

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

DARÍO GERMAN FERRER



Departamento de Bioquímica Clínica

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología

CIBICI – CONICET

Córdoba, Argentina

Año 2016

**ESTUDIO DE LOS ASPECTOS MOLECULARES Y CELULARES
INVOLUCRADOS EN LA ATEROESCLEROSIS.**

**Expresión y función del sistema
 α_2 -macroglobulina/LRP1 en monocitos de sangre periférica
y macrófagos.**

DIRECTOR DE TESIS

**Prof. Dr. Gustavo Alberto
Chiabrando**

COMISIÓN ASESORA

**Prof. Dra. Claudia M. Castro
(miembro propuesto por el Director)**

Prof. Dra. Marta E. Hallak

Prof. Dra. Virginia E. Rivero

EVALUADOR EXTERNO

Prof. Dr. Cesar Horacio Casale

Este trabajo de tesis se realizó gracias al aporte de las Becas de Posgrado Tipo I y II del CONICET y a los siguientes subsidios provistos por las siguientes instituciones: CONICET (PIP 2012-2014 Proyecto N° 11220110100775), FONCYT (PICT-2012-2607 y PICTO-GLAXO 2012-0084) y SECyT-UNC (Res N° 124/13 y 162/12).

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SIGLAS	<i>i</i>
RESUMEN	<i>vi</i>
SUMMARY	<i>viii</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Aterosclerosis: consideraciones generales de la etiopatogenia	1
1.2 Monocitos y Aterosclerosis	4
1.3 Participación de las α -Macroglobulinas en la inflamación	5
1.4 El receptor de las α -Macroglobulinas activadas: LRP1	8
1.5 La migración celular y el sistema α_2 M/LRP1.	11
1.6 El sistema α_2 M/LRP1, monocitos y Aterosclerosis.	15
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo general	19
2.2 Objetivos específicos	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 Materiales	21
3.1.1 Químicos	21
3.1.2 Material de laboratorio	21
3.1.3 Equipamiento	22
3.1.4 Kits y reactivos	22
3.1.5 Anticuerpos	23
3.1.6 Medios, <i>buffers</i> y soluciones	24
3.1.7 Líneas celulares	27
3.1.8 Software	28
3.2 Métodos	28
3.2.1 Animales y Dietas	28
3.2.2 Grupos de pacientes	28
3.2.3 Métodos de biología celular	29
3.2.4 Métodos bioquímicos	32
3.2.5 Adquisición de imágenes de microscopía	37
3.2.6 Procedimientos para cuantificación de imágenes y análisis estadístico de los datos	37
4. RESULTADOS	40
4.1 Estudio de los mecanismos moleculares que regulan la migración de monocitos-macrófagos a través del sistema α_2M/LRP1	40

4.1.1 Efecto migratorio inducido por el sistema α_2M /LRP1 en la línea celular RAW264.7.	40
4.1.2 Fenotipo migratorio inducido por la interacción α_2M^* /LRP1.	41
4.1.2.1 Evaluación de proteinasas secretorias (MMP-2 y MMP-9) y de membrana (MT1-MMP).	42
4.1.2.2 Remodelación del citoesqueleto celular en células RAW264.7 estimuladas con α_2M^* .	45
4.1.2.3 El señalamiento intracelular activado por el el sistema α_2M /LRP1 media la producción del modo migratorio mesenquimal en macrófagos.	47
4.1.3 Asociación de LRP1 con proteínas involucradas en la adhesión y migración celular.	49
4.1.3.1 Participación de LRP1 en la formación de adhesiones focales.	49
4.1.3.2 Asociación molecular de LRP1 con integrinas.	52
4.1.4 Efecto redistributivo de LRP1 hacia los procesos celulares generados por el estímulo con α_2M^* .	54
4.1.5 Principales Conclusiones	56
4.2. Expresión y función de LRP1 en subpoblaciones de monocitos de sangre periférica murina.	57
4.2.1. Caracterización del modelo murino KO-ApoE ^{-/-}	57
4.2.2 Estudio de la expresión de LRP1 de monocitos de ratón por citometría de flujo.	60
4.2.3 Estudio de la expresión de LRP1 en subpoblaciones de monocitos murinos C57BL/6J - KO-ApoE ^{-/-} .	63
4.2.4 Principales Conclusiones	65
4.3. Expresión de LRP1 en subpoblaciones de monocitos en sangre periférica humana.	65
4.3.1 Estudio de la expresión de LRP1 de monocitos humanos por citometría de flujo.	67
4.3.2 Estrategia de identificación de subpoblaciones de monocitos humanos basada en la marcación monocítica de LRP1.	68
4.3.4 Expresión diferencial de LRP1 en subpoblaciones de monocitos humanos.	74
4.3.5 Expresión diferencial de LRP1 en subpoblaciones de monocitos humanos estimuladas con α_2M^* .	76
4.3.6 Principales Conclusiones	78
5. DISCUSIÓN	80
5.1 Caracterización de los mecanismos moleculares que regulan la migración y activación de monocitos y monocitos-macrófagos a través del sistema α_2M/LRP1	80
5.2 Expresión de LRP1 en las diferentes subpoblaciones de monocitos en sangre periférica de ratón	85
5.3 Expresión de LRP1 en las diferentes subpoblaciones de monocitos en sangre periférica humana	87
5.4 Perspectivas	91
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
7. ADENDA	102
7.1 Presentaciones a congresos	103
7.1.2 Congresos nacionales	103
7.1.2 Congresos internacionales	104
7.2 Publicaciones	105
7.2.1 Publicación de resultados del presente trabajo de tesis	105
7.2.2 Otras publicaciones	105

ABREVIATURAS Y SIGLAS

ADAMTS	<i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>
agLDLs	lipoproteínas de baja densidad agregadas
α -M	alfa-Macroglobulina
α_2 M	alfa 2-Macroglobulina
α_2 M*	forma activa de α_2 M
AMPC	adenosín monofosfato cíclico
AP2	<i>adaptor-related protein complex 2</i>
APBB1	<i>amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1</i>
apoE	apolipoproteína E
apoER2	<i>apolipoprotein E receptor 2</i>
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
ARNm	ARN mensajero
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C	componente del complemento
CAPON	<i>carboxyl-terminal PDZ ligand of neuronal nitric oxide synthase protein</i>
Cbl	<i>casitas B-lineage lymphoma</i>
CCV	<i>clathrin-coated vesicles</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>

CM	célula de Müller
CRE	compartimento de reciclado endocítico
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
D.O.	densidad óptica
Dab1	<i>disabled-1</i>
DIC	dominio intra-citoplasmático
DTT	<i>Dithiothreito</i>
EAP	exotoxina A de <i>Pseudomonas</i>
EE	<i>early endosome</i>
EEA1	<i>early endosome antigen 1</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGF-R	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EM	<i>electron microscopy</i>
F-actina	actina polimerizada
FAK	quinasa de adhesión focal
FD	fluorescencia directa
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FN	dominio fibronectina
FSC	<i>foward side scatter</i>
GAG	Glicosaminoglicano
GDP	<i>guanosine diphosphate</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	<i>green fluorescence protein</i>

GLUP	<i>glucose/galactose transporter protein</i>
GLUT4	<i>glucose transporter type 4</i>
GM130	<i>golgi matrix protrin</i>
GN	Granulocitos
GPI	<i>glycosylphosphatidylinositol-anchored protein</i>
GST	<i>glutathione S-transferase</i>
GTP	<i>guanosine triphosphate</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HF	hipercolesterolemia familiar
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSPG	<i>heparan sulfate proteoglycan</i>
ICAP-1	<i>integrin cytoplasmic domain-associated protein-1</i>
ICAM1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IFI	inmunofluorescencia indirecta
IMF	intensidad media de fluorescencia
IGF	<i>insulin growth factor</i>
IL	Interleuquina
ILK	quinasas unidas a integrinas
ILV	<i>intraluminal vesicle</i>
IP	Inmunoprecipitación
IRV	<i>insulin responsive vesicle</i>
JIP	<i>JNK-interacting protein</i>
NK	<i>natural killer cells</i>

LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LDLR	<i>low density lipoprotein receptor</i>
LE	<i>late endosome</i>
LPS	lipopolisacarido
LRP1	<i>low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
MAPK/ERK	<i>mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases</i>
MC	microscopía confocal
MCP1	monocyte chemoattractant protein1
MEC	matriz extracelular
MEGF7	<i>multiple epidermal growth factor-like domains 7</i>
MIO-M1	<i>Moorfields/Institute of Ophthalmology-Müller 1</i>
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i>
MP	membrana plasmática
MT1-MMP	<i>membrane type 1 matrix metalloproteinase</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
PBS	buffer fosfato salino
PDGFR β	<i>platelet-derived growth factor receptor β</i>
PMA	<i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PKB	<i>protein kinase B</i>
PSD95	<i>postsynaptic density protein 95</i>
PSGL-1	<i>P-selecting glycoprotein ligand -1</i>

PTB	<i>phosphotyrosine binding domain</i>
PZP	<i>pregnancy zone protein</i>
p-FAK	quinasa de adhesión focal fosforilada
RAP	<i>receptor associated protein</i>
RBD	<i>receptor binding domain</i>
ROS	especies reactivas de oxígeno
Shc	<i>src homology</i>
SSC	<i>side scatter</i>
SNX17	<i>sorting nexin 17</i>
TA	temperatura ambiente
TAC	tomografía axial computada
TSP	<i>Thrombospondin</i>
t-PA	<i>tissue-plasminogen activator</i>
uPA	<i>urokinase-type plasminogen activator</i>
uPAR	<i>urokinase receptor</i>
VCAM1	<i>vascular cell adhesion protein 1</i>
VSMC	<i>vascular smooth muscle cells</i>
VLDLR	<i>very low density lipoprotein receptor</i>
WT	<i>wild type</i>

RESUMEN

La α_2 -macroglobulina (α_2 M) y su receptor LRP1 (por *lowdensitylipoprotein receptor-relatedprotein 1*) tienen una activa participación en el control de la proteólisis extracelular y activación del componente celular implicado en los procesos inflamatorios. En el presente trabajo de tesis doctoral se propuso dilucidar el rol del sistema α_2 M/LRP1 en la migración de macrófagos. Por otra parte, basados en la evidencia de que los monocitos cumplen un rol clave en el inicio y progresión de la aterosclerosis, y considerando que LRP1 está incrementado en el componente celular de la lesión aterosclerótica, resultó de interés investigar la expresión de este receptor en monocitos circulantes de ratón y humano.

A través de ensayos de *wound-healing* y microscopía confocal se demostró que α_2 M induce un aumento de la motilidad de células derivadas de monocito-macrófagos RAW264.7, promoviendo modo migratorio mesenquimal caracterizado por: i) redistribución subcelular de MT1-MMP, FAK, p-FAK y β 1-integrina hacia protrusiones celulares; ii) aumento de la secreción de MMP-9, polimerización de actina (F-actina); y iii) redistribución subcelular y tráfico intracelular de LRP1 hacia las protrusiones celulares. Por otra parte, también se estableció que α_2 M induce un aumento significativo en el nivel de colocalización de LRP1 con β 1-integrina en estructuras vesiculares que está próximas a las protrusiones celulares.

Empleando ensayos de citometría de flujo, se demostró que LRP1 se expresa en monocitos y no en otros componentes leucocitarios de sangre periférica, tales como linfocitos y neutrófilos, de ratones C57BL/6J. Esta expresión diferencial pan-leucocitaria de LRP1 permitió caracterizar tres subpoblaciones monocíticas: Ly6C^{hi}LRP1^{hi}, Ly6C^{hi}LRP1^{lo} y Ly6C^{lo}LRP1^{lo}. Por otra parte, también se demostró que los niveles de LRP1 disminuyeron

de manera significativa en la subpoblación monocítica murina Ly6C^{hi}LRP1^{hi} en ratones deficientes de la Apolipoproteína E (KO ApoE^{-/-}) con evidente presencia de placa aterosclerótica.

Por último, a través de ensayos de citometría de flujo basados en la detección de LRP1 como marcador monocítico se pudo identificar las diferentes subpoblaciones de monocitos circulantes humanos, a saber: clásicos [CD14⁺⁺CD16⁻], intermedios [CD14⁺⁺CD16⁺] y no clásicos [CD14⁺CD16⁺⁺]. A su vez, se demostró que las diferentes subpoblaciones de monocitos humanos expresan de manera diferencial LRP1, siendo significativamente mayor en monocitos clásicos e intermedios que en no clásicos. Finalmente, α_2 M* indujo cambios en la expresión de LRP1 a nivel de la superficie celular en las distintas subpoblaciones de monocitos humanos. Estos efectos también se asociaron con la producción de protrusiones celulares, similar a lo observado en células RAW264.7, siendo esto último más evidente en la subpoblación no clásica de monocitos.

En conclusión, en este trabajo de tesis se demostró que: i) el sistema α_2 M*/LRP1 induce la migración de macrófagos a través de un modo mesenquimal; ii) LRP1 es un marcador de monocitos que permite determinar la heterogeneidad de subpoblaciones; y iii) LRP1 se expresa de manera diferencial en cada subpoblación de monocitos circulantes de ratón y humano. Estos hallazgos le confieren a LRP1 un gran potencial en el diagnóstico clínico de enfermedad aterosclerótica, al ser utilizado como un biomarcador temprano de esta patología inflamatoria crónica.

SUMMARY

The α_2 -macroglobulin (α_2 M) and its receptor LRP1 (low density lipoprotein receptor-related protein 1) are involved in the extracellular proteolysis control and cellular component activation during inflammatory processes. In the present study we investigate the molecular mechanism of the macrophage migration induced by the α_2 M/LRP1 system. Moreover, based on the evidence that monocytes play a key role in the initiation and progression of atherosclerosis, and considering that LRP1 is increased in the cellular component of the atherosclerotic lesion, it was of interest to investigate the expression of this receptor in mouse and human monocytes.

Through wound-healing assays and confocal microscopy we demonstrate that α_2 M induces an increased cell motility of the monocyte-macrophage derived RAW264.7 cell line, promoting mesenchymal migration mode characterized by: i) subcellular distribution of MT1-MMP, FAK, p-FAK and β 1-integrin towards cellular protrusions; ii) increased MMP-9 secretion, and actin polymerization (F-actin); and iii) subcellular distribution and intracellular trafficking of LRP1 towards cell protrusions. Moreover, it was also established that α_2 M induces a significant increase of the colocalization level between LRP1 and β 1-integrin in vesicular structures of cellular protrusions.

Using flow cytometry assays, it was shown that LRP1 is expressed in monocytes but not in other peripheral blood leukocytes of C57BL/6J mice. This LRP1 monocyte expression allowed characterizing three monocytic subpopulations: Ly6C^{hi}LRP1^{hi}, Ly6C^{hi}LRP1^{lo} and Ly6C^{lo}LRP1^{lo}. Moreover, it was also demonstrated that LRP1 levels decreased in the

monocyte Ly6C^{hi}LRP1^{hi} subpopulation in Apolipoprotein E deficient (ApoEKO^{-/-}) mice with evident development of aortic atherosclerotic plaque.

Finally, through flow cytometry assays, based on the LRP1 detection as monocyte marker, three monocytic subpopulations were identified as classical [CD14⁺⁺CD16⁻], intermediate [CD14⁺⁺CD16⁺] and non classical [CD14⁺CD16⁺⁺]. In turn, it was demonstrated that the LRP1 expression is higher in classical and intermediate than in non classical monocytes. Finally, α_2 M induced changes in the expression level of LRP1 on the cell surface of human monocyte subpopulations. These effects were also associated with the production of cellular protrusions, being more evident in non classical than classical and intermediate monocytes.

In conclusion, this study showed that: i) the α_2 M/LRP1 system induces macrophage migration through a mesenchymal mode; ii) LRP1 is a monocyte marker, which may be used to determine the subpopulation heterogeneity of peripheral blood monocytes; and iii) LRP1 is differentially expressed in monocyte subpopulations both in mice and human. These findings, taken together, indicate that the α_2 M/LRP1 system is involved in the migratory processes of macrophages and that LRP1 monocyte may be a putative and early biomarker for the clinical diagnosis of atherosclerotic disease.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Ateroesclerosis: consideraciones generales de la etiopatogenia

La ateroesclerosis es un proceso inflamatorio crónico que afecta a arterias de diferentes lechos vasculares y se caracteriza por el engrosamiento de la capa íntima y media arterial y pérdida de elasticidad vascular. En la actualidad, a nivel mundial la ateroesclerosis es la principal causa de enfermedad cardiovascular con un alto nivel de morbilidad y mortalidad [1]. En nuestro país, alrededor del 40% de los decesos se producen por enfermedades cardiovasculares, siendo la aterosclerosis la responsable del 70% de estos casos. Además, las enfermedades cardiovasculares constituyen un problema significativo a nivel sanitario y social puesto que provocan discapacidad física en personas adultas económicamente activas. Es por ello relevante generar políticas sanitarias preventivas de ateroesclerosis y enfermedades cardiovasculares basadas en hábitos de vida más saludable, acceso a un diagnóstico precoz y atenciones terapéuticas tempranas. Sobre estos dos últimos aspectos, es importante destacar la necesidad de emprender nuevas investigaciones bioquímicas y clínicas que permitan establecer biomarcadores de las etapas tempranas de la ateroesclerosis, así como dilucidar los mecanismos moleculares involucrados, para la generación de nuevas herramientas terapéuticas contra esta enfermedad cardiovascular.

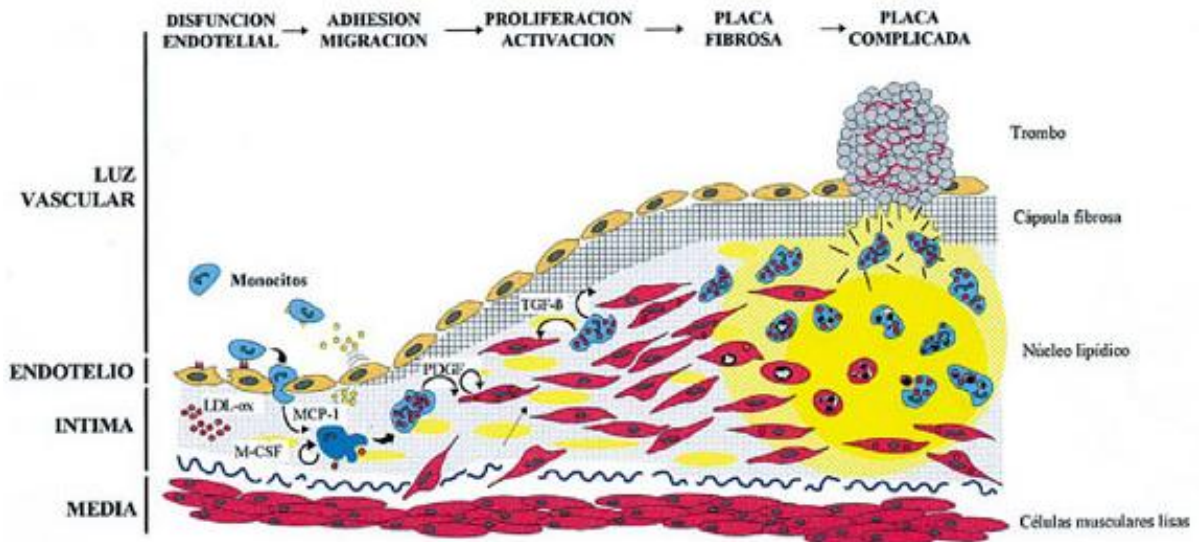


Figura 1.1: Esquema de las diferentes etapas e intermediarios involucrados en el desarrollo de la arterosclerosis.

La Figura 1.1 representa esquemáticamente el proceso de desarrollo de la aterosclerosis y la formación de placa aterosclerótica, el cual puede ser dividido en diferentes etapas. Un etapa inicial de “Disfunción Endotelial”, donde diferentes factores de riesgo como la obesidad, el tabaquismo y la hipertensión arterial, entre otros, promueven cambios estructurales y funcionales del endotelio[2-4]. A esta etapa le sigue otra de “Adhesión-Migración” leucocitaria, la cual se caracteriza por la participación de los leucocitos circulantes en sangre periférica, que son los encargados de detectar la alteración endotelial, generando la migración transendotelial o diapédesis y activación de estas células en los sitios de la injuria a nivel intra-vascular [5, 6]. Entre estos leucocitos, se destaca el reclutamiento de monocitos de sangre periférica, los cuales en un primer paso van a interactuar con el endotelio modificado a través de interacciones de corta duración entre *E-selectinas* de células endoteliales y *P-selectinas* de monocitos, fenómeno conocido como “rolling”[7]. Luego, se produce el proceso de adhesión monocítica, el cual está mediado por la interacción de $\beta 1$ y $\beta 2$ integrinas en monocitos con VCAM-1 e ICAM-1 del endotelio[8, 9]. Esta adhesión monocito-endotelio facilita la diapédesis monocitaria hacia la íntima vascular, originando el proceso de activación de

los monocitos a macrófagos. A partir de allí, se origina una etapa de “Proliferación-Activación” celular que promueve el engrosamiento de la capa íntima y media vascular y la formación de la placa aterosclerótica en donde los monocitos, entre otros leucocitos allí reclutados liberan citoquinas, factores de crecimiento y enzimas proinflamatorias que inducen la proliferación y migración de células musculares lisas vasculares (VSMC, por *vascular smooth muscle cells*) y macrófagos tisulares en el sitio de lesión aterosclerótica[10]. A su vez, los individuos con riesgo de desarrollar aterosclerosis, generalmente presentan hipercolesterolemia, lo cual promueve la acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL, por *low density lipoprotein*) a nivel intra-vascular, lugar donde sufre un proceso de agregación (LDL agregadas) u oxidativo (LDL oxidadas), las cuales son selectivamente internalizadas por los macrófagos y las VSMC a través de diferentes receptores *scavengers*, promoviendo una acumulación grasa a nivel intracelular, originando células espumosas o *foam cells*. Estas células amplifican la liberación de moléculas proinflamatorias, proteinasas, principalmente metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP por *extracellular matrix metalloproteinases*) del tipo MMP-9 y MMP-2, y colágeno que dan origen a la etapa “Placa Fibrosa”, la cual está caracterizada por la acumulación celular grasa o lipídica y también plaquetaria. La etapa final, denominada “Placa Complicada”, se caracteriza por la ruptura de la placa fibrosa, produciendo la liberación de material altamente trombogénico con la consecuente formación de trombos, el cual puede ocluir *in situ* la luz vascular y/o liberarse al torrente sanguíneo y ocluir en otros sitios vasos de menor calibre [11]. Por lo tanto, si los procesos trombogénicos ocurren a nivel de arterias coronarias promoverán procesos isquémicos del músculo cardíaco e infarto agudo de miocardio, mientras que si la oclusión ocurre a nivel de arterias de menor calibre resultará en la producción de isquemia cerebral y accidente cerebro-vascular. Considerando la totalidad de las etapas que involucran el

desarrollo aterosclerótico se concluye que los monocitos de sangre periférica así como los macrófagos tisulares cumplen un rol clave durante las etapas de “Disfunción Endotelial”, “Migración-Adhesión” y “Activación-Proliferación”, lo cual hace que estos componentes celulares sean un blanco de interés en la investigación bioquímica y clínica de la aterosclerosis.

1.2 Monocitos y Aterosclerosis

Importantes avances, sobre los mecanismos moleculares y celulares que participan en la aterosclerosis, han sido establecidos a partir de la utilización de modelos animales que reproducen esta enfermedad. Entre ellos los modelos más utilizados son los ratones deficientes (*knockout*) del gen que expresa la Apolipoproteína E (KO-ApoE^{-/-}) y otros deficientes del gen codificante para el receptor de LDL (KO-LDLR^{-/-}) [12]. Aunque existen diferencias en los patrones de enfermedad aterosclerótica producida entre ambos modelos, tanto los ratones KO-ApoE^{-/-} como los KO-LDLR^{-/-} promueven hipercolesterolemia y lesión ateromatosa en grandes vasos cuando son alimentados con dietas ricas en colesterol, también denominadas dietas occidentales o *western-type diets*. Interesantemente, estos modelos animales han permitido caracterizar las diferentes subpoblaciones de monocitos que son activados a macrófagos en el proceso aterogénico [13-15] que de algún modo, reproduce lo ocurrido con la activación de las subpoblaciones monocíticas en la aterogénesis humana [16, 17].

Los monocitos de sangre periférica, tanto en humanos como en ratón, son clasificados en diferentes subpoblaciones a partir de la expresión diferencial de grupos antigénicos de superficie celular. En ratón, al menos dos subpoblaciones son caracterizadas a partir del nivel de expresión de los antígenos de superficie celular Ly6C, CCR2 y CX3CR1, como:

a) Ly6C⁺CCR2⁺CX3CR1⁻; y b) Ly6C⁻CCR2⁻CX3CR1⁺. En humanos, tres

subpoblaciones son clasificadas por la expresión diferencial de los antígenos de superficie CD14 y CD16, como monocitos: a) clásicos [CD14⁺⁺CD16⁻]; b) intermedios [CD14⁺⁺CD16⁺]; y c) no clásicos [CD14⁺CD16⁺⁺] [18]. En general, los monocitos murinos Ly6C⁺ se acumulan en sitios donde se desencadenan procesos inflamatorios, mientras que los Ly6C⁻ hacen lo propio en tejidos linfoides y no linfoides bajo condiciones homeostáticas [19]. Estudios recientes realizados en ratones KO-ApoE^{-/-} muestran un incremento de la subpoblación de monocitos Ly6C⁺CD11c⁺ circulantes, lo cual se asocia con un aumentado nivel de reclutamiento y adhesión de monocitos a nivel de la pared vascular y desarrollo de aterosclerosis [13]. Además, se observó que subpoblaciones de monocitos Ly6C⁺CCR2⁺, se encuentran preferentemente en placas ateromatosas [15]. En cuanto a humanos, un número importante de evidencias demuestran un incremento de monocitos intermedios (CD14⁺⁺CD16⁺) en pacientes con diferentes alteraciones cardiovasculares [20-23]. Sin embargo, dada las diferencias entre las especies es difícil establecer un patrón común de las subpoblaciones de monocitos que participan en el desarrollo de aterosclerosis en humanos y modelos murinos. No obstante, en el marco del estudio de la aterosclerosis es importante poder establecer la subpoblación de monocitos que participan en el desarrollo de esta enfermedad. La búsqueda a través de diferentes estrategias experimentales tiende a caracterizar las analogías fenotípicas y funcionales de las subpoblaciones de monocitos murinos y humanos en esta patología.[24, 25].

1.3 Participación de las α -Macroglobulinas en la inflamación

La familia de las α -Macroglobulinas (α Ms) humanas inhibidoras de proteinasas está integrada por dos glicoproteínas plasmáticas: la α_2 -Macroglobulina (α_2 M) y la *Pregnancy Zone Protein* (PZP), las cuales son análogas a las encontradas en el plasma de otros

vertebrados[26]. Tanto α_2M como PZP inhiben proteinasas por un mecanismo particular de "atrapamiento molecular", el cual es iniciado por la acción proteolítica de la proteínasa en una región específica de las αMs , conocida como "bait", seguido por la reducción de una unión tiol-éster intracadena, lo cual promueve un cambio conformacional y exposición de un dominio C-terminal de reconocimiento a su receptor específico denominado LRP1 (por *low density lipoprotein receptor-related protein 1*) [26]. Un esquema del mecanismo de inhibición de proteinasas por α_2M es representado en la Figura 1.2.

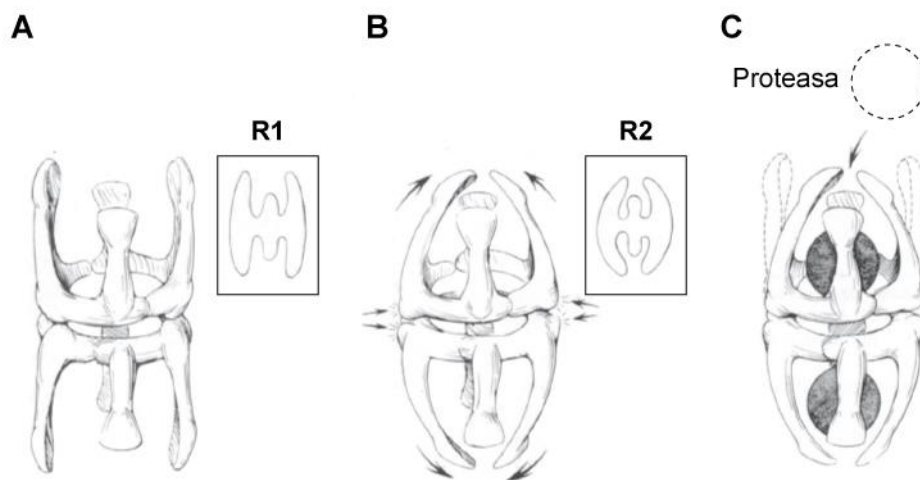


Figura 1.2. Mecanismo de inhibición de proteinasas de α_2M siguiendo el modelo de "atrapamiento" molecular.(A) forma nativa de α_2M junto a la emulación de su micrografía electrónica representada en R1;(B) cambio de conformación (flechas largas) que sufre esta glicoproteína al interactuar con proteinasas y la emulación de su micrografía electrónica en R2. Las flechas cortas indican los sitios de reconocimiento del receptor LRP1.; y (C) representación final del "atrapamiento" molecular de la proteínasa que impide interactuar con sustratos proteicos. Representación modificada de Feldman et al [27].

Por nomenclatura, se denomina αM "activada" o αM^* al complejo inhibidor-proteínasa que adquiere la capacidad de interactuar con LRP1. Aminas primarias nucleofílicas, del tipo metilamina o 5-OH-triptamina (serotonina), producen, al igual que las proteinasas, formas activadas de αMs por reducción de las uniones tiol-éster intracadena [28, 29]. Las αMs cumplirían un rol central durante la inflamación al inhibir la actividad proteolítica extracelular de serino-proteinasas del sistema fibrinolítico, incluidas t-PA

(por *tissue-plasminogen activator*)[30, 31], uPA (por *urokinase-type plasminogen activator*) y plasmina [32] así como diferentes MMPs, entre ellas a MMP-2 y MMP-9 [32]. Asimismo, las α Ms también pueden inhibir proteinasas que provienen de agentes infecciosos, como lo ocurrido durante la Enfermedad de Chagas, donde PZP y α_2 M inhiben la principal cisteíno-proteinasa del *Trypanosoma cruzi*, cruzipaina, con lo cual no sólo contrarresta la actividad proteolítica sino que además atenuaría el efecto activador de la inflamación desencadenado por la presencia de esta enzima parasitaria [33, 34]. Sumado al efecto inhibitorio de proteinasas, las α Ms activadas tendrían efectos funcionales sobre el componente celular inflamatorio mediado por su interacción con LRP1, lo cual desencadena, además de la internalización y degradación lisosomal del complejo α M-proteinasa vía endocitosis, la activación de vías de señalamiento intracelular y proliferación celular. En este sentido, resultados de nuestro grupo de investigación demostraron que la interacción α_2 M*-LRP1 induce la expresión de MMP-9 y la proliferación celular a través de la activación de las vías de señalamiento intracelular MAPK/ERK y del factor de transcripción NF- κ B, en líneas celulares de macrófagos de ratón [35, 36]. Además se ha demostrado que el sistema α_2 M*/LRP1 aumenta la expresión de la quemoquina MCP1 (por *Monocyte chemoattractant protein-1*) así como la supervivencia y migración de células de Schwann, a través de la activación de las vías de señalamiento intracelular MAPK/ERK y PI₃K/Akt [37]. Por lo tanto, α_2 M cumple una función clave durante los procesos inflamatorios evidenciada por la capacidad inhibitoria sobre proteasas que tienen una activa participación en la remodelación de la matriz extracelular y al inducir eventos proliferativos celulares del sistema retículo-endotelial.

1.4 El receptor de las α -Macroglobulinas activadas: LRP1

LRP1 es un miembro de la familia de genes que codifican para diversos receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL), entre los que se destacan, por homología estructural, al LDLR (por *low density lipoprotein receptor*), VLDLR (por *very low density lipoprotein receptor*), apoER2 (por *apolipoprotein E receptor 2*), MEGF7 (por *multiple epidermal growth factor-like domains 7*), LRP2 o Megalina y LRP1b, entre otros (figura 1.3 A). Adicionalmente se incluyen otros 3 miembros de la familia que no son homólogos desde el punto de vista estructural, tales como: LRP5, LRP6 y SorLa o LR11 (figura 1.3 B) [38-41].

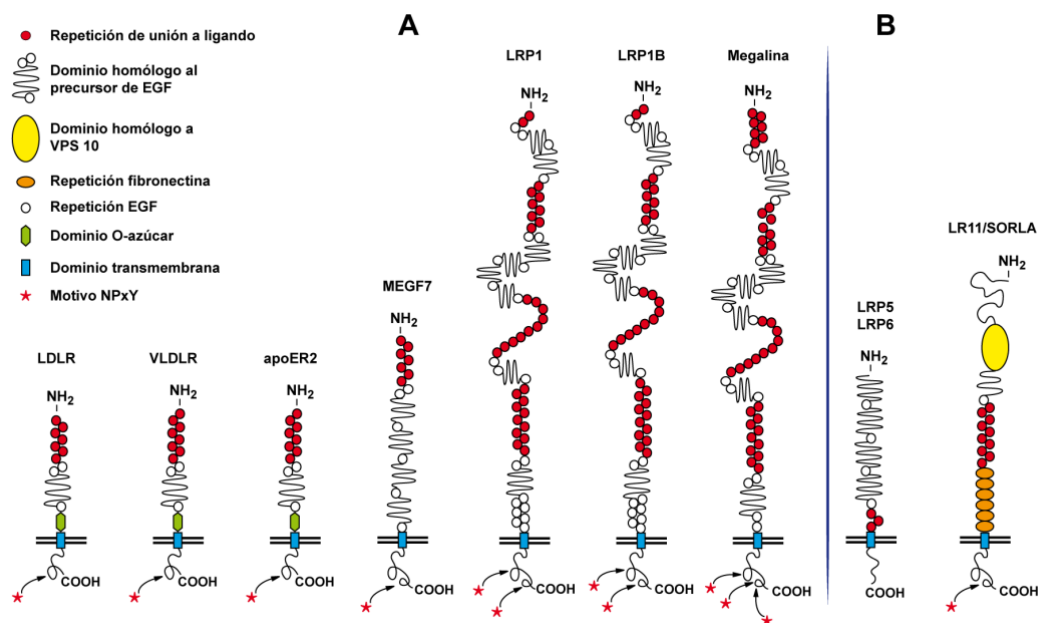


Figura 1.3. Miembros de la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL). (A) Miembros de la familia que presentan alta homología estructural. (B) Miembros de la familia que no son homólogos al resto desde el punto de vista estructural. Modificado de Herz y colaboradores [40].

Dentro de esta familia de receptores, el LRP1 es considerado uno de los más importantes ya que, en mayor o menor medida, se expresa en diversos tipos celulares, tiene la capacidad de interactuar con otros receptores de transmembrana y une a más de 40 ligandos funcionalmente no relacionados, entre los que se encuentran proteasas y complejos de inhibidores de proteasas, factores de crecimiento, proteínas implicadas en

el transporte de lípidos, virus y toxinas. Esta cualidad de interactuar con diversos tipos moleculares le confiere el rol de participar en la remodelación de la matriz extracelular (MEC), en procesos inflamatorios, en la regulación del metabolismo de lípidos y lipoproteínas, en el ingreso de virus y toxinas bacterianas a la célula, en la activación de enzimas lisosomales, la transducción de señales y la transmisión nerviosa [38, 41].

LRP1 es una proteína de transmembrana tipo I, sintetizado como un precursor de simple cadena de 600 kDa, el cual luego es procesado a nivel postraduccional en sistema de Golgi por endoproteasas tipo furina, originando la estructura heterodimérica madura de la proteína compuesta por dos subunidades asociadas de manera no covalente: una extracelular α de 515 kDa y otra de transmembrana e intracitoplasmática β de 85 kDa [42, 43]. La subunidad α contiene cuatro motivos de unión a ligandos, denominados de I a IV, de los cuales los motivos I y II son los responsables de unir α_2M^* [38, 43]. En cuanto a la subunidad β , todos los miembros de la familia de receptores de LDL presentan características estructurales comunes basadas principalmente en la presencia de motivos con secuencia de aminoácidos NPxY, YxxL y LL (di-Leu) en el dominio intracitoplasmático. Aunque la función de estos motivos no está completamente esclarecida, serían claves para el mecanismo de endocitosis y de señalamiento intracelular. De todos ellos, el motivo NPxY cobra especial interés debido a que también está presente en otras proteínas de transmembrana del tipo APP (por *amyloid precursor protein*), β -integrinas y receptores tirosina quinasa, incluido los receptores de insulina (IR) y del factor de crecimiento epidermal (EGF-R)[44], donde cumpliría funciones adicionales a la de endocitosis, tal como en la activación de señalamiento intracelular [45]. El motivo NPxY interactúa con dominios proteicos denominados PTB (por *phosphotyrosine binding domain*) presentes en diversas proteínas adaptadoras citosólicas. Estas proteínas adaptadoras a su vez son las encargadas de reclutar un conjunto adicional

de proteínas que promueven la activación de vías de señalamiento intracelular [46, 47]. LRP1 contiene dos motivos NPxY en el dominio intracitoplasmático de la subunidad β , aunque sólo el motivo ubicado en la región próxima al extremo C-terminal del receptor es el que une proteínas adaptadoras conteniendo dominios PTB del tipo Shc, FE65, ARH, PSD95, SNX17, Dab1, Dab2, JIP-1 y JIP-2[47]. Por lo tanto, los motivos NPxY, y posiblemente los LxxY y di-Leu, le conferirían a LRP1 la propiedad de receptor de endocitosis o de señalamiento dependiendo del tipo de proteína adaptadora intracelular asociada [43].

El LRP1 internaliza su ligandos a través de un mecanismo de endocitosis que está fundamentalmente mediado por vesículas cubiertas de la proteína clatrina (CCV, por *clathrin-coated vesicles*) [48]. No obstante, no todos los ligandos tienen el mismo destino intracelular. Como se mencionó anteriormente, α_2M^* luego de su endocitosis sufre degradación a nivel de lisosomas [49, 50]. En cambio, la apolipoproteína E (apoE), una vez que se disocia de LRP1 a nivel de endosomas de *sorting*, se ubica en endosomas que no contienen LRP1 y desde donde recicla a la membrana plasmática a través de partículas enriquecidas en lipoproteínas de alta densidad o HDL (por *high density lipoprotein*)[51]. Otro caso particular es el de la exotoxina A de *Pseudomonas* la cual se acumula en el retículo endoplasmático y, al igual que apoE, evade la vía de degradación [52]. Por su parte, nuestro grupo de investigación ha demostrado que α_2M^* a través de LRP1 induce la activación de MT1-MMP a nivel de la superficie celular mediante una vía dependiente de la enzima reductora de GTP a GDP o *smallGTPase*, denominada Rab11, promoviendo así un aumento de la migración celular y activación de proMMP-2 a MMP-2 en células MIO-M1[53]. En forma conjunta, estas evidencias sugieren que no existen rutas endocíticas comunes para el transporte intracelular de los ligandos de LRP1, lo cual puede

explicar en parte las funciones biológicas disímiles y no redundantes de este receptor en determinadas condiciones fisiológicas y patológicas.

En lo que respecta al reciclado endocítico de LRP1 a membrana plasmática, en general se conoce que podría seguir al menos dos rutas de tráfico intracelular: una de reciclado rápido y otra de reciclado lento. El reciclado “rápido” ($t_{1/2}$: 4 min) se produce directamente desde los endosomas de *sorting* a la membrana plasmática dependiente de la actividad de Rab4. Por su parte, el reciclado “lento” ($t_{1/2}$: 15 min) se produce vía el compartimiento de reciclado endocítico, previo paso por endosomas de *sorting* y/o compartimiento de Golgi. El reciclado lento es dependiente de la activación de Rab11. Por último, es importante mencionar que, además del reciclado a través del compartimiento de reciclado endocítico, los receptores pueden regresar a la membrana plasmática desde el compartimiento de Golgi sin atravesar compartimentos subcelulares intermedios. Una de las enzimas Rab claves en este tipo de transporte intracelular es Rab8, que además regula el equilibrio entre Golgi y el retículo endoplasmático. En este sentido, nuestro grupo de investigación demostró que α_2M^* indujo el incremento de los niveles de LRP1 en la membrana plasmática, lo cual involucraría su movilización desde estructuras vesiculares que lo almacenan; siendo a su vez independiente del reciclado endocítico “lento” mediado por Rab11 y de la vía biosintética y secretoria del receptor (Tesis doctoral de Jaldín Fincati Javier, FCQ UNC, 2014).

1.5 La migración celular y el sistema α_2M /LRP1.

La migración celular requiere de la interacción dinámica de la célula con el sustrato extracelular sobre el cual se producen los procesos de adhesión y motilidad. Distintos modos de migración contribuyen a diversos tipos de movimientos celulares, que van desde la motilidad individual hasta la migración celular colectiva, donde se conservan las

interacciones intercelulares y los grupos celulares se mueven coordinadamente [54]. Básicamente, dentro de la motilidad individual de las células se pueden describir dos tipos: modo "mesenquimal" y "ameboidal". El modo mesenquimal se caracteriza por la motilidad celular individual y ciclos de múltiples pasos, los cuales incluyen, protrusión, formación de focos de adherencias y procesos de estabilización del frente migratorio o "*leading edge*", seguido por la translocación del cuerpo celular y la liberación de adherencias de la parte anterior de la célula [55-59]. La migración mesenquimal en los tejidos tridimensionales se asocia con la degradación proteolítica de la MEC, y es por ello que necesita de proteinasas secretorias (MMP-2 y MMP-9) y de membrana (MT1-MMP)[54]. Por el contrario, el modo ameboidal se caracteriza por el deslizamiento y migración rápida de la célula. Es el principal modo de migración para células altamente móviles que incluyen neutrófilos, células dendríticas y linfocitos. Estas células ejercen fuerzas de tracción relativamente débiles sobre el sustrato circundante, las cuales son mediadas por integrinas y puede incluso ser integrina-independiente [54, 60].

La adhesión celular tiene dos funciones principales en la migración. Una es la de generar tracción mediante la vinculación del sustrato extracelular con los filamento de actomiosina y la otra es organizar las redes de señalización que regulan la migración así como otros procesos celulares, incluyendo proliferación, expresión de genes y supervivencia celular. La unión a ligando induce la agrupación de integrinas con complejos multiproteicos compuestos por proteínas adaptadoras y de señalamiento intracelular que conectan con el citoesqueleto de actina. La activación de las integrinas es crítico para la transmigración y la motilidad celular polarizada de leucocitos, donde se observa activación de la integrina $\alpha\beta3$ en el "*leading edge*" de las células [61]. Las adhesiones mediadas por integrina funcionan como centros de señalización que orquestan una red de vías de señalización, las cuales median la migración de células. Las GTPasas

Rho actúan como un punto de convergencia para estas redes y funcionan regulando la polimerización y dinámica de la actina, así como la adhesión en sí [59, 62, 63]. Se han identificado más de 150 componentes asociados a la adhesión. Ellos incluyen proteínas integrales de membrana (por ejemplo, integrinas, sindecanos), proteínas de unión a la actina (por ejemplo, talina, vinculina, α -actinina, zyxin), proteínas adaptadoras y de señalización (por ejemplo, la tirosina quinasa Src, quinasa de adhesión focal [FAK], paxilina, y quinasas unidas a integrinas [ILK])[64-68].

En células carentes de motilidad, las adhesiones focales son bastante estables en condiciones normales, mientras que en células que presentan una alta motilidad estas adhesiones focales son menos estables. Esto obedece a que en las células móviles, las adhesiones focales están siendo constantemente montadas y desmontadas a medida que la célula establece nuevos contactos en el frente de avance y se rompen contactos establecidos en el borde anterior o de salida de la célula. El ensamblado dinámico y desmontaje de las adhesiones focales juega un papel central en la migración celular. Inicialmente, pequeñas adherencias focales se forman en el frente de avance de la célula denominados “lamelipodios”, los cuales consisten en la asociación coordinada de integrinas con determinadas proteínas adaptadoras, como *talin* y *paxilin*. Muchos de estos complejos de coordinación no llegan a madurar y se desacoplan, generando como consecuencia la retracción de la “lamelipodia”. Sin embargo, algunos de los complejos de coordinación maduran en adhesiones focales más grandes y estables, y reclutan muchas más proteínas tales como *zyxin*. Una vez en su lugar, una adhesión focal permanece estacionario con respecto a la MEC y la célula utiliza esto como un ancla en el que se puede empujar o tirar de sí misma a través de la propia MEC.

Las integrinas constituyen un grupo de receptores de transmembrana que median interacciones dinámicas entre determinados componentes de la matriz extracelular y la

actina del citoesqueleto durante la motilidad celular. Las integrinas son heterodímeros formados por una cadena α y otra β . Poseen un dominio mayor extracelular que interacciona con la MEC y un dominio menor o tallo citoplasmático que interacciona con actina a nivel del citoesqueleto [69]. Los dominios extracelulares de diversas combinaciones $\alpha\beta$ de integrinas interaccionan específicamente con diversos ligandos de la MEC, incluyendo fibronectina con $\alpha5\beta1$, $\alpha\nu\beta3$ y $\alpha4\beta1$, colágeno con $\alpha1\beta1$ y $\alpha2\beta1$, y laminina con $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$ y $\alpha6\beta1$. Receptores de la superficie celular, incluido los miembros de la súper familia Ig, ICAM-1 ($\alpha L\beta2$, $\alpha M\beta2$) o VCAM-1 ($\alpha4\beta1$), son también considerados integrinas. Células altamente migratorias e invasivas forman adherencias especializadas mediadas por integrinas, las cuales se denominan podosomas e invadopodias, dependiendo del tipo celular. Por lo general, el termino “podosoma” es utilizado en fibroblasto, osteoclastos, monocitos, macrófagos y células dendríticas, entre otras, mientras que el termino “invadopodia” se utiliza en células tumorales. Las diferencias entre ambas estructuras no están claramente definidas.

La naturaleza multifuncional de LRP1 es evidente cuando se considera sus efectos sobre la migración celular. En fibroblastos, LRP1 inhibe la migración celular al disminuir la expresión del receptor de uroquinasa (uPAR) a nivel de la superficie celular [70, 71]. En macrófagos, LRP1 puede promover la migración celular, facilitando el tráfico intracelular de Mac-1 cuando el activador tisular del plasminógeno y su inhibidor PAI-1 se encuentran disponibles [72]. En células de Schwann, LRP1 promueve la migración celular mediante la regulación del estado de activación de Rho-GTPasas [73]. También, ha sido descrito que LRP1, en asociación con proteínas del citoesqueleto e integrinas, regula la migración de otros tipos celulares normales y tumorales [73, 74]. Nuestro grupo de investigación, como fue mencionado anteriormente, ha demostrado que la interacción de α_2M con LRP1 en células RAW264.7 y MIO-M1 incrementa la movilidad celular. Con dichos hallazgos

y en el contexto teórico antes planteado, resulta interesante establecer y caracterizar los mecanismos moleculares que regulan la migración y activación de monocitos y monocitos-macrófagos a través del sistema $\alpha_2\text{M/LRP1}$, puesto que estos tipos celulares juegan roles claves en el inicio y progresión del proceso aterosclerótico.

1.6 El sistema $\alpha_2\text{M/LRP1}$, monocitos y Aterosclerosis.

Como se mencionó, los monocitos tienen una participación preponderante en la etapa inicial y progresión de la aterosclerosis. En general, en todo proceso inflamatorio, posterior a una injuria, y luego de que la primera respuesta aguda de polimorfonucleares neutrófilos ha sido depurada por apoptosis, los monocitos circulantes son activados a macrófagos (estadio monocito-macrófago), migran a la zona tisular afectada y generan la infiltración celular mononuclear. Mientras tanto, los macrófagos tisulares son sensibilizados previa activación a través de la vía clásica Tipo 1 (proceso que involucra citoquinas proinflamatorias y células Th1) o la vía alternativa o Tipo 2 (citoquinas proinflamatorias y células Th2) [75]. En general, los macrófagos tisulares presentan una baja tasa de proliferación, lo cual se revierte bajo ciertas condiciones inflamatorias de activación, proceso que es acompañado por un aumento en la producción de MMP-9 [75]. Interesantemente, resultados propios y de otros autores han demostrado que LRP1 se expresa en la superficie de monocitos-macrófagos y macrófagos tisulares activados [76, 77], y sumado a ello, tal como fuese indicado antes, $\alpha_2\text{M}^*$ induce la proliferación y migración de estas células a través de la activación de la vía de señalamiento intracelular MAPK-ERK1/2 [35, 36]. Todos estos resultados sugieren que el sistema $\alpha_2\text{M/LRP1}$ participa en la activación de macrófagos a través de la inducción de la síntesis de MMP-9 así como por la proliferación y migración celular que este sistema induce.

Debido a que la depleción total embrionaria del gen LRP1 es letal en ratones [78], se han realizado estudios de depleción génica específica en tejidos murinos que tienen participación con la Aterosclerosis, tal es el caso de células musculares lisas vasculares (VSMCs) y macrófagos deficientes de LRP1. De este modo, se ha podido establecer que LRP1 cumple funciones protectoras contra el desarrollo de aterosclerosis [79-81]. En este sentido, nuestro laboratorio recientemente ha demostrado que insulina produce una marcada disminución de LRP1 en macrófagos [82], lo cual desde el punto de vista de la aterosclerosis, posicionaría a este receptor como un factor protector. Esto se debe a que durante los procesos asociados con síndrome metabólico y aumento de la resistencia a la insulina, esta hormona es considerada proaterogénica [83].

Como es sabido, la formación de células espumosas es un acontecimiento clave en el inicio y progresión de las lesiones ateroscleróticas. En este sentido, se ha demostrado que LRP1 media la captación e internalización de lipoproteínas de baja densidad agregadas (agLDLs) en VSMCs y macrófagos, lo cual produce la acumulación de éster de colesterol en estas células [84, 85]. Si bien se conoce que LRP1 se encuentra altamente expresado en células musculares lisas, macrófagos y *foam cells* en etapas avanzadas de la aterosclerosis [86], se desconoce la influencia del sistema α_2M /LRP1 en monocitos de sangre periférica y monocitos-macrófagos en etapas iniciales de esta patología. En este sentido, en este trabajo de tesis doctoral se hipotetiza que LRP1 expresado a nivel de monocitos de sangre periférica cumple una función clave en las etapas iniciales de la aterosclerosis al regular la maquinaria molecular asociada con la adhesión y migración celular. Además, la participación de LRP1 en estos procesos estaría mediada por su interacción con α_2M^* puesto que el sistema α_2M^* /LRP1 tiene una activa participación en la remodelación de la MEC, al inducir y activar la expresión de determinadas proteinasas, principalmente MMP-2 y MMP-9, así como en la migración celular, al promover la

activación de proteínas de membrana plasmática involucradas en la adhesión y motilidad de células.

Con el propósito de poder demostrar esta hipótesis en este trabajo de tesis doctoral se utilizaron dos modelos experimentales: uno *in vitro*, donde se empleó una línea celular derivada de macrófagos de ratón así como monocitos de sangre periférica humana y murina; y uno *in vivo*, consistente con un modelo murino de aterosclerosis (KO-ApoE^{-/-}). Con el primer modelo se estudió el mecanismo molecular y celular involucrado en la migración inducida por el sistema $\alpha_2M^*/LRP1$, mientras que con el segundo se determinó el nivel de expresión monocítica de LRP1 en relación con la producción de daño aterosclerótico. De este modo, se pretende efectuar un aporte al entendimiento de la etiopatogenia de la aterosclerosis desde una perspectiva de la inmunidad innata y la inflamación donde el sistema $\alpha_2M/LRP1$ y monocitos cumplen roles preponderantes en el desarrollo de esta enfermedad.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Teniendo en cuenta la participación de α_2M y su receptor LRP1 en el control de la proteólisis extracelular y activación del componente celular implicado en los procesos inflamatorios, en este trabajo de tesis se propuso dilucidar el rol del sistema α_2M /LRP1 en la migración de macrófagos. Por otra parte, basados en la evidencia de que los monocitos cumplen un rol clave en el inicio y progresión de la aterosclerosis, y considerando que LRP1 está incrementado en el componente celular de la lesión aterosclerótica, resultó de interés investigar la expresión de este receptor en monocitos de ratón y humanos.

2.2 Objetivos específicos

A través de modelos *in vitro* e *in vivo* de experimentación, se propuso:

- a) establecer el mecanismo molecular por el cual el sistema α_2M /LRP1 regula la migración de macrófagos.
- b) analizar la expresión de LRP1 en diferentes subpoblaciones de monocitos de sangre periférica en un modelo murino de aterosclerosis; y
- c) determinar la expresión de LRP1 en subpoblaciones de monocitos circulantes de individuos sanos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Químicos

Acetato de sodio	EACA	NaCl
Acetato de Zn	EDTA ácido	NaH ₂ PO ₄
Ácido acético glacial	Etanol	NaOH
Ácido bórico	Extracto de levadura	NH ₄ Cl
Ácido nítrico	Glicerol	Ortovanadato de sodio
Ácido ortofosfórico	Glicina	Paraformaldehído
Acrilamida	GM6001	PEG 8000
Agar-agar	H ₂ SO ₄	Peróxido de hidrógeno
Agarosa	HCl	Persulfato de amonio
Albúmina sérica bovina	HEPES	PMSF
Ázida de sodio	IPTG	Ponceau S
Azul brillante de Coomassie R-250	KCl	Sacarosa
Azul de bromofenol	KH ₂ PO ₄	Saponina
β-mercaptoetanol	Leche en polvo descremada	SDS
Bicarbonato de sodio	Metanol	TEMED
CaCl ₂	Metilamina-HCl	Tripteína (Tripton)
Cloroformo	MgSO ₄	Tris
Colágeno tipo I	Mowiol 4-88	Tritón X-100
Cicloheximida	N,N'-metil-bis-acrilamida	Tween 20
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Na ₂ EDTA	Urea
Ditiotritol	Na ₂ PO ₄	

3.1.2 Material de laboratorio

Tipo de Material	Marca comercial
Cubreobjetos de vidrio Ø 12 mm	©Marienfeld-Superior
Cubreobjetos de vidrio Ø 25 mm	Assistent®
<i>Chambered coverglass</i>	Nunc™Lab-Tek™Thermo Scientific
Membrana de nitrocelulosa	GE Healthcare Amersham
Placa de 100/60/35 mm	Greiner BioOne
Placa <i>multiwell</i> de 6-/24- wells	Greiner Bio-One

Placa <i>multiwell</i> de 96 <i>wells</i> para ELISA	Greiner Bio-One
Portaobjetos de vidrio 76 x 26 mm	©Marienfeld-Superior
Scrapers	Greiner Bio-One
Tubos eppendorf 0,5/1,5 mL	Greiner Bio-One
Tubos para Citometria de Flujo	BD Biosciences
Tubos EDTA-K3	DVS
BioMax light film ultrasensible	Kodak
Hyperfilm ECL	GE Healthcare Amersham
MagRack 6	GE Healthcare Amersham

3.1.3 Equipamiento

Citómetros de Flujo: FACSCanto™ II yBD FACS Aria™ IIu (BD Biosciences, San Jose, CA).

Microscopio confocal FV1000: Microscopio confocal invertido espectral con las siguientes líneas de láseres: 405, 458, 488, 515, 543 y 633 nm. Equipado para DIC y con cámara de incubación para experimentos de *live-cell*.

Microscopio confocal FV300: Microscopio confocal invertido de filtros con los siguientes líneas de láseres: 405, 458, 488, 515 y 543 nm. Equipado con DIC.

Microscopio de epifluorescencia: Nikon TE2000U

Termociclador: MULTIGENE (LabMet)

Sistema de amplificación a tiempo real: Applied Biosystems (ABI7500 Sequence Detection System)

Equipamiento menor: MiniProtean III (con módulo para mini *trans blot*), centrífuga refrigerada Thermo Sorvall™, baño termostatzado Vicking SRL, estufa de cultivo, *shaker* rotacional y de balanceo.

3.1.4 Kits y reactivos

Kits

Tipo	Marca comercial
Protein labeling kits (Alexa flúor 488 y Alexa flúor 594)	Molecular Probes®
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Chatsworth, CA

Reactivos

Tipo	Marca Comercial
GlutaMAX™	Gibco®
DMEM High Glucose	Gibco®
DMEM High Glucose suplementado con GlutaMAX™	Gibco®
<i>Penicillin/Streptomycin</i> 10 000 U/mL	Gibco®
Faloidina Alexa Fluor® 594 y 488	Molecular Probes®
BD Cytotfix™	BD Bioscience
<i>Hoestch</i> 33258	Molecular Probes®
BD Cytotfix/Cytoperm™	BD Bioscience
BD Perm/Wash™	BD Bioscience
Lysing buffer BD Pharm Lyse	BD Pharm Lyse
RPMI 1640	Gibco®
SYBR Green PCR Master Mix	Applied BioSystems
Suero fetal de cabra	PAA
Trypsin 0,5% EDTA	Gibco®
HEPES	Gibco®
TRIzol®	Invitrogen
<i>Calphostin-C</i>	Sigma-Aldrich
PD98059	Sigma-Aldrich

3.1.5 Anticuerpos

Anticuerpo primario	Aplicación/dilución	Marca comercial
Calreticulina	WB: 1/5000 IF: 1/1500	Santa Cruz
p-FAK	IF: 1/50	Santa Cruz
FAK	IF: 1/50	Santa Cruz
GM130	IF: 1/200	AbCam
LRP1 α	IP: 1/100 μ g prot. tot.	Serotec
LRP1 α -PE	CF: 1/100	Serotec
LRP1 β	WB: 1/10 000 IF: 1/250	AbCam
LRP1 (EPR3724)	IF: 1/200 CF: 1/500	AbCam
MT1-MMP	WB: 1/1000 IF: 1/100	AbCam
CD14 (FITC)	CF: 1/50	Bd Bioscience

CD16 (APC-Cy7)	CF: 1/50	Bd Bioscience
HLA-Dr (FITC)	CF: 1/50	Bd Bioscience
CD 56 (FITC)	CF: 1/50	Beckam Coulter
CD15 (FITC)	CF:1/50	Beckam Coulter
CD14 (PE)	CF:1/50	Beckam Coulter
CD45 (PC5)	CF:1/50	Beckam Coulter
CD11b (FITC)	CF:1/200	Bd Bioscience
Ly6C (PE-Cy7)	CF:1/400	Bd Bioscience
Ly6-G (PE)	CF:1/200	Bd Bioscience

Anticuerpo secundario	Dilución	Marca comercial
Goat anti-mouse Alexa flúor 488		
Goat anti-mouse Alexa flúor 594		
Goat anti-mouse Alexa flúor 647	IF: 1/800	Molecular Probes®
Goat anti-rabbit Alexa flúor 488		
Goat anti-rabbit Alexa flúor 594		
Goat anti-rabbit Alexa flúor 647		

3.1.6 Medios, *buffers* y soluciones

Geles de poliacrilamida (electroforesis y *Western blot*)

<u>Buffer de corrida</u>	<u>Buffer de transferencia</u>	<u>TBS 10X (cell signaling)</u>
3,03 g Tris base	3,03 g Tris base	8 g NaCl
14,4 g glicina	14,4 g glicina	2,4 g Tris base
1,0 g SDS	200 mL metanol (20%)	H ₂ O c.s.p. 1000 mL
H ₂ O c.s.p. 1000 mL	H ₂ O c.s.p. 1000 mL	pH 7,6
<u>Resolving buffer</u>	<u>Stacking buffer</u>	<u>TBST</u>
18,5 g Tris base	10 g Tris base	TBS 1X
H ₂ O c.s.p. 100 mL	H ₂ O c.s.p. 100 mL	0,5% Tween-20
pH 8,8	pH 6,8	
<u>Solución de SDS 10%</u>	<u>Solución de persulfato de amonio</u>	<u>Solución de bloqueo para <i>Western blot</i></u>
10 g SDS		
H ₂ O c.s.p. 100 mL	10 g persulfato de amonio	5 g leche descremada
	H ₂ O c.s.p. 100 mL	TBST c.s.p. 100 mL

<u>Solución de acrilamida/bis acrilamida 30%</u>	<u>Solución de incubación con anticuerpo</u>	<u>Sample buffer</u>
29 g acrilamida	5 g albúmina sérica bovina	1,25 mL <i>stacking buffer</i>
1 g N,N'-metil-bis-acrilamida	TBS 1X c.s.p. 100 mL	2,5 mL glicerol
H ₂ Od c.s.p. 100 mL		2 mL SDS al 10%
		0,2 mL Azul de bromofenol
		0,5% (v/v)
		H ₂ Od c.s.p. 9,5 mL

<u>Solución colorante</u>	<u>Solución de Fijación de Geles</u>	<u>Solución decolorante</u>
0,25 g Azul Brillante de Coomassie R-250	30 mL etanol	30 mL metanol
45,0 mL metanol	10 mL ácido acético glacial	10 mL ácido acético glacial
10 mL ácido acético glacial	H ₂ Od c.s.p. 100 mL	H ₂ Od c.s.p. 100 mL
H ₂ Od c.s.p. 100 mL		

Células eucariotas

<u>HBSS 10X (sin Ca & Mg)</u>	<u>PBS 10X</u>	<u>Medio de cultivo celular</u>
4 g KCl	80 g NaCl	DMEM <i>High glucose</i> 4,5 g/L
0,6 g KH ₂ PO ₄ anhidro	2 g KCl	10% SFC
80 g NaCl	14,4 g Na ₂ HPO ₄ anhidro	50 U/mL P/S
0,48 g Na ₂ HPO ₄ anhidro	2,4 g KH ₂ PO ₄ anhidro	1% Glutamax (células MIO-M1)
10 g D-glucosa	H ₂ Od c.s.p. 1000 mL	
H ₂ Od c.s.p. 1000 mL	pH 7,4	
pH 7,4		

<u>Medio para congelar células eucariotas 2X</u>	<u>Medio de incubación</u>	<u>Medio para transfección de células eucariotas</u>
2 mL DMSO	53 mg CaCl ₂	OPTIMEM
8 mL SFC	19,53 mg MgSO ₄	SFC 10%
	80 mg KCl	
	1360 mg NaCl	
	24,4 mg NaH ₂ PO ₄	
	200 mg D-glucosa	
	440 mg bicarbonato de sodio	
	H ₂ Od c.s.p. 200 mL	

<u>Solución de lisis no desnaturalizante</u>	<u>Detaching buffer</u>	<u>Solución de lisis RIPA</u>
20 mM Tris-HCl	10 mM D-glucosa	50 mM Tris-HCl pH 8
137 mM NaCl	3 mM Na ₂ EDTA	150 mM NaCl
10% de glicerol	PBS 1X	1% Tritón X-100
1% Triton-X100	pH 7,4	0,5% desoxicolato de sodio
Na ₂ EDTA 2 mM		0,1% SDS
pH 8,0		1 mM PMSF
1 mM PMSF		10 mM orto-vanadato de sodio
10 mM orto-vanadato de sodio		Inhibidores de proteasas
Inhibidores de proteasas		

FACS buffer

2% SFC
5 mM Na₂EDTA
0,1% ázida de sodio
En PBS 1X

Inmunofluorescencia directa e indirecta

<u>Solución fijadora (IFI y FD)</u>	<u>Solución de quenching</u>	<u>Solución de bloqueo y permeabilización para IFI 100X</u>
4% paraformaldehído 4% sacarosa PBS 1X	50 mM NH ₄ Cl en PBS 1X	20 g albúmina sérica bovina 5 g saponina PBS 1X c.s.p. 100 mL
<u>Solución para incubación de anticuerpos (IFI)</u>	<u>Solución de montaje</u>	
Solución de bloqueo y permeabilización 1X	2,4 g Mowiol 4-88 6 g glicerol 6 mL H ₂ O 12 mL <i>buffer</i> fosfato 0,2 M	

Zimografía

Buffer enzima

50 mM de Tris-HCl
200 mM NaCl
5 mM de CaCl₂
pH 7,5

Purificación de α_2 -Macroglobulina

<u>Solución de precipitación</u> 125 g PEG 8000 H ₂ O c.s.p. 250 mL	<u>Solución para la remoción de impurezas de la columna</u> 9 g Urea H ₂ O c.s.p. 25 mL	<u>Buffer A</u> 1,5 g EDTA Ácido 2,9 g NaCl H ₂ O c.s.p. 100 mL pH 7
<u>Buffer B</u> 0,5 g acetato de Zn H ₂ O c.s.p. 100 mL pH 6	<u>Buffer C</u> 2,1 g acetato de sodio 0,9 g NaCl H ₂ O c.s.p. 100 mL pH 5	<u>Buffer D</u> 16,4 g NaH ₂ PO ₄ 9 g Na ₂ HPO ₄ 93,5 g NaCl H ₂ O c.s.p. 2000 mL pH 6,5
<u>Buffer E</u> 0,53 g NaH ₂ PO ₄ 0,09 g Na ₂ HPO ₄ 2,2 g NaCl H ₂ O c.s.p. 250 mL pH 6	<u>Buffer F</u> 0,08 g acetato de sodio 0,88 g NaCl H ₂ O c.s.p. 100 mL pH 4,5	<u>TBS para transformación de α_2M</u> 36,3 g Tris base 5,8 g NaCl H ₂ O c.s.p. 2000 mL pH 7,2

Solución de transformación
de α_2M

3,03 g Tris base
6,75 g Metilamina-HCl
H₂O c.s.p. 500 mL
pH 8

Gel native para α_2 -Macroglobulina

Resolving buffer

0,57 g Tris base
2 M HCl para pH 5,7
H₂O c.s.p. 50 mL

Stacking buffer

0,33 g Tris base
2 M H₂SO₄ para pH 6,1
H₂O c.s.p. 50 mL

Sample buffer

X mL de *stacking buffer*
8% azul de bromofenol
10% glycerol

Buffer de corrida

4,97 g Tris base
2,47 g ácido bórico
H₂O c.s.p. 1000 mL

Purificación de GST-RAP

2xYT

16 g tripeína (triptona)
10 g extracto de levadura
5 g NaCl
H₂O c.s.p. 1000 mL
Autoclavar 20 min a 121 °C

Binding buffer

PBS 1X

Elution buffer

50 mM Tris-HCl
10 mM glutatión reducido
pH 8

Solución de inducción

100 mM IPTG en H₂O

Tinción de arterias con oil red

Oil red O

0,035 Oil red O
12,5 ml metanol
5 ml NaOH
(Calentar sin llegar a
ebullición para disolver y
filtrar)

3.1.7 Líneas celulares

Línea celular RAW264.7: es una línea celular derivada de leucemia monocítica (monocitos-macrófagos). Fueron adquiridas a la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC) y son de origen ATCC.

3.1.8 Software

Adobe Photoshop CS4

Adobe Illustrator CS4

BD FACSDiva™

ImageJ

Fiji

Huygens Essential

FlowJo

FluoView 4.0

NisElements Viewer

Graphpad Prism 5.0

Microsoft Office 2007

3.2 Métodos

3.2.1 Animales y Dietas

Todos los animales fueron tratados de acuerdo a los descrito en “*Guiding Principles in the Care and Use of Animals*” del Instituto Nacional de Salud delos Estados Unidos.

Ratones machos C57BL/6J normales (WT) y ApoE deficientes o *knock-out* (KO-ApoE^{-/-}) de 8 semanas de edad (20 a 22 gramos; *The Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME*) fueron utilizados en este trabajo. Los animales se mantuvieron en una habitación a 22 °C con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad, recibieron agua potable y fueron alimentados con una dieta normal (3,9% p/p de grasa con 0.09% p/p de colesterol) o dieta rica en grasas (20% p/p de grasa y colesterol 1.25% p/p) (GEPSA, Argentina).

3.2.2 Grupos de pacientes

Dos grupos de pacientes (Grupo A y Grupo B) participaron del estudio. Cada individuo fue enrolado en el Hospital Privado Centro Medico de Cordoba (Córdoba, Argentina) a

través de la firma del correspondiente consentimiento informado y bajo la aprobación del Comité de Revisión Interna (CRI HP 4-178/2011) del Hospital Privado Centro Médico de Córdoba.

Grupo A para el análisis de comparación de métodos correspondiente a los ensayos de Citometría de Flujo basados en la estrategia LRP1 vs. estrategia HLA-DR para la identificación y valoración de subpoblaciones de monocitos de sangre periférica humana: Veintidós sujetos (11 mujeres y 11 varones, con edades comprendidas entre los 26 y 59 años), sin antecedentes de diabetes y ausencia de cuadros febriles o infecciosos dentro de la semana previa a la extracción de sangre.

Grupo B para la determinación de la expresión del LRP1 en subpoblaciones de monocitos de sangre periférica humana: Veintitres sujetos sanos (14 mujeres y 9 hombres de edades comprendidas entre los 20 y 47 años).

En ambos grupos, los criterios para la selección de los sujetos sanos fueron los siguientes: Colesterol total <200 mg/dl; HDL-colesterol > 50 mg/dl (mujeres) y >40 mg/dl (hombres); glucosa plasmática en ayunas <100 mg/dl; creatinina plasmática <1,2 mg/dl; no fumadores; y sin hipertensión arterial.

3.2.3 Métodos de biología celular

Fluorescencia directa

Células RAW 264.7 sobre *coverslips* de vidrio pre-adsorbidos con colágeno tipo I fueron fijadas con solución de paraformaldehído/Sacarosa 4% en PBS por 10 min y luego incubadas en solución de *quenching* por 20 min. Paso siguiente se incubaron con los correspondientes anticuerpos marcados o detectores fluorescentes diluidos en solución de dilución de anticuerpos a 37 °C por 60 min. Finalmente, previo lavados con PBS (3 x 5

min en *shaker*) se montaron sobre portaobjetos de vidrio con solución de montaje. Se dejaron secar toda la noche (*overnight*) a TA y al abrigo de la luz.

Immunofluorescencia indirecta de línea celular

Células RAW 264.7 sobre *coverslips* de vidrio pre-adsorbidos con colágeno tipo I fueron fijadas con solución de paraformaldehído/Sacarosa 4% en PBS por 10 min, luego incubadas en solución de *quenching* por 20 min y permeabilizadas con solución de permeabilización y bloqueo por 25 min. Paso siguiente se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios diluidos en solución de dilución de anticuerpos a 37 °C por 60 min. Luego se lavaron con solución de permeabilización y bloqueo (5 x 3 min en *shaker*) y se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos. Finalmente previos lavados con PBS (3 x 5 min en *shaker*) se montaron sobre portaobjetos de vidrio con solución de montaje. Se dejaron secar *overnight* a TA y al abrigo de la luz.

Immunofluorescencia indirecta de cultivo primario de monocitos humanos

Para visualizarla localización celular de LRP1, cada subpoblación de monocitos fue aislada mediante el uso de *cell sorter* BD FACSAriaTMIIu a partir de monocitos seleccionados mediante SSC vs. CD45 y luego CD14 vs. CD16. Cada subpoblación de monocitos aislados ($\sim 1,5 \times 10^5$ células) se sembró en cubreobjetos de vidrio durante 3 horas en medio RPMI, que contenía 110 mg/ml de piruvato sódico, 10% (v/v) de suero fetal bovino y 100 unidades/ml de penicilina/estreptomicina, a 37 ° C con 5% de CO₂. Estas células fueron lavadas con PBS, fijadas con paraformaldehído/sacarosa al 4% por 10 min, y permeabilizadas o no con 0,05% de saponina en PBS. Las células fueron bloqueadas con 0,2% BSA-PBS y se incubaron con un anticuerpo anti-LRP1 contra la β -subunidad, seguido de incubación con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa

Fluor 488. Las células fueron montadas en portaobjetos de vidrio con Mowiol 4-88 y se obtuvieron imágenes fluorescentes mediante el uso de microscopia confocal.

Citometría de flujo para proteínas de superficie de células de sangre periférica humana

Sangre periférica obtenida por punción venosa en tubos con EDTA-K3, fueron procesadas para citometría de flujo dentro de los 30 min posteriores a su obtención. Para ello, se colocó 50 µl de sangre entera en tubos de 5 ml de poliestireno para citometria de flujo y se añadió 1 µl de cada anticuerpo conjugado a cada fluoróforo específico para los antígenos a evaluar (dilución 1:50). La muestra se incubó durante 20 min a 4 °C en la oscuridad. Posteriormente, la lisis de los eritrocitos se realizó utilizando una solución de lisis comercial durante 15 min. Para asegurar la máxima viabilidad de las células marcadas, estas fueron adquiridas en el citómetro de flujo con prontitud y finalmente, analizadas siguiendo las estrategias descriptas en la sección de resultados.

Citometría de flujo para proteínas de superficie de células de sangre periférica de ratón

Sangre periférica obtenida por punción cardiaca en tubos con EDTA-K3, fueron procesadas para citometría de flujo dentro de los 30 min posteriores a su obtención. Para ello, se colocó 1ml de sangre entera con 5 ml de solución de lisis comercial durante 15 min. Luego, las células fueron lavadas con *FACS buffer* e incubadas con solución de bloqueo (10% suero de cabra/0,3 M glicina-PBS) durante 20min. A continuación, se realizó un nuevo lavado y al *pellet* de células se le agregó 50 µl de una mezcla de anticuerpos en *FACS buffer* por 20 min a 4 °C en oscuridad. Finalmente, previo lavado se incubó por 30 min con el anticuerpo secundario. Para asegurar la máxima viabilidad las células marcadas, estas fueron adquiridas en el citómetro de flujo con prontitud y finalmente, analizadas siguiendo las estrategias descriptas en la sección de resultados.

Ensayo de migración bidimensional “en la herida” o Wound Healing

Los procesos de migración celular se examinaron mediante un ensayo de *wound-scratch* de 2 dimensiones en placas *multiwell* de 6 pocillos recubiertas con colágeno tipo I (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; Sigma-Aldrich). Las células RAW264.7 (5×10^5 células/pocillo) se cultivaron durante 48 h a 37 °C en DMEM de alta glucosa conteniendo FCS al 10% y L-glutamina 2 mM con CO₂ al 5%, seguido de incubación durante la noche hasta agotamiento de suero. En cada pocillo, se realizó una lesión lineal en el centro de la monocapa de células RAW264.7 con un *tip* estéril de 10 μL . Esta técnica produce una herida pronunciada carente de células, de aproximadamente 35 mm de largo y 400 μm de ancho. Luego, los pocillos se enjuagaron dos veces con medio libre de suero para eliminar los residuos de células y se añadieron 2 mL de DMEM de alta glucosa sin rojo de fenol. Las células fueron tratadas con $\alpha_2\text{M}^*$ 60 nM a diferentes tiempos. Para bloquear la unión $\alpha_2\text{M}^*/\text{LRP1}$, las células fueron tratadas previamente con GST-RAP 400 nM durante 30 min. La migración celular se midió siguiendo el procedimiento descrito previamente [87]. Brevemente, en diferentes tiempos (0 y 12 h), se adquirieron 3 imágenes aleatorias por condición de la herida usando un dispositivo de carga acoplada de la cámara (Nikon) en un microscopio de campo brillante (microscopio invertido Nikon TU-2000; Nikon, Tokyo, Japón) con un objetivo 10X (0,3 NA). Cada imagen representa un área promedio equivalente de la herida de $5 \times 10^5 \pm 1 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ registrado en tiempo 0 h. Las células que invaden esta área se contaron a las 12 h y los resultados se expresaron como número de células por área.

3.2.4 Métodos bioquímicos

Western blot

Extractos proteicos celulares (15–35 μg de proteínas totales) se diluyeron en *buffer* de muestra 5X en ausencia o presencia de DTT según se requirió de condiciones no reductoras o reductoras, respectivamente, a partir de las especificaciones de los

fabricantes de los anticuerpos primarios. Las muestras sin DTT se incubaron a 65 °C durante 10 min y las muestras con DTT a 95 °C durante 5 min. Luego fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (7,5%, 10%, ó 12% de acrilamida/bis-acrilamida) en presencia de SDS (EGPA-SDS). La corrida se llevó a cabo a voltaje constante (100 V) durante al menos 120 min. Luego las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en *buffer* de transferencia durante 60 min a voltaje constante (100 V), se bloquearon con *buffer* de bloqueo para WB durante 60 min y se incubaron con una dilución del anticuerpo primario en *buffer* de incubación para WB a 4 °C *overnight* en *shaker*. Al día siguiente, previos lavados con TBS 1X se incubaron con una dilución 1:5000 de un anticuerpo secundario anti-especie conjugado con HRP durante 60 min. Paso siguiente, previo lavados con TBS 1X se revelaron por reacción de quimioluminiscencia en placas radiográficas ultrasensibles.

Purificación de α_2M

La α_2M se purificó a partir de muestras de plasma (aproximadamente 200 mL) de varones sanos de acuerdo al método descrito por Chu y Pizzo, 1994. Brevemente, el procedimiento consistió en una precipitación diferencial de proteínas con PEG 8000 al 6% y al 16%, seguido por una cromatografía de afinidad en columna (usando *Chelating Sepharose Fast Flow*; columna de 7 mL de gel). El protocolo de cromatografía consistió en los siguientes pasos: 1- preparación de la columna (limpieza con 10–30 mL de solución de urea 6 M y lavado con 300–500 mL de H₂O MilliQ ultrapura); 2- equilibrado de la columna (50 mL de *buffer* A, 150 mL de H₂O MilliQ ultrapura, 60 mL de *buffer* B, 50 mL de *buffer* C y 60 mL de *buffer* D); 3- siembra (pasaje de la muestra, 100 mL de *buffer* D, 150 mL de *buffer* E); y 4- elución con *buffer* F.

Transformación de α_2M con metilamina

La metilamina es una amina primaria nucleofílica que produce una reducción de la unión tiol-éster intracadena contenida en cada subunidad de 180 kDa de α_2M . De esta manera se produce un cambio conformacional en la molécula de α_2M similar a lo ocurrido luego de la interacción con proteasas, con la consiguiente exposición del dominio RBD (α_2M^*) [88]. Este tratamiento se llevó a cabo incubando α_2M con metilamina 200 mM en Tris-HCl 50 mM; pH 8 durante 2 h a TA. Luego, la mezcla fue dializada exhaustivamente contra TBS pH 7,2 para eliminar el exceso de metilamina libre. La α_2M^* fue evaluada por ensayos de EGPA en condiciones no desnaturalizantes (5% de acrilamida/bis acrilamida)[89, 90], lo cual permitió diferenciar el cambio de movilidad electroforética ocurrida en la α_2M^* respecto a α_2M .

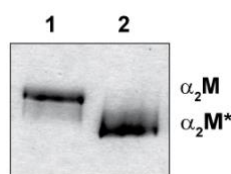


Figura 2.1. Evaluación de la movilidad electroforética de α_2M^* por EGPA no desnaturalizante al 5%. 1) α_2M nativa, 10 μ g. 2) α_2M^* , 10 μ g. Las proteínas fueron visualizadas por tinción con azul brillante de *Coomassie R-250*.

Purificación de GST-RAP

Colonias únicas de bacterias BL21 transformadas con el plásmido pGEX que expresa la proteína recombinante GST-RAP, fueron incubadas *overnight* en medio 2xYT en presencia de ampicilina 50 μ g/mL (iniciador). Al día siguiente se inocularon 100 mL de medio 2xYT con 1 mL de iniciador y se incubó a 37 °C con agitación hasta que se alcanzó una A_{600} 0,5-2. Luego, se procedió a la inducción con solución de IPTG a una concentración de 0,1-1 mM final durante 2 h. Paso siguiente se centrifugó a 7700 x g durante 10 min a 4 °C. Finalmente, las bacterias se re-suspendieron en 5 mL de PBS 1X y se lisaron en hielo por sonicación. Se agregó Tritón X-100 a una concentración final de 1% y se centrifugó a 12.000 x g para eliminar *debris* producto de la lisis. Paso siguiente

se procedió a purificar la proteína GST-RAP mediante la utilización de una columna *Glutathione Sepharose 4B*, siguiendo las especificaciones del fabricante.

Inhibición de unión de ligandos a LRP1 con GST-RAP

Para inhibir la interacción de α_2M^* con LRP1, células RAW 264.7 cultivadas en medio de cultivo celular, fueron lavadas con HBSS e incubadas con GST-RAP 400 nM en medio de incubación durante 30 min previo al ensayo. Paso siguiente se lavaron nuevamente con HBSS y se sometieron a las correspondientes incubaciones con GST-RAP 400 nM junto con α_2M^* 60 nM en medio de incubación.

Inhibición del señalamiento inducido por la interacción $\alpha_2M^*/LRP1$

Para inhibir el señalamiento intracelular activado por la interacción $\alpha_2M^*/LRP1$, células RAW264.7 cultivadas en medio de cultivo celular, fueron lavadas con HBSS e incubadas con *calphostin-C* (inhibidor de PKC) ó PD98059 (inhibidor Mek1-ERK1/2), ambos a una concentración final de 10 μ M en medio de incubación durante 30 min previo al ensayo. Paso siguiente se lavaron nuevamente con HBSS y se sometieron a las correspondientes incubaciones con dichos inhibidores junto con α_2M^* 60 nM en medio de incubación.

RT-PCR

Para evaluar el ARNm específico de LRP1, células MIO-M1 se trataron con el reactivo TRIzol® (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) y se extrajo ARN total en un solo paso mediante el uso del *kit* de extracción RNeasy Mini Kit (Qiagen, Chatsworth, CA), siguiendo las especificaciones del fabricante. Para medir el nivel de transcritos de LRP1, se utilizó una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR). La síntesis de ADNc se llevó a cabo utilizando *hexaprimers* al azar. Los *cebadores* específicos para *lrp1* y *gapdh* fueron:

LRP1 humano. Forward 5'- AGTGCTGCCAGACACAGCTCAAGTGTG-3'

LRP1 humano. Reverse 5'-CACAATCTTGCTGTCGACGAGCTTGGTG-3'

LRP1mouse.Foward: 5'- CCACTATGGATGCCCCTAAAAC-3'

LRP1mouse.Reverse:5'-GCAATCTCTTTCACCGTCACA-3'

GAPDH humano.Forward5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

GAPDH humano.Reverse5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

GAPDH mouse.Forward 5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3'

GAPDH mouse.Reverse 5'-GATCTCGCTCCTGGAAGATGG-3'

Para la amplificación se utilizaron 27 ciclos (hibridación, 58 °C 60 s; extensión, 72 °C 45 s y desnaturalización, 94 °C 30 s). Los productos de PCR fueron evaluados en un gel de agarosa al 2% y para su detección por fluorescencia se utilizó *SYBR® Safe DNA* (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina).

PCR a tiempo real

El sistema de amplificación a tiempo real utilizado fue de AppliedBioSystems (ABI7500 Sequence Detection System). Las condiciones de reacción, los cebadores y el tamaño de los fragmentos se seleccionaron para amplificar el gen de interés con eficiencias de amplificación comparables. Los experimentos se realizaron usando 1 X de la mezcla comercial de PCR (SYBR Green PCR Master Mix, Applied BioSystems), con las concentraciones de cebadores adecuadas para cada caso y 5 µL de una dilución 1/5, 1/10 o 1/20 de cADN en un volumen final de reacción de 15 µL. El protocolo de ciclado empleado incluyó un paso de desnaturalización de 10 min a 95°C seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 s y a 60°C por 1 min. La especificidad de la amplificación obtenida se evaluó a través del análisis de las curvas de disociación. El nivel de expresión relativa de los genes se calculó usando el método del $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando los transcritos de ciclofilina A como ARNm de referencia endógeno. La eficiencia de amplificación se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula matemática: $[10^{(-1/a)}]-1$ donde “a” es la pendiente de la curva estándar de cada fragmento amplificado. Cabe citar que en cada ensayo se han incluido los controles negativos necesarios.

LRP1humano.Foward: 5' - GCTATCGACGCCCCCTAAGAC – 3'

LRP1humano.Reverse5' - :CACACAGCTCAGTACCCAGG -3'

Ciclofilina.Foward:5'-GTCAACCCCACCGTGTCTT-3'

Ciclofilina.Reverse:5'-CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT-3'

Zimografía

Para evaluar la actividad gelatinolítica de proteasas en sobrenadantes de cultivos celulares, se emplearon ensayos de zimografía en EGPA-SDS copolimerizada con gelatina al 1,5 mg/mL como sustrato [91]. Las muestras fueron diluidas en *buffer* de muestra 5X. Los geles fueron lavados durante 90 min con 2,5% (v/v) Triton X-100 y la actividad de MMP fue desarrollada a 37 °C en *buffer* enzima durante 24 h. Posteriormente, los geles fueron teñidos con *Azul Brillante de Coomasie R-250* (125 mg/dL) y decolorados en solución decolorante [92]. Las zonas de lisis en la gelatina fueron evidenciadas como bandas claras en contraste con el fondo oscuro producto de la coloración.

3.2.5 Adquisición de imágenes de microscopía

Las imágenes para análisis de colocalización se obtuvieron mediante el empleo de los microscopios de fluorescencia confocal FV300 y FV1000. Secciones ópticas simples de dobles y triples marcaciones de células RAW264.7 y monocitos fueron adquiridas utilizando objetivos PLAPON 60X *Oil*/1,42 NA y un muestreo o *scanning* a 8 μs/pixel en modo secuencial por línea.

3.2.6 Procedimientos para cuantificación de imágenes y análisis estadístico de los datos

Comparación estadística de medias

En el caso de resultados derivados de dos condiciones experimentales, la comparación estadística de las medias se llevó a cabo mediante la prueba τ -*Student* para muestras independientes, mientras que en situaciones donde las condiciones experimentales fueron más de dos, se realizó análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey.

Se graficaron las medias \pm DE o SEM. En ambos casos valores de $p < 0,05$ determinaron diferencias significativas.

Cálculo de coeficientes de colocación de Manders

Los coeficientes de colocación de Manders se calcularon mediante el empleo del programa informático *ImageJ* a través del *pluginJAPoC*[93]. Al menos 20 células por condición fueron analizadas.

Las imágenes binarias de los pixeles que colocaron se obtuvieron a partir del empleo del *plugin Colocalization Highlighter*.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Estudio de los mecanismos moleculares que regulan la migración de monocitos-macrófagos a través del sistema α_2M /LRP1

4.1.1 Efecto migratorio inducido por el sistema α_2M /LRP1 en la línea celular RAW264.7.

Si bien ha sido establecido que LRP1 es clave en la migración de distintos tipos celulares, resta establecer el efecto que ejercen determinados ligandos de este receptor sobre la motilidad celular. Con esto en mente, en una primera etapa se investigó si α_2M^* podía inducir migración celular de monocito-macrófagos que expresan de manera constitutiva LRP1. Para ello, se realizaron ensayos de migración bidimensional en “herida” o de *Wound-Healing* empleando la línea celular RAW264.7. Estos ensayos se realizaron individualmente en presencia de α_2M^* , y como ensayo control se utilizó la proteína RAP, la cual inhibe la unión de α_2M^* a LRP1. En la Figura 4.1 se muestran imágenes representativas de estos experimentos seguido del análisis cuantitativo basado en el número de células invadiendo la “herida” a un tiempo fijo de ensayo. Un mayor número de células invadiendo la zona de “herida” dentro de un determinado período de tiempo indica un incremento de la motilidad celular. Por lo tanto, los resultados obtenidos muestran que α_2M^* genera un aumento de la migración celular a 12 h de estímulo. Aquí también se observa que el evento celular migratorio inducido por α_2M^* es mediado por su interacción con LRP1 puesto que la migración celular fue significativamente disminuida cuando las células fueron pre-incubadas con RAP.

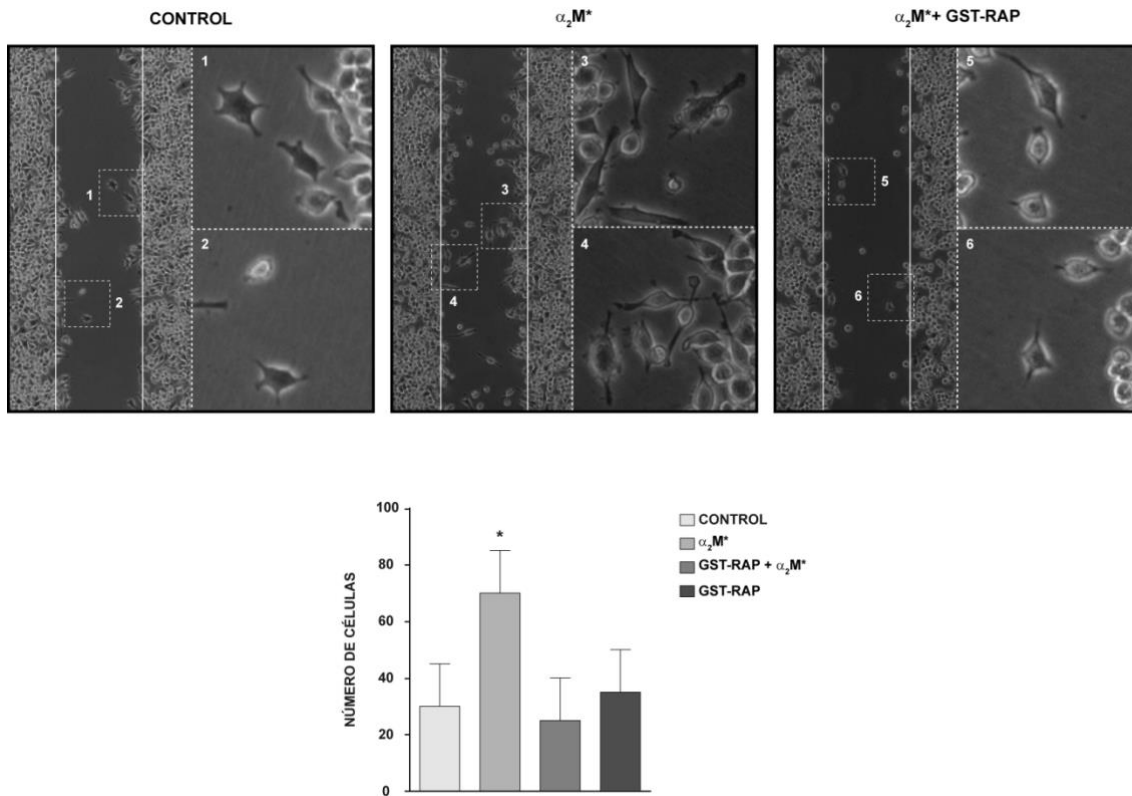


Figura 4.1. Ensayo de *Wound-Healing* para analizar el efecto migratorio inducido por el sistema $\alpha_2M^*/LRP1$ en células RAW264.7. El panel superior muestra una imagen representativa de ensayos de *Wound-Healing* en presencia o ausencia de α_2M^* (60 nM) y RAP (400 nM), la cual fue pre-incubada durante 2h previo a la adición de α_2M^* . Ampliaciones (zoom digital 4X) de cada condición (recuadros 1–6) son mostradas. El panel inferior muestra el análisis cuantitativo del ensayo de *Wound-Healing* indicado por el número de células que invaden la “herida” obtenido a partir de tres experimentos independientes para cada condición. Cada imagen representa un área promedio equivalente de la herida de $5 \times 10^5 \pm 1 \times 10^4 \mu m^2$ registrado en tiempo 0 h. Las células que invaden esta área se contaron a las 12 h y los resultados se expresaron como número de células por área de acuerdo a lo detallado en Materiales y métodos. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo mediante un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey. (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cuando los experimentos fueron realizados en presencia del inhibidor de proliferación celular, hidroxurea se obtuvieron resultados similares (datos no mostrados), lo cual indica que α_2M^* está afectando la migración y no proliferación, a los tiempos de ensayos analizados.

4.1.2 Fenotipo migratorio inducido por la interacción $\alpha_2M^*/LRP1$.

Dentro del marco conceptual sobre migración celular, se evaluó en células RAW264.7 el modo de movimiento celular inducido por α_2M^* sobre células RAW264.7. Para ello, a partir de los ensayos de *Wound-Healing* mostrados en la Figura 4.1 se procedió a realizar

capturas de imágenes por microscopia óptica de campo claro, a diferentes intervalos de tiempo durante todo el periodo de estímulo con α_2M^* . En los recuadros de la Figura 4.1 se muestran magnificaciones (4X) de dichas regiones, evidenciando que el estímulo con α_2M^* induce un aumento de la migración celular a través de la formación de largas protrusiones que resultan ser típicos de un modo migratorio mesenquimal[59]. Del mismo modo que con la migración celular, RAP produce una inhibición en la formación de protrusiones inducida por α_2M^* , lo cual indica que este evento está mediado por la interacción de α_2M^* con su receptor LRP1.

4.1.2.1 Evaluación de proteinasas secretorias (MMP-2 y MMP-9) y de membrana (MT1-MMP).

Como fue previamente descrito, se conoce que el modo mesenquimal se asocia con la degradación proteolítica de la matriz extracelular[54]. En esta etapa evaluamos metaloproteinasas secretorias (MMP-2 y MMP-9) y de membrana (MT1-MMP) en células RAW264.7 cultivadas en presencia de α_2M^* , utilizando para ello ensayos de zimografía gelatinolítica y microscopia inmunofluorescente, respectivamente. En la Figura 4.2 se muestran resultados representativos de los análisis zimográficos donde se observa que α_2M^* indujo un aumento de la actividad de MMP-9, lo cual es indicativo de un aumento de la síntesis y secreción de dicha metaloproteinasa. En las mismas condiciones de ensayo no se observaron modificaciones en la secreción y actividad de MMP-2, puesto que este tipo celular no produce constitutivamente esta clase de metaloproteinasa (datos del laboratorio no publicados). Por lo tanto, la secreción de MMP-9 inducida por α_2M^* es compatible con la migración celular de un modo mesenquimal en células RAW264.7.

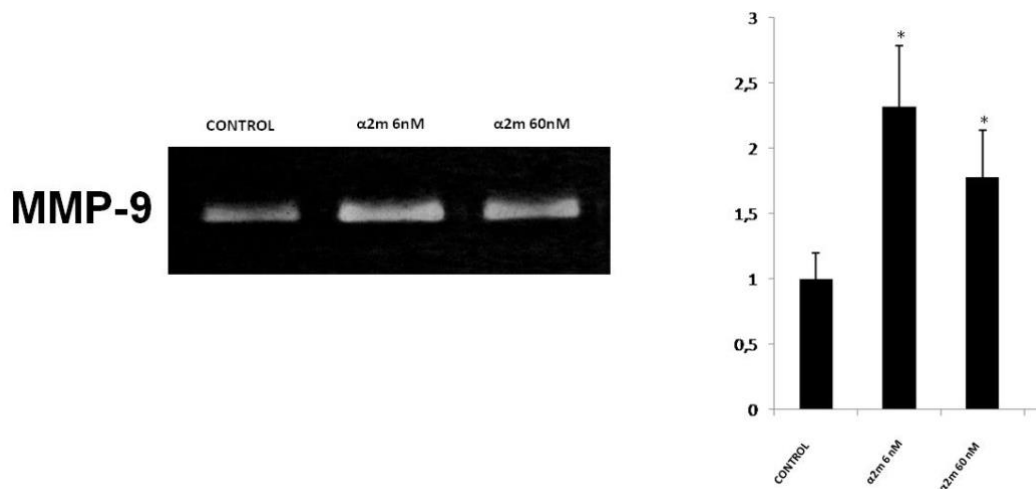


Figura 4.2. Análisis zimográfico de MMP-9 en medio celular condicionado obtenido de cultivos decélulas RAW264.7. Las células fueron desprovistas de SFB durante 2h previo al estímulo con α_2M^* a distintas concentraciones (6 nM y 60 nM) por 12 h. Las barras muestran el valor medio de la Intensidad Relativa obtenida por densitometría respecto al control a partir de 3 experimentos independientes. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo mediante un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey. (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

Como fuera mencionado, en los procesos migratorios con modo mesenquimal, MT1-MMP cumple una función clave a nivel de la superficie celular al degradar componentes de la matriz extracelular y al motorizar mecanismos de señalamiento intracelular que participan en el propio proceso migratorio [53]. Por este motivo, se procedió a analizar la distribución subcelular de MT1-MMP en células RAW264.7 estimuladas con α_2M^* por microscopía de fluorescencia. Para ello, MT1-MMP fue detectada por inmunofluorescencia indirecta (IFI) conjuntamente con LRP1 a través de anticuerpos específicos. La observación y adquisición de imágenes se realizó a través de microscopía de fluorescencia confocal (MC), las cuales se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos detallados en Materiales y Métodos. En la Figura 4.3 se muestra una imagen representativa de estos experimentos, donde se observa que α_2M^* (1 h de estímulo) produce una marcada redistribución de MT1-MMP conjuntamente con LRP1 hacia estructuras vesiculares localizadas a nivel de las protrusiones celulares o *leading edge*. En ausencia de estímulo con α_2M^* (condición control) se observa que tanto LRP1 como MT1-MMP son sustancialmente distribuidos a nivel de estructuras vesiculares

perinucleares. Por lo tanto, se deduce que α_2M^* induce la redistribución y localización de MT1-MMP a nivel de las protrusiones celulares, lo cual es característico del modo mesenquimal de migración.

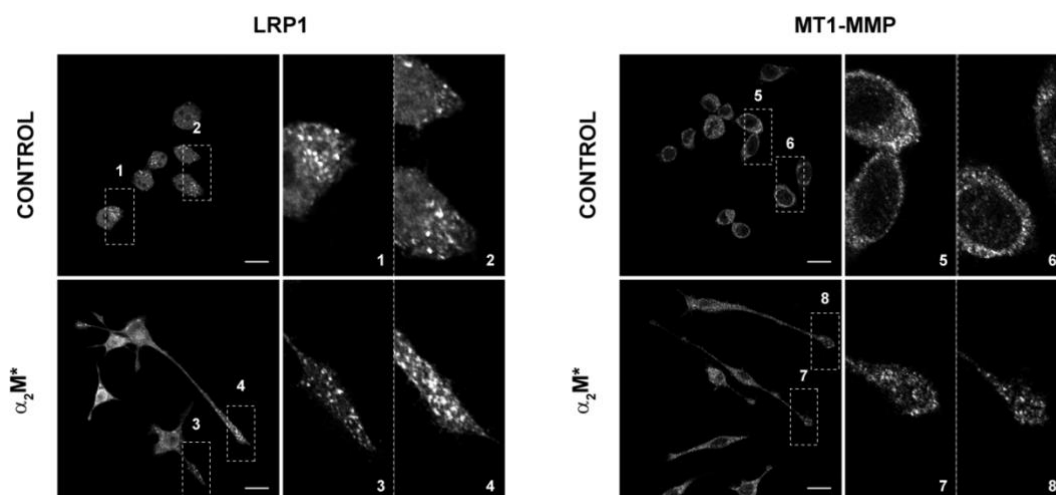


Figura 4.3. Distribución subcelular de LRP1 y MT1-MMP en células RAW264.7 estimuladas con α_2M^* . Inmunofluorescencia indirecta analizada por microscopía confocal. Distribución subcelular de LRP1 (cuadrante izquierdo) y MT1-MMP (cuadrante derecho) en ausencia y presencia de α_2M^* (60 nM, 1h). Ampliaciones (*zoom* digital 4X) de las regiones celulares (recuadros) son mostradas.

Teniendo en cuenta que α_2M^* promueve una relocalización subcelular de LRP1 y MT1-MMP hacia las protrusiones celulares, resultó de interés el estudio de colocalización entre ambas proteínas. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de IFI utilizando simultáneamente ambos anticuerpos específicos, en las mismas condiciones de ensayo antes mencionadas. En la figura 4.4 no se observa una colocalización significativa entre LRP1 y MT1-MMP a nivel perinuclear ni en las protrusiones, tanto en ausencia como en presencia de α_2M^* . Estos resultados indican que el estímulo con α_2M^* genera una redistribución de LRP1 y MT1-MMP hacia las protrusiones celulares, aunque no comparten las mismas estructuras vesiculares a este nivel, lo cual sugiere que LRP1 y MT1-MMP, bajo el estímulo inducido con α_2M^* , son distribuidas hacia estas protrusiones siguiendo rutas de tráfico intracelulares diferentes.

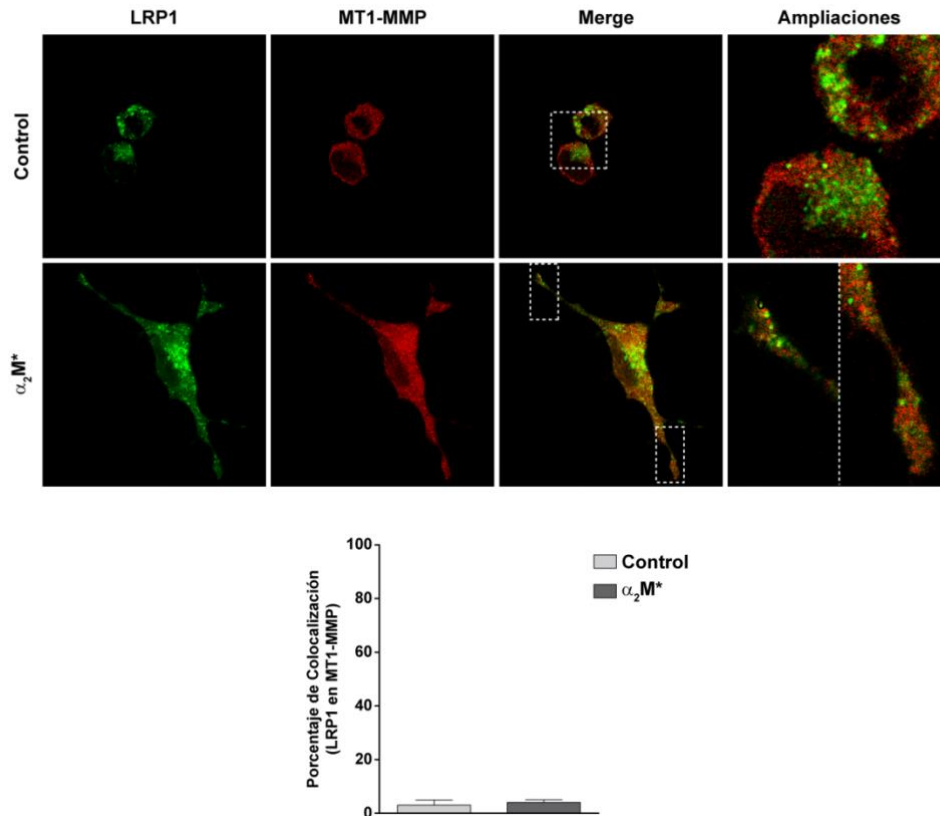


Figura 4.4. Inmunodetección de LRP1 y MT1-MMP en células RAW264.7. *Panel superior*, distribución subcelular de LRP1, MT1-MMP y su respectivo análisis de colocalización (*Merge*), en ausencia y presencia de α_2M^* (60 nM, 1h). Ampliaciones (*zoom* digital 4X) de las regiones celulares provenientes de las imágenes *Merge* (recuadros) son mostradas. Cada panel es representativo de 15 imágenes por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 20 μm . *Panel inferior*, Medias \pm DE de los coeficientes de colocalización (proporción de estructuras vesiculares que contienen LRP1 y MT1-MMP) en ausencia y presencia de α_2M^* . Las cuantificaciones fueron realizadas en al menos 20 células por condición. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba τ -Student para muestras independientes.

4.1.2.2 Remodelación del citoesqueleto celular en células RAW264.7 estimuladas con α_2M^* .

Considerando que los procesos de motilidad celular mediado por modos mesenquimales requieren de una remodelación del citoesqueleto con polimerización de actina [69], se procedió a detectar este estado de actina a través de la toxina faloidina, la cual tiene una gran afinidad por los filamentos de actina polimerizada (F-Actina). Para ello, las células RAW264.7 fueron cultivadas en medio de cultivo sin α_2M^* (control) y en presencia de α_2M^* (60 nM) durante 60 min. A través de ensayos de IFI se analizó la distribución de LRP1, utilizando un anticuerpo monoclonal específico, mientras que F-actina se detectó

empleando la toxina faloidina conjugada con Alexa-Fluor⁵⁹⁴. Por otra parte, resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que α_2M^* induce la migración celular de monocitos-macrófagos a través de la activación de PKC (Tesis Doctoral Leandro Cáceres, 2010, Facultad de Ciencias Químicas, UNC). Del mismo modo, se conoce que PMA (por *phorbol 12-myristate 13-acetate*) es un activador de PKC en este tipo celular[94]. Por lo tanto, en esta etapa experimental se procedió a utilizar PMA (300 nM) como un control de activación de PKC respecto al inducido por α_2M^* y comparar el efecto de ambos inductores sobre la remodelación del citoesqueleto. La Figura 4.5 muestra un experimento representativo de cada ensayo de IFI donde se observa que α_2M^* , respecto al ensayo control, produjo una marcada redistribución de F-actina hacia las protrusiones celulares conjuntamente con una evidente distribución de LRP1 hacia estos procesos. En cuanto al estímulo con PMA, sí bien indujo un marcado aumento del volumen celular de las células RAW264.7, respecto al ensayo control, esto no fue acompañado de protrusiones celulares. El estímulo con PMA, a diferencia de lo acontecido con α_2M^* , indujo una distribución de F-Actina de características difusas y radiales con localización franca a nivel de la membrana plasmática, mientras que LRP1 hizo lo propio en estructuras vesiculares más difusa y perinucleares. Por lo tanto, estos resultados demuestran que α_2M^* induce la remodelación del citoesqueleto celular, compatible con el modo migratorio mesenquimal, lo cual involucraría una vía selectiva de señalamiento intracelular dependiente de PKC.

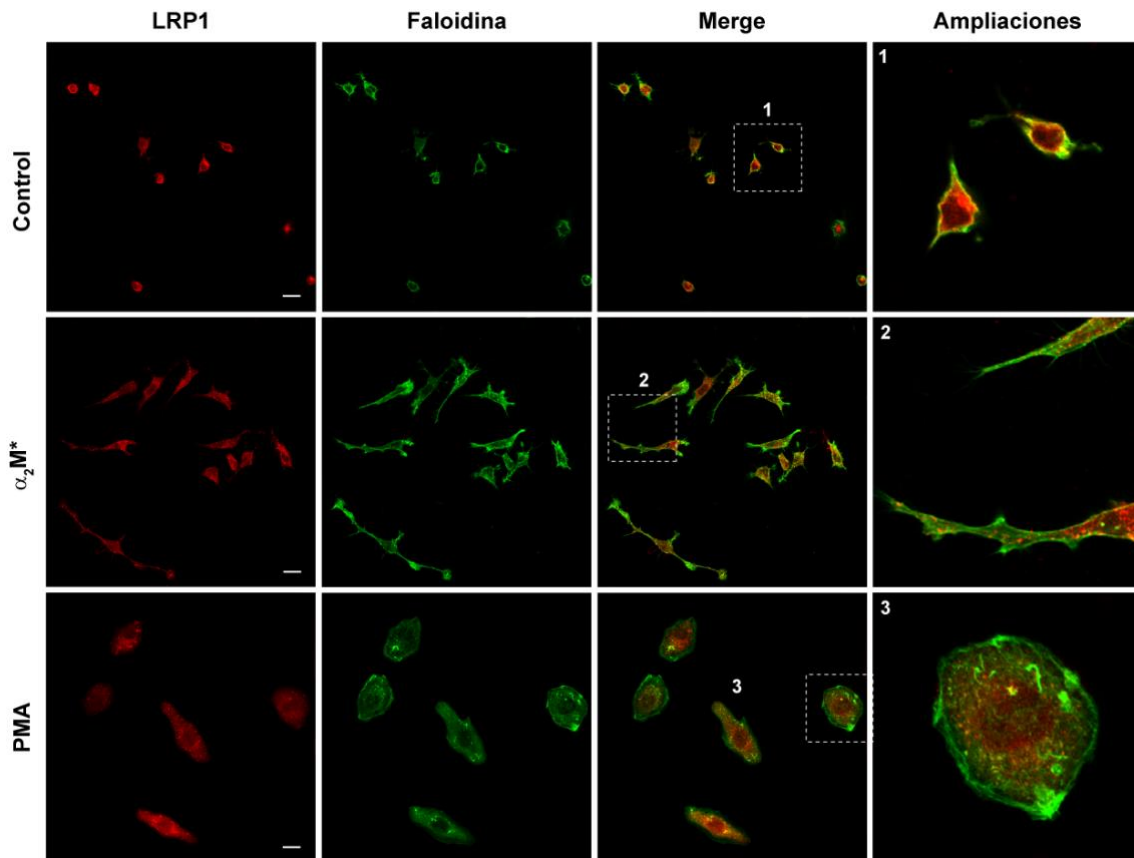


Figura 4.5. Ensayos IFI para el análisis de la distribución subcelular de LRP1 y F-Actina en células RAW264.7. Cada panel representa la detección de LRP1, inmunodetectado por un anticuerpo específico (rojo), F-actina, detectada por Faloidina-Alexa Fluor⁵⁹⁴ (verde), y el respectivo análisis de colocalización de ambas proteínas (*Merge*), en ausencia y presencia de α_2M^* (60 nM, 1h) así como de PMA (100 nM, 1h). Ampliaciones (*zoom* digital 4X) de las regiones celulares provenientes de las imágenes *Merge* (recuadros) son mostradas. Cada panel es representativo de 15 imágenes por condición provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 20 μ m.

4.1.2.3 El señalamiento intracelular activado por el sistema α_2M /LRP1 media la producción del modo migratorio mesenquimal en macrófagos.

Como se mencionara anteriormente, nuestro laboratorio ha demostrado que la activación de las vías de señalamiento intracelular inducida por α_2M^* en monocitos-macrófagos involucra la rápida activación de las isoformas PKC α / β II y la proteína adaptadora Shc-A, la cual activa corriente abajo la vía de señalamiento MAPK-ERK1/2 (Tesis Doctoral Leandro Cáceres, 2010, Facultad de Ciencias Químicas, UNC y [36]). Teniendo en cuenta estos antecedentes y los resultados de la Figura 4.5, en esta etapa se propuso analizar si el cambio hacia el modo migratorio mesenquimal de células RAW264.7, inducido por la

interacción $\alpha_2M^*/LRP1$, estaba mediado por la activación de estas vías de señalamiento intracelular. Para ello, las células fueron pre-incubadas con calfostin-C, un inhibidor farmacológico de PKC, previo al estímulo con α_2M^* .

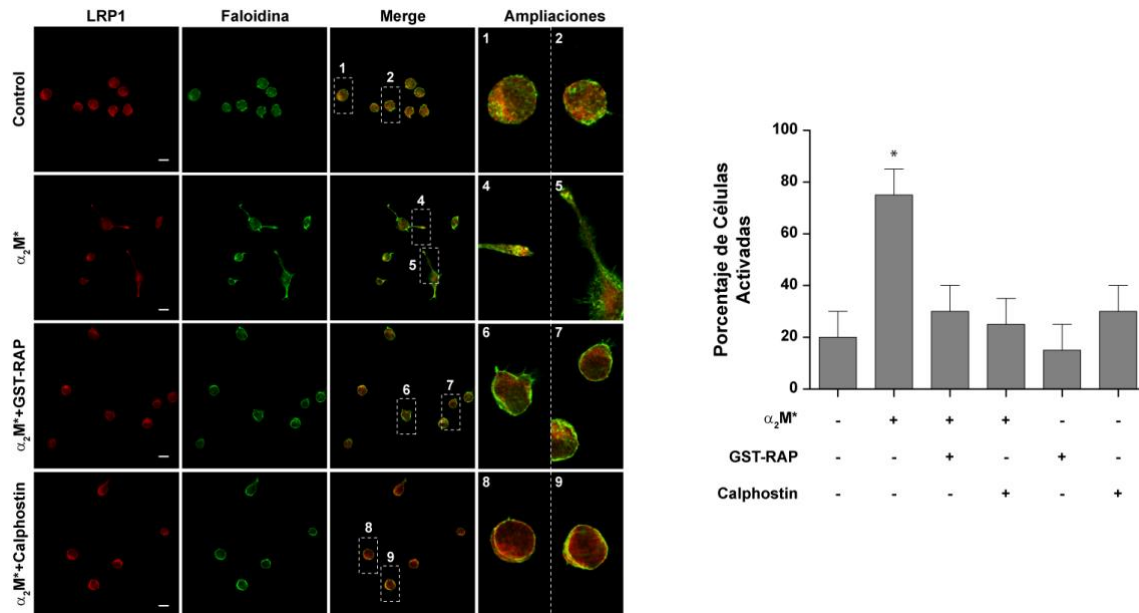


Figura 4.6. Ensayos IFI para analizar la dependencia de la activación de PKC en la producción del modo migratorio mesenquimal inducido por la interacción α_2M^* -LRP1. Cada panel representa la detección de LRP1, inmunodetectado por un anticuerpo específico (rojo), F-actina, detectada por Faloidina-Alexa Fluor⁵⁹⁴ (verde), y el respectivo análisis de colocalización de ambas proteínas (*Merge*), en ausencia y presencia de α_2M^* (60 nM, 1h). El tratamiento con GST-RAP (400 nM) por 30 min y Calfostin-C (Calphostin; 100 nM) por 30 min previo al tratamiento con α_2M^* también son indicados. Ampliaciones (*zoom* digital 4X) de las regiones celulares provenientes de las imágenes *Merge* (recuadros) son mostradas. Cada panel es representativo de 15 imágenes por condición provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 20 μ m. El gráfico de barras de la derecha muestra el porcentaje de células con formación de protrusiones celulares en las diferentes condiciones experimentales, obtenidos mediante el recuento de 200 células en campos de 40X. Una protrusión celular es definida como una proyección de la superficie celular cuya extensión excede al menos una vez el soma celular [59]. El símbolo (*) denota diferencias estadísticas significativas con un valor de $p < 0,05$

La Figura 4.6 muestra experimentos representativos de estos ensayos, donde se observa que α_2M^* induce protrusiones características del modo mesenquimal, con presencia de formación de filamentos de actina y distribución subcelular de LRP1 hacia estas protrusiones. Del análisis cuantitativo se desprende que el 70% del total de las células tratadas con α_2M^* , durante 1 hora de estímulo, presentan este modo migratorio. Por otra parte, células pretratadas con calfostin-C y luego estimuladas con α_2M^* mostraron una franca inhibición de las protrusiones celulares, polimerización de actina y redistribución

de LRP1. Del mismo modo, se puede observar que el pre-tratamiento con RAP (GST-RAP) también produjo un significativo bloqueo del efecto migratorio de α_2M^* . Estos resultados indican que el modo migratorio mesenquimal de células RAW264.7, inducido por α_2M^* , es mediado por el señalamiento intracelular dependiente de PKC activado por la interacción α_2M^* -LRP1.

4.1.3 Asociación de LRP1 con proteínas involucradas en la adhesión y migración celular.

4.1.3.1 Participación de LRP1 en la formación de adhesiones focales.

Como fue mencionado anteriormente, durante el proceso migratorio ocurren procesos de adhesiones focales a nivel celular y la MEC, donde participan diferentes asociaciones de proteínas que interactúan entre sí de manera secuencial y dinámica. Entre las proteínas participantes se destaca la presencia de la quinasa FAK, encargada de regular las adhesiones focales a nivel de la periferia celular [95]. Esta enzima se activa por diferentes estímulos migratorios y fosforila residuos específicos de diversas proteínas que interactúan a nivel intracelular con integrinas. Además, FAK cumple funciones fisiológicas claves implicadas con el desarrollo embrionario, la migración y supervivencia celular, mientras que la excesiva activación de FAK también está asociada con procesos patológicos como en el cáncer y enfermedades cardiovasculares [96, 97]. Considerando que LRP1 se localiza en estructuras vesiculares presentes en las protrusiones celulares, en esta etapa se propuso evaluar la participación de LRP1 en adhesiones focales en células RAW264.7 estimuladas con α_2M^* (60 nM; 1h). Para ello, se realizaron ensayos IFI para analizar la localización de FAK constitutiva y LRP1, utilizando anticuerpos específicos, conjuntamente con F-actina. Para la observación de las muestras y la adquisición de las imágenes se utilizaron técnicas de microscopía de fluorescencia confocal, las cuales se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos

detallados en Materiales y Métodos. En la figura 4.7 se muestran imágenes representativas de estos ensayos donde se observa que α_2M^* produce una redistribución de LRP1, FAK y F-actina hacia las protrusiones celulares, proceso que es completamente bloqueado cuando las células son pre-tratadas con GST-RAP (datos no mostrados). El análisis cuantitativo de estos ensayos IFI muestran un bajo nivel de colocalización de LRP1 y FAK en células RAW264.7, tanto en condiciones basales (sin estímulo) como en presencia de α_2M^* . Del mismo modo, el nivel de colocalización entre LRP1 y F-actina (faloidina) resultó ser sustancialmente baja, tanto en ausencia como en presencia de α_2M^* .

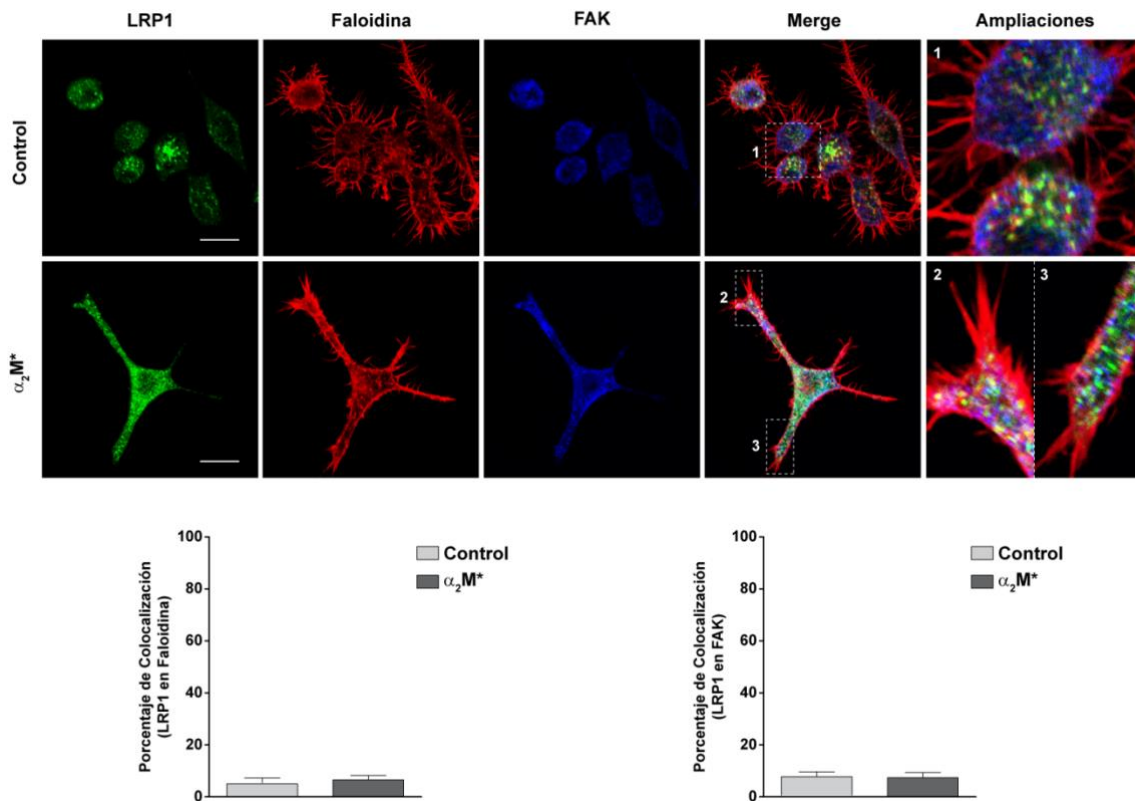


Figura 4.7. Ensayos de IFI para analizar la colocalización de LRP1 con FAK y F-actina en células RAW264.7 estimuladas con α_2M^* . Distribución subcelular de LRP1, F-actina (Faloidina), FAK y sus respectivos análisis de triple colocalización (*Merge*) en ausencia y presencia de α_2M^* (60 nM, 1h) en células RAW264.7. Ampliaciones (*zoom* digital 4X) de las imágenes *Merge* (recuadros) son mostradas. Cada panel es representativo de 15 imágenes por condición provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 20 μ m. Los gráficos de barra representan las Medias \pm DE de los coeficientes de colocalización (proporción de estructuras vesiculares que contienen LRP1 y FAK ó Faloidina positivas) en ausencia y presencia de α_2M^* , obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba t -Student para muestras independientes.

Con el propósito de evaluar si la redistribución de FAK a nivel de las protrusiones celulares inducidas por α_2M^* estaba asociado con la formación de procesos focales de adhesión caracterizados por la fosforilación de FAK (p-FAK), se procedió a la inmunodetección de p-FAK bajo las mismas condiciones experimentales del ensayo anterior.

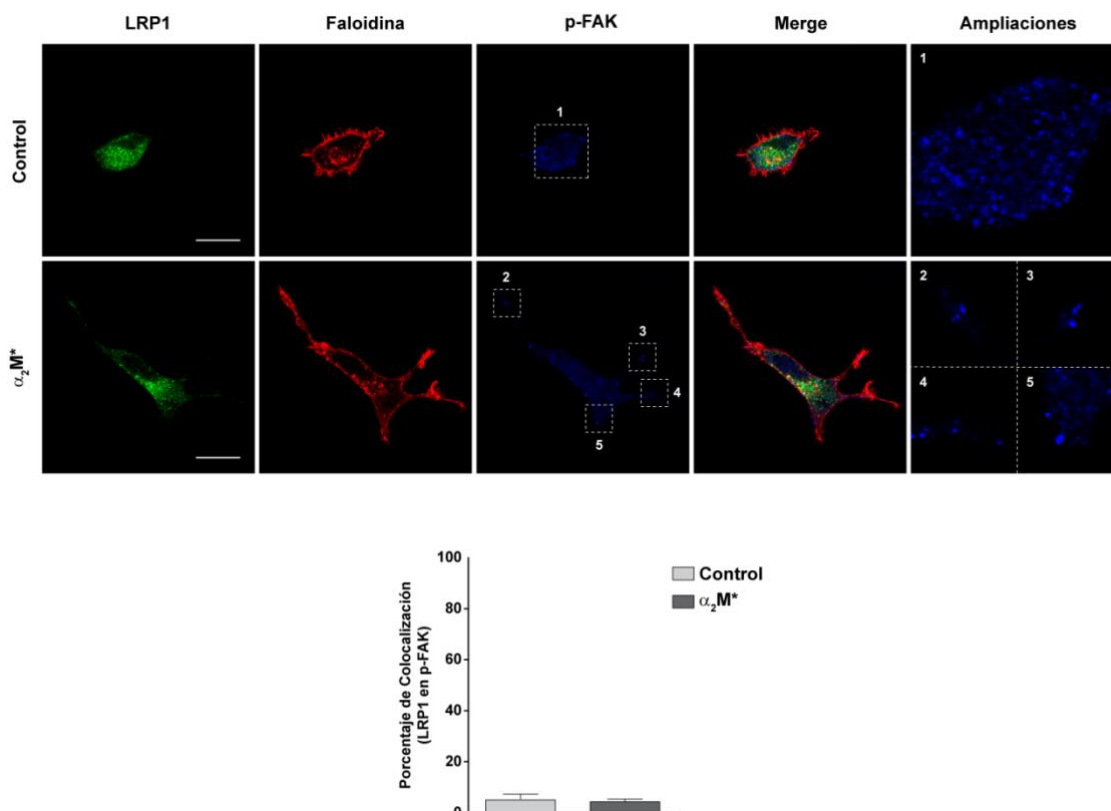


Figura 4.8. Ensayos de IFI para analizar la colocalización de LRP1 con p-FAK en células RAW264.7 estimuladas con α_2M^* . Distribución subcelular de LRP1, F-actina (Faloidina), p-FAK y sus respectivos análisis de triple de colocalización (*Merge*), en ausencia y presencia de α_2M^* (60 nM, 1h) en células RAW264.7. Ampliaciones (*zoom* digital 4X) provenientes de estructuras p-FAK positivas (recuadros) son mostradas. Cada panel es representativo de 15 imágenes por condición provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 20 μ m. Los gráficos de barra representan las Medias \pm DE de los coeficientes de colocalización (proporción de estructuras vesiculares que contienen LRP1 y p-FAK ó Faloidina positivas) en ausencia y presencia de α_2M^* , obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *t-Student* para muestras independientes.

En la Figura 4.8 se muestran imágenes representativas de estos ensayos donde se observa que el estímulo con α_2M^* induce la generación de protrusiones celulares con puntos definidos de fosforilación de FAK compatibles con adhesiones focales. Estos resultados en asociación con los mostrados en la Figura 4.7 demuestran que α_2M^* genera una

redistribución de p-FAK coincidente con lo mostrado para FAK constitutiva hacia las protrusiones celulares, lo cual es considerado un evento característico del modo migratorio mesenquimal. No obstante, el análisis cuantitativo del nivel de colocalización entre p-FAK y LRP1 muestra que el receptor de α_2M^* no colocaliza en estructuras focales p-FAK positivas, tanto en ausencia como en presencia de α_2M^* . Por lo tanto, se concluye que LRP1 no participa directamente en las adhesiones focales ya que no presenta una significativa colocalización con p-FAK a nivel de protrusiones celulares.

4.1.3.2 Asociación molecular de LRP1 con integrinas.

Dado que observamos una redistribución de LRP1 a nivel de protrusiones celulares conjuntamente con diferentes proteínas que participan en procesos migratorios, tales como MT1-MMP y p-FAK, aunque sin evidencias de colocalización, en esta etapa nos propusimos investigar si LRP1 presentaba algún nivel de asociación con integrinas, más precisamente con β_1 -integrina. Para ello, se realizaron ensayos de IFI en células RAW264.7 tratadas con α_2M^* (60 nM, 1h) con el propósito de analizar la distribución subcelular de LRP1 y β_1 -integrina utilizando anticuerpos específicos. En la figura 4.9 se muestran imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal donde se observa que LRP1 y β_1 -integrina colocalizan, principalmente hacia los procesos celulares, en células estimuladas con α_2M^* . El análisis cuantitativo del nivel de colocalización entre LRP1 y β_1 -integrina muestra un aumento en el porcentaje de colocalización cuando las células fueron estimuladas con α_2M^* ($56 \pm 4\%$) con respecto al control ($7 \pm 3\%$). Por otra parte, en células estimuladas con α_2M^* el porcentaje de colocalización entre ambas proteínas fue mayor a nivel de las protrusiones celulares ($60 \pm 5\%$) con respecto al cuerpo celular ($39 \pm 5\%$). Estos resultados indican que LRP1, si bien no participa directamente con la maquinaria molecular de las adhesiones focales, se asocia a nivel intracelular con β_1 -integrina, lo cual se incrementa en presencia de α_2M^* , sugiriendo que el sistema

$\alpha_2M^*/LRP1$ podría regular el tráfico y actividad de integrinas durante el proceso de adhesión y migración celular.

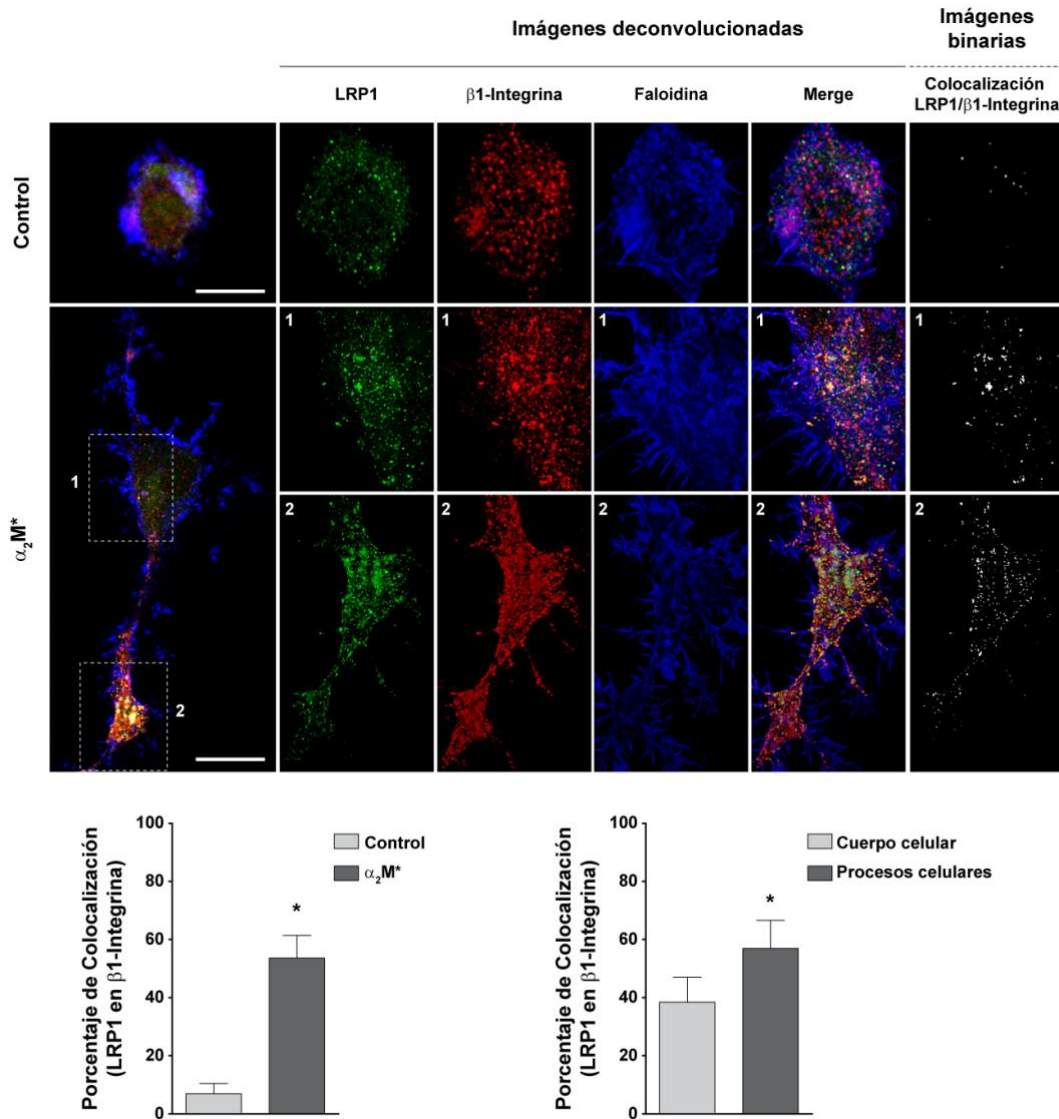


Figura 4.9. Ensayos de IFI para analizar la colocalización de LRP1 con $\beta 1$ integrina en células RAW264.7 estimuladas con α_2M^* . Imagen deconvolucionada obtenida por microscopía confocal (recuadros primera columna) mostrando la distribución subcelular de LRP1, $\beta 1$ -integrina, F-actina (faloidina) y de colocalización de ambas proteínas (*Merge*), en ausencia y presencia de α_2M^* (60 nM, 1h) en células RAW264.7. También se observan sus correspondientes imágenes binarias (sexta columna), en las que se muestran en color blanco los píxeles que colocalizaron entre LRP1 y $\beta 1$ -integrina. Cada panel es representativo de 15 imágenes por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 20 μm . Los gráficos de barra representan las Medias \pm DE de los coeficientes de colocalización (proporción de estructuras vesiculares que contienen LRP1 y $\beta 1$ -integrina) en ausencia y presencia de α_2M^* , obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición a nivel del cuerpo y procesos celulares (indicados en recuadros de la primera columna). La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba t -Student para muestras independientes.

Debido a que el estímulo con α_2M^* produce redistribución hacia los procesos celulares de LRP1, MT1-MMP, F-actina, p-FAK y $\beta 1$ -integrina, a modo de control, en las mismas condiciones que en los experimentos anteriores, se procedió a inmunomarcarse una proteína que se expresa exclusivamente en vesículas de Golgi (GM130) con el propósito de demostrar que el efecto de la redistribución de las proteínas estudiadas era específica al efecto de α_2M^* y no producto de un artefacto experimental.

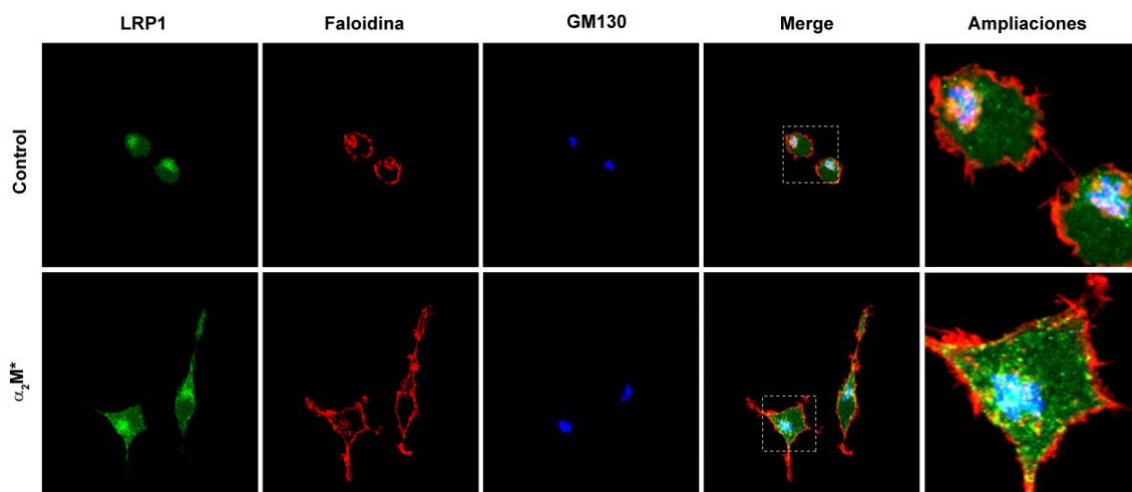


Figura 4.10. Ensayos de IFI para analizar la distribución subcelular de LRP1, F-actina y GM130 en células RAW264.7 estimuladas con α_2M^* . Distribución subcelular de LRP1, F-actina (Faloidina) y GM130 y sus respectivos análisis de triple de colocalización (*Merge*), en ausencia y presencia de α_2M^* (60 nM, 1h) en células RAW264.7. Ampliaciones (*zoom* digital 4X) de las regiones celulares provenientes de las imágenes *Merge* (recuadros) son mostradas. Cada panel es representativo de 15 imágenes por condición provenientes de tres experimentos independientes.

En la Figura 4.10 se muestran imágenes representativas de microscopía confocal donde se observa que GM130 conserva su ubicación en vesículas de Golgi en células RAW264.7 independiente del estímulo con α_2M^* . Estos resultados, claramente indican que la redistribución observada en las otras proteínas son producto de un efecto específico inducido por el sistema $\alpha_2M^*/LRP1$.

4.1.4 Efecto redistributivo de LRP1 hacia los procesos celulares generados por el estímulo con α_2M^* .

En este punto nos propusimos evaluar si la redistribución de LRP1 hacia las protrusiones celulares inducida por el estímulo con α_2M^* era debido a una síntesis “*de novo*” o

producto de una redistribución de LRP1 desde compartimientos de almacenamiento intracelulares hacia la periferia celular. Para ello, las células fueron pre-incubadas concicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica, previo al estímulo con α_2M^* .

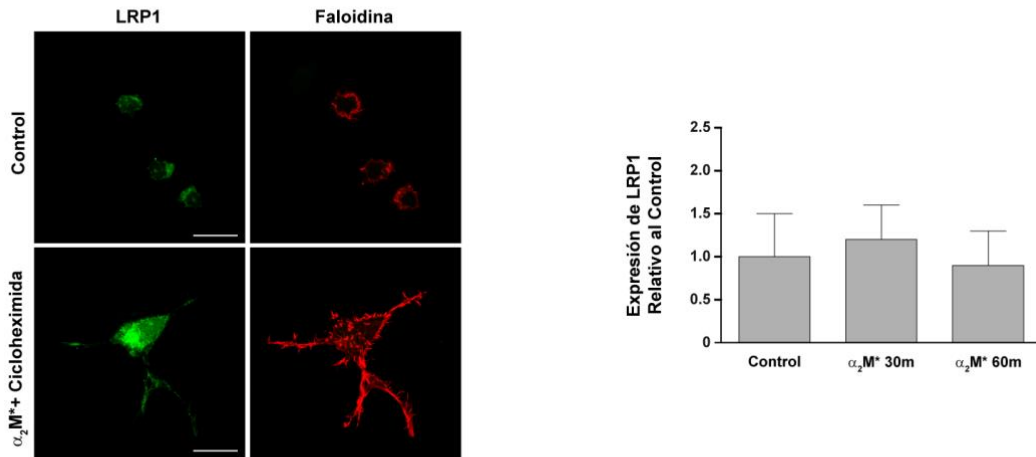


Figura 4.11 Ensayos de IFI para analizar la redistribución y síntesis de LRP1 en células RAW 264.7 estimuladas con α_2M^* . Imagen representativa de microscopía confocal mostrando la distribución subcelular de LRP1 y F-actina (faloidina) en ausencia y presencia de α_2M^* (60 nM, 1h) en células RAW264.7 previamente tratadas o no con cicloheximida. La barra de escala corresponde a 20 μ m. Los gráficos de barra representan los niveles relativos de ARNm de LRP1 obtenidos por RT-PCR cuantitativa en células RAW264.7 estimuladas con α_2M^* (60 nM) durante 30 y 60 min, obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas de 3 experimentos independientes por condición. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba t -Student para muestras independientes.

En la Figura 4.11 se observa un experimento representativo donde se muestra que cicloheximida no afecta la generación de protrusiones celulares con la consecuente redistribución de LRP1 y polimerización de actina bajo estímulo con α_2M^* . Por otra parte, para evaluar si α_2M^* induce la expresión del gen de LRP1 en este tipo celular se procedió a evaluar la expresión de este receptor a nivel del ARN mensajero específico (ARNm-LRP1) mediante RT-PCR cuantitativas sobre células RAW264.7 estimuladas con α_2M^* durante 30 y 60 min (Fig.4.11), donde se observa que α_2M^* no indujo cambios en la expresión del gen de LRP1 con respecto al control.

Por lo tanto, este conjunto de resultados indican que la movilidad intracelular de LRP1 hacia las protrusiones celulares generados por el estímulo con α_2M^* se debe a una redistribución subcelular y no a una síntesis proteica de este receptor.

4.1.5 Principales Conclusiones

Los resultados detallados en la sección 4.1. permiten concluir que α_2M^* constituye un estímulo migratorio de las células RAW264.7. A su vez, se logró determinar que dicho fenómeno está mediado por un modo migratorio mesenquimal caracterizado por: i) una redistribución de MT1-MMP, FAK, p-FAK y $\beta 1$ -integrina hacia las protrusiones celulares; ii) aumento de la secreción de MMP-9 y polimerización de actina (F-actina); y iii) redistribución subcelular y tráfico intracelular de LRP1 hacia las protrusiones celulares. El modo migratorio mesenquimal inducido por α_2M^* fue bloqueado por la presencia de RAPo de inhibidores farmacológicos de las diferentes vías de señalamiento intracelular inducidas por $\alpha_2M^*/LRP1$.

La significativa colocalización de LRP1 con $\beta 1$ -integrina inducida por α_2M^* a nivel de las protrusiones celulares, así como la baja colocalización con p-FAK a nivel de los puntos de adhesiones focales, estarían indicando que la participación de LRP1 en los procesos migratorios celulares no se relacionarían con el complejo molecular responsable de la adhesión celular, sino a través de la regulación del tráfico intracelular de $\beta 1$ -integrina hacia los sitios intracelulares donde se promueve la formación de las lamidopodias. En este punto es importante mencionar que existe evidencia de que la endocitosis y el transporte intracelular de LRP1 jugaría un rol clave en la regulación de la actividad de otros receptores de transmembrana, tales como PDGFR β , uPAR y MT1-MMP, los cuales participan directamente en la migración de células normales y tumorales. Por lo tanto, se deduce que el sistema α_2M^* -LRP1 media la motilidad celular de macrófagos al activar la maquinaria molecular que participa en el tráfico intracelular de $\beta 1$ -integrina.

4.2. Expresión y función de LRP1 en subpoblaciones de monocitos de sangre periférica murina.

La utilización de modelos animales ha contribuido sustancialmente al conocimiento de la patogeniade enfermedades cardiovasculares, permitiendo desarrollar técnicas diagnósticas y de validación de protocolos preventivos y terapéuticos [98]. Aunque los modelos animales no siempre reflejan la realidad clínica de las patologías humanas, permiten obtener información sobre la etiopatogenia a través de un control adecuado de variables y procedimientos, con frecuencia invasivos, que son de difícil aplicación en los estudios clínicos en humanos.

La cepa de ratones C57BL/6J es la más susceptible a desarrollar aterosclerosis y es, por lo tanto, de elección para ser genéticamente modificada con el fin de desarrollar modelos de aterosclerosis. Los ratones ApoE deficientes o *knock-out* (KO-ApoE^{-/-}), o sea que tienen suprimido el gen que codifica para la Apolipoproteína E, constituyente fundamental de diversos tipos de lipoproteínas, desarrollan dislipemia (aumento de colesterol y triglicéridos séricos) y placas de aterosclerosis en arterias de gran calibre (aorta y carótidas) a edad temprana (dentro de los primeros 3 meses de edad) cuando son alimentados con dietas ricas en grasa [99]. Este ha sido el modelo de aterosclerosis más estudiado y mejor caracterizado, el cual generalmente se utiliza como base para el estudio de otros genes que participan en el desarrollo de la aterosclerosis.

4.2.1. Caracterización del modelo murino KO-ApoE^{-/-}

Como se mencionara arriba, los ratones C57BL/6J KO-ApoE^{-/-} desarrollan dislipemias y placas ateroscleróticas a edad temprana, cuando son alimentados con dietas con alto contenido graso, también conocida como dieta occidental o “*western diet*”. [99]. Por lo tanto, en una primera etapa, en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Claudia Castro (IMBECU, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Cuyo), se

procedió a medir los niveles séricos de colesterol, triglicéridos y glucosa en ratones C57BL/6J normales y KO-ApoE^{-/-} (dos meses de edad) alimentados con dieta estandar y dieta rica en grasas durante 1 mes, siguiendo lo indicado en Materiales y Métodos. Para ello, se conformaron al menos 4 grupos de estudio de 5 animales por grupo (n= 5), a saber: i) ratones normales (WT) alimentados con dieta control, ii) ratones normales (WT) alimentados con dieta rica en grasas, iii) ratones KO-ApoE^{-/-} alimentados con dieta control, y iv) ratones KO-ApoE^{-/-} alimentados con dieta rica en grasas. Transcurrido el mes de alimentación, se tomaron muestras de sangre entera a través de la cavidad cardíaca y luego los ratones fueron sacrificados para otros propósitos del estudio siguiendo lo detallado en Materiales y Métodos. Como se puede observar en la figura 4.12, las concentraciones medias de colesterol y triglicéridos mostraron diferencias estadísticamente significativas en los animales modificados genéticamente respecto a los normales, siendo aun mayor esta diferencia en animales KO-ApoE^{-/-} alimentados con dieta grasa con respecto a los alimentados con dieta normal. Por el contrario, todos los grupos de animales presentaron concentraciones similares de glucosa en sangre.

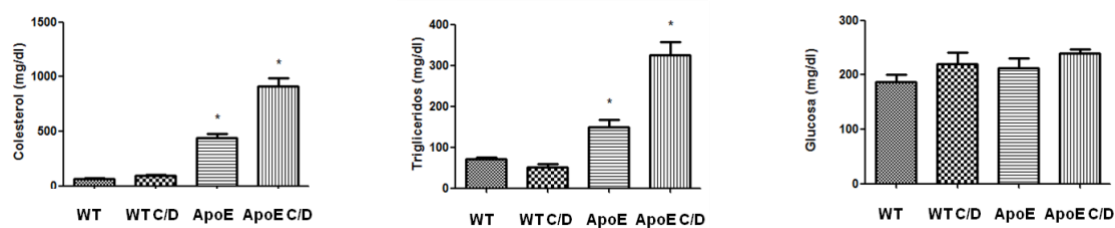


Figura 4.12: Niveles séricos de colesterol, triglicéridos y glucosa de ratones C57BL/6J normales (WT) y KO-ApoE^{-/-}(ApoE) alimentados con dieta control y dieta rica en grasas (C/D).Las gráficas representan los valores medios de concentración sérica en mg/dl de colesterol (izquierda), triglicéridos (medio) y glucosa (derecha) en cada grupo estudio (n=5), con sus correspondientes barras de error de la media (SEM). El símbolo (*) denota diferencias estadísticamente significativas con un valor p <0,05 respecto a la situación control (WT).

Por otra parte, es conocido que los ratones KO-ApoE^{-/-} presentan acumulación de lípidos y formación de placas ateroscleróticas a nivel de las principales arterias, lo cual no se evidencia en un animal normal aún alimentado con dieta rica en grasas [99]. Teniendo

esto en cuenta, en el laboratorio de la Dra. Claudia Castro (IMBECU, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Cuyo) se procedió analizar porciones de aortas provenientes de los grupos de animales mencionados, con el propósito de examinar la presencia de placas ateromatosas con inclusiones lipídicas en aortas a través de un procedimiento de tinción con el colorante Oil-Red. En la Figura 4.13 se muestra una imagen representativa donde se observa que una importante acumulación lipídica y formación de placas ocurre en ratones KO-ApoE^{-/-} alimentados con dieta rica en grasa respecto a los alimentados con dieta normal. En cambio, los animales WT no evidenciaron presencia de acumulación de lípidos ni formación de placas ateromatosas bajo ninguno de los dos tratamientos dietarios (datos no mostrados).

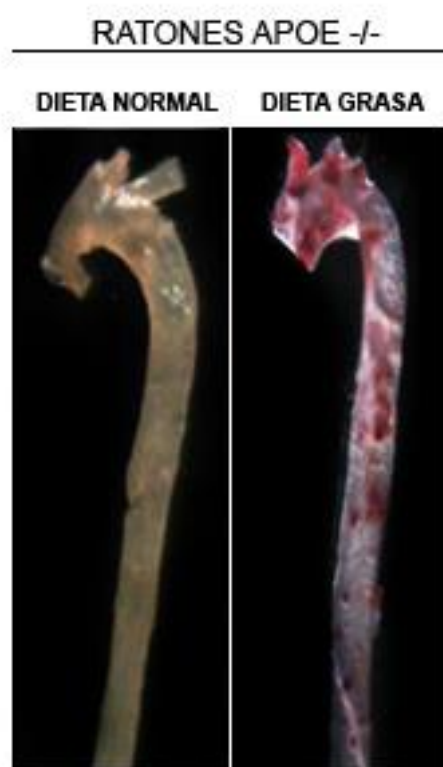


Figura 4.13: Tinción de Oil-Red para la detección de acumulación grasa en aortas de ratones KO-ApoE^{-/-} de tres meses de edad y alimentados con DIETA NORMAL o GRASA durante un mes, pudiéndose observar como la acumulación de grasa ocurre principalmente en la región del cayado aórtico.

En conclusión, ratones C57BL/6J KO-ApoE^{-/-} alimentados con una dieta rica en grasas reproducen un modelo de aterosclerosis caracterizado por dislipemia y evidente formación de placas ateromatosas a nivel de aorta. A partir de esta caracterización del modelo animal de aterosclerosis se procedió a planificar y desarrollar los siguientes experimentos.

4.2.2 Estudio de la expresión de LRP1 de monocitos de ratón por citometría de flujo.

Los monocitos son células claves del sistema inmune al participar en la asociación celular y molecular de la inmunidad innata con la inmunidad adaptativa durante el desarrollo de diversas enfermedades inflamatorias [100]. Como fuera ya definido, en ratón se identifican al menos dos subpoblaciones de monocitos, las cuales son caracterizadas a partir del nivel de expresión de los antígenos de superficie celular Ly6C, CCR2 y CX3CR1, como: a) Ly6C⁺CCR2⁺CX3CR1⁻; y b) Ly6C⁻CCR2⁻CX3CR1⁺. Por lo tanto, en esta etapa se procedió a identificar las subpoblaciones de monocitos de ratón y la expresión de LRP1 en cada una de ellas por citometría de flujo, utilizando, en primer lugar, ratones C57BL/6J normales (WT) para luego ser aplicado a los ratones C57BL/6J KO-ApoE^{-/-}.

En la Fig.4.14 se muestran resultados representativos de citometría de flujo empleando una estrategia de identificación de las dos subpoblaciones de monocitos (Ly6C^{hi} y Ly6C^{lo}) de sangre periférica de ratones C57BL/6J WT, de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. A partir de un gráfico SSC vs. CD11b (Fig.4.14 A), se pueden identificar dos regiones de distribución celular: una conformada mayoritariamente por linfocitos (región I) y otra mayoritariamente por monocitos y neutrófilos (región “a”). De esta última región, mediante SSC vs. Ly6G (Fig.4.14 B), se obtuvieron dos nuevas regiones: una conformada mayoritariamente por monocitos (región “b”) y otra conformada mayoritariamente por neutrófilos (región II). Finalmente, a partir de los

monocitos seleccionados (región “b”) se separaron las dos subpoblaciones mediante Ly6C vs SSC (Fig.4.14 C): monocitos Ly6C^{hi} (región III) y Ly6C^{lo} (región IV). Además, todos los eventos de las cuatro regiones (desde I a IV) se aislaron por procedimientos de citometría de flujo *cell sorter*, con el fin de evaluar la expresión del LRP1 por ensayos de RT-PCR. La Figura 4.14 D muestra que el ARN mensajero específico para LRP1 está presente mayoritariamente en monocitos (regiones III y IV), mientras que en los granulocitos (región II) y linfocitos (región I) sólo se detecta una débil o nula expresión.

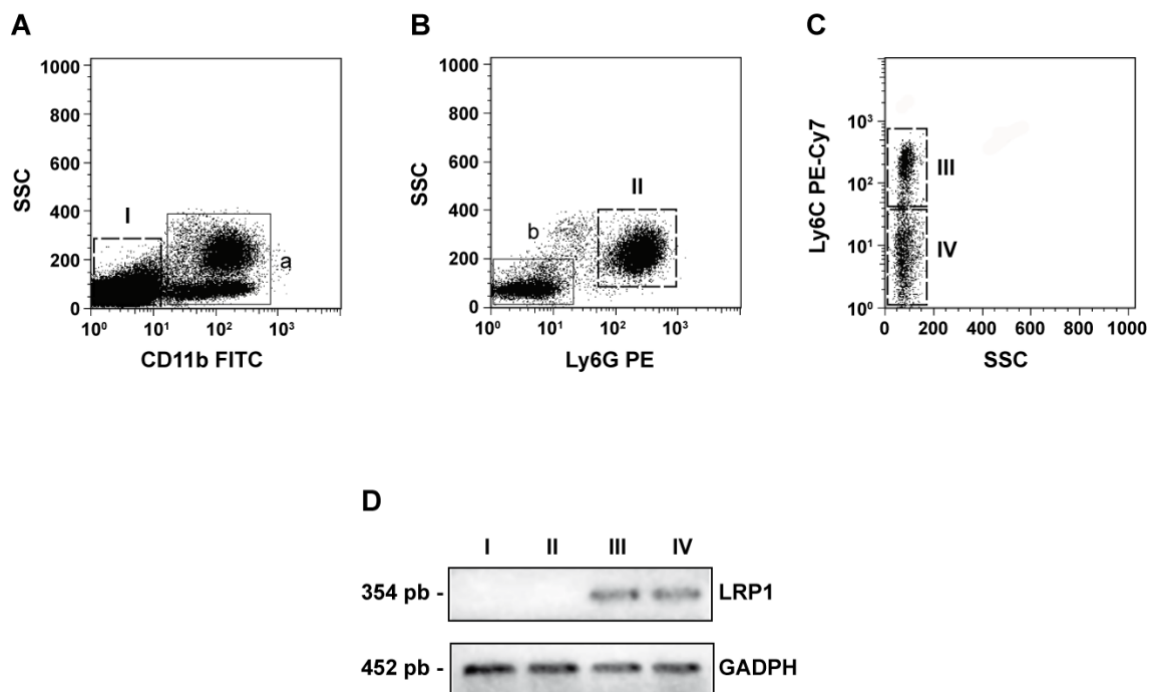


Figura 4.14: Análisis por citometría de flujo para caracterizar subpoblaciones de monocitos de sangre periférica en ratones C57BL/6J normales. (A) Distribución celular del componente pan-leucocitario de sangre periférica a partir del gráfico SSC vs. CD11b donde se indican las regiones conteniendo mayormente monocitos y neutrófilos (región a) y linfocitos (región I). (B) Distribución celular de la “región a” utilizando la gráfica SSC vs Ly6G donde se indican las regiones conteniendo monocitos (región b) y neutrófilos (región II). (C) Distribución celular de la “región b” a partir de la gráfica Ly6C vs. SSC donde se indican las regiones conteniendo monocitos Ly6C^{hi} (región III) y Ly6C^{lo} (región IV). (D) Análisis de la expresión de ARNm específico para LRP1 por ensayos de RT-PCR a partir de los componentes celulares aislados por citometría de flujo *cell sorter* de las regiones I, II, III y IV. El contenido amplificado de GADPH es utilizado como control de carga para el análisis de LRP1.

Por lo tanto, estos resultados permiten concluir que LRP1 está principalmente expresado en monocitos de sangre periférica de ratón y no en otros componentes celulares

leucocitarios aquí analizados, al menos en neutrófilos y linfocitos.

Con el propósito de analizar el nivel de expresión de LRP1 en las distintas subpoblaciones de monocitos murino, se procedió a sumar a la estrategia de selección indicada un cuarto anticuerpo que reconoce específicamente LRP1. En la Figura 4.15 A se muestra un patrón de distribución celular por citometría de flujo de las diferentes subpoblaciones de monocitos Ly6C^{hi} (Región III) y Ly6C^{lo} (Región IV) a partir de la estrategia de selección detallada en la Figura 4.14. Con el propósito de analizar el nivel de expresión de LRP1 en cada subpoblación de monocitos, a partir de las regiones III y IV se analizó la distribución celular utilizandola gráfica Ly6C vs. LRP1 (Figura 4.15 B) donde se puede evidenciar claramente la presencia de dos regiones celulares con alta y baja expresión de LRP1 en monocitos Ly6C^{hi}, y una mayoritaria de baja o nula expresión de LRP1 en monocitos Ly6C^{lo}. En la Figura 4.15 C se muestran los histogramas de cada subpoblación de ratón para LRP1 con sus respectivos controles de isotipo para monocitos Ly6C^{hi} (III) y Ly6C^{lo} (IV).

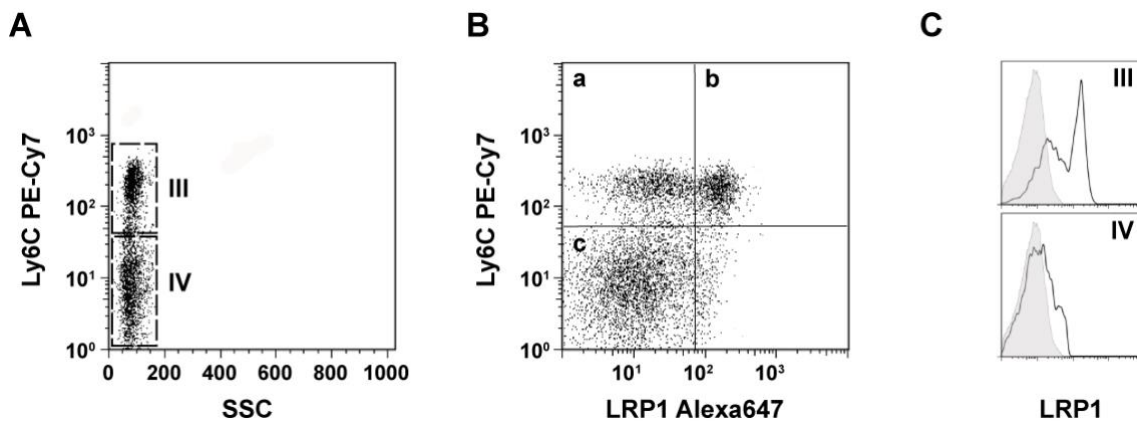


Figura 4.15: Análisis por citometría de flujo para determinar la expresión de LRP1 en subpoblaciones de monocitos de sangre periférica en ratón C57BL/6J normales. (A) Distribución celular de subpoblaciones de monocitos murino a partir de la gráfica Ly6C vs. SSC (III: Ly6C^{hi}; IV: Ly6C^{lo}) siguiendo la estrategia indicada en la Fig.4.14. (B) Distribución celular de las subpoblaciones de monocitos Ly6C^{hi} (III) y Ly6C^{lo} (IV) en función de la expresión de LRP1 a partir de la gráfica Ly6C vs. LRP1. En (a), (b) y (c) se representan las distintas subpoblaciones de monocitos Ly6C^{hi}/LRP1^{lo}, Ly6C^{hi}/LRP1^{hi} y Ly6C^{lo}/LRP1^{lo}, respectivamente. (C) Histogramas de expresión de LRP1 en las subpoblaciones de monocitos Ly6C^{hi} (III): LRP1^{lo} (a) y LRP1^{hi} (b) y Ly6C^{lo} (IV): LRP1^{lo} (c) donde se indica el control de isotipo del anticuerpo anti-LRP1 (gris claro).

Por lo tanto, a partir de la estrategia de citometría de flujo desarrollada y representada en

las Figuras 4.14 y 4.15 se demuestra que en función de la expresión diferencial de LRP1 en monocitos murinos se logran identificar al menos tres subpoblaciones, a saber: i) en la subpoblación Ly6C^{lo} se identifica baja o nula expresión de LRP1 (Ly6C^{lo}/LRP1^{lo}) y ii) dentro de la subpoblación de Ly6C^{hi} se identifica una subpoblación con baja expresión (Ly6C^{hi}/LRP1^{lo}) y otra con alta expresión de LRP1 (Ly6C^{hi}/LRP1^{hi}).

4.2.3 Estudio de la expresión de LRP1 en subpoblaciones de monocitos murinos C57BL/6J - KO-ApoE^{-/-}.

Basado en los resultados obtenidos en ratones C57BL/6J normales, en primer lugar se procedió a evaluar en el modelo murino de aterosclerosis KO-ApoE^{-/-} la expresión de LRP1 en aquellas subpoblaciones monocíticas que preferentemente expresan este receptor de manera diferencial (monocitos Ly6C^{hi} en sus divisiones LRP1^{hi} y LRP1^{lo}) con el propósito de examinar si el estado de aterosclerosis podía afectar la expresión de LRP1 en estas subpoblaciones de monocitos. Para ello, con el grupo de ratones conformados anteriormente (sección 4.2.1.1), en una primera instancia se estableció el porcentaje de monocitos Ly6C^{hi}/LRP1^{lo} y Ly6C^{hi}/LRP1^{hi} utilizando la estrategia de citometría de flujo detallada arriba. Como se muestra en la Tabla 1, el porcentaje de subpoblaciones de monocitos Ly6C^{hi} en sus variantes LRP1^{hi} y LRP1^{lo} no experimentan cambios porcentuales en función del modelo animal normal (ratones C57BL/6JWT) o aterosclerótico (ratones C57BL/6J KO-ApoE^{-/-}) ni por el tipo de dieta recibida (dieta

Tabla 1: Porcentaje de subpoblaciones de monocitos Ly6C^{hi}/LRP1^{lo} y Ly6C^{hi}/LRP1^{hi} de ratón medidos por citometría de flujo .

Modelo de ratón C57BL/6J/Tipo de dieta	Porcentaje de Ly6C ^{hi} /LRP1 ^{hi} (media±SD)	Porcentaje de Ly6C ^{hi} /LRP1 ^{lo} (media±SD)	<i>p</i>
WT/dieta normal (n= 4)	55±5	45±5	<i>n.s.</i>
WT/dieta grasa (n= 4)	48±5	52±5	<i>n.s.</i>
KO-ApoE ^{-/-} /dieta normal (n= 4)	53±4	47±4	<i>n.s.</i>
KO-ApoE ^{-/-} /dieta grasa (n= 4)	50±7	50±6	<i>n.s.</i>

p, probabilidad estadística de diferencia significativa entre los valores de las medias de subpoblaciones de monocitos en cada condición de estudio; *n.s.*: no diferencia significativa (*p*>0,05).

normal o dieta rica en grasas). En todos los casos se observa que el porcentaje de ambas subpoblaciones rondan el 50%.

Considerando que los niveles porcentuales de las subpoblaciones de monocitos no presentaban modificaciones significativas en los diferentes grupos de estudio, en una siguiente etapa se procedió a determinar si la expresión de LRP1, en términos de intensidad media de fluorescencia (IMF), presentaba modificaciones en dichas subpoblaciones monocíticas en cada grupo de ratones en estudio. La Tabla 2 resume estos resultados donde se observa que LRP1 incrementa significativamente en la subpoblación Ly6C^{hi}/LRP1^{hi} en ratones WT alimentados con dieta rica en grasas respecto a los alimentados con dieta normal. Por el contrario, ratones KO-ApoE^{-/-} mostraron una significativa disminución de LRP1 en esta subpoblación de monocitos cuando fueron alimentados con dieta rica en grasas respecto a los de dieta normal. Un dato llamativo es que LRP1 incrementa significativamente en subpoblaciones de monocitos Ly6C^{hi}/LRP1^{hi} en ratones KO-ApoE^{-/-} respecto a los WT cuando son alimentados con dieta normal; por el contrario, LRP1 disminuye de manera significativa en animales KO-ApoE^{-/-} respecto a

Tabla 2: Valores de expresión de LRP1 en términos de intensidad media de fluorescencia (IMF) en subpoblaciones de monocitos Ly6C^{hi}LRP1^{hi} y Ly6C^{hi}LRP1^{lo} en ratones C57BL/6J normales (WT) y ateroscleróticos (KO-ApoE^{-/-}) tratados con dieta normal o dieta rica en grasas.

Modelo de ratón C57BL/6J/Tipo de dieta (n=número de ratones)	IMF de LRP1 en Ly6C ^{hi} /LRP1 ^{hi} (media ±SD)	IMF de LRP1 en Ly6C ^{hi} /LRP1 ^{lo} (media±SD)	IMF de LRP1 en Ly6C ^{lo} /LRP1 ^{lo} (media±SD)
WT/dieta normal (n= 4)	94,0±9,6 ⁽¹⁾⁽³⁾	15,8±0,5	11,0±1,5
WT/dieta grasa (n= 4)	137,5±15,7 ⁽¹⁾⁽⁴⁾	17,3±2,5	9,5±1,3
KO-ApoE ^{-/-} /dieta normal (n= 4)	131,0±9,5 ⁽²⁾⁽³⁾	16,5±3,7	13,5±3,4
KO-ApoE ^{-/-} /dieta grasa (n= 4)	110,3±8,0 ⁽²⁾⁽⁴⁾	15,0±3,0	13,3±5,1

⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾Diferencia estadísticamente significativa (p<0,05) entre las medias; **SD**; Desviación estándar

los WT alimentado con dieta rica en grasas. Cuando este mismo análisis se realizó en subpoblaciones de monocitos Ly6C^{hi}/LRP1^{lo} se observó que LRP1 no experimenta cambios significativos en ninguno de los grupos de ratones estudiados.

4.2.4 Principales Conclusiones

A partir de esta etapa experimental, los resultados obtenidos demuestran que LRP1 es expresado en monocitos de sangre periférica de ratones C57BL/6J y no en otros componentes leucocitarios, principalmente linfocitos y neutrofilos. Esta expresión diferencial pan-leucocitaria de LRP1 permitió caracterizar tres subpoblaciones monocíticas basadas en las dos subpoblaciones descritas hasta el presente, a saber Ly6C^{hi} y Ly6C^{lo}. En base a la expresión diferencial de LRP1 en la subpoblación Ly6C^{hi}, se caracterizaron dos subpoblaciones de monocitos: Ly6C^{hi}LRP1^{hi} y Ly6C^{hi}LRP1^{lo}. La tercera subpoblación aquí identificada muestra un bajo contenido de LRP1 en la subpoblación monocítica Ly6C^{lo} (Ly6C^{lo}LRP1^{lo}).

Por otra parte, también se demostró que los niveles de LRP1 disminuyen de manera significativa en la subpoblación monocítica Ly6C^{hi}LRP1^{hi} en ratones KO ApoE^{-/-} con evidente presencia de placa aterosclerótica (dieta rica en grasas) respecto a los ratones KO ApoE^{-/-} sin lesión evidente (dieta normal). Por el contrario, LRP1 incrementa en dicha subpoblación en ratones KO ApoE^{-/-} sin evidencia de lesión de aterosclerosis respecto a ratones normales alimentados con dietas sin contenidos grasos. De otro modo, la dieta rica en grasas, también promueve un incremento de LRP1 en esta subpoblación monocítica en ratones normales respecto a los alimentados con dieta normal. En las otras subpoblaciones de monocitos analizados, la expresión de LRP1 no muestra cambios sustanciales en los modelos de ratón estudiados.

4.3. Expresión de LRP1 en subpoblaciones de monocitos en sangre periférica humana.

Como ya fue definido, en humanos se identifican al menos tres subpoblaciones de monocitos, la cuales están basadas en la expresión diferencial del receptor del lipopolisacárido (LPS) CD14 y del receptor de FcγIIICD16. Estas subpoblaciones son:

monocitos clásicos [CD14⁺⁺CD16⁻], intermedios [CD14⁺⁺CD16⁺] y no clásicos [CD14⁺CD16⁺⁺][18]. La medición de las subpoblaciones de monocitos, empleando ensayos de citometría de flujo, representa una herramienta atractiva para el diagnóstico de varias enfermedades inflamatorias, entre ellas las enfermedades cardiovasculares [24]. Si bien la diferenciación de las subpoblaciones de monocitos por citometría de flujo se basa en la expresión de CD14 y CD16 a nivel de la superficie celular, la correcta identificación de los monocitos se lleva a cabo a través de un tercer marcador pan-monocítico, entre los que se destacan CD86 y HLA-DR [101-103]. Esto obedece a que los protocolos de citometría de flujo que sólo analizan la expresión de CD14 y CD16 a partir de las características físicas de estas células, midiendo el ángulo de luz dispersada hacia adelante [FSC] y la dispersión lateral ortogonal [SSC][18], corren el riesgo de no distinguir correctamente los monocitos de otros subconjuntos de leucocitos que también expresan CD16, tales como granulocitos-neutrófilos y células NK (por *natural killer cells*). Cuando se utiliza la estrategia de selección con CD86, los monocitos son seleccionados a partir de la gráfica representada por SSC vs. CD86, dentro de una región de células CD86 positivas (CD86⁺) con complejidad de monocitos [102, 103]. Por otra parte, la selección de monocitos de sangre periférica que emplea el tercer marcador pan-monocítico HLA-DR se pueden excluir las células NK CD16⁺ mediante una gráfica que representa HLA-DR vs. CD14, mientras que los granulocitos-neutrófilos CD16⁺ son separados de los monocitos por selección en una gráfica de FSC vs. SSC [101].

Entre los leucocitos de sangre periférica, hay varios estudios que informan que LRP1 se expresa principalmente en monocitos[104-107]. Sin embargo, la expresión del LRP1 en cada subpoblación de monocitos no se ha establecido aún. Por otra parte, y como fuera demostrado en este trabajo de tesis, LRP1 es diferencialmente expresado dentro de las subpoblaciones de monocitos murino. Esto podría revelar funciones específicas del

receptor en cada subpoblación de monocitos durante los procesos inflamatorios, en particular, en el desarrollo de la aterosclerosis. Por esta razón, en esta etapa nos propusimos desarrollar un ensayo de citometría de flujo para la determinación de la heterogeneidad de monocitos y la expresión monocítica de LRP1 en sangre periférica humana.

4.3.1 Estudio de la expresión de LRP1 de monocitos humanos por citometría de flujo.

En primer lugar, se procedió a evaluar por citometría de flujo si LRP1 puede ser utilizado como un tercer marcador para la identificación de monocitos en conjunto con CD14 y CD16, examinando la expresión del LRP1 en cada tipo de leucocitos, los cuales se identifican a partir de un gráfico SSC vs. CD45 (Figura 4.16 A). Con esta representación gráfica, se pueden identificar regiones conteniendo mayoritariamente los tres tipos leucocitarios: granulocitos (región I), linfocitos (región II) y monocitos (región III). Para evaluar la expresión del LRP1 en cada región, se utilizó un anticuerpo anti-LRP1- α conjugado con PE y se analizó por citometría de flujo tal como se detalla en Materiales y Métodos. La Figura 4.16 B muestra que todos los eventos seleccionados en la región III fueron LRP1 positivo (LRP1⁺), mientras que todos los eventos celulares contenidas en las regiones I y II no mostraron una marcación significativa para este receptor en comparación con los controles de isotipo. Además, todos los eventos de las tres regiones seleccionadas a partir de la gráfica SSC vs. CD45 se aislaron por procedimientos de citometría de flujo (*cell sorter*) con el fin de evaluar la expresión del LRP1 por RT-PCR y Western blot. La Figura 4.16C muestra que el ARN mensajero específico para LRP1 está presente mayoritariamente en monocitos (I), mientras que en los granulocitos (I) y linfocitos (II) sólo se detecta una débil o nula expresión. A su vez, por análisis de Western

blot, se demuestra que LRP1 solo está presente en extractos proteicos de lisados celulares provenientes de la región monocítica III (Figura 4.16D).

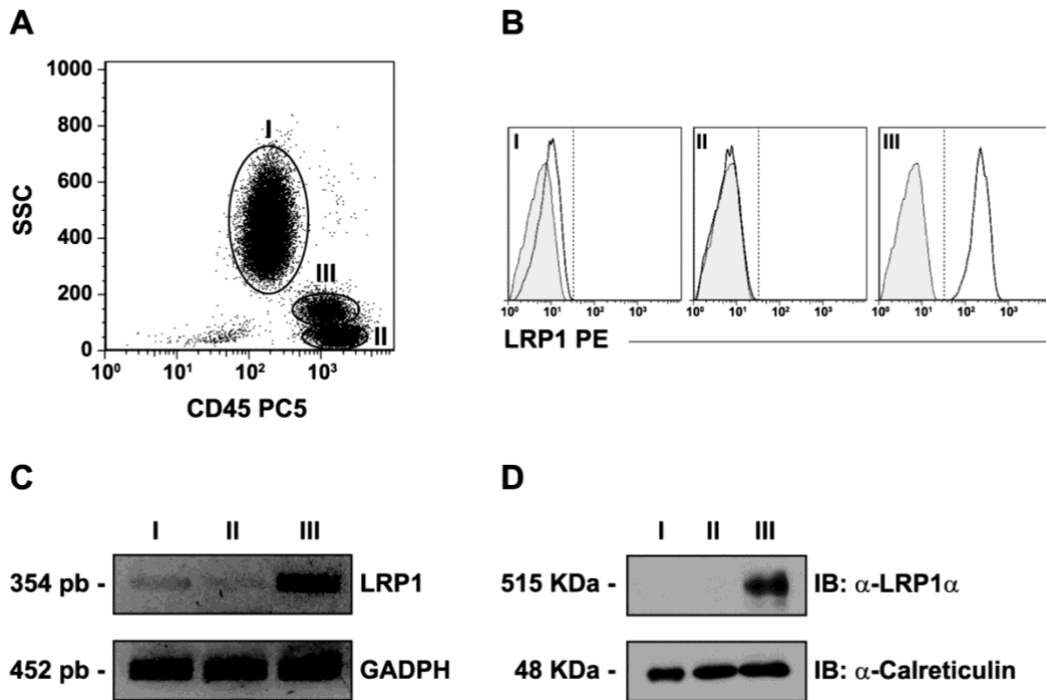


Figura 4.16. Caracterización de la expresión del LRP1 en los monocitos de sangre periférica humana. (A) Gráfico SSC vs. CD45 indicando las regiones de selección de granulocitos (I), linfocitos (II) y monocitos (III). (B) Histogramas representativos del análisis de expresión de LRP1 en granulocitos (I), linfocitos (II) y monocitos (III) por citometría de flujo. El nivel de expresión del LRP1 (histograma blanco) se compara con el control de isotipo de este anticuerpo anti-LRP1 (histograma gris). (C) Análisis de RT-PCR para la detección de ARNm específico de LRP1 en lisados de granulocitos (I), linfocitos (II) y monocitos (III) aislados por citometría de flujo *cell-sorting* basados en la distribución celular del panel (A). GAPDH se muestra como control de carga. (D) Análisis de Western blot para LRP1 en lisados de granulocitos (I), linfocitos (II) y monocitos (III). *Calreticulin* se muestra como control de carga proteica. Todos los resultados mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

4.3.2 Estrategia de identificación de subpoblaciones de monocitos humanos basada en la marcación monocítica de LRP1.

A partir de los resultados antes expuestos se procedió a diseñar una estrategia de selección de monocitos a partir de sangre periférica utilizando los siguientes anticuerpos conjugados a fluoróscoros: i) anti-LRP1- α -PE, ii) anti-CD14-FITC, iii) anti-CD16-APC-Cy7 y iv) anti-CD45-PC5. La Figura 4.17A muestra la gráfica SSC vs. LRP1 de leucocitos seleccionados mediante la expresión de CD45, donde la región de monocitos

(III) es LRP1⁺ claramente separada de las regiones de granulocitos (I) y linfocitos (II). Luego, todos los eventos seleccionados en la región de monocitos (III) fueron seleccionados mediante la gráfica CD16 vs. CD14 (Figura 4.17B). En esta gráfica se pueden observar tres subpoblaciones de monocitos, a saber: CD14⁺⁺CD16⁻ (clásicos), CD14⁺⁺CD16⁺ (intermedios) y CD14⁺CD16⁺⁺ (no clásicos), siendo este patrón de distribución similar a lo previamente publicado por otros autores[102, 108, 109]. Luego, y mediante técnicas de citometría de flujo *cell sorter*, las tres subpoblaciones fueron aisladas y teñidas por coloración May-Grünwald-Giemsa, en donde se puede observar que estas células presentan características citomorfológicas de monocitos (Figura 4.17C). En la Figura 4.17D se muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) para LRP1 en cada subpoblación de monocitos, donde se observa que los monocitos no clásicos tienen un valor de IMF aproximadamente dos veces menor que lo expresado en monocitos clásicos e intermedios, respectivamente.

Para evaluar si células NK y granulocitos-neutrófilos (GN) eran incluidas en las subpoblaciones de monocitos utilizando la estrategia de selección por LRP1, sendas alícuotas de sangre periférica fueron lisadas e incubadas con anti-CD15-FITC (marcador de GN) o anti-CD56-FITC (marcador de NK) junto con los anticuerpos anti-CD45-PC5 y anti-LRP1-PE. Basados en la gráfica SSC vs. LRP1 (Figura 4.17A), se observó que ninguno de los eventos celulares seleccionados en la región III mostró marca significativa para CD15 o CD56, cuando se compararon con los eventos de las regiones I y II, respectivamente (Figura 4.17E). Además, y como se esperaba para GN, se identificaron células CD15⁺ en todos los eventos de la región I, pero no en la correspondiente a la región II, que está de acuerdo con la identificación de células granulocitos neutrófilos. Las células CD56⁺ se detectaron parcialmente en la región II pero no en la I, lo cual está en concordancia con la detección de células NK en esta región

que representa la subpoblación de linfocitos. Por último, todos los eventos en I, II y III mostraron tinción positiva para CD16, ya que GN, NK y las correspondientes subpoblaciones de monocitos (intermedios y no clásicos) expresan este tipo de marcador. Por lo tanto, estos resultados permiten concluir que LRP1 puede ser utilizado como un tercer marcador pan-monocítico en conjunto con CD14 y CD16 para identificar subpoblaciones de monocitos en sangre periférica humana.

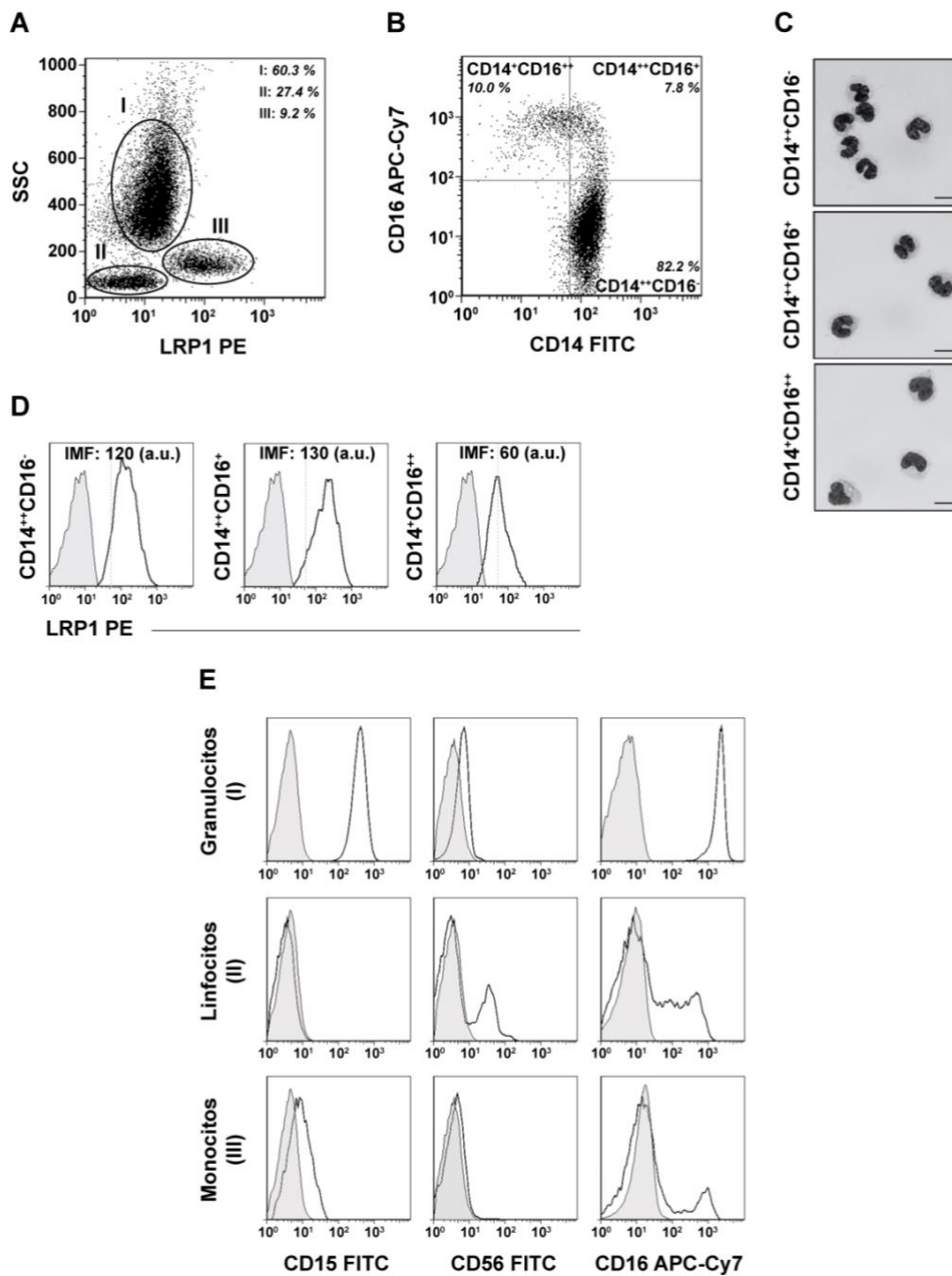


Figura 4.17: Estrategia de selección de subpoblaciones de monocitos a partir de sangre periférica basada en la marcación de LRP1. (A) Gráfica SSC vs. LRP1 donde la región de monocitos (III) LRP1⁺ separadas de las regiones de granulocitos (I) y linfocitos (II). (B) Gráfica CD16 vs. CD14 de eventos seleccionados en la región de monocitos (III) para la selección de subpoblaciones de monocitos: CD14⁺⁺CD16⁻ (clásicos), CD14⁺⁺CD16⁺ (intermedios) y CD14⁺CD16⁺⁺ (no clásicos). (C) Imagen representativa de la tinción May-Grünwald-Giemsa (MG-G) de las subpoblaciones de monocitos aisladas por citometría de flujo *cell-sorter*. Las barras de escala representan 10 μ m. (D) Análisis representativo de la expresión de LRP1 en monocitos clásicos, intermedios y no clásicos, donde se indican los valores de intensidad media de fluorescencia (IMF). El nivel de expresión del LRP1 (histograma blanco) se compara con el control de isotipo del anticuerpo anti-LRP1 (histograma gris). (E) Análisis representativo de citometría de flujo que muestra la expresión de CD15, CD56 y CD16 en leucocitos separados por SSC vs. LRP1 en de granulocitos (I), linfocitos (II) y monocitos (III). El nivel de expresión de cada marcador (histograma blanco) se compara con su respectivo control de isotipo de cada anticuerpo en particular (histograma gris). Todos los resultados mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Con el propósito de confirmar que la estrategia de citometría de flujo para la selección de monocitos por LRP1 también puede ser utilizada para medir la cantidad absoluta o relativa de subpoblaciones de monocitos en sangre periférica, en esta etapa se procedió a comparar esta estrategia con aquella que emplea HLA-DR como tercer marcador pan-monocítico [101]. Para ello, se realizó un análisis de comparación de métodos empleando ambas estrategias de citometría de flujo (LRP1 vs HLA-DR) mediante la determinación de la cantidad relativa porcentual de las tres subpoblaciones de monocitos de sangre periférica en muestras de sangre periférica extraídas de veintidós individuos voluntarios (11 mujeres y 11 hombres). En la Figura 4.18 se muestra la estrategia de selección monocítica basada en la marca de HLA-DR por ensayo de citometría de flujo siguiendo exactamente el procedimiento detallado por el autor [101].

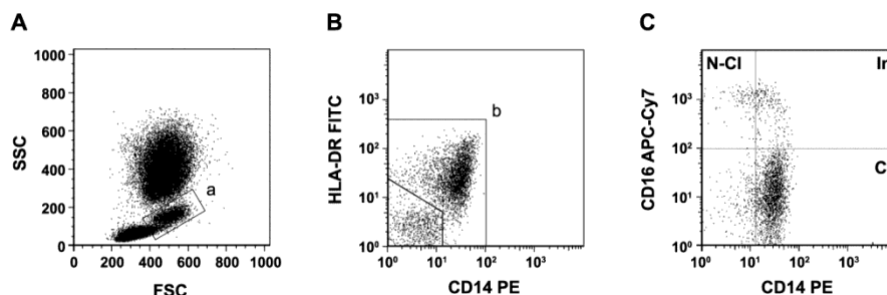


Figura 4.18: Estrategia de selección monocítica basada en la marca de HLA-DR por ensayo de citometría de flujo. (A) Los monocitos son seleccionados junto a otros grupos celulares a partir de un grafico FSC vs. SSC por sus propiedades de dispersión en (a). (B) El conjunto celular (a) es separado de los monocitos por HLA-DR vs CD14, siendo estos CD14⁺HLA-DR⁺ (b). (C) Las tres subpoblaciones de monocitos clásicos (CI), no clásicos (N-CI) e intermedios (I) se identifican mediante la selección CD16 vs. CD14 de células provenientes de (b).

Empleando tanto el ensayo de citometría de flujo basado en LRP1 como en HLA-DR, se obtuvo, a partir de un análisis estadístico de comparación de métodos, que los porcentajes de las tres subpoblaciones de monocitos determinados por ambos ensayos no presentaron diferencias significativas entre los valores medios porcentuales de monocitos clásicos, intermedios y no clásicos ($p > 0,05$) (Tabla 1).

Tabla 2: Porcentaje de las subpoblaciones de monocitos humanos de sangre periférica medidos por citometría de flujo mediante la estrategia LRP1 y HLA-DR en 22 voluntarios sanos (*)

Monocitos	Clásicos		Intermedios		No clásicos	
	LRP1	HLA-DR	LRP1	HLA-DR	LRP1	HLA-DR
Media (%)	84.9 ⁽¹⁾	84.7 ⁽¹⁾	5.9 ⁽²⁾	6.8 ⁽²⁾	9.2 ⁽³⁾	8.4 ⁽³⁾
SD (%)	4.3	4.5	2.3	2.0	3.1	3.3
Min (%)	76.4	77.3	2.4	3.5	4.4	3.6
Max (%)	93.1	92.8	11.1	11.4	14.0	15.6

SD: Desviación estándar; Min: valor mínimo; Max: valor máximo.

(1), (2), (3) diferencias estadísticamente no significativas entre las medias ($p > 0.05$).

(*) 11 mujeres y 11 hombres.

Por otra parte, también se demostró que ambos ensayos de citometría de flujo son comparables para la determinación de subpoblaciones de monocitos dentro de todo el intervalo de porcentajes medido, mostrando valores significativos de correlación de Pearson ($r \sim 0,9$ y $p < 0.0001$) (Figura 4.19).

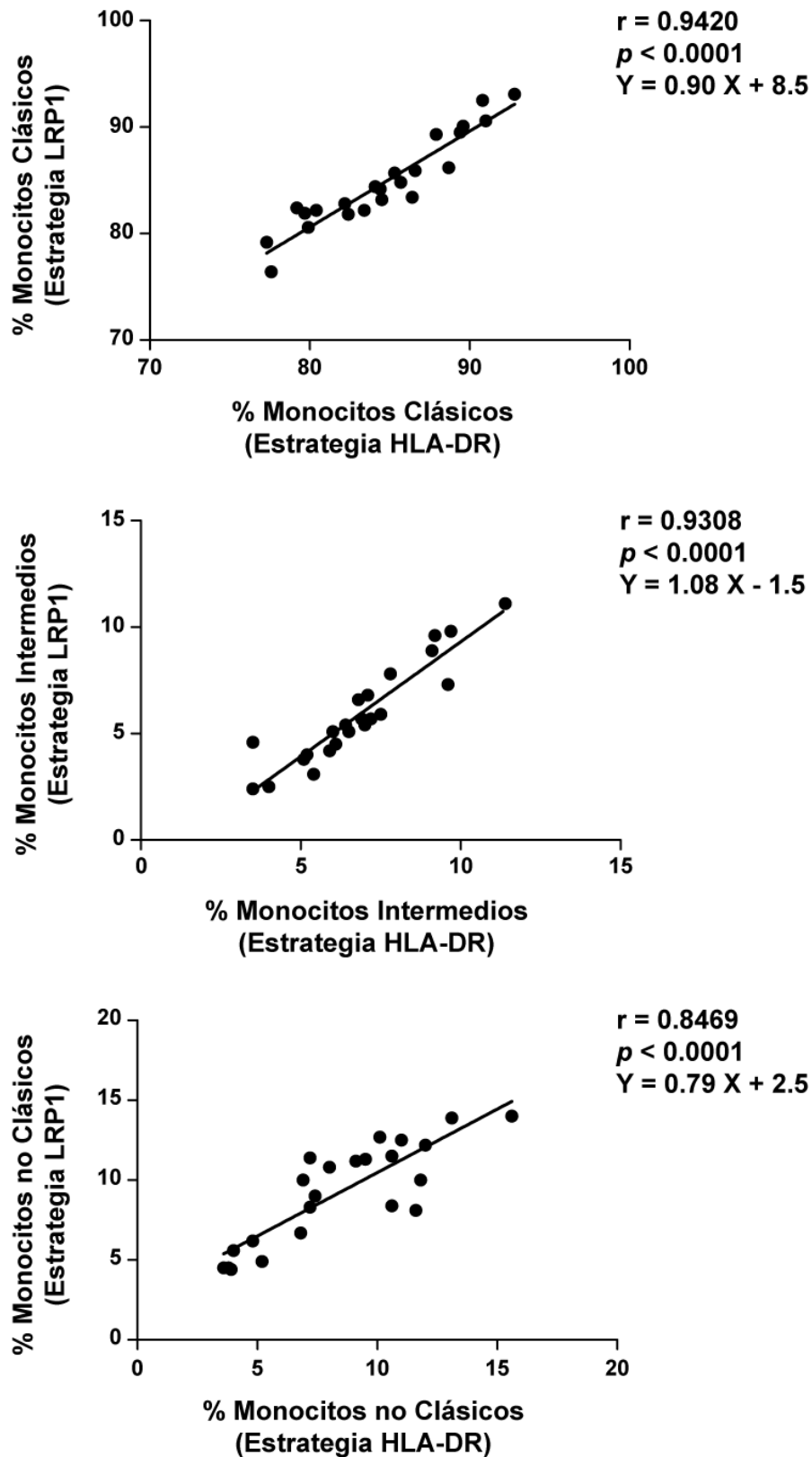


Figura 4.19: Análisis de comparación de métodos para la heterogeneidad de monocitos utilizando citometría de flujo mediante la estrategia de selección por LRP-1 vs.HLA-DR. Cada panel representa el análisis comparativo de los porcentajes de monocitos clásicos, intermedio y no clásicos. Del análisis de regresión, se muestran el coeficiente de correlación de Pearson (r) y el nivel de significancia p .

4.3.4 Expresión diferencial de LRP1 en subpoblaciones de monocitos humanos.

Con el propósito de confirmar que la expresión de LRP1 sigue un patrón diferencial en monocitos clásicos e intermedios en comparación con los monocitos no clásicos, se procedió a determinar el nivel de LRP1, en términos de IMF, en las distintas subpoblaciones de monocitos desangre periférica en 23 individuos voluntarios sanos. La Figura 4.20A muestra que los valores medios de IMF para LRP1 fueron significativamente menores en monocitos no clásicos que clásicos e intermedios, mientras que no hubo diferencias significativas entre las últimas dos subpoblaciones. Estos resultados concluyen que LRP1 se expresa diferencialmente en subpoblaciones de monocitos de sangre periférica provenientes de individuos sanos.

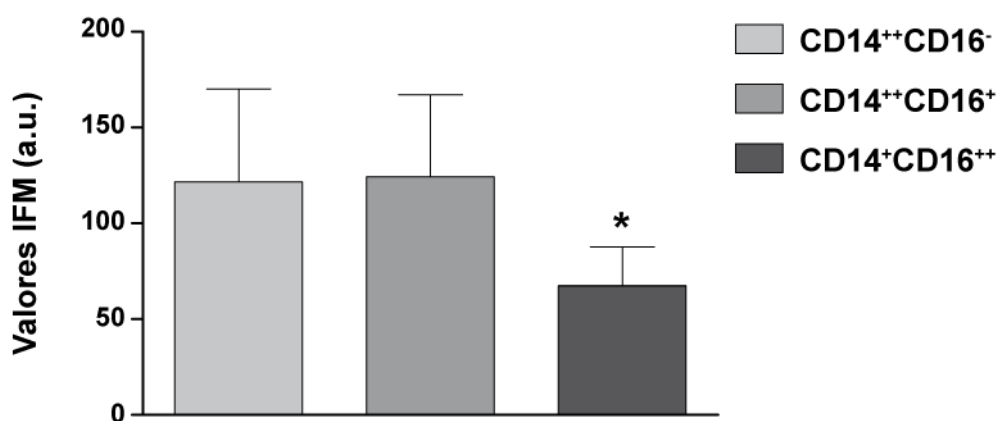


Figura 4.20: Niveles de expresión de LRP1 en subpoblaciones de monocitos de sujetos sanos. Las barras representan los valores medios de IMF (± 1 desviación estándar) para la expresión de LRP1 en monocitos clásicos (CD14⁺⁺CD16⁻), intermedios (CD14⁺⁺CD16⁺) y no clásicos (CD14⁺CD16⁺⁺) medidos por citometría de flujo utilizando la estrategia de selección por LRP1 en 23 sujetos sanos (14 mujeres y 9 varones). (*) indica diferencias estadísticamente significativas con un $p < 0,05$

Por otra parte, se conoce que la distribución subcelular de LRP1 es predominantemente intracelular (~70%) en diferentes tipos de células [110]. Como pudo observarse a través de citometría de flujo, los niveles de expresión de LRP1 en la superficie celular son más elevados en monocitos clásicos e intermedios que en los no clásicos (Figura 4.17D). Sin

embargo, la distribución subcelular de LRP1 en monocitos es desconocida. Por lo tanto, mediante el uso de microscopía de fluorescencia confocal se evaluó la expresión del LRP1 a nivel intracelular y de membrana plasmática en cada subpoblación de monocitos aislados por citometría de flujo *cell sorter* siguiendo las estrategias de selección mencionadas. Para ello, la expresión del LRP1 se examinó con un anticuerpo monoclonal de ratón contra LRP1- β en condiciones de permeabilización y no permeabilización celular en monocitos clásicos, intermedios y no clásicos. La figura 4.21 muestra resultados representativos de estos experimentos para monocitos clásicos y no clásicos, observándose que en condiciones no permeabilizadas, los niveles de expresión de LRP1 está mayormente expresado en membrana plasmática de monocitos clásicos respecto a los no clásicos, lo cual es concordante con los resultados obtenidos por citometría de flujo. En condiciones permeabilizadas, la expresión del LRP1 a nivel intracelular presentó una distribución típica en estructuras vesiculares perinucleares en ambas subpoblaciones de monocitos, similar a lo observado en otros tipos celulares [111]. La cuantificación de estas imágenes demostró que la expresión del LRP1 intracelular es también mayor en monocitos clásicos que en los no clásicos. Del mismo modo que los monocitos clásicos, la distribución celular de LRP1 en monocitos intermedios mostró un patrón similar tanto a nivel intracelular como de membrana plasmática (datos no presentados). Finalmente, a partir del análisis de la intensidad de fluorescencia entre las condiciones no permeabilizadas y permeabilizadas en las tres subpoblaciones de monocitos se pudo determinar que aproximadamente el 80% de LRP1 se expresa a nivel intracelular, lo cual resulta similar a lo informado para otros tipos celulares [111]. De este modo, también se concluye que los niveles de expresión de LRP1 en la superficie celular son representativos del nivel total de este receptor en cada subpoblación monocítica.

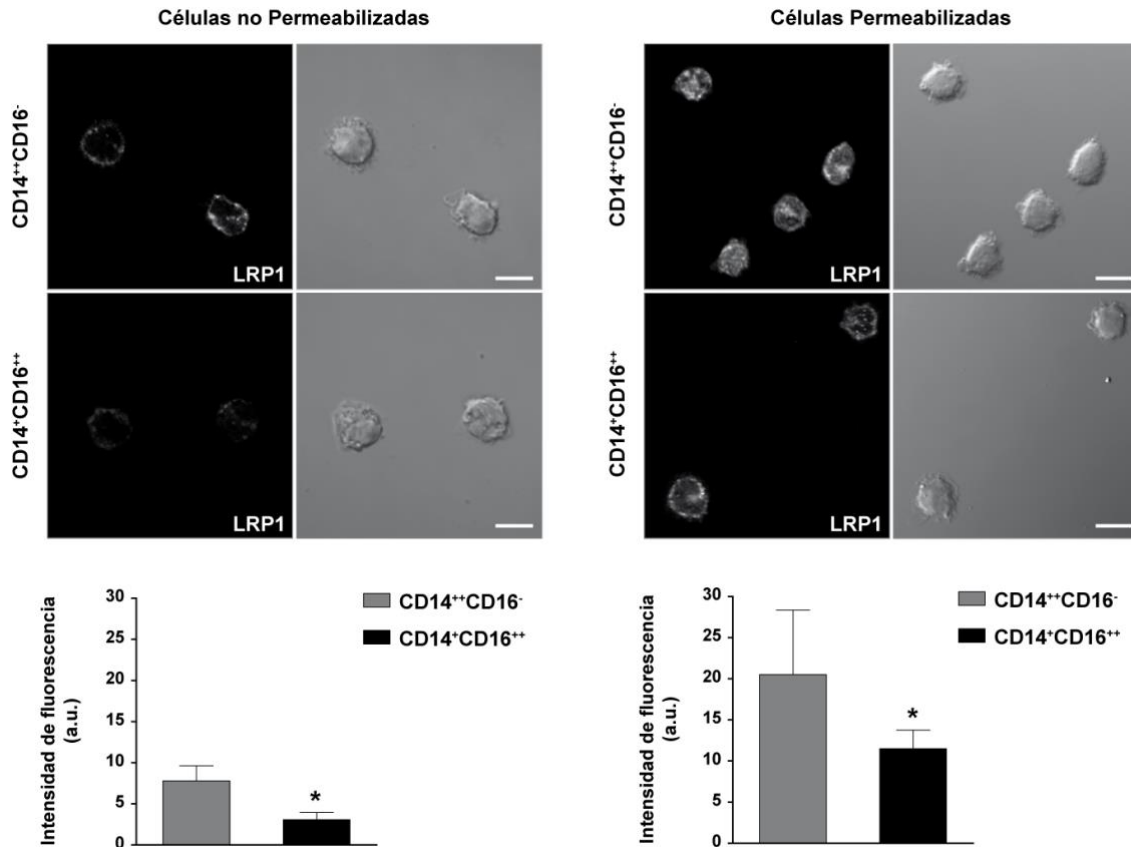


Figura 4.21: Imagen representativa del análisis y distribución subcelular de LRP1 en monocitos clásicos (CD14⁺⁺CD16⁻) y no clásicos (CD14⁺CD16⁺⁺) por microscopía confocal. Subpoblaciones de monocitos aislados por citometría de flujo *cell sorting* fueron tratadas en condiciones de no permeabilización (panel izquierdo) o permeabilización (panel derecho). Los gráficos representan el análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia. Las barras son el valor medio \pm 1 SEM (error estándar de la media) de la intensidad de fluorescencia. Tres experimentos independientes se realizaron por triplicado. (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($p < 0,05$). Las barras blancas representan una escala de 10 μ m.

4.3.5 Expresión diferencial de LRP1 en subpoblaciones de monocitos humanos estimuladas con α_2 M*.

Resultados de nuestro laboratorio demostraron que α_2 M* induce un incremento de LRP1 en la superficie celular de diferentes tipos de células a través de un mecanismo postransduccional que involucra el tráfico intracelular de este receptor desde compartimentos endosomales que almacenan LRP1 hacia la membrana plasmática (Tesis doctoral Bioq. Javier Jaldín-Fincati FCQ-UNC 2014 y trabajo en preparación para su publicación). Basados en estos hallazgos, nos propusimos investigar si α_2 M* podía modificar los niveles de LRP1 a nivel de la superficie celular en cultivos de subpoblaciones de monocitos humanos. Para ello, las subpoblaciones de monocitos

fueron aisladas por citometría de flujo *cells sorter* como antes, cultivadas y estimuladas con α_2M^* 60 nM durante 1 h a 37 °C.

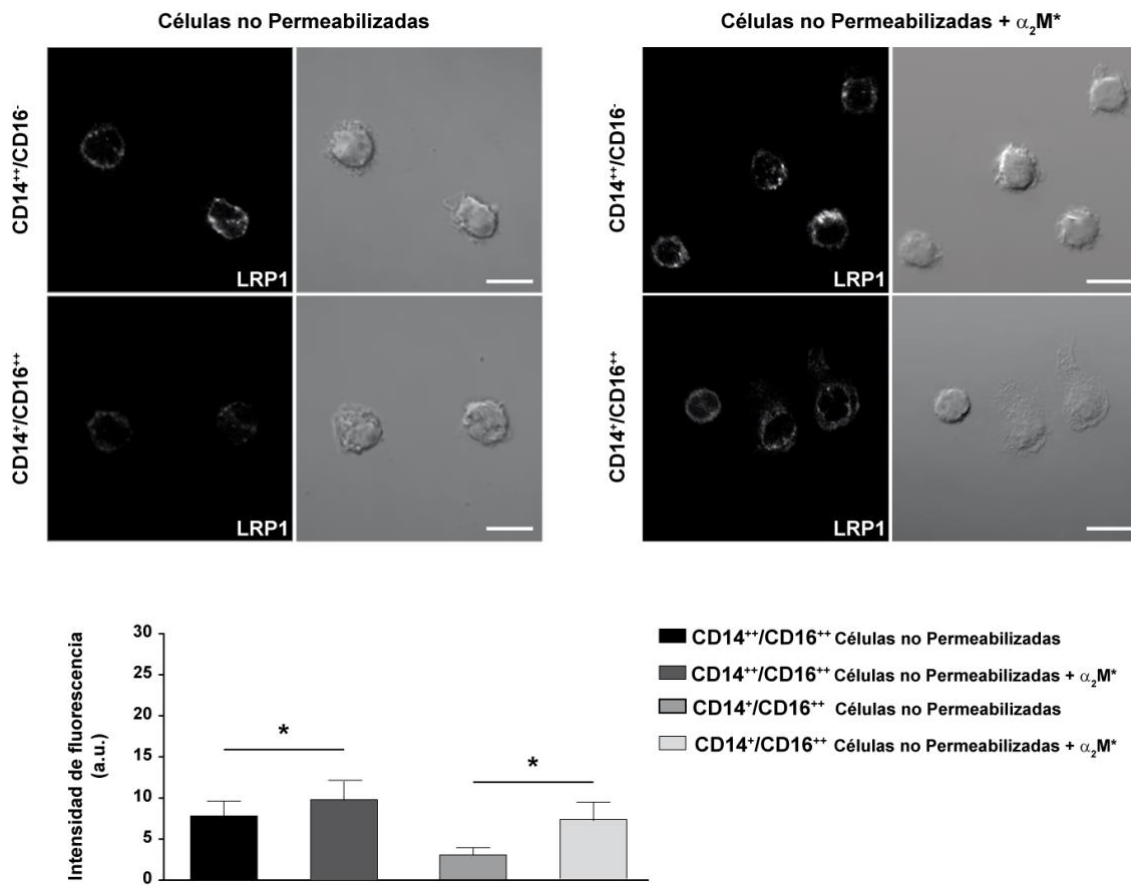


Figura 4.22: Imagen representativa del análisis y distribución celular de LRP1 en monocitos clásicos (CD14⁺CD16⁻) y no clásicos (CD14⁺CD16⁺⁺) por microscopía confocal. Células aisladas por citometría *cell sorter* fueron cultivadas y tratadas o no con α_2M^* (60 nM) durante 60 min. Luego, fueron tratadas en condiciones de no permeabilización. Los gráficos representan el análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia. Las barras son el valor medio \pm 1 SEM (error estándar de la media) de la intensidad de fluorescencia. Tres experimentos independientes se realizaron por triplicado. (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($p < 0,05$). Las barras blancas representan una escala de 10 μ m.

En la Figura 4.22 se muestra que α_2M^* indujo un incremento significativo en la expresión de LRP1 en la superficie celular de subpoblaciones de monocitos clásicos y no clásicos, aunque el incremento fue más evidente en ésta última subpoblación. Por el contrario, α_2M^* no afectó el contenido total de LRP1 en ambas subpoblaciones de monocitos humanos (datos no mostrados), lo cual indica que la regulación de la expresión en la superficie celular en cultivos primarios de monocitos humanos es mediada por un mecanismo postransduccional. De manera interesante, aunque de manera preliminar,

podimos observar que α_2M^* indujo procesos celulares de tipo mesenquimal únicamente en la subpoblación de monocitos no clásicos, similares a los observados con células RAW264.7. Estos resultados permiten concluir que α_2M^* induce un cambio de la expresión de LRP1 a nivel de la superficie celular. Estos efectos también se asociarían con la producción de procesos celulares, siendo esto último más evidente en subpoblaciones no clásicas que clásicas de monocitos.

4.3.6 Principales Conclusiones

Los resultados de los experimentos detallados en la sección 4.3 permitieron identificar y aislar las diferentes subpoblaciones de monocitos humanos a través de estrategias de citometría de flujo basados en la expresión monocítica de LRP1. A su vez, se demostró que las diferentes subpoblaciones de monocitos humanos expresan de manera diferencial LRP1, siendo significativamente mayor en aquellas subpoblaciones monocíticas que tienen una participación activa en el proceso inflamatorio (monocitos clásicos e intermedios en humanos). También se caracterizó la distribución subcelular de LRP1 en las diferentes subpoblaciones de monocitos humanos, determinando que aproximadamente el 80% de LRP1 se expresa a nivel intracelular, lo cual resulta similar a lo informado para otros tipos celulares[53]. De este modo, también se concluye que los niveles de expresión de LRP1 en la superficie celular son representativos del nivel total de este receptor en cada subpoblación monocítica. Finalmente, datos preliminares indicarían que α_2M^* induce cambios en la expresión de LRP1 a nivel de la superficie celular de monocitos humanos. Estos efectos también se asociarían con la producción de procesos celulares, siendo esto último más evidente en subpoblaciones no clásicas que clásicas de monocitos.

4. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1 Caracterización de los mecanismos moleculares que regulan la migración y activación de monocitos y monocitos-macrófagos a través del sistema $\alpha_2M/LRP1$

LRP1 participa en diversos procesos biológicos que están relacionados con el control de la proteólisis extracelular y el metabolismo de los lípidos, como así también con el desarrollo embrionario, la transmisión nerviosa y la inflamación, entre otros [38, 41]. Más allá de su expresión prácticamente ubicua, la capacidad polifuncional de LRP1 subyace en la capacidad que tiene este receptor de interactuar con más de 40 ligandos funcionalmente no relacionados, de asociarse con otros receptores de membrana y de unir una gran variedad de proteínas adaptadoras a través de su dominio intracitoplasmático (ICD)[41]. Lo que resulta aún más interesante, es que se trata de un receptor con una gran especificidad, lo que le permite generar efectos no redundantes a pesar de interactuar con una amplia variedad de ligandos, receptores y proteínas adaptadoras. Un ejemplo claro de esta gran versatilidad funcional, es puesto de manifiesto cuando se observa la implicancia de LRP1 en la migración celular. Dicho evento, es un fenómeno regulado que necesita de la adhesión intermitente entre proteínas de la superficie celular y la matriz extracelular. Tanto en el inicio como en la progresión del proceso aterosclerótico, la migración celular de los diferentes tipos celulares involucrados es considerada fundamental en el desarrollo de esta enfermedad. Okada y col. fueron los primeros investigadores en reconocer la influencia de LRP1 en la migración de células musculares lisas (SMCs), al demostrar que cuando se incuban estas células con la proteína RAP, un antagonista de la unión de ligandos a LRP1, o con un anticuerpo anti-LRP1, se producía una inhibición significativa en la migración celular, y que dicho hallazgo era dependiente de la composición de la matriz extracelular [112]. Si

bien en este trabajo no lograron dilucidar cuál era el mecanismo exacto por el cual LRP1 influía en la migración celular de SMCs, observaron que la adición de dos de sus ligandos, t-PA y uPA, aumentaba la motilidad de este tipo de células. En otro estudio, Cao y col. demostraron que LRP1 puede promover la migración de macrófagos, facilitando el tráfico intracelular de Mac-1, una integrina $\alpha M\beta 2$, en presencia de t-PA y su inhibidor PAI-1 [72]. Otros autores, también han demostrado que ligandos de LRP1, como ApoE y trombospondina (TSP por *thrombospondin*), modulan la migración celular. Si bien es conocido que ApoE ejerce un efecto de protección contra enfermedades vasculares, dicha acción se extiende más allá de su función en el metabolismo de lipoproteínas. En este sentido, se ha caracterizado que ApoE al interactuar con LRP1 activa PKA e incrementa AMPc en SMCs, con lo cual evita el accionar de factores inductores de la motilidad celular, tal el caso de PDGF-B [113, 114]. Por otra parte, TSP es una proteína de matriz extracelular que estimula la migración celular mediante el desensamblado de adhesiones focales cuando se une a LRP1 [115, 116].

Tal como se mencionó previamente, hallazgos de nuestro grupo de investigación demostraron, en líneas celulares de macrófagos de ratón, que la interacción $\alpha_2 M^*$ con LRP1 induce la expresión de MMP-9 y proliferación celular, lo cual está mediado por la activación de las vías de señalamiento intracelular MAPK/ERK y del factor de transcripción NF κ B [35, 36]. Por otra parte, nuestro grupo también demostró en células MIO-M1 que la interacción $\alpha_2 M^*/LRP1$ induce un incremento en la migración celular, lo cual se caracteriza por la redistribución celular de MT1-MMP hacia las protrusiones celulares y activación de proMMP-2. En este contexto, en el presente trabajo de tesis se investigaron los efectos producidos por la interacción entre LRP1 y su ligando $\alpha_2 M^*$ en la migración celular de macrófagos. El interés en el estudio de dicho tipo celular radica en que los macrófagos juegan un rol clave en la progresión de las lesiones

ateroscleróticas a nivel vascular[86]. Esta particularidad, sumado a las elevadas cantidades de α_2M^* y LRP1 en este ambiente vascular inflamatorio, nos llevaron a plasmar la hipótesis de que α_2M^* no sólo estaría cumpliendo una función en la remodelación de la MEC regulando la actividad proteolítica, sino que además podría tener acciones en la migración celular del macrófago mediante la interacción con su receptor, LRP1. En el presente estudio, mediante ensayos de *Wound-Healing*, se demostró que la interacción de α_2M^* con LRP1 aumenta la migración de células RAW 264.7. A su vez, capturas de imágenes por microscopia óptica de campoclaro evidenciaron que el estímulo con α_2M^* induce un aumento de la migración celular a través de la formación de largas protrusiones que resultan ser típicos de un modo migratorio mesenquimal. Tanto la migración celular como la formación de dichas protrusiones, fueron bloqueadas por RAP, lo cual indica que este evento de motilidad celular está mediado por la interacción de α_2M^* con su receptor LRP1. A partir de este hallazgo, y con los antecedentes anteriormente mencionados, nos propusimos caracterizar el modo migratorio de células RAW264.7 inducido frente al estímulo con α_2M^* . De esta manera, demostramos, mediante el uso de microscopia confocal, que α_2M^* produce una redistribución subcelular del propio LRP1 conjuntamente con otras proteínas que se asocian con la motilidad celular, incluidas MT1-MMP, FAK (en sus formas constitutivas y fosforiladas) y $\beta 1$ -Integrina, hacia las protrusiones celulares. Además, también se observó remodelación del citoesqueleto, evidenciado por una incrementada polimerización de actina, y un aumento de la expresión y secreción de MMP-9. En su conjunto, todos estos hallazgos permiten concluir que la interacción de α_2M^* con LRP1 induce un aumento de la motilidad celular a través de un modo migratorio mesenquimal, el cual en líneas generales es dependiente de al menos tres procesos diferenciados: i) actividad de proteasas de membrana (MT1-MMP) y secretorias (MMP-9), ii)

remodelación del citoesqueleto para generar las protrusiones celulares, y iii) formación de adhesiones focales que promueven los puntos de anclaje para ejercer un efecto de tracción hacia el frente migratorio [95].

Considerando los procesos moleculares y celulares que definen el modo migratorio mesenquimal, resultó de interés caracterizar en cuales de ellos LRP1 se encontraba directamente involucrado. Con esto en mente, se procedió a analizar el grado de colocalización de LRP1 con diferentes proteínas que participan de este proceso mesenquimal. De este modo, se demostró que LRP1 no colocaliza con MT1-MMP en estructuras vesiculares intracelulares ni a nivel de la membrana plasmática en células RAW264.7. Esta ausencia de colocalización entre LRP1 y MT1-MMP sería selectivo de este tipo celular puesto que resultados previos de nuestro grupo de investigación demostraron un nivel de localización de ambas proteínas a nivel de estructuras vesiculares intracelulares pero no a nivel de membrana plasmática en células gliales de Muller de retina humana [53]. En este tipo celular, α_2M^* induce la motilidad celular y regula la internalización y reciclado de MT1-MMP, lo cual resulta un mecanismo molecular fundamental para que estas células migren. En el caso de células RAW264.7, α_2M^* induce la migración celular y el tráfico de MT1-MMP hacia la membrana plasmática, pero posiblemente dicho tráfico sería independiente de una asociación directa con LRP1. Nuevos estudios de biología celular son requeridos para esclarecer estas diferencias de mecanismos entre ambos tipos celulares. Por otra parte, también se observó un bajo grado de colocalización de LRP1 con FAK y p-FAK, lo que indicaría que LRP1 no participa directamente en el proceso migratorio asociado con la formación de adhesiones focales. Por el contrario, LRP1 mostró un significativo incremento de colocalización con $\beta 1$ -integrina en células RAW264.7 estimuladas con α_2M^* , en mayor medida a nivel de las protrusiones que en el cuerpo celular. Como fuera mencionado, las integrinas juegan un

rol clave en el proceso migratorio mesenquimal puesto que median la interacción entre el citoesqueleto celular y la matriz extracelular [69]. Por otra parte, se conoce que LRP1 es capaz de modular el tráfico y propiedades funcionales de un gran número de proteínas integrales de membrana, entre las que se encuentran PDGFR, APP e integrinas. Salcioni y col. demostraron que la expresión de LRP1 incrementa los niveles de β 1-integrina en la superficie celular de fibroblastos de ratón y células CHO [117]. Estudios más recientes han demostrado que mutaciones en el dominio NPxY-2 de LRP1 en fibroblastos de ratón, generan un aumento en la superficie celular de β 1-integrina y una disminución en su tasa de internalización, lo cual trae aparejado un aumento en el número de adhesiones focales y la consecuente disminución de la migración celular [118]. Tal como se mencionó anteriormente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la interacción α_2 M*/LRP1 indujo la activación de diferentes vías de señalización intracelular, incluida PKC α [36]. De manera interesante, Ranganathany col. demostraron que PKC α también induce la fosforilación de los residuos serina y treonina presentes en el dominio intracitoplasmático (DIC) de LRP1, promoviendo así la interacción con proteínas adaptadoras como Dab1 y CED-6/GULP, que modulan las funciones endocíticas y de señalización de este receptor [119]. En este sentido, en este trabajo de tesis se demostró que el modo migratorio mesenquimal es dependiente del señalamiento intracelular inducido por la interacción α_2 M*/LRP1, ya que dicho fenómeno fue bloqueado completamente cuando las células fueron pre-incubadas con *calphostin-C*, un inhibidor farmacológico de PKC, y RAP.

En conclusión, estos hallazgos tomados en su conjunto, sugieren que la migración de macrófagos inducidas por el sistema α_2 M*/LRP1 estaría mediada por el siguiente mecanismo molecular dinámico: i) la interacción α_2 M*/LRP1 activaría las isoformas PKC α , lo cual promueve la fosforilación de los residuos serina y treonina en DIC de

LRP1; y ii) este proceso activaría la endocitosis conjunta de LRP1 y β 1-integrina, aumentando así la tasa de reciclado endocítico de esta integrina, con lo cual las adhesiones focales se vuelven más dinámicas con el consecuente aumento en la motilidad celular. El esclarecimiento de los mecanismos aquí planteados debe ser motivo de futuras investigaciones puesto que este tipo celular cobra vital importancia en el desarrollo de diferentes patologías, como el cáncer y la aterosclerosis.

5.2 Expresión de LRP1 en las diferentes subpoblaciones de monocitos en sangre periférica de ratón

Los monocitos de sangre periférica murina pueden clasificarse básicamente en dos subpoblaciones: Ly6C^{hi} y Ly6C^{lo}. En líneas generales se conoce que ratones normales de la cepa C57BL/6J poseen niveles porcentuales similares de ambas subpoblaciones monocíticas, mientras que ratones C57BL/6J deficientes de ApoE (KO-ApoE^{-/-}) muestran un incremento porcentual significativo en la subpoblación de monocitos Ly6C^{hi}, siendo más marcado cuando son alimentados con dietas ricas en grasas [14, 120]. Los monocitos Ly6C^{hi} se adhieren preferentemente al endotelio activado, se acumulan en las placas ateroscleróticas y se convierten rápidamente a macrófagos. En comparación con monocitos Ly6C^{lo}, monocitos Ly6C^{hi} poseen mayores propiedades pro inflamatorias, ya que producen mayores niveles de citoquinas pro inflamatorias, mieloperoxidasa y proteinasas. An y col. demostraron que los monocitos Ly6C^{hi} producen mayores niveles de PSGL-1 (del inglés *P-selectinglycoprotein ligand-1*) que monocitos Ly6C^{lo}, lo que contribuye con el reclutamiento y *rolling* del monocito previo a la extravasación a la intima arterial [121]. En este trabajo de tesis hemos reproducido, mediante ensayos de citometría de flujo, las dos subpoblaciones de monocitos de ratón caracterizadas, con el adicional de establecer el nivel de expresión de LRP1 en la superficie celular en cada una de ellas. En este sentido, hemos podido demostrar: i) que la subpoblación inflamatoria de

monocitos de ratón (Ly6C^{hi}) es la que posee una expresión mayor de LRP1; y ii) que a través de la expresión diferencial de LRP1 se lograron identificar tres subpoblaciones de monocitos, a saber: Ly6C^{hi}/LRP1^{hi}, Ly6C^{hi}/LRP1^{lo} y Ly6C^{lo}/LRP1^{lo}. Estos hallazgos suponen que LRP1 podría estar jugando un rol clave en la subpoblación Ly6C^{hi}, en donde participaría activamente en el fenómeno migratorio de estas células a nivel de la injuria vascular.

Finalmente, cuando se analizó la expresión de LRP1 en la subpoblación de monocitos Ly6C^{hi}, por ser ésta la que expresaba en mayor medida este receptor, se pudo observar que los monocitos Ly6C^{hi}/LRP1^{hi} fueron los únicos capaces de mostrar cambios en la expresión de LRP1 ya sea por la dieta recibida o por la variante genética modificada del modelo animal utilizado. En primer lugar, se observó que los niveles de expresión de LRP1 en la subpoblación de monocitos Ly6C^{hi}/LRP1^{hi} mostraban un aumento significativo en ratones C57BL/6J normales (WT) alimentados con dieta rica en grasas respecto a los alimentados con dieta normal. Estos niveles de LRP1 fueron similares a los alcanzados con los ratones KO-ApoE^{-/-} alimentados con dieta normal. Ambos modelos, tanto WT con dieta ricas en grasas como KO-ApoE^{-/-} con dieta normal, no presentan formación de placas ateromatosas, pero si contienen factores condicionantes para el desarrollo de la patología, los cuales podrían ser los responsables de este aumento en la expresión de LRP1 en esta subpoblación de monocitos murinos. Por el contrario, cuando se analizó el nivel de expresión de LRP1 en la subpoblación de monocitos Ly6C^{hi}LRP1^{hi} en ratones KO-ApoE^{-/-} alimentados con dieta rica en grasas, se observó una disminución significativa de LRP1 respecto de ratones KO-ApoE^{-/-} alimentados con dieta normal. De manera opuesta a lo observado con la expresión de LRP1 en esta subpoblación de monocitos, los niveles de este receptor no sufrió modificaciones significativas en las otras dos subpoblaciones (Ly6C^{hi}LRP1^{lo} y Ly6C^{lo}LRP1^{lo}) en ningún modelo de estudio

murino utilizado en este trabajo de tesis. En este sentido, y a modo de conclusión es importante destacar que los ratones KO-ApoE^{-/-} alimentados con dieta rica en grasas presentan una evidente formación de placas ateroscleróticas, lo cual podría explicar de alguna manera esa disminución de LRP1, producto posiblemente a que este tipo de subpoblación de monocitos Ly6C^{hi}LRP1^{hi} sean preferentemente reclutados a los sitios donde ocurre la injuria vascular. Por este motivo, los cambios en la expresión de LRP1 en subpoblaciones de monocitos Ly6C^{hi}/LRP1^{hi}, frente a factores de riesgo o a la patología ya desencadenada, le confieren a LRP1 un gran potencial como biomarcador para el diagnóstico temprano y seguimiento de la aterosclerosis, el cual deberá ser abordado en mayor profundidad por futuros estudios.

5.3 Expresión de LRP1 en las diferentes subpoblaciones de monocitos en sangre periférica humana

Tanto la heterogeneidad de monocitos como la expresión de LRP1 han sido relacionados con el desarrollo de la aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares [79, 103, 105, 108, 122, 123]. LRP1 es altamente expresado en macrófagos, SMCs y células espumosas durante el desarrollo del proceso aterosclerótico en humanos y modelos animales de aterosclerosis[122]. Además, si bien se sabe que en células de sangre periférica LRP1 se expresa principalmente en monocitos de células de sangre periférica [104, 106, 107], su expresión en relación a la heterogeneidad de monocitos aun quedaba por establecer. Considerando los resultados obtenidos sobre la expresión de LRP1 en subpoblaciones de monocitos murino, también se estableció esta comparación en monocitos humanos. En este sentido, se demostró que LRP1 se encuentra expresado principalmente en monocitos de sangre periférica, lo que permite una clara separación de estas células del resto de leucocitos empleando ensayos de citometría de flujo a través de la distribución celular leucocitaria obtenida de la gráfica SSC vs. LRP1. De este modo demostramos que la

totalidad de los monocitos seleccionados de esta manera fueron negativos para CD15 y CD56, marcadores de células granulocitos-neutrófilos (NG) y linfocitos *natural killers*(NK), respectivamente. Tanto NG como NK expresan altos niveles de CD16 y pueden producir un sesgo importante en la determinación de monocitos no clásico e intermedios si estas células son incorrectamente incluidas en la selección de los monocitos por citometría de flujo[101, 108]. También hemos demostrado que todos los eventos seleccionados en las regiones de granulocitos y linfocitos mostraron un alto nivel de expresión de CD16; sin embargo, en estas regiones celulares seleccionadas no se detectó la expresión de LRP1, lo cual indica que los monocitos no se incluyeron en este grupo celular de leucocitos. Por lo tanto, se concluye que con la estrategia de citometría de flujo desarrollada, se pudo separar de manera selectiva los monocitos circulantes, siendo de este modo LRP1 un pan-marcador para la selección de los monocitos de sangre periférica.

Al presente, existen informados dos ensayos de citometría de flujo diferentes para la determinación de subpoblaciones de monocitos humana . Estos ensayos emplean estrategias distintas, a saber: a través de la detección de CD86 [102, 103, 124] o de HLA-DR [101], ambos como tercer marcador pan-monocítico. En nuestro caso, y basados en la expresión de LRP1 en monocitos, determinamos que los porcentajes de las diferentes subpoblaciones eran significativamente comparables con los obtenidos con el procedimiento de HLA-DR, con lo cual puede ser considerado como un procedimiento alternativo para la medición de las subpoblaciones de monocitos mediante citometría de flujo. Finalmente, una posible ventaja de nuestro ensayo, cuando se compara con la estrategia de selección basada en HLA-DR, es que una baja proporción de células NK expresan HLA-DR, la cual puede incrementarse en respuesta a IL-2 durante ciertas respuestas inflamatorias [125] . Por lo tanto, bajo estas condiciones, éstas células HLA-

DR⁺ NK podrían ser consideradas como monocitos CD16⁺. En este sentido nosotros demostramos que LRP1 no se expresa en células NK, con lo cual estas células HLA-DR⁺ NK serían completamente excluidas de los eventos monocíticos seleccionados con nuestra estrategia basada en LRP1. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales para determinar si la expresión de LRP1 en células NK puede variar bajo ciertas respuestas inmunológicas.

LRP1 juega un rol clave durante diferentes eventos celulares, incluyendo la adhesión y motilidad celular de células malignas y normales [36, 74, 111, 126]. La función molecular de LRP1 dependería de su expresión a nivel de la superficie celular, donde LRP1 puede interactuar y regular otras proteínas de membrana tales uPAR, PDGF-R β , y MT1-MMP [111, 127, 128]. Sin embargo, LRP1 se expresa en baja proporción en la membrana plasmática, y su detección sobre todo es a nivel intracelular [110, 111]. En nuestro estudio demostramos que LRP1 se expresa principalmente a nivel intracelular en las tres subpoblaciones de monocitos humanos y que aproximadamente el 20% del total del receptor es detectado a nivel de la membrana plasmática. Además, también demostramos por citometría de flujo y microscopia, que existe una expresión diferencial de LRP1 a nivel de la superficie celular, siendo mayor en monocitos CD14⁺⁺ (clásicos e intermedios) que en monocitos CD14⁺ (no clásicos) provenientes de pacientes sanos. Así, al igual que en ratón, LRP1 es altamente expresado en la subpoblación de monocitos clásicos CD14⁺⁺CD16⁻ que posee un alto potencial inflamatorio, ya que son los principales productores de ROS (*reactive oxygen species*) en condiciones de no estímulo y producen selectivamente IL1 β y TNF α bajo el estímulo con LPS [102, 129]. Por otro lado, LRP1 posee baja expresión en monocitos no clásicos CD14⁺CD16⁺⁺, los cuales son inducidos a secretar IL1 β y TNF α por virus y ácidos nucleicos a través de la vía TLR7-TLR8-MyD88-MEK [129]. De manera interesante, ha sido reportado que LRP1 puede mediar

la inducción de citoquinas pro inflamatorias en células de Schwann[37], así como la secreción de MMP-9 en macrófagos[36] cuando las células son estimuladas mediante el ligando de LRP1, α_2M^* . En este sentido, se demostró mediante el uso de microscopía confocal que α_2M^* podía modificar los niveles de LRP1 a nivel de la superficie celular en cultivos de subpoblaciones de monocitos humanos, induciendo un incremento significativo en la expresión de LRP1 en la superficie celular de subpoblaciones de monocitos clásicos y no clásicos, no siendo este tan evidente en ésta última subpoblación. Por el contrario, α_2M^* no afectó el contenido total de LRP1 en ambas subpoblaciones de monocitos humanos, lo cual indica que la regulación de la expresión en la superficie celular en cultivos primarios de monocitos humanos es mediada por un mecanismo postransduccional similar al observado en la línea RAW264.7 de ratón. Sin embargo, se desconoce si los factores inflamatorios pueden modificar la expresión de LRP1 en las diferentes subpoblaciones de monocitos. En este sentido, se ha reportado que existe un aumento en la expresión de LRP1 en monocitos totales de pacientes infectados con el virus HIV-1, en los cuales no hay progreso de la enfermedad, sugiriendo que este receptor podría mantener la respuesta $CD8^+$ en dichos pacientes [104]. Por lo tanto, es muy importante poder dilucidar el rol funcional como la estabilidad de LRP1 en las diferentes subpoblaciones de monocitos durante los procesos inflamatorios, principalmente en la aterosclerosis. En este sentido, nuestro laboratorio ha demostrado que pacientes con Diabetes Mellitus Tipo2 sufren una disminución en la expresión de LRP1 en monocitos totales (manuscrito en preparación para ser publicado), resultado que corroboraría hallazgos previos donde se demostró que insulina produce una marcada disminución de LRP1 en macrófagos [82], lo cual posicionaría a este receptor como un factor protector, debido a que durante los procesos asociados con síndrome metabólico y aumento de la resistencia a la insulina, esta hormona es considerada proaterogénica [83]. Resultados

preliminares de nuestro grupo de investigación han evidenciado una disminución en la expresión de LRP1 en la subpoblación de monocitos clásicos en pacientes con lesión aterosclerótica a nivel de carótidas o coronarias (Tesis doctoral Med. Ricardo Arturo Albertini. En curso), lo cual muestra una importante correlación con lo demostrado en el modelo de ratón aquí informado, ya que la disminución de LRP1 se produce en la subpoblación monocítica inflamatoria, y a su vez en presencia de lesión aterosclerótica.

En conclusión, el ensayo de citometría de flujo basado en la estrategia de selección de monocitos por LRP1 puede ser utilizada para determinar, en un procedimiento único, la heterogeneidad de monocitos y la expresión de LRP1 en esta población leucocitaria de sangre periférica, con lo cual, estos parámetros son de gran interés diagnóstico clínico en enfermedades inflamatorias, en particular en la aterosclerosis, donde podrían ser utilizado como un biomarcador temprano y de monitoreo de esta patología. Curiosamente, a este ensayo también se le pueden sumar otros marcadores de monocitos que intervienen en el desarrollo de la aterosclerosis, tales como CD36, CCR2, CCR5, CX3CR1 y CD11a, con lo cual se aumentaría aun más la sensibilidad diagnóstica de este ensayo.

5.4 Perspectivas

Como fue mencionado anteriormente, los resultados sugieren que la migración de macrófagos inducidas por el sistema $\alpha_2M^*/LRP1$ está mediado por la activación de las vías de señalamiento intracelulares inducidas por dicha interacción y por el consecuente aumento de la tasa de reciclado endocítico/exocítico conjunto entre LRP1 y $\beta 1$ -integrina, aumentando así la actividad de la mencionada integrina y la motilidad celular. Para ello, sería importante caracterizar la distribución y localización subcelular de LRP1 y $\beta 1$ -integrina en ausencia y presencia de α_2M^* así como la(s) ruta(s) de reciclado endocítico y/o exocitosis de ambas proteínas desde estructuras vesiculares intracelulares hacia la

membrana plasmática.

La expresión diferencial de LRP1 en la subpoblación de monocitos Ly6C^{hi}, permitió caracterizar tres subpoblaciones monocíticas basadas en las dos descriptas hasta el presente (Ly6C^{hi} y Ly6C^{lo}) las cuales son: Ly6C^{hi}LRP1^{hi}, Ly6C^{hi}LRP1^{lo}, y Ly6C^{lo}LRP1^{lo}. Con lo cual, sería interesante evaluar longitudinalmente la expresión de LRP1 de dichas subpoblaciones de monocitos murinos KO-ApoE^{-/-} alimentados con dieta normal durante extensos períodos (por ejemplo: al menos hasta los 12 meses). El uso de la dieta normal en reemplazo de la dieta rica en grasas, se debería al menos por dos motivos: i) a que la dieta rica en grasas *per se* puede generar un severo estado inflamatorio, lo cual complica adjudicar los resultados obtenidos únicamente al proceso aterosclerótico; y ii) a que la cinética de estos ratones en el desarrollo de formación de placas ateroscleróticas es lento y gradual cuando son alimentados con dieta normal, lo cual permitiría correlacionar el grado de daño vascular con los niveles del LRP1 en dichas subpoblaciones monocíticas.

En cuanto a la expresión diferencial de LRP1 en subpoblaciones de monocitos humanos, y en base a lo establecido en ratones, sería importante establecer el grado de asociación clínica entre los niveles de expresión de LRP1, en conjunto con otros marcadores de activación de monocitos, en individuos que presentan alto riesgo de desarrollar aterosclerosis y enfermedad cardiovascular. Para ello, se podría estudiar individuos que presentan evidente lesión aterosclerótica, ya sea nivel de la arteria carótida (engrosamiento y/o formación de placa) establecida por ecografía Doppler y/o a nivel de arterias coronarias analizadas por el score de calcificación de dichas arterias determinadas por tomografía axial computada (TAC). Si bien este análisis de imágenes es una evaluación parcializada del estado de las arterias en relación con la aterosclerosis, dado que una prueba negativa no significa ausencia de ateroma en otras arterias, la

positividad de la prueba permitirá asociar aquellos pacientes con formación evidente de placa aterosclerótica en función del perfil de marcadores monocíticos analizados.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. D'Agostino, R.B., Sr., et al., *Validation of the Framingham coronary heart disease prediction scores: results of a multiple ethnic groups investigation*. JAMA, 2001. **286**(2): p. 180-7.
2. Alamanda, V., et al., *Nicotine-mediated induction of E-selectin in aortic endothelial cells requires Src kinase and E2F1 transcriptional activity*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **418**(1): p. 56-61.
3. Alvarez, A., et al., *Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II*. Blood, 2004. **104**(2): p. 402-8.

4. Hansson, G.K. and A. Hermansson, *The immune system in atherosclerosis*. Nat Immunol, 2011. **12**(3): p. 204-12.
5. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
6. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
7. Mestas, J. and K. Ley, *Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis*. Trends Cardiovasc Med, 2008. **18**(6): p. 228-32.
8. Huo, Y., A. Hafezi-Moghadam, and K. Ley, *Role of vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin connecting segment-1 in monocyte rolling and adhesion on early atherosclerotic lesions*. Circ Res, 2000. **87**(2): p. 153-9.
9. Ley, K., Y.I. Miller, and C.C. Hedrick, *Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(7): p. 1506-16.
10. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, *Inflammation and atherosclerosis*. Circulation, 2002. **105**(9): p. 1135-43.
11. Fuster, V., et al., *Atherothrombosis and high-risk plaque: Part II: approaches by noninvasive computed tomographic/magnetic resonance imaging*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(7): p. 1209-18.
12. Jawien, J., P. Nastalek, and R. Korbut, *Mouse models of experimental atherosclerosis*. J Physiol Pharmacol, 2004. **55**(3): p. 503-17.
13. Wu, H., et al., *Functional role of CD11c+ monocytes in atherogenesis associated with hypercholesterolemia*. Circulation, 2009. **119**(20): p. 2708-17.
14. Swirski, F.K., et al., *Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytoysis and give rise to macrophages in atheromata*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 195-205.
15. Tacke, F., et al., *Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 185-94.
16. Wildgruber, M., et al., *Monocyte subset dynamics in human atherosclerosis can be profiled with magnetic nano-sensors*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5663.
17. Gleissner, C.A., N. Leitinger, and K. Ley, *Effects of native and modified low-density lipoproteins on monocyte recruitment in atherosclerosis*. Hypertension, 2007. **50**(2): p. 276-83.
18. Ziegler-Heitbrock, L., et al., *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*. Blood, 2010. **116**(16): p. e74-80.
19. Sunderkotter, C., et al., *Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4410-7.
20. Suzuki, A., et al., *Circulating intermediate CD14++CD16+ monocytes are increased in patients with atrial fibrillation and reflect the functional remodelling of the left atrium*. Europace, 2016.
21. Rogacev, K.S., et al., *CD14++CD16+ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography*. J Am Coll Cardiol, 2012. **60**(16): p. 1512-20.
22. Wrigley, B.J., et al., *CD14++CD16+ monocytes in patients with acute ischaemic heart failure*. Eur J Clin Invest, 2013. **43**(2): p. 121-30.
23. Tapp, L.D., et al., *The CD14++CD16+ monocyte subset and monocyte-platelet interactions in patients with ST-elevation myocardial infarction*. J Thromb Haemost, 2012. **10**(7): p. 1231-41.
24. Gratchev, A., et al., *Monocytes as a diagnostic marker of cardiovascular diseases*. Immunobiology, 2012. **217**(5): p. 476-82.
25. Zawada, A.M., et al., *Monocyte heterogeneity in human cardiovascular disease*. Immunobiology, 2012. **217**(12): p. 1273-84.

26. Chu, C.T. and S.V. Pizzo, *alpha 2-Macroglobulin, complement, and biologic defense: antigens, growth factors, microbial proteases, and receptor ligation*. Lab Invest, 1994. **71**(6): p. 792-812.
27. Feldman, S.R., S.L. Gonias, and S.V. Pizzo, *Model of alpha 2-macroglobulin structure and function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(17): p. 5700-4.
28. Skornicka, E.L., X. Shi, and P.H. Koo, *Comparative binding of biotinylated neurotrophins to alpha(2)-macroglobulin family of proteins: relationship between cytokine-binding and neuro-modulatory activities of the macroglobulins*. J Neurosci Res, 2002. **67**(3): p. 346-53.
29. Skornicka, E.L., et al., *Pregnancy zone protein is a carrier and modulator of placental protein-14 in T-cell growth and cytokine production*. Cell Immunol, 2004. **232**(1-2): p. 144-56.
30. Sanchez, M.C., et al., *Interaction of human tissue plasminogen activator (t-PA) with pregnancy zone protein: a comparative study with t-PA-alpha2-macroglobulin interaction*. J Biochem, 1998. **124**(2): p. 274-9.
31. Sanchez, M.C., G.A. Chiabrando, and M.A. Vides, *Pregnancy zone protein-tissue-type plasminogen activator complexes bind to low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP)*. Arch Biochem Biophys, 2001. **389**(2): p. 218-22.
32. Arbelaez, L.F., et al., *Interaction of matrix metalloproteinases-2 and -9 with pregnancy zone protein and alpha2-macroglobulin*. Arch Biochem Biophys, 1997. **347**(1): p. 62-8.
33. Ramos, A., et al., *Inhibitory effects of human alpha 2-macroglobulin on Trypanosoma cruzi epimastigote proteinases*. Acta Trop, 1997. **68**(3): p. 327-37.
34. Ramos, A.M., et al., *Trypanosoma cruzi: cruzipain and membrane-bound cysteine proteinase isoform(s) interacts with human alpha(2)-macroglobulin and pregnancy zone protein*. Exp Parasitol, 2002. **100**(2): p. 121-30.
35. Bonacci, G.R., et al., *Activated alpha(2)-macroglobulin induces cell proliferation and mitogen-activated protein kinase activation by LRP-1 in the J774 macrophage-derived cell line*. Arch Biochem Biophys, 2007. **460**(1): p. 100-6.
36. Caceres, L.C., et al., *Activated alpha(2) macroglobulin induces matrix metalloproteinase 9 expression by low-density lipoprotein receptor-related protein 1 through MAPK-ERK1/2 and NF-kappaB activation in macrophage-derived cell lines*. J Cell Biochem, 2010. **111**(3): p. 607-17.
37. Shi, Y., et al., *Regulation of cytokine expression by Schwann cells in response to alpha2-macroglobulin binding to LRP1*. J Neurosci Res, 2011. **89**(4): p. 544-51.
38. Herz, J. and D.K. Strickland, *LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor*. J Clin Invest, 2001. **108**(6): p. 779-84.
39. 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.
40. Herz, J. and H.H. Bock, *Lipoprotein receptors in the nervous system*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 405-34.
41. Lillis, A.P., et al., *LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies*. Physiol Rev, 2008. **88**(3): p. 887-918.
42. Willnow, T.E., A. Nykjaer, and J. Herz, *Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(6): p. E157-62.
43. Rebeck, G.W., et al., *The generation and function of soluble apoE receptors in the CNS*. Mol Neurodegener, 2006. **1**: p. 15.
44. Uhlik, M.T., et al., *Structural and evolutionary division of phosphotyrosine binding (PTB) domains*. J Mol Biol, 2005. **345**(1): p. 1-20.
45. Stolt, P.C. and H.H. Bock, *Modulation of lipoprotein receptor functions by intracellular adaptor proteins*. Cell Signal, 2006. **18**(10): p. 1560-71.

46. Beffert, U., et al., *Functional dissection of Reelin signaling by site-directed disruption of Disabled-1 adaptor binding to apolipoprotein E receptor 2: distinct roles in development and synaptic plasticity*. J Neurosci, 2006. **26**(7): p. 2041-52.
47. Gotthardt, M., et al., *Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction*. J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25616-24.
48. Maxfield, F.R. and T.E. McGraw, *Endocytic recycling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(2): p. 121-32.
49. Salzman, N.H. and F.R. Maxfield, *Fusion accessibility of endocytic compartments along the recycling and lysosomal endocytic pathways in intact cells*. J Cell Biol, 1989. **109**(5): p. 2097-104.
50. Yamashiro, D.J., et al., *Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-Golgi compartment in the recycling pathway*. Cell, 1984. **37**(3): p. 789-800.
51. Laatsch, A., et al., *Low density lipoprotein receptor-related protein 1 dependent endosomal trapping and recycling of apolipoprotein E*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e29385.
52. Walters, J.J. and B. Berwin, *Differential CD91 dependence for calreticulin and Pseudomonas exotoxin-A endocytosis*. Traffic, 2005. **6**(12): p. 1173-82.
53. Barcelona, P.F., et al., *Activated alpha2-macroglobulin induces Muller glial cell migration by regulating MT1-MMP activity through LRP1*. FASEB J, 2013. **27**(8): p. 3181-97.
54. Friedl, P. and K. Wolf, *Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model*. J Cell Biol, 2010. **188**(1): p. 11-9.
55. Abercrombie, M., J.E. Heaysman, and S.M. Pegrum, *The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella*. Exp Cell Res, 1971. **67**(2): p. 359-67.
56. Heath, J.P. and G.A. Dunn, *Cell to substratum contacts of chick fibroblasts and their relation to the microfilament system. A correlated interference-reflexion and high-voltage electron-microscope study*. J Cell Sci, 1978. **29**: p. 197-212.
57. Huttenlocher, A., R.R. Sandborg, and A.F. Horwitz, *Adhesion in cell migration*. Curr Opin Cell Biol, 1995. **7**(5): p. 697-706.
58. Lauffenburger, D.A. and A.F. Horwitz, *Cell migration: a physically integrated molecular process*. Cell, 1996. **84**(3): p. 359-69.
59. Ridley, A.J., et al., *Cell migration: integrating signals from front to back*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1704-9.
60. Lammermann, T., et al., *Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing*. Nature, 2008. **453**(7191): p. 51-5.
61. Kiosses, W.B., et al., *Rac recruits high-affinity integrin alphavbeta3 to lamellipodia in endothelial cell migration*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(3): p. 316-20.
62. Abram, C.L. and C.A. Lowell, *The ins and outs of leukocyte integrin signaling*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 339-62.
63. Huveneers, S. and E.H. Danen, *Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 8): p. 1059-69.
64. Zamir, E. and B. Geiger, *Components of cell-matrix adhesions*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 20): p. 3577-9.
65. Turner, C.E., *Paxillin and focal adhesion signalling*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(12): p. E231-6.
66. Frame, M.C., *Newest findings on the oldest oncogene; how activated src does it*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 7): p. 989-98.
67. Mitra, S.K., D.A. Hanson, and D.D. Schlaepfer, *Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(1): p. 56-68.
68. Legate, K.R., et al., *ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(1): p. 20-31.

69. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 2002. **110**(6): p. 673-87.
70. Weaver, A.M., et al., *Embryonic fibroblasts that are genetically deficient in low density lipoprotein receptor-related protein demonstrate increased activity of the urokinase receptor system and accelerated migration on vitronectin*. J Biol Chem, 1997. **272**(22): p. 14372-9.
71. Ma, Z., et al., *Regulation of Rac1 activation by the low density lipoprotein receptor-related protein*. J Cell Biol, 2002. **159**(6): p. 1061-70.
72. Cao, C., et al., *Endocytic receptor LRP together with tPA and PAI-1 coordinates Mac-1-dependent macrophage migration*. EMBO J, 2006. **25**(9): p. 1860-70.
73. Mantuano, E., et al., *Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP1) regulates Rac1 and RhoA reciprocally to control Schwann cell adhesion and migration*. J Biol Chem, 2010. **285**(19): p. 14259-66.
74. Song, H., et al., *Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 promotes cancer cell migration and invasion by inducing the expression of matrix metalloproteinases 2 and 9*. Cancer Res, 2009. **69**(3): p. 879-86.
75. Ma, J., et al., *Regulation of macrophage activation*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(11): p. 2334-46.
76. Libby, P. and J. Plutzky, *Diabetic macrovascular disease: the glucose paradox?* Circulation, 2002. **106**(22): p. 2760-3.
77. Ferrer, D.G., et al., *Standardized flow cytometry assay for identification of human monocytic heterogeneity and LRP1 expression in monocyte subpopulations: Decreased expression of this receptor in nonclassical monocytes*. Cytometry A, 2014.
78. Herz, J., D.E. Clouthier, and R.E. Hammer, *LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation*. Cell, 1992. **71**(3): p. 411-21.
79. Boucher, P., et al., *LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis*. Science, 2003. **300**(5617): p. 329-32.
80. Yancey, P.G., et al., *Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 prevents early atherosclerosis by limiting lesional apoptosis and inflammatory Ly-6Chigh monocytosis: evidence that the effects are not apolipoprotein E dependent*. Circulation, 2011. **124**(4): p. 454-64.
81. Hu, L., et al., *Macrophage low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency enhances atherosclerosis in ApoE/LDLR double knockout mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(12): p. 2710-5.
82. Ceschin, D.G., M.C. Sanchez, and G.A. Chiabrando, *Insulin induces the low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) degradation by the proteasomal system in J774 macrophage-derived cells*. J Cell Biochem, 2009. **106**(3): p. 372-80.
83. Schmitz, G. and M. Grandl, *Lipid homeostasis in macrophages - implications for atherosclerosis*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 2008. **160**: p. 93-125.
84. Llorente-Cortes, V., et al., *Sterol regulatory element binding proteins downregulate LDL receptor-related protein (LRP1) expression and LRP1-mediated aggregated LDL uptake by human macrophages*. Cardiovasc Res, 2007. **74**(3): p. 526-36.
85. Llorente-Cortes, V., et al., *Cholesteryl esters of aggregated LDL are internalized by selective uptake in human vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(1): p. 117-23.
86. Llorente-Cortes, V., et al., *Intracellular lipid accumulation, low-density lipoprotein receptor-related protein expression, and cell survival in vascular smooth muscle cells derived from normal and atherosclerotic human coronaries*. Eur J Clin Invest, 2004. **34**(3): p. 182-90.
87. Liang, C.C., A.Y. Park, and J.L. Guan, *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*. Nat Protoc, 2007. **2**(2): p. 329-33.

88. Barrett, A.J., M.A. Brown, and C.A. Sayers, *The electrophoretically 'slow' and 'fast' forms of the alpha 2-macroglobulin molecule*. *Biochem J*, 1979. **181**(2): p. 401-18.
89. Van Leuven, F., J.J. Cassiman, and H. Van den Berghe, *Functional modifications of alpha 2-macroglobulin by primary amines. II. Inhibition of covalent binding of trypsin to alpha 2 M by methylamine and other primary amines*. *J Biol Chem*, 1981. **256**(17): p. 9023-7.
90. Van Leuven, F., J.J. Cassiman, and H. Van den Berghe, *Functional modifications of alpha 2-macroglobulin by primary amines. I. Characterization of alpha 2 M after derivatization by methylamine and by factor XIII*. *J Biol Chem*, 1981. **256**(17): p. 9016-22.
91. Lombard, C., J. Saulnier, and J. Wallach, *Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) activities: a review*. *Biochimie*, 2005. **87**(3-4): p. 265-72.
92. Murphy, G. and T. Crabbe, *Gelatinases A and B*. *Methods Enzymol*, 1995. **248**: p. 470-84.
93. Bolte, S. and F.P. Cordelieres, *A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy*. *J Microsc*, 2006. **224**(Pt 3): p. 213-32.
94. Blumberg, P.M., *Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: sixth Rhoads memorial award lecture*. *Cancer Res*, 1988. **48**(1): p. 1-8.
95. Schaller, M.D., *Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions*. *J Cell Sci*, 2010. **123**(Pt 7): p. 1007-13.
96. Zhao, J. and J.L. Guan, *Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 2009. **28**(1-2): p. 35-49.
97. Vadali, K., X. Cai, and M.D. Schaller, *Focal adhesion kinase: an essential kinase in the regulation of cardiovascular functions*. *IUBMB Life*, 2007. **59**(11): p. 709-16.
98. Hearse, D.J. and F.J. Sutherland, *Experimental models for the study of cardiovascular function and disease*. *Pharmacol Res*, 2000. **41**(6): p. 597-603.
99. Zhang, S.H., et al., *Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E*. *Science*, 1992. **258**(5081): p. 468-71.
100. Hume, D.A., *The mononuclear phagocyte system*. *Curr Opin Immunol*, 2006. **18**(1): p. 49-53.
101. Heimbeck, I., et al., *Standardized single-platform assay for human monocyte subpopulations: Lower CD14+CD16++ monocytes in females*. *Cytometry A*, 2010. **77**(9): p. 823-30.
102. Zawada, A.M., et al., *SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset*. *Blood*, 2011. **118**(12): p. e50-61.
103. Rogacev, K.S., et al., *CD14++CD16+ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease*. *Eur Heart J*, 2011. **32**(1): p. 84-92.
104. Stebbing, J., et al., *The heat-shock protein receptor CD91 is up-regulated in monocytes of HIV-1-infected "true" long-term nonprogressors*. *Blood*, 2003. **101**(10): p. 4000-4.
105. Llorente-Cortes, V., et al., *Effect of Mediterranean diet on the expression of pro-atherogenic genes in a population at high cardiovascular risk*. *Atherosclerosis*, 2010. **208**(2): p. 442-50.
106. Mosig, S., et al., *Different functions of monocyte subsets in familial hypercholesterolemia: potential function of CD14+ CD16+ monocytes in detoxification of oxidized LDL*. *FASEB J*, 2009. **23**(3): p. 866-74.
107. Moestrup, S.K., et al., *Immunocytochemical identification of the human alpha 2-macroglobulin receptor in monocytes and fibroblasts: monoclonal antibodies define the receptor as a monocyte differentiation antigen*. *Exp Cell Res*, 1990. **190**(2): p. 195-203.
108. Zawada, A.M., et al., *Monocyte heterogeneity in human cardiovascular disease*. *Immunobiology*, 2012.
109. Rogacev, K.S., et al., *Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis*. *Eur Heart J*, 2010. **31**(3): p. 369-76.

110. Bu, G., et al., *Subcellular localization and endocytic function of low density lipoprotein receptor-related protein in human glioblastoma cells*. J Biol Chem, 1994. **269**(47): p. 29874-82.
111. Barcelona, P.F., et al., *Activated alpha2-macroglobulin induces Muller glial cell migration by regulating MT1-MMP activity through LRP1*. FASEB J, 2013.
112. Okada, S.S., S.R. Grobmyer, and E.S. Barnathan, *Contrasting effects of plasminogen activators, urokinase receptor, and LDL receptor-related protein on smooth muscle cell migration and invasion*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. **16**(10): p. 1269-76.
113. Swertfeger, D.K., G. Bu, and D.Y. Hui, *Low density lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E inhibition of smooth muscle cell migration*. J Biol Chem, 2002. **277**(6): p. 4141-6.
114. Zhu, Y. and D.Y. Hui, *Apolipoprotein E binding to low density lipoprotein receptor-related protein-1 inhibits cell migration via activation of cAMP-dependent protein kinase A*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36257-63.
115. Orr, A.W., et al., *Low density lipoprotein receptor-related protein is a calreticulin coreceptor that signals focal adhesion disassembly*. J Cell Biol, 2003. **161**(6): p. 1179-89.
116. Orr, A.W., et al., *Thrombospondin signaling through the calreticulin/LDL receptor-related protein co-complex stimulates random and directed cell migration*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 14): p. 2917-27.
117. Salicioni, A.M., et al., *Low density lipoprotein receptor-related protein-1 promotes beta1 integrin maturation and transport to the cell surface*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 10005-12.
118. Rabiej, V.K., et al., *Low density lipoprotein receptor-related protein 1 mediated endocytosis of beta1-integrin influences cell adhesion and cell migration*. Exp Cell Res, 2015.
119. Ranganathan, S., et al., *Serine and threonine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein by protein kinase Calpha regulates endocytosis and association with adaptor molecules*. J Biol Chem, 2004. **279**(39): p. 40536-44.
120. Libby, P., et al., *Diversity of denizens of the atherosclerotic plaque: not all monocytes are created equal*. Circulation, 2008. **117**(25): p. 3168-70.
121. An, G., et al., *P-selectin glycoprotein ligand-1 is highly expressed on Ly-6Chi monocytes and a major determinant for Ly-6Chi monocyte recruitment to sites of atherosclerosis in mice*. Circulation, 2008. **117**(25): p. 3227-37.
122. Boucher, P. and J. Herz, *Signaling through LRP1: Protection from atherosclerosis and beyond*. Biochem Pharmacol, 2011. **81**(1): p. 1-5.
123. Llorente-Cortes, V. and L. Badimon, *LDL receptor-related protein and the vascular wall: implications for atherothrombosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(3): p. 497-504.
124. Spijkers, P.P., et al., *LDL-receptor-related protein regulates beta2-integrin-mediated leukocyte adhesion*. Blood, 2005. **105**(1): p. 170-7.
125. Evans, J.H., et al., *A distinct subset of human NK cells expressing HLA-DR expand in response to IL-2 and can aid immune responses to BCG*. Eur J Immunol, 2011. **41**(7): p. 1924-33.
126. Barcelona, P.F., et al., *alpha2-Macroglobulin induces glial fibrillary acidic protein expression mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in Muller cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(2): p. 778-86.
127. Gonias, S.L., A. Gaultier, and M. Jo, *Regulation of the urokinase receptor (uPAR) by LDL receptor-related protein-1 (LRP1)*. Curr Pharm Des, 2011. **17**(19): p. 1962-9.
128. Boucher, P., et al., *LRP1 functions as an atheroprotective integrator of TGFbeta and PDGF signals in the vascular wall: implications for Marfan syndrome*. PLoS ONE, 2007. **2**(5): p. e448.

129. Cros, J., et al., *Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors*. *Immunity*, 2010. **33**(3): p. 375-86.

7. ADENDA

7. ADENDA

Los resultados del presente trabajo de tesis fueron presentados en congresos nacionales e internacionales. Algunos de ellos fueron publicados y otros se encuentran en consideración para su publicación en revistas científicas con referato (*peer review*). Finalmente, es importante destacar que el autor del presente trabajo de tesis, en el marco de su formación doctoral, colaboró activamente en la generación y publicación de otros resultados del grupo de investigación.

7.1 Presentaciones a congresos

7.1.2 Congresos nacionales

- 2013** *LRP1 se expresa diferencialmente en subpoblaciones de monocitos de sangre periférica y presenta niveles disminuidos en monocitos clásicos de pacientes con lesión aterosclerótica carotídea respect a individuos sanos.* Albertini R., Ferrer D., Amigone J., Tinti M., Collino C., Capra R., Chiabrando G.. LVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Mar del Plata, Noviembre 2013. Póster
- 2013** *Estimación de Variabilidad Biológica Intra-Individual de la Expresión de LRP1 en Subpoblaciones de Monocitos de Sangre Periférica.* José L. Amigone, Darío G. Ferrer, Ricardo Albertini, Raúl Capra, Gustavo A. Chiabrando. Segundo Congreso Bioquímico Córdoba, organizado por el Colegio de Bioquímicos de la Provincia de Córdoba, Córdoba, Córdoba, Octubre de 2013. Póster
- 2013** *Identificación de Subpoblaciones de monocitos humanos basada en la expresión diferencial monocítica de LRP1.* Ferrer D., Jaldin-Fincati JR., Collino C., Albertini R., Chiabrando G.A. XIX Jornadas Científicas de la Sociedad de Biología de Córdoba. La Falda-Córdoba, Agosto de 2013. Comunicación oral.
- 2012** *LRP1 expression and function in human blood peripheral monocyte (bpm) subpopulations.* Ferrer DG, Jaldín Fincati JR, Sánchez MC, Chiabrando GA. XLVIII Reunión Anual – Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Mendoza, Noviembre de 2012. Póster
- 2011** *Alpha-2 macroglobulin/LRP1 induces differential macrophage migration in normoxic and hypoxic conditions.* Ferrer DG, Jaldín-Fincati JR; Sánchez MC, and Chiabrando GA. XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología

Molecular (SAIB). Potrero de los Funes, San Luis, Argentina. Noviembre de 2011. Póster.

2010

$\alpha_2M/Lrp1$ system induces cell migration and proliferation by intracellular signaling activation. Ferrer DG, Cáceres LC, Jaldín-Fincati JR, Sánchez MC, and Chiabrando GA. XLVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Puerto Madryn, Chubut, Argentina. Del 30 de Noviembre al 03 de diciembre de 2010. Póster.

7.1.2 Congresos internacionales

2013

Activated alpha-2 macroglobulin induces cellular migration by regulating MT1-MMP activity through LRP1. Ferrer DG, Jaldín-Fincati JR, Barcelona PF, Sánchez MC, Chiabrando GA. XXVII Reunión Anual de la Sociedad de Biología Celular de Chile. Puerto Varas, Chile. Del 23 al 27 de octubre de 2013. Póster.

2010

Biochemical Parameters Discriminate Patients With Clinically Significant Macular Edema (CSME) From Diabetic Patients Without CME. M.C. Sanchez, C.J.G. Collino, V.M. Baroni, G. Forzinetti, D. Ferrer, G.A. Chiabrando, L. Gramajo, C.P. Juarez, L.G. Garcia, J.D. Luna. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2010 Annual Meeting, Fourt Lauderdale, Florida. May 5, 2010. Póster 5045/D976.

2010

Discriminat Analysis of Serum Biochemical Parameters In Dry and Wet Age Related Macular Degeneration Patients. J.D. Luna Pinto, A.L. Gramajo, J.V. Espejo, C.J.G. Collino, G. Forzinetti, M.V. Baroni, D. Ferrer, G.A. Mendez Nicolía, C.P. Juarez, M.C. Sanchez. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2010 Annual Meeting, Fourt Lauderdale, Florida. May 5, 2010. Póster 4112/A539.

2010

Discriminat Analysis Of Serum Biochemical Parameters In Dry And Wet Age Related Macular Degeneration Patient. J.D. Luna Pinto, A.L. Gramajo, J.V. Espejo, C.J.G. Collino, G. Forzinetti, M.V. Baroni, D. Ferrer, G.A. Mendez Nicolia, C.P. Juarez, M.C. Sanchez. IX Reunión Anual Día Panamericano de la Investigación, 1 de Mayo de 2010. Fourt Lauderdale, Florida, USA. Comunicación oral.

7.2 Publicaciones

7.2.1 Publicación de resultados del presente trabajo de tesis

Standardized Flow Cytometry assay for identification of human monocytic heterogeneity and LRP1 expression in monocyte subpopulations: decreased expression of this receptor in nonclassical monocytes. Ferrer DG, Jaldín-Fincati JR, Amigone JL, Capra RH, Collino CJG, Albertini RA and Chiabrando GA. Cytometry Part A. 2014 Jul;85(7):601-10. doi: 10.1002/cyto.a.22455. Epub 2014 Mar 17.

7.2.2 Otras publicaciones

Edema Macular Diabético Clínicamente Significativo: Análisis Discriminante de Parámetros Bioquímicos. Gabriel M. Forzinetti, César J. G. Collino, María V. Baroni, Darío G. Ferrer, Ana Laura Gramajo, Jimena Espejo, José D. Luna, María Cecilia Sánchez Oftalmol Clin Exp 2010: 4(3): 96-102.