutos se procedió al desarrollo de color mediante el substrato 4-cloronaftol diluido en metanol/Tris-Cl pH 7.4 con el agregado de H₂O₂ 30% (1:1000).

6.2.12 Detección de mARN de VLDLR mediante RT-PCR en células THP-1

Para la determinación de las cantidades relativas del mARN de VLDLR se utilizó la técnica de RT-PCR semicuantitativa. Esta técnica se basa en la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) acoplada a una reacción de retro-transcripción, ambas realizadas por polimerasas. Se utilizó el kit Titanium One-Step (Clontech, Japón) Las reacciones fueron realizadas en las condiciones que recomienda el fabricante.

6.2.12.1 Extracción de RNA total a partir de cultivos celulares

Las células THP-1 se cultivaron como se ha descrito anteriormente en placas T-75. Para la extracción de RNA a partir de células en cultivo se utilizó el reactivo Trizol según las indicaciones del fabricante:

Se aspiró el medio de cultivo y se lo guardo para otras determinaciones como se describió más arriba. A continuación se lavaron las células 3 veces con PBS frío, se las colocó en hielo y se agregó 1 ml de TRIZOL a cada placa. Se despegaron las células mediante una escobilla de goma y se las homogeneizó con una pipeta automática, en esterilidad. Luego de homogeneizadas, se transfirió la mezcla a tubos eppendorf y se incubó las muestras homogeneizadas por 5 min a °T ambiente y se agregó 60 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (proporción 49:1, v/v), y se agito vigorosamente por 15 s. Luego se incubo a °T ambiente. por 2 o 3 min. Finalizado este tratamiento se centrifugó las muestras por 15 min a 12,000 g a 4 °C y se transfirió la fase superior acuosa a otro tubo eppendorf. El ARN fue precipitado de la fase superior acuosa mezclándolo con 150 µl de isopropanol. Se dejaron las muestras a °T ambiente por 10 min y se centrifugaron a 12,000 g por 10 min. Se removió el sobrenadante y se lavo el precipitado de ARN con 300 µl de etanol 75%. Luego se centrifugó a 7,500g por 5 min a °T ambiente. Finalmente se removió el etanol y el precipitado de ARN se seco brevemente al aire y se disolvió el precipitado en 100 µl en agua DEPC. Las muestras fueron guardadas a -20 °C hasta su uso dentro de los 3 días de obtenidas.

6.2.12.2 Cuantificación del ARN total

Se calentaron las muestras de ARN total durante 10 minutos a 65 °C para resuspender bien el ARN, y se diluyó 1 µl del mismo en 1 ml de agua (por duplicado). La cuantificación se hizo utilizando el espectrofotómetro Shimadzu UV 160-A. Se midió la absorción a 260 nm, la cual refleja la cantidad de ARN y a 280 nm, que indica la cantidad de proteína. La relación entre DO 260/DO 280 de todas las muestras utilizadas estuvo comprendida entre 1,7 y 2 para lograr un resultado optimo. La integridad del RNA se comprobó corriendo 1 mg del mismo en un gel desnaturalizante de agarosa al 1,2% y visualizando el RNA en un transiluminador de luz ultravioleta.

6.2.12.3 Síntesis del cADN

La síntesis de cADN se llevó a cabo mediante el kit ThermoScript RT-PCR System kit (Invitrogen, Argentina) según las indicaciones del fabricante utilizando cebadores al azar de 6 pb.

6.2.12.4 PCR de los cADN producidos

Se amplificaron mediante PCR los cADN obtenidos utilizando los siguientes oligonucleótidos para el VLDLR humano:

sentido 5'-CTAGTCAACAACCTGAATGATG-3',
antisentido 5'-AAGAATGGCCCATGCAGAA-3',

que genera un producto de 224 pb. Las condiciones utilizadas para cada reacción fueron: 50,6 °C, 30 min (1x); 94°C, 2min (1x); 94°C, 1 min; 60°C, 1min; 72°C, 1min (34x) En cada tubo se agregaron los siguientes reactivos:

Tampón de PCR (10X, sin MgCl₂) 5.0 ul

MgCl₂ (50mM) 1.5 ul

dNTPs (10mM cada uno) 1.0 ul

Primer sentido (1uM) 15 ul

Primer antisentido (1uM) 15 ul

Taq polimerasa (5 U/ul) 1.0 ul

ARN total (~10 ug/ml) 1.5 ul

Los productos de la RT-PCR fueron separados en un gel de agarosa al 2% en TBE 1X. Los valores de los mARN fueron corregidos por el mARN de la β -actina.

6.3 Anticuerpos

6.3.1 Obtención del anticuerpo policlonal anti-Apo AI

Para la obtención de anticuerpos policlonales anti-Apo AI, se obtuvo HDL humana mediante ultracentrifugación en gradiente de KBr, de la cual se

purificó Apo AI mediante SDS-Page. La banda correspondiente se cortó del gel, se molió en mortero bajo aire líquido y se mezcló con coadyuvante completo de Freund en proporción 1:1 en volumen. Con alícuotas de esta mezcla (de aprox. 40 ug de proteína) se inmunizó a conejos, los cuales luego recibieron otras dosis de proteína similar mezclada con coadyuvante incompleto de Freund cada 2 meses para mejorar la respuesta antigénica. Luego de alcanzar un título alto de IgG anti-Apo AI, se les extrajo el antisuero el cual fue utilizado para las mediciones de Apo AI mediante ELISA y Western blot (Figura 39).

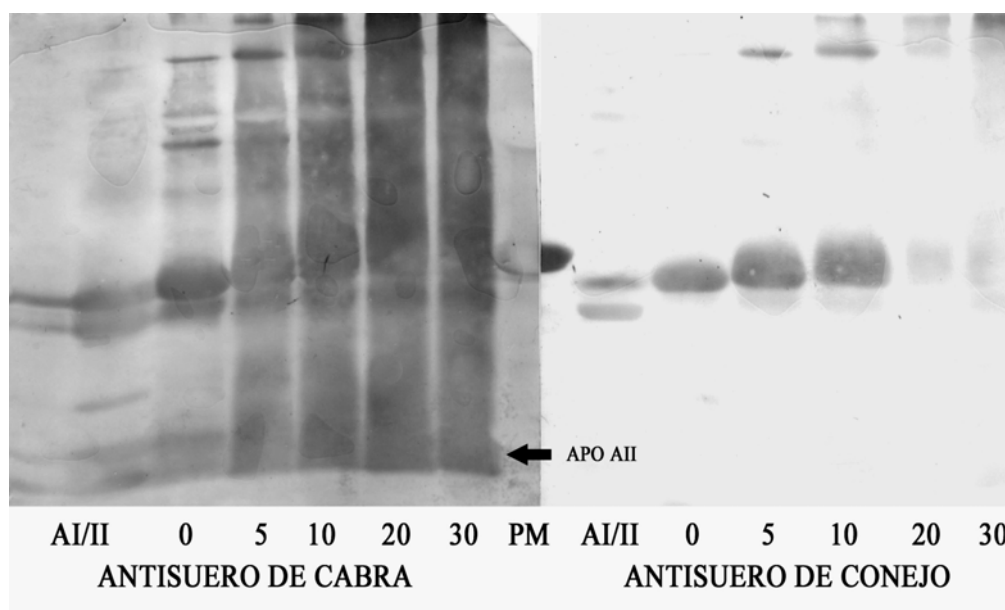


Figura 39: Western Blot de HDL humana peroxidada a distintos tiempos (0,5,10,20 y 30 minutos) que muestra la especificidad del anticuerpo producido en nuestro laboratorio. Nótese que el anticuerpo hecho en cabra reconoce además Apo AII y Apo AI peroxidada.

6.3.2 Otros anticuerpos utilizados

El antisuero de cabra anti-Apo AI-AII (anti HDL) usado como control fue un generoso regalo del Dr. Petar Alaupovic (Lipid and Lipoprotein Laboratory at the Oklahoma Medical Research Foundation.). El antisuero de rata anti-Apo B fue una donación del Dr. Edilberto Rubiolo. El fragmento F(ab)2 de anticuerpo de cabra contra conejo conjugado con FITC (Isotiocianato de fluoresceína) fueron comprados a Sigma-Aldrich. El anticuerpo anti VLDLR fue donado por la Dra. Keith McCrae (Case Western Reserve University School of Medicine

USA). El anticuerpo monoclonal anti-LRP fue una generosa donación del grupo del Dr. Chiabrando. El anticuerpo anti-StarD7 fue generosamente provisto por las Dras. Susana Genti y Sofía Angeletti.

6.4 Otras determinaciones

6.4.1 Determinación de proteínas

Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Lowry modificado por Peterson (165).

6.4.2 Determinación de colesterol

La determinación cuantitativa del colesterol se realizó con un kit comercial (GTLab, Rosario, Argentina) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el colesterol libre de la muestra y el proveniente de la hidrólisis de los ésteres de colesterol por acción de la enzima colesterol esterasa, es oxidado a delta 4-colestona por acción de la enzima colesterol oxidasa. El peróxido de hidrógeno producido, en presencia de peroxidasa, 4-aminofenazona y fenol, forma una quinoneimina con un pico de absorción a 505 nm. La intensidad de color es proporcional a la concentración de colesterol de la muestra.

6.4.3 Análisis Estadístico

Los datos se presentan como promedio \pm E.S y fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA factorial utilizando el software XXX para MS EXCEL. En todos los análisis, un valor de $p \leq 0,02$ fue considerado estadísticamente significativo.

6.5 Cultivos celulares

6.5.1 Esquema experimental general

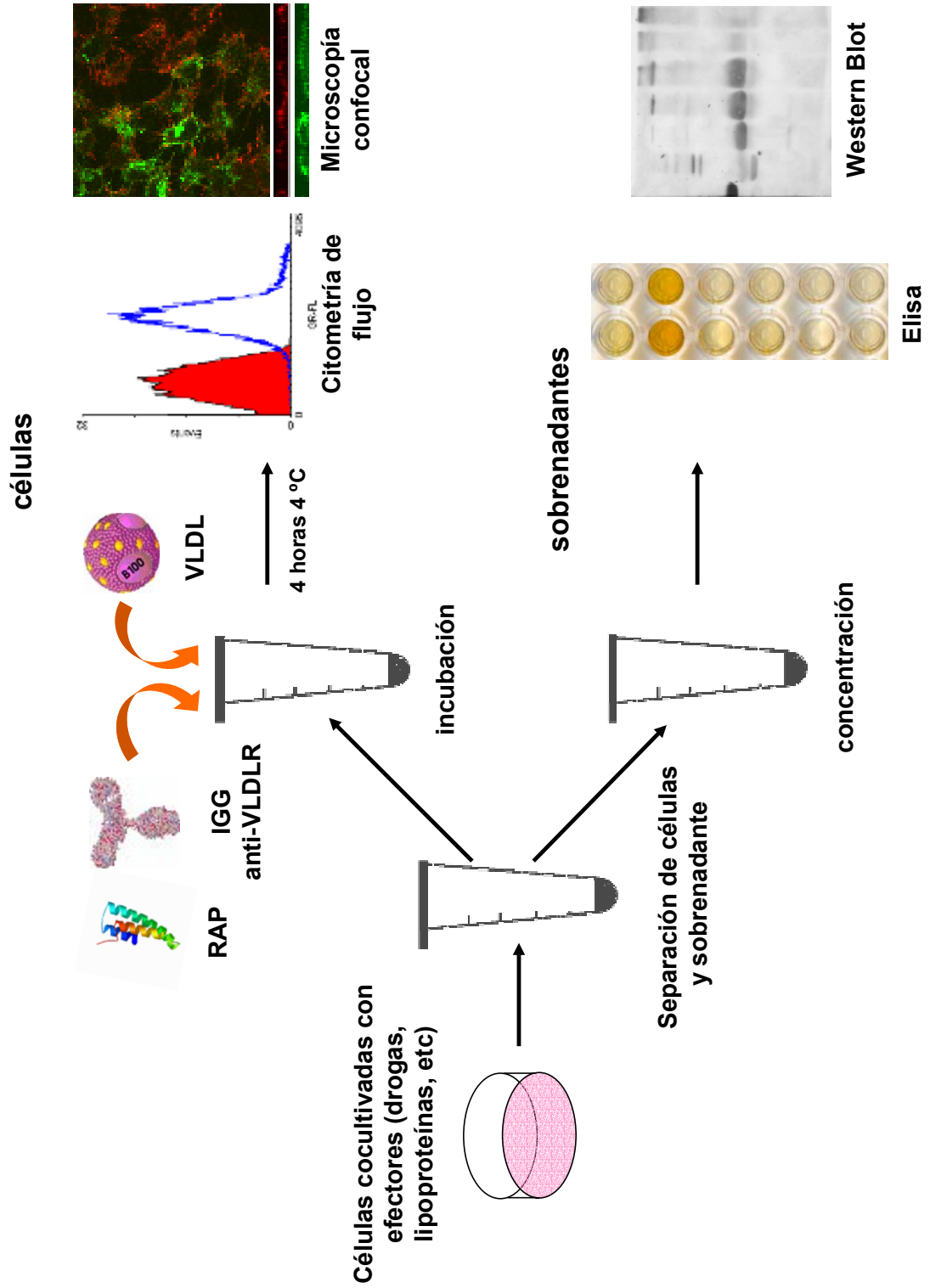


Figura 40: Esquema experimental general utilizado en los distintos experimentos

6.5.2 Cultivos celulares de células hepatocitarias

Las células HepG2 (derivadas de hepatoblastoma humano) fueron cultivadas en cápsulas de Petri de 100 mm con medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco, USA) adicionado con glutamina (4 mM) y gentamicina (1 μ l/ml). En estas condiciones (cultivo sin lipoproteínas provenientes del suero fetal bovino) cuando las células llegan a confluencia expresan el receptor de LDL y producen las apolipoproteínas y lipoproteínas que se acumulan en el medio, razón por la cual esta línea celular es ampliamente usada para estudiar el metabolismo de las lipoproteínas (164). Para los experimentos de citometría de flujo como de acumulación de apolipoproteínas en el medio condicionado las células se sembraron en cápsulas de Petri de 35 mm, se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) y se incubaron en DMEM suplementado con 10% LPDS junto con los distintos efectores. Luego del periodo de co-cultivo, se recolectó el sobrenadante, el cual fue centrifugado para eliminar células y debris celular, se les agregó inhibidor de proteasas, se alicuotaron en tubos eppendorf y se guardaron a -70 °C hasta su uso. Las células fueron levantadas con PBS/EDTA 2 mM para los ensayos de citometría de flujo, o bien fueron levantadas con tampón de lisis fuerte RIPA con inhibidores de proteasas para recuperar la proteína celular y guardadas a -70 °C hasta su uso (Figura 40).

6.5.3 Cultivos celulares de células monocíticas THP-1

Las células THP-1, línea celular monocítica humana, fueron mantenidas capsulas T75 en RPMI-1640 (DMEM, Gibco, USA) adicionado con glutamina (4 mM) y gentamicina (1 μ l/ml) y 5% de suero fetal bovino (SFB). El medio de cultivo se renovó una vez por semana.

6.5.4 Purificación de células mononucleares de bazo de ratón (CMB)

Se extrajeron bazos provenientes de ratones Balb-c (CNEA, Argentina) de entre 6 y 8 semanas de los cuales se obtuvieron suspensiones de células mediante homogenización. Los eritrocitos fueron lisados mediante una breve incubación en 8,3 g/l NH₄Cl en tampón 0,01 mol/l de Tris-HCl, pH 7,5 (tampón de lisis de glóbulos rojos, Sigma, Argentina). Las células remanentes fueron lavadas 3 veces con RPMI-1640 y utilizadas inmediatamente.

7. Referencias

1. Genest, J. and J. Genest, *Lipoprotein disorders and cardiovascular risk*. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2003. **26**: p. 267-87.
2. Vance, D.E. and J.E. Vance, *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 3 ed. New Comprehensive Biochemistry, ed. D. Vance and J. Vance. 1996, Amsterdam Elsevier.
3. Tulenko, T. and A. Sumner, *The physiology of lipoproteins*. Journal of nuclear cardiology : official publication of the American Society of Nuclear Cardiology, 2002. **9**(6): p. 638-49.
4. Mahley, R.W., et al., *Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function*. J Lipid Res, 1984. **25**(12): p. 1277-94.
5. Herz, J., et al., *Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor*. Embo Journal, 1988. **7**(13): p. 4119-27.
6. Mann, C.J., et al., *Inhibitory Effects of Specific Apolipoprotein C-III Isoforms on the Binding of Triglyceride-rich Lipoproteins to the Lipolysis-stimulated Receptor*. J. Biol. Chem., 1997. **272**(50): p. 31348-54.
7. Navab, M., et al., *HDL and the Inflammatory Response Induced by LDL-Derived Oxidized Phospholipids*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(4): p. 481-8.
8. Willnow, T.E., A. Nykjaer, and J. Herz, *Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(6): p. E157-62.
9. Herz, J. and U. Beffert, *Apolipoprotein E receptors: linking brain development and alzheimer's disease*. Nat Rev Neurosci, 2000. **1**(1): p. 51-8.
10. Willnow, T.E., et al., *Functional expression of low density lipoprotein receptor-related protein is controlled by receptor-associated protein in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(10): p. 4537-41.
11. Rohlmann, A., et al., *Inducible Inactivation of Hepatic LRP Gene by Cre-mediated Recombination Confirms Role of LRP in Clearance of Chylomicron Remnants*. J. Clin. Invest., 1998. **101**(3): p. 689-95.
12. Krieger, M. and J. Herz, *Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP)*. Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 601-37.
13. Herz, J., *The LDL receptor gene family: (un)expected signal transducers in the brain*. Neuron, 2001. **29**(3): p. 571-81.
14. Liu, Y., et al., *Uptake of HIV-1 Tat protein mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein disrupts the neuronal metabolic balance of the receptor ligands*. Nat Med, 2000. **6**(12): p. 1380-7.
15. Acton, S., et al., *Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor*. Science, 1996. **271**(5248): p. 518-20.
16. Stangl, H., et al., *Scavenger Receptor, Class B, Type I-dependent Stimulation of Cholesterol Esterification by High Density Lipoproteins*,

-
- Low Density Lipoproteins, and Nonlipoprotein Cholesterol*. J. Biol. Chem., 1998. **273**(47): p. 31002-8.
17. Krieger, M., *The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense*. Curr Opin Lipidol, 1997. **8**(5): p. 275-80.
 18. MacDougall, E.D., et al., *Aggressive very low-density lipoprotein (VLDL) and LDL lowering by gene transfer of the VLDL receptor combined with a low-fat diet regimen induces regression and reduces macrophage content in advanced atherosclerotic lesions in LDL receptor-deficient mice*. Am J Pathol, 2006. **168**(6): p. 2064-73.
 19. Kotokorpi, P., et al., *Physiological Differences between Human and Rat Primary Hepatocytes in Response to Liver X Receptor Activation by 3-[3-[N-(2-Chloro-3-trifluoromethylbenzyl)-(2,2-diphenylethyl)amino]propyloxy]phenylacetic Acid Hydrochloride (GW3965)*. Mol Pharmacol, 2007. **72**(4): p. 947-55.
 20. Sirvent, A., et al., *The farnesoid X receptor induces very low density lipoprotein receptor gene expression*. FEBS Letters, 2004. **566**(1-3): p. 173-7.
 21. Degrace, P., et al., *Upregulation of liver VLDL receptor and FAT/CD36 expression in LDLR-/- apoB100/100 mice fed trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid*. J. Lipid Res. , 2006. **47**(12): p. 2647-55.
 22. Tiebel, O., et al., *Mouse very low-density lipoprotein receptor (VLDLR): gene structure, tissue-specific expression and dietary and developmental regulation*. Atherosclerosis, 1999. **145**(2): p. 239-51.
 23. Tran, H., et al., *Modulation of the LDL receptor and LRP levels by HIV protease inhibitors*. J. Lipid Res., 2003. **44**(10): p. 1859-69.
 24. Nakazato, K., et al., *Expression of very low density lipoprotein receptor mRNA in circulating human monocytes: its up-regulation by hypoxia*. Atherosclerosis, 2001. **155**(2): p. 439-44.
 25. Takahashi, S., et al., *The Very Low-density Lipoprotein (VLDL) Receptor: Characterization and Functions as a Peripheral Lipoprotein Receptor*. Journal of Atherosclerosis and thrombosis, 2004. **11**: p. 200-8.
 26. Enslin, K., et al., *Dexamethasone stimulates very low density lipoprotein (VLDL) receptor gene expression in differentiating 3T3-L1 cells*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Molecular and Cell Biology of Lipids, 2002. **1581**: p. 36-48.
 27. Kalaany, N.Y. and D.J. Mangelsdorf, *LXRS AND FXR: The Yin and Yang of Cholesterol and Fat Metabolism*. Annual Review of Physiology, 2006. **68**(1): p. 159-91.
 28. Takahashi, S., et al., *Rabbit Very Low Density Lipoprotein Receptor: A Low Density Lipoprotein density Receptor-Like Protein with Distinct Ligand Specificity*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(19): p. 9252-6.
 29. Webb, J.C., et al., *Characterization and tissue-specific expression of the human very low density lipoprotein (VLDL) receptor mRNA*. Hum. Mol. Genet., 1994. **3**(4): p. 531-7.
 30. Gafvels, M., et al., *Cloning of a complementary deoxyribonucleic acid encoding the murine homolog of the very low density lipoprotein/apolipoprotein-E receptor: expression pattern and assignment of the gene to mouse chromosome 19 [published erratum appears in*

-
- Endocrinology* 1995 Feb;136(2):795]. *Endocrinology*, 1994. **135**(1): p. 387-94.
31. Jokinen, E., et al., *Regulation of the very low density lipoprotein receptor by thyroid hormone in rat skeletal muscle*. *J. Biol. Chem.*, 1994. **269**(42): p. 26411-8.
 32. Semenkovich, C.F., et al., *Lipoprotein lipase and hepatic lipase mRNA tissue specific expression, developmental regulation, and evolution*. *J. Lipid Res.*, 1989. **30**(3): p. 423-31.
 33. Trommsdorff, M., et al., *Reeler/disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2*. *Cell*, 1999. **97**(6): p. 689-701.
 34. Cooper, J. and B. Howell, *Lipoprotein receptors: signaling functions in the brain?* *Cell*, 1999. **97**(6): p. 671-4.
 35. Trommsdorff, M., et al., *Interaction of Cytosolic Adaptor Proteins with Neuronal Apolipoprotein E Receptors and the Amyloid Precursor Protein*. *J. Biol. Chem.*, 1998. **273**(50): p. 33556-60.
 36. Sakai, J., et al., *Structure, chromosome location, and expression of the human very low density lipoprotein receptor gene*. *J. Biol. Chem.*, 1994. **269**(3): p. 2173-82.
 37. Rettenberger, P.M., et al., *Ligand Binding Properties of the Very Low Density Lipoprotein Receptor. ABSENCE OF THE THIRD COMPLEMENT-TYPE REPEAT ENCODED BY EXON 4 IS ASSOCIATED WITH REDUCED BINDING OF Mr 40,000 RECEPTOR-ASSOCIATED PROTEIN*. *J. Biol. Chem.*, 1999. **274**(13): p. 8973-80.
 38. Patel, D., et al., *Synthesis and properties of the very-low-density-lipoprotein receptor and a comparison with the low-density-lipoprotein receptor*. *Biochem. J.*, 1997. **324**: p. 371-7.
 39. Hegele, R.A., J.H. Brunt, and P.W. Connelly, *Multiple Genetic Determinants of Variation of Plasma Lipoproteins in Alberta Hutterites*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. **15**(7): p. 861-71.
 40. Haines, J.L., et al., *Functional Candidate Genes in Age-Related Macular Degeneration: Significant Association with VEGF, VLDLR, and LRP6*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2006. **47**(1): p. 329-35.
 41. Okuizumi, K., et al., *Genetic association of the very low density lipoprotein (VLDL) receptor gene with sporadic Alzheimer's disease*. *Nat Genet*, 1995. **11**(2): p. 207-9.
 42. Helbecque, N., et al., *The Role of a Triplet Repeat Sequence of the Very Low Density Lipoprotein Receptor Gene in Plasma Lipid and Lipoprotein Level Variability in Humans*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(11): p. 2759-64.
 43. Ruiz, J., et al., *The apoE isoform binding properties of the VLDL receptor reveal marked differences from LRP and the LDL receptor*. *J. Lipid Res.*, 2005. **46**(8): p. 1721-31.
 44. Goudriaan, J.R., et al., *The VLDL receptor plays a major role in chylomicron metabolism by enhancing LPL-mediated triglyceride hydrolysis*. *J. Lipid Res.*, 2004. **45**(8): p. 1475-81.
 45. Sakthivel, R., et al., *Regulation of the Ligand Binding Activity of the Human Very Low Density Lipoprotein Receptor by Protein Kinase C-dependent Phosphorylation*. *J. Biol. Chem.*, 2001. **276**(1): p. 555-62.

-
46. Pickup, J.C., *Inflammation and Activated Innate Immunity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes*. *Diabetes Care*, 2004. **27**(3): p. 813-23.
 47. Pearson, T.A., et al., *Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice: A Statement for Healthcare Professionals From the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association*. *Circulation*, 2003. **107**(3): p. 499-511.
 48. Weiler-Normann, C. and B. Rehermann, *The liver as an immunological organ*. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2004. **19**: p. S279-S83.
 49. Khovidhunkit, W., et al., *Thematic review series: The Pathogenesis of Atherosclerosis. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism mechanisms and consequences to the host*. *J. Lipid Res.*, 2004. **45**(7): p. 1169-96.
 50. Fruchart, J.C., B. Staels, and P. Duriez, *The role of fibric acids in atherosclerosis*. *Curr Atheroscler Rep*, 2001. **3**(1): p. 83-92.
 51. Staels, B., et al., *Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPAR α but not by PPAR γ activators*. *Nature*, 1998. **393**(6687): p. 790-3.
 52. Barbier, O., et al., *Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(5): p. 717-26.
 53. Elisaf, M., *Effects of Fibrates on Serum Metabolic Parameters*. *Current Medical Research and Opinion*, 2002. **18**: p. 269-76.
 54. Chen, Y.E., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptors and the cardiovascular system*. *Vitam Horm*, 2003. **66**: p. 157-88.
 55. Jonkers, I.J., et al., *Severe hypertriglyceridemia with insulin resistance is associated with systemic inflammation: reversal with bezafibrate therapy in a randomized controlled trial*. *Am J Med*, 2002. **112**(4): p. 275-80.
 56. Zhao, S.P., et al., *Gemfibrozil reduces release of tumor necrosis factor- α in peripheral blood mononuclear cells from healthy subjects and patients with coronary heart disease*. *Clin Chim Acta*, 2003. **332**(1-2): p. 61-7.
 57. Xu, X., et al., *PPAR α and GR Differentially Down-Regulate the Expression of Nuclear Factor- κ B-Responsive Genes in Vascular Endothelial Cells*. *Endocrinology*, 2001. **142**(8): p. 3332-9.
 58. Okopien, B., et al., *The effect of statins and fibrates on interferon-gamma and interleukin-2 release in patients with primary type II dyslipidemia*. *Atherosclerosis*, 2004. **176**(2): p. 327-35.
 59. Rizos, E., et al., *Effect of Ciprofibrate on Lipoproteins, Fibrinogen, Renal Function, and Hepatic Enzymes*. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 2002. **7**(4): p. 219-26.
 60. Kon Koh, K., et al., *Effects of fenofibrate on lipoproteins, vasomotor function, and serological markers of inflammation, plaque stabilization, and hemostasis*. *Atherosclerosis*, 2004. **174**(2): p. 379-83.
 61. Wang, T.D., et al., *Efficacy of fenofibrate and simvastatin on endothelial function and inflammatory markers in patients with combined hyperlipidemia: relations with baseline lipid profiles*. *Atherosclerosis*, 2003. **170**(2): p. 315-23.

-
62. Bilz, S., et al., *Effects of atorvastatin versus fenofibrate on apoB-100 and apoA-I kinetics in mixed hyperlipidemia*. J. Lipid Res., 2004. **45**(1): p. 174-85.
 63. Briand, F., et al., *Effects of atorvastatin on high-density lipoprotein apolipoprotein A-I metabolism in dogs*. European Journal of Clinical Investigation, 2006. **36**: p. 224-30.
 64. Calder, P.C., *Polyunsaturated fatty acids and inflammation*. Biochem. Soc. Trans., 2005. **33**(Pt 2): p. 423-7.
 65. Calder, P.C., *Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity*. Lipids., 2001. **36**(9): p. 1007-24.
 66. Meydani, S.N., et al., *Immunologic effects of national cholesterol education panel step-2 diets with and without fish-derived N-3 fatty acid enrichment*. J Clin Invest, 1993. **92**(1): p. 105-13.
 67. Caughey, G.E., et al., *The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil*. Am. J. Clinical Nutrition, 1996. **63**(1): p. 116-22.
 68. Sperling, R.I., et al., *Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils*. J Clin Invest., 1993. **91**(2): p. 651-60.
 69. Gallin, J.I., D. Kaye, and W.M. O'Leary, *Serum lipids in infection*. N Engl J Med, 1969. **281**: p. 1081-6.
 70. Grunfeld, C., et al., *Circulating interferon-alpha levels and hypertriglyceridemia in the acquired immunodeficiency syndrome*. Am J Med, 1991. **90**: p. 154-62.
 71. Grunfeld, C., et al., *Lipids, lipoproteins, triglyceride clearance, and cytokines in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome*. J Clin Endocrinol Metab, 1992. **74**: p. 1045-52.
 72. Hellerstein, M.K., et al., *Increased de novo hepatic lipogenesis in human immunodeficiency virus infection*. J Clin Endocrinol Metab, 1993. **76**: p. 559-65.
 73. Nonogaki, K., et al., *Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats*. Endocrinology, 1995. **136**: p. 2143-9.
 74. Nonogaki, K., et al., *Lipoteichoic acid stimulates lipolysis and hepatic triglyceride secretion in rats in vivo*. J Lipid Res, 1995. **36**: p. 1987-95.
 75. Memon, R.A., et al., *Differential effects of interleukin- 1 and tumor necrosis factor on ketogenesis*. Am J Physiol, 1992. **263**: p. E301-9.
 76. Memon, R.A., et al., *Tumor necrosis factor mediates the effects of endotoxin on cholesterol and triglyceride metabolism in mice*. Endocrinology, 1993. **132**: p. 2246-53.
 77. Feingold, K.R., et al., *Endotoxin rapidly induces changes in lipid metabolism that produce hypertriglyceridemia: low doses stimulate hepatic triglyceride production while high doses inhibit clearance*. J Lipid Res, 1992. **33**: p. 1765-76.
 78. Hardardóttir, I., C. Grunfeld, and K.R. Feingold, *Effects of endotoxin and cytokines on lipid metabolism*. Curr Opin Lipidol, 1994. **5**: p. 207-15.
 79. Feingold, K.R., et al., *Tumor necrosis factor stimulates hepatic lipid synthesis and secretion*. Endocrinology, 1989. **124**: p. 2336-42.
 80. Feingold, K.R., et al., *Multiple cytokines stimulate hepatic lipid synthesis in vivo*. Endocrinology, 1989. **125**: p. 267-74.

-
81. Krauss, R.M., et al., *Tumor necrosis factor acutely increases plasma levels of very low density lipoproteins of normal size and composition*. *Endocrinology*, 1990. **127**: p. 1016–21.
 82. Memon, R.A., et al., *Endotoxin and cytokines increase hepatic sphingolipid biosynthesis and produce lipoproteins enriched in ceramides and sphingomyelin*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. **18**: p. 1257–65.
 83. Memon, R.A., et al., *Regulation of Glycosphingolipid Metabolism in Liver during the Acute Phase Response*. *J. Biol. Chem.*, 1999. **274**(28): p. 19707-13.
 84. Chatterjee, S.B., et al., *Accumulation of glycosphingolipids in human atherosclerotic plaque and unaffected aorta tissues*. *Glycobiology*, 1997. **7**: p. 57–65.
 85. Redgrave, T.G., et al., *Effects of sphingomyelin and phosphatidylcholine acyl chains on the clearance of triacylglycerol-rich lipoproteins from plasma. Studies with lipid emulsions in rats*. *Biochim Biophys Acta*, 1992. **1126**: p. 65–72.
 86. Vreugdenhil, A.C.E., et al., *LPS-binding protein circulates in association with apoB-containing lipoproteins and enhances endotoxin-LDL/VLDL interaction*. *J. Clin. Invest.*, 2001. **107**(2): p. 225-34.
 87. Rowe, I.F., et al., *Circulating human C-reactive protein binds very low density lipoproteins*. *Clin Exp Immunol*, 1984. **58**(1): p. 237-44.
 88. Dixon, J.L., et al., *Increased atherosclerosis in diabetic dyslipidemic swine: protection by atorvastatin involves decreased VLDL triglycerides but minimal effects on the lipoprotein profile*. *J. Lipid Res.*, 2002. **43**(10): p. 1618-29.
 89. Saraswathi, V. and A.H. Hasty, *The role of lipolysis in mediating the proinflammatory effects of very low density lipoproteins in mouse peritoneal macrophages*. *J. Lipid Res.*, 2006. **47**(7): p. 1406-15.
 90. Sammalkorpi, K., et al., *Changes in serum lipoprotein pattern induced by acute infections*. *Metabolism*, 1988. **37**: p. 859–65.
 91. Feingold, K.R., et al., *Effect of endotoxin on cholesterol biosynthesis and distribution in serum lipoproteins in Syrian hamsters*. *J Lipid Res*, 1993. **34**: p. 2147–58.
 92. Cabana, V.G., J.N. Siegel, and S.M. Sabesin, *Effects of the acute phase response on the concentration and density distribution of plasma lipids and apolipoproteins*. *J Lipid Res*, 1989. **30**: p. 39–49.
 93. Auerbach, B.J. and J.S. Parks, *Lipoprotein abnormalities associated with lipopolysaccharide- induced lecithin:cholesterol acyltransferase and lipase deficiency*. *J Biol Chem*, 1989. **264**: p. 10264–70.
 94. Ettinger, W.H., et al., *Lipopolysaccharide and tumor necrosis factor cause a fall in plasma concentration of lecithin: cholesterol acyltransferase in cynomolgus monkeys*. *J Lipid Res*, 1990. **31**: p. 1099–107.
 95. Feingold, K.R., et al., *Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response*. *Atherosclerosis*, 1998. **139**: p. 307–15.
 96. Hardardóttir, I., et al., *Endotoxin and cytokines increase hepatic messenger RNA levels and serum concentrations of apolipoprotein J (clusterin) in Syrian hamsters*. *J Clin Invest*, 1994. **94**: p. 1304–9.

-
97. Hoffman, J.S. and E.P. Benditt, *Changes in high density lipoprotein content following endotoxin administration in the mouse. Formation of serum amyloid protein-rich subfractions.* J Biol Chem, 1982. **257**: p. 10510–7.
 98. Ly, H., et al., *Endotoxin and TNF lead to reduced plasma LCAT activity and decreased hepatic LCAT mRNA levels in Syrian hamsters.* J Lipid Res, 1995. **36**: p. 1254–63.
 99. Hardardóttir, I., et al., *Endotoxin and cytokines decrease serum levels and extra hepatic protein and mRNA levels of cholesteryl ester transfer protein in syrian hamsters.* J Clin Invest, 1996. **97**: p. 2585–92.
 100. Feingold, K.R., et al., *Endotoxin and interleukin-1 decrease hepatic lipase mRNA levels.* Atherosclerosis, 1999. **142**: p. 379–87.
 101. Jiang, X.C. and C. Bruce, *Regulation of murine plasma phospholipid transfer protein activity and mRNA levels by lipopolysaccharide and high cholesterol diet.* J Biol Chem, 1995. **270**: p. 17133–8.
 102. Pruzanski, W., P. Vadas, and J. Browning, *Secretory non-pancreatic group II phospholipase A2: role in physiologic and inflammatory processes.* J Lipid Mediat, 1993. **8**: p. 161–7.
 103. Chen, Y., et al., *Inflammatory cytokines disrupt LDL-receptor feedback regulation and cause statin resistance: a comparative study in human hepatic cells and mesangial cells.* Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **293**(3): p. F680-7.
 104. Stopeck, A.T., et al., *Cytokine regulation of low density lipoprotein receptor gene transcription in HepG2 cells.* J. Biol. Chem., 1993. **268**(23): p. 17489-94.
 105. Kumar, A., et al., *Differential Roles of Extracellular Signal-regulated Kinase-1/2 and p38MAPK in Interleukin-1beta - and Tumor Necrosis Factor-alpha -induced Low Density Lipoprotein Receptor Expression in HepG2 Cells.* J. Biol. Chem., 1998. **273**(25): p. 15742-8.
 106. Wu, Y., et al., *Obesity-Related Glomerulopathy: Insights from Gene Expression Profiles of the Glomeruli Derived from Renal Biopsy Samples.* Endocrinology, 2006. **147**(1): p. 44-50.
 107. Liao, W., M. Rudling, and B. Angelin, *Endotoxin suppresses mouse hepatic low-density lipoprotein-receptor expression via a pathway independent of the toll-like receptor 4.* Hepatology, 1999. **30**(5): p. 1252-6.
 108. Grip, O., S. Janciauskiene, and S. Lindgren, *Pravastatin down-regulates inflammatory mediators in human monocytes in vitro.* European Journal of Pharmacology, 2000. **410**(1): p. 83-92.
 109. Zhang, X., et al., *Tissue-Type Plasminogen Activator and the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein Mediate Cerebral Ischemia-Induced Nuclear Factor- κ B Pathway Activation.* Am J Pathol, 2007. **171**(4): p. 1281-90.
 110. Hamik, A., et al., *Down-regulation of Monocyte Tissue Factor Mediated by Tissue Factor Pathway Inhibitor and the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein.* J. Biol. Chem., 1999. **274**(8): p. 4962-9.
 111. Overton, C.D., et al., *Deletion of Macrophage LDL Receptor-Related Protein Increases Atherogenesis in the Mouse.* Circ Res, 2007. **100**(5): p. 670-7.

-
112. Garner, B., et al., *Regulation of serum-induced lipid accumulation in human monocyte-derived macrophages by interferon-gamma. Correlations with apolipoprotein E production, lipoprotein lipase activity and LDL receptor-related protein expression.* *Atherosclerosis*, 1997. **128**(1): p. 47-58.
 113. LaDu, M.J., et al., *Apolipoprotein E Receptors Mediate the Effects of beta -Amyloid on Astrocyte Cultures.* *J. Biol. Chem.*, 2000. **275**(43): p. 33974-80.
 114. Li, C., et al., *Biochemical Alterations in the Retinas of Very Low-Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice: An Animal Model of Retinal Angiomatous Proliferation.* *Arch Ophthalmol*, 2007. **125**(6): p. 795-803.
 115. Olsavsky, K.M., et al., *Gene expression profiling and differentiation assessment in primary human hepatocyte cultures, established hepatoma cell lines, and human liver tissues.* *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2007. **222**(1): p. 42-56.
 116. Pegorier, J.-P., C.L. May, and J. Girard, *Control of Gene Expression by Fatty Acids.* *J. Nutr.*, 2004. **134**(9): p. 2444S-9.
 117. Wustner, D., et al., *Rapid nonvesicular transport of sterol between the plasma membrane domains of polarized hepatic cells.* *J Biol Chem*, 2002. **277**(33): p. 30325-36.
 118. Schmitt, M. and T. Grand-Perret, *Regulated turnover of a cell surface-associated pool of newly synthesized apolipoprotein E in HepG2 cells.* *J. Lipid Res.*, 1999. **40**(1): p. 39-49.
 119. Forcato, D., et al., *Respuesta del receptor de VLDL a estresores inflamatorios en hepatocitos y células de bazo de ratón.* *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 2007.
 120. Grove, R.I., et al., *Macrophage-derived factors increase low density lipoprotein uptake and receptor number in cultured human liver cells.* *J. Lipid Res.*, 1991. **32**(12): p. 1889-97.
 121. Shetty, S., et al., *Phosphatidylinositol-3-Kinase Regulates Scavenger Receptor Class B Type I Subcellular Localization and Selective Lipid Uptake in Hepatocytes.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(9): p. 2125-31.
 122. Forcato, D.O., et al., *Milk Fat Content Measurement by a Simple UV Spectrophotometric Method: An Alternative Screening Method.* *J. Dairy Sci.*, 2005. **88**(2): p. 478-81.
 123. Jiménez López, J.M., et al., *Hexadecylphosphocholine inhibits phosphatidylcholine biosynthesis and the proliferation of HepG2 cells.* *European Journal of Biochemistry*, 2002. **269**: p. 4649-55.
 124. Olayioye, M.A., et al., *The phosphoprotein StarD10 is overexpressed in breast cancer and cooperates with ErbB receptors in cellular transformation.* *Cancer Res*, 2004. **64**(10): p. 3538-44.
 125. Mahley, R.W. and Y. Huang, *Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring, and internalizing.* *J. Clin. Invest.*, 2007. **117**(1): p. 94-8.
 126. Twickler, T.B., et al., *Induction of Postprandial Inflammatory Response in Adult Onset Growth Hormone Deficiency Is Related to Plasma Remnant-Like Particle-Cholesterol Concentration.* *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. **88**(3): p. 1228-33.

-
127. Sampedro, M.C., et al., *VLDL Modulates the Cytokine Secretion Profile to a Proinflammatory Pattern*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. **285**: p. 393-9.
 128. Wu, X., et al., *Exogenous VLDL stimulates apolipoprotein B secretion from HepG2 cells by both pre- and post-translational mechanisms*. J. Lipid Res., 1994. **35**(7): p. 1200-10.
 129. Jin, F.-Y., et al., *Gemfibrozil Stimulates Apolipoprotein A-I Synthesis and Secretion by Stabilization of mRNA Transcripts in Human Hepatoblastoma Cell Line (Hep G2)*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 1996. **16**(8): p. 1052-62.
 130. Tam, S.P., *Effects of gemfibrozil and ketoconazole on human apolipoprotein AI, B and E levels in two hepatoma cell lines, HepG2 and Hep3B*. Atherosclerosis 1991. **91**((1-2)): p. 51-61.
 131. Moraes, L.A., L. Piqueras, and D. Bishop-Bailey, *Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation*. Pharmacology & Therapeutics, 2006. **110**(3): p. 371-85.
 132. Jackowski, S., *Cell Cycle Regulation of Membrane Phospholipid Metabolism*. J. Biol. Chem., 1996. **271**(34): p. 20219-22.
 133. Jackowski, S., *Coordination of membrane phospholipid synthesis with the cell cycle*. J. Biol. Chem., 1994. **269**(5): p. 3858-67.
 134. Jana, M., et al., *Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated up-regulation of I kappa B alpha in anti-inflammatory effect of gemfibrozil in microglia*. J Immunol, 2007. **179**(6): p. 4142-52.
 135. Maggiora, M., et al., *An overview of the effect of linoleic and conjugated-linoleic acids on the growth of several human tumor cell lines*. International Journal of Cancer, 2004. **112**(6): p. 909-19.
 136. Diry, M., et al., *Activation of the dioxin//aryl hydrocarbon receptor (AhR) modulates cell plasticity through a JNK-dependent mechanism*. Oncogene, 2006. **25**(40): p. 5570-4.
 137. Hoekstra, D., et al., *Membrane dynamics and cell polarity: the role of sphingolipids*. J. Lipid Res., 2003. **44**(5): p. 869-77.
 138. Pike, L., *Lipid rafts: heterogeneity on the high seas*. Biochem J, 2004. **378**(Pt 2): p. 281-92.
 139. Blank, N., et al., *Cholera toxin binds to lipid rafts but has a limited specificity for ganglioside GM1*. Immunol Cell Biol, 2007. **85**(5): p. 378-82.
 140. Atshaves, B.P., et al., *SCP-2/SCP-x gene ablation alters lipid raft domains in primary cultured mouse hepatocytes*. J. Lipid Res., 2007. **48**(10): p. 2193-211.
 141. Mazzone, A., et al., *Isolation and characterization of lipid microdomains from apical and basolateral plasma membranes of rat hepatocytes*. Hepatology, 2006. **43**(2): p. 287-96.
 142. Martinez-Botas, J., et al., *Cholesterol starvation decreases P34cdc2 kinase activity and arrests the cell cycle at G2*. FASEB J., 1999. **13**(11): p. 1359-70.
 143. Sampedro, M.C., et al., *VLDL Modulates the Cytokine Secretion Profile to a Proinflammatory Pattern*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. **285**: p. 393-9.
 144. Jin, F.-Y., et al., *Gemfibrozil Stimulates Apolipoprotein A-I Synthesis and Secretion by Stabilization of mRNA Transcripts in Human*

-
- Hepatoblastoma Cell Line (Hep G2)*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 1996. **16**(8): p. 1052-62.
145. Vu-Dac, N., et al., *The Nuclear Receptors Peroxisome Proliferator-activated Receptor alpha and Rev-erbalpha Mediate the Species-specific Regulation of Apolipoprotein A-I Expression by Fibrates*. *J. Biol. Chem.*, 1998. **273**(40): p. 25713-20.
146. Hiltunen, T.P., et al., *Expression of LDL receptor, VLDL receptor, LDL receptor-related protein, and scavenger receptor in rabbit atherosclerotic lesions: marked induction of scavenger receptor and VLDL receptor expression during lesion development*. *Circulation*, 1998. **97**(11): p. 1079-86.
147. Tacke, P.J., et al., *Living up to a name: the role of the VLDL receptor in lipid metabolism*. *Curr Opin Lipidol*, 2001. **12**(3): p. 275-9.
148. Tacke, P.J., et al., *VLDL receptor deficiency enhances intimal thickening after vascular injury but does not affect atherosclerotic lesion area*. *Atherosclerosis*, 2002. **162**(1): p. 103-10.
149. Goudriaan, J.R., et al., *Protection From Obesity in Mice Lacking the VLDL Receptor*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**(9): p. 1488-93.
150. Kamataki, A., et al., *Remnant lipoprotein particles are taken up into myocardium through VLDL receptor--a possible mechanism for cardiac fatty acid metabolism*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **293**(3): p. 1007-13.
151. Oka, K., et al., *Long-Term Stable Correction of Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice With a Helper-Dependent Adenoviral Vector Expressing the Very Low-Density Lipoprotein Receptor*. *Circulation*, 2001. **103**(9): p. 1274-81.
152. Iwasaki, T., et al., *Deficiency of the Very Low-Density Lipoprotein (VLDL) Receptors in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Insulin Dependency of the VLDL Receptor*. *Endocrinology*, 2005. **146**(8): p. 3286-94.
153. Vaziri, N.D. and K. Liang, *Down-regulation of VLDL receptor expression in chronic experimental renal failure*. *Kidney Int*, 1997. **51**(3): p. 913-9.
154. Liang, K. and N.D. Vaziri, *Acquired VLDL receptor deficiency in experimental nephrosis*. *Kidney Int*, 1997. **51**(6): p. 1761-5.
155. Claudel, T., et al., *Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element*. *J Clin Invest*, 2002. **109**(7): p. 961-71.
156. Kyrklund, C., et al., *Gemfibrozil increases plasma pravastatin concentrations and reduces pravastatin renal clearance[ast]*. *Clin Pharmacol Ther*, 2003. **73**(6): p. 538-44.
157. Kim, M.S., et al., *Repression of farnesoid X receptor during the acute phase response*. *J. Biol. Chem.*, 2003: p. M212633200.
158. Zhao, A., et al., *Polyunsaturated fatty acids are FXR ligands and differentially regulate expression of FXR targets*. *DNA Cell Biol*, 2004. **23**(8): p. 519-26.
159. Masuzaki, H., et al., *Regulation of Very-Low-Density Lipoprotein Receptor in Hypertrophic Rat Heart*. *Circ Res*, 1996. **78**(1): p. 8-14.
160. Forcato, D.O., R.P. Pécora, and S.C. Kivatinitz, *On-line biomass monitoring in bench-scale stirred bioreactors using parts of a liquid chromatography system*. *Biotechnology Letters*, 2002. **24**(23): p. 1999-2003.

-
161. Nicoletti, I., et al., *A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry*. Journal of Immunological Methods, 1991. **139**(2): p. 271-9.
 162. Stein, E.A., et al., *Enzyme-linked immunoabsorbant assay of apolipoprotein All in plasma, with use of a monoclonal antibody*. Clin Chem, 1986. **32**(6): p. 967-71.
 163. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
 164. Javitt, N.B., *Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids*. FASEB J, 1990. **4**(2): p. 161-8.
 165. Peterson, G.L., *A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable*. Anal Biochem, 1977. **83**(2): p. 346-56.