

***REGULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE  
LAS CÉLULAS QUE FORMAN LA LESIÓN  
ATEROESCLERÓTICA POR LIPOPROTEÍNAS***

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

por

**MARÍA CECILIA SAMPEDRO**

**Prof. Dra. SILVIA CLARA KIVATINITZ**

DIRECTORA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

CÓRDOBA- ARGENTINA

FEBRERO 2004



---

Director de Tesis: Prof. Dra Silvia Clara Kivatinitz

Comisión de Tesis: Prof. Dra. Adriana Gruppi

Prof. Dr. Aldo Héctor Coleoni

Prof. Dr. Hugo José Fernando Maccioni

---

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todos aquellos que de diversas maneras han hecho posible la realización de este trabajo, muy especialmente:

- A la Dra Silvia Kivatinitz, por haberme brindado la posibilidad de trabajar a su lado, en un ambiente de libertad.
- Al Departamento de Química Biológica, por permitirme desarrollar este trabajo de tesis.
- Al Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Provincia de Córdoba (CONICOR) y a la Agencia Córdoba Ciencia, por brindarme el apoyo económico a través de sus becas.
- A CONICOR, Agencia Córdoba Ciencia, Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Córdoba, a FONCyT, por el apoyo económico brindado al grupo a través de sus subsidios.
- A los miembros de mi comisión de tesis, por los aportes y el seguimiento realizado de mi trabajo.
- A los profesores Dra. Beatriz Caputto, Dr. José Luis Daniotti, Dr. Gustavo Chiabrando, por brindarme desinteresadamente su material de trabajo.
- A todos los integrantes del Departamento de Química Biológica, porque en cierta forma han llegado a ser una parte importante de mi vida.
- A toda la “familia de planta baja”, por darle alegría al trabajo de cada día.
- A todas las chicas del departamento, por brindarme su amistad simplemente con el compartir del mate y las “reuniones de mujeres”. A todas, las que están y las que no, muchísimas gracias por los buenos momentos.
- A mi gran amiga Estela, por ser mi apoyo incondicional de cada día.
- A mis padres, por su apoyo y confianza que me son, desde siempre imprescindibles.
- Muy especialmente a José Luis, por su amor y paciencia y por la hermosa familia que hemos formado juntos.
- A Lucas y Andrés, por ser mi alegría y fortaleza de cada día, gracias por darle sentido a mi vida.
- A Dios, por ser el principio y fin de toda mi vida.

---

## ABREVIATURAS

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>ALEXA:</b>           | Alexa 488, Molecular Probes   |
| <b>CD3:</b>             | Marcador de linfocitos T  |
| <b>CD4:</b>             | Marcador de población de linfocitos T cooperadores                          |
| <b>CD8:</b>             | Marcador de población de linfocitos T citotóxicos                           |
| <b>CMB:</b>             | Células mononucleares de bazo de ratón.                                     |
| <b>Con A:</b>           | Concanavalina A   |
| <b>COX-1:</b>           | Ciclooxigenasa 1  |
| <b>COX-2:</b>           | Ciclooxigenasa 2  |
| <b>DiI:</b>             | 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato            |
| <b>FITC:</b>            | Isotiocianato de fluoresceína.  |
| <b>FW-SC:</b>           | Detector de Citómetro de Flujo, parámetro relacionado con el tamaño celular |
| <b>GSL:</b>             | Glicoesfingolípidos   |
| <b>HDL:</b>             | Lipoproteína de alta densidad.  |
| <b>HSP:</b>             | Proteínas de shock térmico  |
| <b>IL:</b>              | Interleukina  |
| <b>LacCer:</b>          | Lactosilceramida  |
| <b>LDL:</b>             | Lipoproteína de baja densidad.  |
| <b>LDL-R:</b>           | Receptor de la lipoproteína de baja densidad                                |
| <b>MFCh:</b>            | Intensidad media de fluorescencia   |
| <b>MLC:</b>             | Cultivo mixto linfocitario.   |
| <b>OxHDL:</b>           | Lipoproteína de alta densidad oxidada.                                      |
| <b>PBMC:</b>            | Células mononucleares de sangre periférica humana.                          |
| <b>PE:</b>              | Ficoeritrina  |
| <b>PGE<sub>2</sub>:</b> | Prostaglandina E2   |
| <b>PGI<sub>2</sub>:</b> | Prostaglandina I2   |
| <b>PHA:</b>             | Fitohemaglutinina   |

---

|                    |  |
|--------------------|--|
| <b>PMA:</b>        | Forbol miristato acetato.  |
| <b>PPAR:</b>       | Receptores activados por el proliferador del peroxisoma                          |
| <b>RAP:</b>        | Proteína asociada al receptor de LDL.  |
| <b>RT-SC</b>       | detector de citómetro de flujo, parámetro relacionado con la complejidad celular |
| <b>SFB:</b>        | Suero fetal bovino   |
| <b>VLDL:</b>       | Lipoproteína de muy baja densidad.   |
| <b>VLDL-Alexa:</b> | Lipoproteína de muy baja densidad marcada con Alexa.                             |

---

## RESUMEN

La Aterosclerosis se caracteriza por la presencia de áreas vasculares que poseen células musculares lisas y células mononucleares en estado proliferante así como componentes de la matriz extracelular, células espumosas y depósitos de colesterol. La primera lesión reconocible de la Aterosclerosis (denominada “fatty streak”) es la aparición de un agregado de linfocitos T y de macrófagos ricos en lípidos dentro de la capa íntima de la pared arterial. En esta lesión temprana, hay una clara preponderancia de células T con respecto a los macrófagos, siendo la mayoría de estas células CD4<sup>+</sup> y receptor de Interleukina 2<sup>+</sup> (IL-2R<sup>+</sup>), característica esta última de los linfocitos T activados. La aterosclerosis se define como una enfermedad inflamatoria ya que las placas ateromatosas inestables son particularmente ricas en células activadas del sistema inmune y en productos de activación liberados por las distintas células.

Diversas lipoproteínas participan en la respuesta inmune en la placa ateromatosa, entre ellas la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y la lipoproteína de alta densidad (HDL). La HDL, considerada como una lipoproteína antiaterogénica, regula la proliferación de las células musculares lisas y la producción de prostaglandinas. Ésta lipoproteína es considerada beneficiosa ya que diversos estudios epidemiológicos demuestran una correlación inversa entre la concentración de HDL y la incidencia de enfermedades coronarias. La VLDL es una lipoproteína aterogénica la cual, entre otras cosas, es capaz de inducir la formación de las células espumosas en la placa ateromatosa.

Existen escasos datos acerca del efecto de estas lipoproteínas sobre los linfocitos T y si existe correlación con la progresión de la placa ateromatosa. En este trabajo de tesis describimos algunos efectos importantes de estas lipoproteínas sobre la activación y proliferación de las células que forman el ateroma; los cuales son fundamentales para el diseño de nuevas terapias de prevención del desarrollo o de la progresión de la aterosclerosis.

El objetivo general de esta tesis doctoral fue estudiar la regulación de la activación y la proliferación de las células que forman la lesión aterosclerótica inicial por lipoproteínas anti-aterogénicas y aterogénicas. Los resultados obtenidos permitieron concluir que:

HDL, una lipoproteína anti-aterogénica, suprime la respuesta linfoproliferativa de la célula T inducida por varios mitógenos. Cuando esta lipoproteína es debilmente oxidada “in vitro” pierde esta capacidad.

Un resultado importante que contribuye a enfatizar las propiedades anti-inflamatorias de la HDL, es que inhibe la respuesta blastogénica sin afectar la proporción relativa de los linfocitos T cooperadores y citotóxicos, esto indica que HDL actúa en forma similar a la de los fármacos anti-

---

inflamatorios y que es distinta de las drogas inmunosupresoras que inhiben principalmente la proliferación de los linfocitos T CD4+ de sangre periférica humana.

Otro hallazgo importante es que HDL inhibe la expresión de los marcadores de activación CD25 (receptor de IL-2) y CD2. Estos resultados refuerzan la hipótesis que los efectos anti-blastogénicos están relacionados con las acciones anti-inflamatorias, ya que la mayoría de las drogas anti-inflamatorias impiden la expresión del receptor de IL-2 y de CD2. Estos datos corroboran que HDL dirige los linfocitos T activados hacia un fenotipo de células en reposo.

Sin duda otra vía por la que HDL ejerce un efecto anti-inflamatorio es que produce una inhibición de la liberación de PGE2, mediador temprano de la inflamación, interfiriendo desde el comienzo con la progresión del ciclo celular de las células que se encuentran en la lesión aterosclerótica.

En cuanto a los mecanismos subyacentes al efecto antiproliferativo de HDL se encontró que produce una inhibición de la expresión de mediadores esfingolipídicos, principalmente LacCer. Además, HDL estimula la fosforilación de Map Kinasa en los linfocitos. Estos dos últimos datos refuerzan la noción de que HDL regula la progresión del linfocito T a lo largo del ciclo celular, ya que ERK1 (p44) interviene en cascadas de señalización que son consecuencia de la unión y activación del complejo del receptor de la célula T que culmina en la multiplicación celular. Esta señal produce la activación de la secuencia de señales intracelulares Ras/Raf-1/MEK/MAPK en los linfocitos humanos.

VLDL, una lipoproteína aterogénica, produce inhibición en forma dosis dependiente de la proliferación de células de bazo de ratón inducida por la presencia de ConA.

VLDL disminuye drásticamente la población de linfocitos con morfología de blastos (Fw-SC elevados) que expresan CD3 (linfocitos T) y en menor medida aquellos que expresan CD19 (linfocitos B). Este mecanismo por el cual VLDL manifiesta efectos antiproliferativos se relaciona con el bloqueo de la progresión de las células T en el ciclo celular acumulando la población en la fase G0/G1, por lo tanto produciendo la depleción de células T totalmente activadas, o sea que expresan IL-2R.

Estos resultados contrastan con las propiedades aterogénicas de esta lipoproteína ya que una inhibición de la proliferación o multiplicación de las células inhibiría el crecimiento del ateroma; sin embargo hay otras células que forman la lesión germinal cuya proliferación puede ser afectada por factores liberados por células T. Apoyando ésta hipótesis se detectó que VLDL aumenta la producción de IL-2 y disminuye la de IL-4 indicando que VLDL promueve una respuesta de tipo inflamatoria.

---

Uno de los hallazgos más importantes es que VLDL marcada con sondas fluorescentes se une a una población de linfocitos de tamaño pequeño y rugosidad variada, que presentan características morfológicas de células en estado de reposo. VLDL se une a dominios de la membrana de esta población linfocitos sin internalizarse.

La unión de VLDL a los linfocitos es desplazable por VLDL nativa y no por otras lipoproteínas, indicando que la unión es específica y saturable. Esta unión se ve incrementada cuando se estimulan las células con un mitógeno, y aumenta aún más cuando se preincuban las células con el mitógeno y VLDL. VLDL se une principalmente a linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

La mayoría de las células estimuladas con el mitógeno que unieron VLDL están en la fase G0/G1 del ciclo celular. Esta inhibición de la progresión del ciclo celular es independiente de la unión de la VLDL a la célula, ya que la preincubación de las células con VLDL y el mitógeno produce la inhibición de la progresión del ciclo celular en la fase G0/G1 unan o no VLDL.

VLDL se une a un receptor de membrana del tipo de los de la familia del receptor de LDL (pero no LDL-R) y no del tipo de los receptores barredores ya que la unión de VLDL se ve claramente inhibida por la presencia de RAP, proteína chaperona que se une exclusivamente a la familia de LDL-R. La preincubación de las células con el mitógeno y con VLDL aumenta la expresión de la proteína que une RAP, sugiriendo por el peso molecular de la misma que VLDL se está uniendo a VLDL-R o a un receptor aún no descrito . Esta es la primera vez que se sugiere la existencia de receptor de VLDL en linfocitos T CD4<sup>+</sup>.



---

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

- *Trabajos publicados:*

- “Mannan from Aloe Saponaria inhibits tumoral cell activation and proliferation”**

- Sampedro MC, Artola RL, Murature M, Murature D, Ditamo Y, Roth G, and Kivatinitz SC. International Immunopharmacology 2004, en prensa.

- “HDL directs activated lymphocytes to a resting phenotype”.**

- Sampedro MC, Gruppi A, Motrán C, Artola RL and Kivatinitz SC.

- Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2003; 41 suplemento especial: 843-856.

- “VLDL modulates the cytokine secretion profile to a proinflammatory pattern”.**

- Sampedro MC, Motrán C, Gruppi A and Kivatinitz SC.

- Biochemical and Biophysical Research Communications 2001; 285: 393.

- *Comunicaciones a Congresos*

- “VLDL se une a linfocitos a través de un receptor de la familia del receptor de LDL”.**

- Sampedro M C, Kivatinitz S C. 2das Jornadas de Bioquímica y Biología Molecular de Lípidos. La Plata, 13-15 de agosto de **2003**. Modalidad Presentación Oral.

- “HDL dirige a los linfocitos activados hacia un estado de reposo”.** Sampedro, M.C., Motrán, C., Gruppi, A. and Kivatinitz, S.C. XXI Congreso Nacional de Cardiología. Federación Argentina de Cardiología. Mar del Plata 17-19 de Agosto **2002**. Modalidad: Presentación Oral.

- “VLDL binds to T-helper lymphocytes and arrest T-cells on G0-G1 phase of cell cycle”.** Sampedro, M.C., Motrán, C., Gruppi, A. and Kivatinitz, S.C. XXXVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Carlos Paz Córdoba, Noviembre **2001**.

- “Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y baja densidad (LDL) inhiben la respuesta linfoproliferativa por mecanismos diversos”.** Sampedro MC, Artola R, Gruppi A, Motrán C, Kivatinitz SC. XXXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Mendoza, Noviembre **1999**.

- “Lipoprotein differential inhibition of lymphoproliferative response”.** Sampedro, M.C., Artola, R.L., Gruppi, A., Motrán, C., Kivatinitz, S.C. 17ºInternational Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Florencia, ITALIA. Junio, **1999**.

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INTRODUCCIÓN</b>   | <b>1</b>  |
| <b>CAPITULO 1</b>   | <b>2</b>  |
| LIPOPROTEÍNAS   | 2         |
| <b>CAPÍTULO 2</b>   | <b>4</b>  |
| APOLIPOPROTEÍNAS  | 4         |
| 2.I- Apolipoproteína A  | 5         |
| 2.II- Apolipoproteína B   | 7         |
| 2.III- Apolipoproteína E  | 8         |
| 2.IV- Apolipoproteína C   | 9         |
| <b>CAPÍTULO 3</b>   | <b>10</b> |
| RECEPTORES DE LIPOPROTEÍNAS                                     | 10        |
| 3.I- Receptores de la familia del receptor de LDL               | 11        |
| 3.I.1- Receptor de LDL (LDL-R)                                  | 12        |
| 3.I.2- Proteína relacionada al receptor de LDL (LRP)            | 13        |
| 3.I.3- Receptor de VLDL (VLDL-R)                                | 13        |
| 3.I.4- Receptor de apoE 2 (apoER2)                              | 14        |
| 3.II- Receptores barredores o “scavenger”                       | 15        |
| <b>CAPÍTULO 4</b>   | <b>17</b> |
| ATEROESCLEROSIS   | 17        |
| 4.I- Descripción del ateroma                                    | 17        |
| 4.II- Teorías Bioquímicas de la Aterogénesis                    | 21        |
| 4.II.1- Hipótesis de Respuesta a la Injuria                     | 21        |
| 4.II.2- Hipótesis de la respuesta a las lipoproteínas alteradas | 22        |
| 4.II.3- Hipótesis inmunológica de la aterogénesis               | 22        |
| <b>CAPÍTULO 5</b>   | <b>24</b> |
| POBLACIONES LINFOCITARIAS DE LA PLACA ATEROMATOSA               | 24        |
| <b>OBJETIVOS</b>  | <b>28</b> |
| <b>OBJETIVOS GENERALES</b>                                      | <b>29</b> |
| <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>                                    | <b>29</b> |

**RESULTADOS** **31**

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>CAPÍTULO 1</b>  | <b>32</b> |
| UN MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA ATEROESCLEROSIS   | 32        |
| <b>CAPÍTULO 2</b>  | <b>36</b> |
| <b>REGULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS FORMADORAS DEL ATEROMA POR HDL.</b>  | <b>36</b> |
| PARTE I  | 37        |
| ¿PRODUCE HDL MODIFICACIONES EN LA RESPUESTA PROLIFERATIVA Y EN LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS?.   | 37        |
| 2.I.1- La HDL inhibe la respuesta proliferativa de las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) estimuladas, pero no modifica dicha respuesta de las células no-estimuladas.                 | 37        |
| 2.I.2- La HDL inhibe la respuesta blastogénica sin afectar la proporción relativa de linfocitos T cooperadores y linfocitos T citotóxicos.   | 41        |
| 2.I.3- HDL inhibe la expresión de marcadores de activación de la superficie celular inducidos por un mitógeno.   | 42        |
| 2.I.4- Conclusión  | 45        |
| PARTE II   | 45        |
| ¿CUÁLES SON LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE EMPLEA HDL PARA INHIBIR LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS?.   | 45        |
| 2.II.1- HDL inhibe la liberación de prostaglandina E2 estimulada por mitógenos.  | 45        |
| 2.II.2- HDL afecta la incorporación de Galactosa en lípidos pero no en glicoproteínas y tampoco afecta la incorporación de fosfatos en lípidos. HDL inhibe específicamente la marcación de lactosilceramida. | 47        |
| 2.II.3- HDL estimula la fosforilación de Map Kinasa en los linfocitos  | 50        |
| 2.II.4- Conclusiones   | 51        |
| <b>CAPÍTULO 3</b>  | <b>53</b> |
| <b>REGULACION DE LA ACTIVACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS FORMADORAS DEL ATEROMA POR VLDL.</b>   | <b>53</b> |
| PARTE I  | 54        |
| ¿ PRODUCE VLDL MODIFICACIONES EN LA RESPUESTA PROLIFERATIVA Y EN LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS?.   | 54        |
| 3.I.1- La VLDL inhibe la respuesta proliferativa de la células de bazo de ratón (CMB) estimuladas, pero no dicha respuesta en las células no estimuladas.  | 54        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.I.2- La VLDL inhibe la respuesta blastogénica de los linfocitos T y B.   | 56        |
| 3.I.3- La VLDL inhibe la expresión de marcadores de activación de los linfocitos inducidos por un mitógeno.                      | 57        |
| 3.I.4- VLDL arresta a los linfocitos T en la fase G0/G1 del ciclo celular  | 59        |
| 3.I.5- VLDL modificación el perfil de liberación de Interleukinas hacia una respuesta proinflamatoria                            | 60        |
| 3.I.6- VLDL inhibe la proliferación de los linfocitos T CD4 <sup>+</sup> sin modificar los linfocitos T CD8 <sup>+</sup>         | 61        |
| 3.I.7- Conclusión  | 62        |
| PARTE II   | 64        |
| ¿VLDL INTERACCIONA CON LOS LINFOCITOS?   | 64        |
| 3.II.1- Obtención de VLDL marcada con sondas fluorescentes que se unen a la parte proteica y lipídica                            | 64        |
| 3.II.2- VLDL se une a una subpoblación de linfocitos T activados y esa unión es específica                                       | 66        |
| 3.II.3- VLDL se une a los linfocitos T estimulados con ConA que presentan características morfológicas de linfocitos T en reposo | 67        |
| 3.II.4- VLDL se une principalmente a linfocitos T CD4 <sup>+</sup>   | 68        |
| 3.II.5- Conclusiones   | 69        |
| PARTE III  | 70        |
| A- ¿VLDL INTERACCIONA CON LAS CÉLULAS LINFOCÍTICAS EN LAS CUALES PRODUCE LA INHIBICIÓN DE LA RESPUESTA LINFOPROLIFERATIVA?       | 70        |
| 3.III.1- VLDL inhibe la proliferación de células distintas a las que se une  | 70        |
| 3.III.2- VLDL inhibe la progresión hacia la fase S/G2/M de las células T activadas, independientemente de si unen o no VLDL      | 71        |
| 3.III.3- VLDL y en menor proporción HDL inducen un aumento del porcentaje de linfocitos activados que unen VLDL                  | 73        |
| B- CARACTERIZACIÓN DE LA/S MOLÉCULA/S QUE UNE VLDL   | 74        |
| 3.III.4- La proteína asociada al receptor de LDL (RAP) inhibe la unión de VLDL   | 74        |
| 3.III.5- RAP se une a una proteína de membrana de un peso molecular de 90 Kda  | 76        |
| 3.III.6- Conclusiones  | 77        |
| <b><u>CONCLUSIONES</u></b>   | <b>78</b> |
| <b>CONCLUSIONES GENERALES</b>  | <b>79</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| REGULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS FORMADORAS DEL ATEROMA POR HDL.  | 79        |
| REGULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS FORMADORAS DEL ATEROMA POR VLDL.   | 80        |
| <b>DISCUSIÓN</b>  | <b>83</b> |
| REGULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS FORMADORAS DEL ATEROMA POR HDL.  | 84        |
| REGULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS FORMADORAS DEL ATEROMA POR VLDL.   | 88        |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>   | <b>91</b> |
| Purificación de las lipoproteínas humanas   | 92        |
| Oxidación de las lipoproteínas  | 92        |
| Purificación de células mononucleares de bazo de ratón (CMB)  | 92        |
| Purificación de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC)  | 93        |
| Ensayos de proliferación celular  | 93        |
| Determinaciones por Citometría de flujo.  | 94        |
| Análisis fenotípico de las poblaciones de linfocitos  | 94        |
| Análisis del ciclo celular y contenido de DNA por el método de Ioduro de Propidio   | 95        |
| Determinación de Citoquinas y Prostaglandina E <sub>2</sub> en los sobrenadantes de los cultivos  | 96        |
| Determinación de proteínas totales  | 96        |
| Determinación de Colesterol   | 96        |
| Microscopía electrónica   | 96        |
| Electroforesis en geles de poliacrilamida   | 97        |
| Marcación metabólica: incorporación de [ <sup>3</sup> H]-galactosa y [ <sup>32</sup> P]-ortofosfato   | 97        |
| Cromatografía en placa fina de alta resolución  | 98        |
| Marcación de la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) con sondas fluorescentes   | 98        |
| Obtención de la proteína asociada al receptor (RAP)   | 99        |
| Determinación de la unión de lipoproteína marcada con sondas fluorescente a las células linfocitarias: citometría de flujo y microscopía de fluorescencia | 99        |
| Western Blot  | 100       |

|  |     |
|--|-----|
| Purificación de mannan de A. Saponaria   | 101 |
| Ensayos de proliferación y activación de linfocitos incubados con mannan de A saponaria. | 101 |

**ANEXO I** **103**

---

|  |            |
|--|------------|
| <b>MANNAN INHIBE LA RESPUESTA BLASTOGÉNICA PERO A DIFERENCIA DE LAS LIPOPROTEÍNAS AUMENTA IL-2R (CD25)</b> | <b>104</b> |
|--|------------|

**REFERENCIAS** **109**

---

**ANEXO II** **132**

---

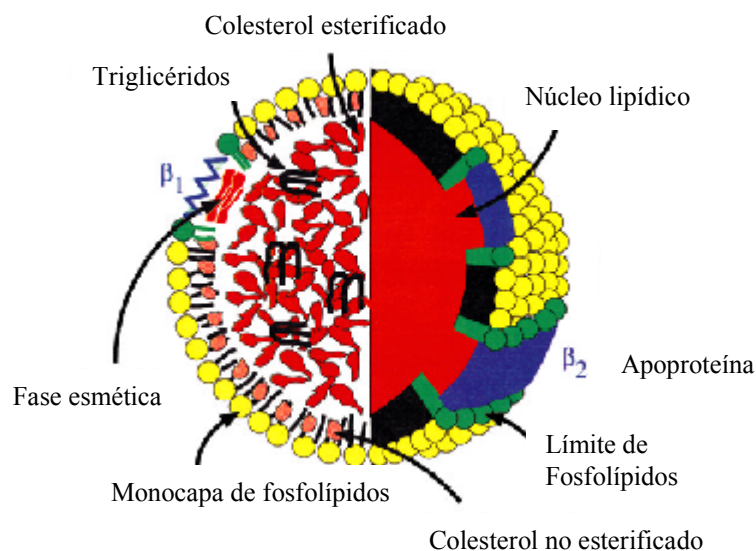
## ***INTRODUCCIÓN***

En la introducción se describen aspectos relacionados a las lipoproteínas y sus receptores, a las células que intervienen en la formación de la placa ateromatosa y por último se hace una descripción histológica y bioquímica del desarrollo de la placa. Estos aspectos son necesarios para comprender el desarrollo experimental de esta tesis doctoral, cuyo objetivo general es: Estudiar la regulación de la activación y proliferación de las células que forman la lesión aterosclerótica inicial por las lipoproteínas aterogénicas (VLDL) y antiaterogénicas (HDL).

## CAPITULO 1

### LIPOPROTEÍNAS

Las lipoproteínas son macromoléculas formadas por lípidos y proteínas específicas denominadas apolipoproteínas, de forma aproximadamente esférica. Todas las lipoproteínas poseen una estructura común: un núcleo de lípidos neutros (triglicéridos y ésteres de colesterol) rodeado de una monocapa superficial de lípidos anfipáticos (fosfolípidos y colesterol no esterificado) y proteínas específicas (*Figura 1*). Las lipoproteínas plasmáticas se clasifican de acuerdo a su densidad cuando son separadas por ultracentrifugación en gradientes isopícnicos. Las principales clases de lipoproteínas



*Figura 1.* Diagrama de la estructura de las lipoproteínas. (Segrest JP y col., 2001)



presentes en plasma humano son: quilomicrones, lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), lipoproteína de densidad intermedia (IDL), lipoproteína de baja densidad (LDL) y lipoproteína de alta densidad (HDL).

Las lipoproteínas en plasma sufren constantemente cambios de tamaño, composición y densidad. En parte estos cambios de composición son la consecuencia de la acción de las enzimas. lipoproteín-lipasa (LPL), la lipasa hepática (HTGL), y por la lecitina colesterol acil-transferasa (LCAT) (para la lipoproteína de alta densidad-HDL-específicamente). Hay un constante tráfico de apolipoproteínas y otros componentes entre las diferentes partículas lipoproteicas. Los cambios en el tamaño de la partícula afectan la conformación de las apolipoproteínas residentes en la superficie modificando así la exposición de los dominios de unión a los receptores.

A medida que aumenta la densidad Las lipoproteínas (*Tabla 1*) aumenta la cantidad porcentual de proteínas y disminuye la de lípidos que las forman. El conjunto de apolipoproteínas que tiene cada lipoproteína es otra característica de las mismas.

|                                 | <b>Quilomicrones</b>                 | <b>VLDL</b>                      | <b>IDL</b>                       | <b>LDL</b>  | <b>HDL</b>                               |
|---------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------|--|
| Densidad (g/ml)                 | <0.95                                | 0.950-1.006                      | 1.006-1.019                      | 1.019-1.063 | 1.06-1.210                               |
| Componentes<br>(% de peso seco) |                                      |                                  |                                  |             |  |
| Proteínas                       | 2                                    | 8                                | 15                               | 22          | 40-55                                    |
| Triglicéridos                   | 86                                   | 55                               | 31                               | 6           | 4  |
| Colesterol Libre                | 3                                    | 12                               | 23                               | 42          | 12-20                                    |
| Fosfolípidos                    | 7                                    | 18                               | 22                               | 22          | 25-30                                    |
| Apolipoproteínas                | A-I, A-II, B-48,<br>C-I, C-II, C-III | B-100<br>C-I, C-II, C-<br>III, E | B-100<br>C-I, C-II, C-<br>III, E | B-100       | A-I, A-II, C-<br>I, C-II, C-III,<br>D, E |

*Tabla 1. Composición relativa de las distintas lipoproteínas*

## CAPÍTULO 2

## APOLIPOPROTEÍNAS

Las apolipoproteínas son proteínas constituidas preponderantemente por dominios de  $\alpha$ -hélices anfipáticas, que se caracterizan por tener dos superficies: una hidrofóbica y otra hidrofílica, que les permite interactuar tanto con los lípidos de las lipoproteínas como con el medio acuoso (Segrest JP y col., 1994). Debido a su naturaleza anfipática, las apolipoproteínas actúan como compuestos tensioactivos y tienen un papel importante en determinar el tamaño y estabilidad de la partícula lipoproteica. Las apolipoproteínas determinan el metabolismo de la partícula uniéndose a receptores específicos (ver Capítulo 3) y actúan también, como co-factores enzimáticos. Las apolipoproteínas plasmáticas se suelen clasificar en dos grandes grupos: las apolipoproteínas no-intercambiables (apoproteína-apo-B100 y apoB48) y las apolipoproteínas intercambiables (apoAI, apoAII, apoAIV, apoCI, apoCII, apoCIII y apoE) (*Tabla 2*).

| APOLIPOPROTEÍNA | PESO MOLECULAR | CARACTERÍSTICAS   |
|-----------------|----------------|---|
| A-I             | 28300          | Proteína mayoritaria de HDL, activa LCAT                                    |
| A-II            | 17400          | Proteína de HDL y Quilomicrones   |
| B-48            | 241000         | Exclusiva de Quilomicrones  |
| B-100           | 513000         | Proteína mayoritaria de LDL   |
| C-I             | 7000           | Se encuentra en Quilomicrones, activa LCAT y LPL                            |
| C-II            | 10000          | Se encuentra principalmente en VLDL, activa LPL                             |
| C-III           | 9300           | Se encuentra en quilomicrones, VLDL y HDL                                   |
| D               | 35000          | Proteína de HDL, también denominada transportadora de esteres de colesterol |
| E               | 33000          | En VLDL, LDL y HDL  |

*Tabla 2.* Clasificación y características de las distintas apolipoproteínas

## 2.1- Apolipoproteína A

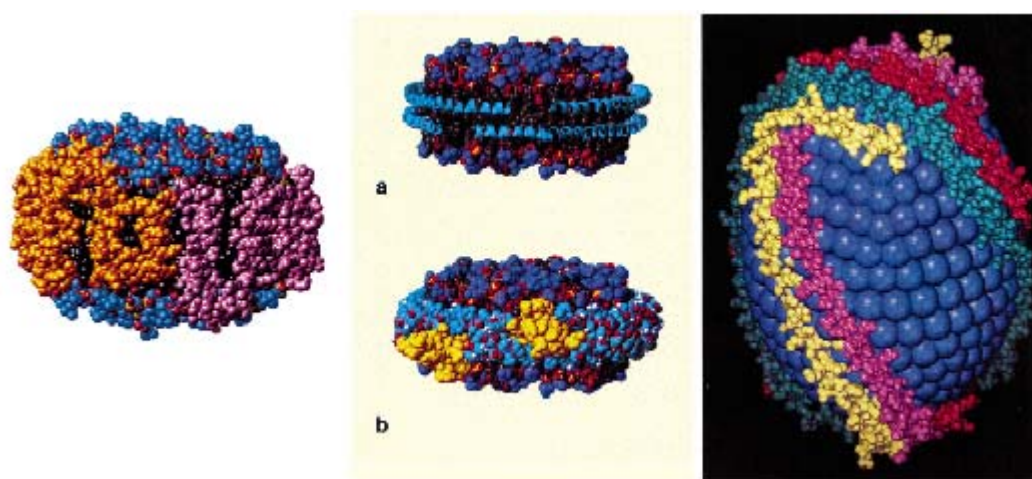
Las apoA son los principales componentes proteicos de las HDL (Schaefer EJ y col., 1978). En humanos hay dos tipos de apoA: apoAI y apoAII. La apoAI es la más abundante. Se ha demostrado que hay una correlación inversa entre la concentración plasmática de apoAI y la predisposición para contraer enfermedades coronarias (Miller NE, 1987; Brunzell JD y col., 1984; Maciejko JJ y col., 1983); por el contrario no se ha demostrado una correlación inversa con los niveles de apoAII (Miller NE, 1987; Arder DJ y col., 1991). Las HDL humanas son muy heterogéneas; una de las subpoblaciones principales contiene apoAI pero no apoAII (se la denomina LpAI) mientras que otra de las subpoblaciones contiene ambas apolipoproteínas (LpAI-AII), esta separación de HDL se consigue utilizando cromatografía de afinidad (Cheung MC y col., 1984). Aunque no hay unanimidad en lo reportado por distintos investigadores, la mayoría de los estudios indican que la LpAI sería más eficaz en la captura del colesterol proveniente de la célula que la LpAI-AII (Lagrost L y col., 1995; Barbaras R y col., 1987). Por consiguiente se ha propuesto que la apoAI sería un agonista y la apoAII un antagonista del flujo reverso de colesterol en las células (Barbaras R y col., 1990).

La apoAI, como otras apolipoproteínas que unen fosfolípidos, está constituida por una serie de segmentos de  $\alpha$ -hélices anfipáticas de 22 aminoácidos de largo separados por residuos de prolina o glicina (Segrest JP y col., 1992). Durante la maduración de la HDL, la apoAI nativa asume tres conformaciones diferentes, según se trate de la HDL pobre en lípidos, la HDL discoidal y la HDL esferoideal.

En la ruta de síntesis de la HDL, la primera especie existente se denomina pre  $\beta$ 1-HDL. Esta lipoproteína tiene un peso molecular de aproximadamente 70 KDa, contiene solamente fosfolípidos y colesterol libre. La pre  $\beta$ 1-HDL contiene una proporción equimolar de esfingomielina y lecitina (Fielding CJ y col., 1995), el contenido de esfingomielina podría explicar la avidéz de esta lipoproteína por el colesterol libre. La transferencia continua de lecitina y colesterol libre hacia pre  $\beta$ 1-HDL en el espacio extracelular lleva a la formación de la HDL discoidal. Estudios estructurales indican que estos discos consisten en una bicapa lipídica circular, estabilizada por la apoAI, y cuando estos discos entran en el plasma, se convierten en sustrato para la LCAT. La síntesis de ésteres de colesterol por esta enzima, a partir de colesterol libre y de lecitina de la HDL,

genera lisofosfatidilcolina que rápidamente es transferida a albúmina. La continua actividad de la enzima LCAT conduce a la aparición dentro de la bicapa de lípidos de un núcleo hidrofóbico con la consecuente reorganización de los fosfolípidos y proteínas de superficie. Este proceso genera una partícula de HDL esférica. Estos cambios están acompañados por grandes alteraciones en los epítopes de la apoAI expresados en la superficie de la partícula.

Hay dos modelos que describen la estructura que adoptaría apoAI en la HDL discoidal (*Figura 2*): 1) el modelo de cinto doble o “double belt”, postula que dos moléculas de apoAI forman un par de  $\alpha$  hélices anfipáticas paralelas al plano del disco (Wlodawer A y col, 1979; Segrest JP, 1977; Borhani DW y col., 1997); 2) El otro modelo se lo denomina cerca de estacas o “picket-fence” y postula que la repetición de las secuencias de 22 aminoácidos de la apoAI se ubican en forma antiparalela perpendicular al plano del disco (Tall AR y col., 1977; Nolte RT y col., 1992). (*Figura 2*). La baja resolución de las técnicas que se utilizan para estudiar estructura de proteínas y la alta redundancia (repetición) de las estructura primaria y secundaria de la apoAI ha hecho muy difícil diseñar experimentos que inequívocamente excluyan uno de los dos modelos. La mayoría de los estudios estructurales y funcionales son consistentes con los dos modelos.



*Figura 2. Modelos de HDL.* Izquierda: representación del modelo “cerca de estacas”. Las dos moléculas de ApoAI están señaladas de color amarillo y rosa. Centro: representación del modelo “cinto doble”. Derecha: modelo estructural de la HDL esférica. (Brouillette CG y col., 2001.).

Una de las funciones de la HDL, ampliamente estudiada, es la del transporte reverso de colesterol transportando colesterol desde los tejidos periféricos hacia el hígado. El flujo reverso de colesterol es un proceso dinámico durante el cual la partícula de HDL acumula colesterol y disminuye su densidad, dando origen a subfracciones de HDL que poseen una continuidad estructural y funcional, estas se denominan HDL3, HDL2 y HDL1. Además del rol que cumple la apoAI en el metabolismo del colesterol participa en otras actividades muy variadas y fisiológicamente relevantes como lo son sus actividades anti-inflamatoria y antioxidante las cuales pueden contribuir a la propiedad anti-aterogénica de la apoAI (Cockerill GW y col., 1995).

## 2.II- Apolipoproteína B

La apoB tiene un rol central en el sistema de transporte de lípidos. Es esencial para la secreción de las lipoproteínas ricas en triglicéridos desde el hígado y el intestino. Hay una única molécula de apoB presente en el quilomicron, en la VLDL en la IDL y en la LDL desde su ensamblaje, pasando por la secreción, la transformación metabólica dentro de la circulación, hasta llegar a su catabolismo final (Berman M y col, 1978). La apoB no se intercambia entre las partículas lipoproteicas. Existe en dos formas, la apoB48 y la apoB100, el 90% de la apoB100 se encuentra en la LDL y el resto en la VLDL. La apoB48 es producida únicamente en el intestino, está presente en el quilomicron y tiene

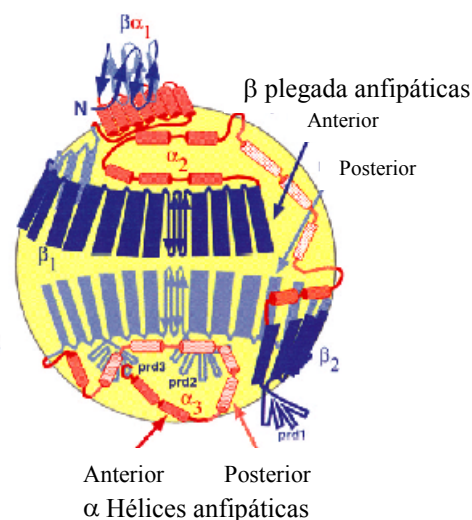


Figura 3: Diagrama de la organización propuesta de la apoB en la superficie de la partícula de LDL. (Segrest JP y col., 2001)

---

aproximadamente el 48% del peso molecular de la B100.

La LDL tiene un diámetro aproximado entre 180 y 250 Å, mucho menor que el de la VLDL originalmente secretada, que oscila entre 600 y 800 Å. Se pueden identificar distintas sub-fracciones de LDL que varían en densidad, tamaño, y composición química; éstas son de importancia clínica, ya que se ha descrito que niveles en sangre relativamente altos de partículas de LDL pequeñas y densas están asociadas con un elevado riesgo de padecer enfermedades coronarias (Krauss RM, 1995; Musliner TA y col, 1988; Austin MA y col., 1990). Las apoB son insolubles en soluciones acuosas, por eso es que permanecen con la partícula proteica durante todo su metabolismo (Kane JP, 1983). Observaciones realizadas por microscopía electrónica determinaron que la apoB100 está distribuida en forma de circunferencia en la superficie de la LDL y que los extremos carboxilo y amino están cercanos uno de otro (*Figura 3*). Análisis estructurales, utilizando un programa de computadora denominado LOCATE (Segrest JP y col., 1994), predicen la presencia de dos regiones de cadenas  $\beta$  alternadas con dos regiones de alfa hélices (De Loof H y col., 1987) y sugirieron la presencia de un tercer dominio alfa hélice en el extremo N terminal, dando a la apoB100 una estructura pentapartita:  $\text{NH}_3\text{-}\alpha 1\text{-}\beta 1\text{-}\alpha 2\text{-}\beta 2\text{-}\alpha 3\text{-COOH}$ .

### 2.III- Apolipoproteína E

La apoE es una glicoproteína de 34 KDa, constituyente de las lipoproteínas ricas en triglicéridos como son los quilomicrones, la VLDL y sus remanentes y también en algunas subclases de HDL. El rol principal de la apoE, en el metabolismo de lípidos del plasma, es mediar la interacción de los remanentes de quilomicrones y de las lipoproteínas de densidad intermedia con los receptores de las lipoproteínas, incluyendo el receptor de LDL y el receptor de remanentes de quilomicrones (LRP, proteína relacionada al receptor de LDL) o al receptor de apoE. A diferencia de otras apolipoproteínas que son expresadas principalmente en el intestino y en el hígado, el mRNA de la apoE está presente en la mayoría de los tejidos del cuerpo, siendo el cerebro el de mayor abundancia (Driscoll DM y col., 1984). Tres isoformas de apoE son codificadas por tres alelos del locus de apoE, denominados E2, E3 y E4. La isoforma más común es la E3, que se caracteriza por tener una cisteína como aminoácido 112 y una arginina en el 158. La isoforma E2 tiene cisteína en las posiciones 112 y 158, mientras que la E4 posee arginina en esas posiciones. El alelo

---

E2, en comparación con el alelo E3, está asociado con bajos niveles de: colesterol plasmático total, colesterol de LDL, apoB y con elevados niveles de TG.

Elevados niveles de TG y apoE son consistentes con la incompleta remoción de las partículas remanentes que contienen apoE2, presumiblemente debido a un defecto en el reconocimiento por parte del receptor de las partículas que contienen apoE2 (Havel RJ y col., 1980). La relación entre el genotipo de apoE y los niveles de lípidos de la lipoproteínas plasmáticas, significativamente influenciado por la edad (Zerba KE y col., 1996), sexo (Reilly S y col., 1991, 1992, 1994), y distribución del peso corporal (Reilly S y col., 1992). Estudios recientes han demostrado que la respuesta de los niveles de las lipoproteínas plasmáticas a diferentes hipolipemiantes puede ser afectado por el genotipo individual de la apoE, indicando una significativa interacción gen-ambiente (Hagberg JM y col., 2002).

La apoE proveniente del hígado es la mayor fuente de apoE del plasma y tiene un importante papel de regular el metabolismo de las lipoproteínas (Mahley RW, 1988). Independientemente de su actividad fisiológica, la apo E derivada de los macrófagos inhibe la progresión de la aterosclerosis (Linton MF y col., 1995; Boisvert W y col., 1995). Se ha demostrado *in vitro* que la apoE tiene propiedades antioxidantes (Miyata M y col., 1996), inhibe la proliferación de los linfocitos T (Kelly ME y col., 1994), inhibe la proliferación de las células musculares lisas de la pared vascular (Ishigami M y col., 1998) y promueve el eflujo de colesterol de las células (Mazzone T, 1996; Hara H y col., 1991; Zhang WY y col., 1996; Smith J y col., 1996; Huang Y y col., 1995).

#### 2.IV- Apolipoproteína C

Las apoC se las considera una familia de proteínas debido a su distribución similar en las lipoproteínas y su bajo peso molecular. Las apoC humanas son proteínas constituyentes de los quilomicrones, VLDL y HDL; en comparación con apoB, apoE y apoA, tiene una importante función en el desarrollo de hiperlipemia y aterosclerosis. Existen cuatro apoC diferentes: apoC1, apoC2, apoC3 y apoC4; sus pesos moleculares varían entre 6,6 y 8 kDa. El gen de la apoC3 humana esta localizado en el cromosoma 11, en un cluster que contiene además el gen de la apoAI y de la apoAIV. Poco se conoce sobre las mutaciones naturales de los genes que codifican las apoC. Se ha observado que pacientes que presentan déficit de apoC1/apoC2 exhiben una marcada disminución de los

niveles de ésteres de colesterol, especialmente evidenciable en HDL (Dumon MF y col., 1986). La deficiencia de apoC1 en HDL modula la actividad de la enzima LCAT, la cual cataliza la esterificación del colesterol libre del plasma (Glomset JA y col., 1966). La importancia de la apoC2 como un activador de la LPL se ha demostrado en pacientes con defectos genéticos en la estructura o producción de apoC2, los cuales presentan un elevado nivel de triglicéridos circulantes produciendo un cuadro patológico fenotípicamente indistinguible del causado por déficit de LPL (Breckenridge WC y col., 1978; Cox DW y col., 1978; Wang CS, 1991; Santamarina-Fojo S, 1992; Fojo SS y col., 1992).

## CAPÍTULO 3

### RECEPTORES DE LIPOPROTEÍNAS

Las lipoproteínas se unen a distintos receptores de la superficie celular, los cuales se pueden agrupar en dos familias que están formadas por varios miembros, algunos relacionados estructuralmente y otros funcionalmente.

Las familias son:

-Receptores de lipoproteínas de la familia del receptor de LDL: esta familia a su vez puede subdividirse. Esta subdivisión obedece a que funcionalmente los miembros de estas familias son muy disímiles.

-Receptores barredores.

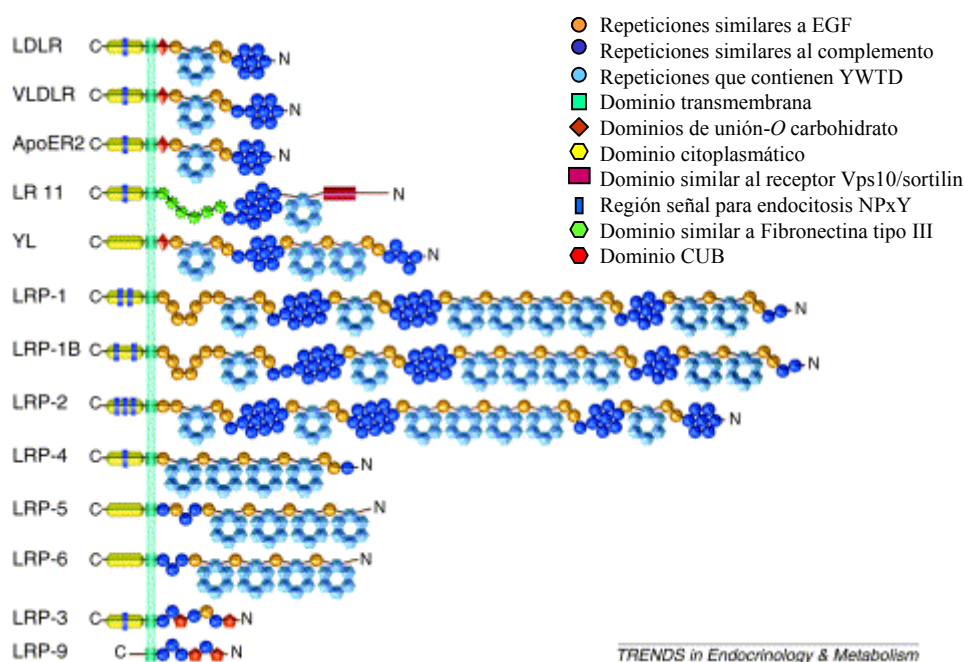
El receptor de LDL está íntimamente relacionado con el transporte de colesterol al interior celular, endocitando a la pareja lipoproteína-receptor.

Su pariente cercano, el receptor de VLDL, por la similitud de secuencia proteica, y el apoER2 tienen funciones de “co-receptores”, en algunos casos conjuntamente con proteoglicanos de la superficie celular, para presentar y ensamblar moléculas señaladoras que llevan a la activación de señales dentro de la misma célula (Nimpf J y col, 2000) o en las células blanco (Howell BW y col., 2001).



### 3.1- Receptores de la familia del receptor de LDL

Hay descritos hasta el presente varios receptores de la familia del receptor de LDL (LDL-R) estructuralmente relacionados (*Figura 4*) (Willnow TE y col., 1999; Herz J y col., 2000). Estos receptores comparten propiedades estructurales e interaccionan con un amplio grupo de ligandos. Estos receptores tienen rasgos comunes que son módulos distinguibles estructural y funcionalmente, los que son definidos por exones de los genes correspondientes. Estos módulos son: 1) repeticiones tipo “A” de unión al ligando, 2) repeticiones tipo B homólogas a regiones del factor de crecimiento epidérmico (EGF), 3) dominios de 50 residuos con una secuencia consenso de tetrapéptido Tyr-Trp-Thr-Asp (YWTD), 4) dominios de unión-O carbohidrato, 5) un dominio corto de transmembrana de aproximadamente 20 amino ácidos, 6) un dominio citoplasmático conteniéndola secuencia señal para la internalización del receptor via “coated-pits”, Asn-Pro-xaa-Tyr (NPXY).



*Figura 4:* Estructura de los miembros de la familia del receptor de LDL (Strickland DK y col.

El receptor de LDL fue el primer miembro de la familia en ser identificado, y su prominente participación en la homeostasis del colesterol y en la remoción de la LDL de la

---

circulación estudiada exhaustivamente. Los receptores de esta familia se caracterizan por la expresión en la superficie celular, por necesitar de la presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  para unir el ligando, por la propiedad de unir una amplia variedad de ligandos entre ellos a apoE y a la proteína asociada al receptor (RAP). RAP es una proteína del retículo endoplásmico que interacciona fuertemente con los receptores de la familia del LDL-R. Esta proteína actúa como chaperona impidiendo la interacción celular de los receptores con ligandos presentes en la vía secretoria y la agregación de los mismos (Bu G, 1998). VLDL-R une RAP con alta afinidad dificultando la unión de cualquier otro ligando.

Los miembros de esta familia participan en un gran número de funciones biológicas, además del transporte de colesterol, incluyendo la regulación de la actividad de las proteasas de superficie, transporte y activación de hormonas esteroideas, regulación de la homeostasis del calcio. Cumplen también un rol central en la señalización intracelular en el desarrollo embrionario. La familia del receptor de LDL incluye (*Figura 4*): el **receptor de LDL** (Yamamoto T y col., 1984), **proteína relacionada al receptor de LDL (LRP)** (Herz J y col., 1988), **megalín** (Saito A y col., 1994), **receptor de VLDL** (Takahashi S y col., 1992), **receptor de Apo E2 (apoER2)** (Kim DH y col., 1996), **LRP1b** (a.k.a. LRP-DIT) (Liu Y, 2000), y **MEGF7**.

### 3.1.1- Receptor de LDL (LDL-R)

Es una glicoproteína de trasmembrana de 839 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 155-165 kDa. Participan en el transporte de colesterol contenido en la LDL circulante y de esta forma cumple un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del colesterol sistémico. Este hecho está bien documentado en el fenotipo de la enfermedad Hipercolesterolemia Familiar, en donde mutaciones del gen que codifica para el receptor de LDL llevan a una disrupción de las vías de regulación concomitantemente con un dramático incremento en los niveles de colesterol plasmático causando una severa aterosclerosis (Goldstein JL y col., 2001). Este receptor fue descubierto por los investigadores Joe Goldstein y Michael Brown que recibieron el premio NOBEL en Medicina en 1985 por este hallazgo. Este descubrimiento permitió desarrollar importantes avances en el tratamiento y la prevención de la aterosclerosis. (Brown MS y col., 1996). Este receptor une principalmente LDL y las apolipoproteínas que la constituyen.

### 3.1.2- Proteína relacionada al receptor de LDL (LRP)

El LRP es una proteína heterodimérica constituida por dos subunidades: una de 515 kDa y otra de 85 kDa. Las dos subunidades permanecen unidas en forma no-covalente y tienen funciones independientes. La subunidad de 85 kDa contiene los dominios citoplasmático y de transmembrana. En el hígado, este receptor coopera con el LDL-R en la remoción de las lipoproteínas remanentes que contienen colesterol (Willnow TE y col., 1995; Rohlmann A y col., 1998). EL LRP se expresa en la superficie de los sinusoides hepáticos, y como el LDL-R, el LRP une lipoproteínas que contienen apoE y media su endocitosis en las células en cultivo. LRP no une LDL, por ello es incapaz de compensar la falta de LDL-R en los individuos con deficiencia de este receptor (Krieger M y col., 1994). El papel de LRP en el metabolismo lipoproteico está más restringido que el de LDL-R, este último puede compensar completamente la falta del LRP funcional en el hígado (Rohlmann A y col., 1998). LRP es un receptor multifuncional que interactúa con una amplia variedad de proteínas de secreción, así como con moléculas residentes de la superficie celular; algunas de las funciones incluyen la entrada de virus y toxinas, la activación de enzimas lisosomales, la transducción de señales intracelulares y neurotransmisión (Herz J, 2001). Ligandos solubles del LRP son complejos proteasas-inhibidores de proteasas, como el activador del plasminógeno y el inhibidor 1 del activador del plasminógeno;  $\alpha$ 2-macroglobulina (Krieger M y col., 1994), hsp96, proteína HIV-1 Tat (proteína transactivadora para genes virales que es secretada por las células infectadas en donde se replica el virus de HIV (Liu Y, 2000) y RAP.

### 3.1.3- Receptor de VLDL (VLDL-R)

A diferencia del LDL-R y de el LRP que se expresan en la mayoría de las células, principalmente en el hígado, la expresión del VLDL-R está virtualmente ausente de este órgano. Los niveles relativos de la expresión en diferentes tejidos extrahepáticos varía entre las especies, pero corazón, músculo esquelético y tejido adiposo son los principales sitios en todos los mamíferos; estos sitios se caracterizan por una activa metabolización de ácidos grasos (Takahashi S y col., 1992; Webb JC y col., 1994; Gafvels ME y col., 1994; Jokinen EV y col., 1994), además se encuentra en ciertas localizaciones del endotelio

---

(Wyne KL y col., 1996; Multhaupt HAB y col., 1996). En mamíferos el VLDL-R existe en dos variantes de distinto peso molecular que se originan por empalmes (splicing) alternativos del pre-mRNA (Sakai J y col., 1994; Webb JC y col., 1994; Jokinen EV y col., 1994). Los receptores tipo I contienen un dominio de unión O-carbohidrato y poseen un peso molecular aparente de 130 kDa en condiciones no desnaturizantes, mientras que el receptor tipo II carece de este dominio y tiene un peso molecular aparente de 95-100 kDa. El análisis cuantitativo de los niveles relativos de expresión de las formas de VLDL-R en diferentes tejidos no se ha realizado aún. Ambas formas del receptor unen la proteína RAP con afinidades similares. VLDL-R al igual que LRP reconoce una amplia variedad de ligandos. Se demostró con lipoproteínas marcadas con sondas fluorescentes que VLDL-R une VLDL pero no une LDL; estos datos sugieren que el VLDL-R reconoce específicamente la apoE pero no apoB (Takahashi S y col., 1992; Patel DD y col., 1997). La disrupción homocigota del gen de VLDL-R en ratones no interfiere con el desarrollo o con el funcionamiento normal de órganos y tejidos (Frykman PK y col., 1995). A pesar de que VLDL-R metaboliza VLDL in vivo, su contribución al metabolismo sistémico de las lipoproteínas debe ser pequeño, ya que una falta total del receptor no tiene influencia sobre el perfil de lipoproteínas plasmáticas. Se ha demostrado en diversos trabajos relacionados con aterosclerosis que el VLDL-R se encuentra en macrófagos presentes en lesiones tempranas y en células musculares lisas de la íntima de las lesiones avanzadas, sugiriendo esto que este receptor estaría involucrado en el desarrollo de la aterosclerosis.

### *3.1.4- Receptor de apoE 2 (apoER2)*

ApoER2 tiene una estructura primaria y un tamaño casi idéntico al LDL-R. Une apoE como otros miembros de la familia de LDL-R (Kim DH y col., 1996), y se encuentra predominantemente en cerebro, placenta y testículo (Stockinger W y col., 1998). Esto es una característica de este receptor ya que los otros miembros de la familia de LDL-R se expresan principalmente en otros órganos y células. Una de las variantes de este receptor puede actuar como receptor de  $\alpha$ 2-macroglobulina sugiriendo una participación en la captación de complejos  $\alpha$ 2-macroglobulina/proteinasa del fluido cerebroespinal y de la superficie de las neuronas (Stockinger W y col., 1998).

Una característica propia y única de los receptores VLDL-R y ApoER2 es que actúan en la transducción de señales como se demostró recientemente (Trommsdorff M y

col., 1999). La disrupción genética de ambos receptores en ratones identificaron a estos receptores como parte de una cascada de señalización que relaciona la señal de Reelina dentro de las neuronas que migran en el desarrollo embrionario. La proteína Reelina es secretada por las células de Cajal-Retzius en la capa externa de la corteza cerebral en desarrollo y dirige la migración de neuronas a través de las fibras radiales, formando así distintas capas corticales (Curran T y col., 1998). La Reelina interacciona con los dominios extracelulares de ambos receptores VLDL-R y ApoER2 (Heisberger T y col., 1999; D'Arcangelo G y col., 1999). Esta interacción, posiblemente en conjunción con la activación de un co-receptor que pertenece a la familia de los receptores de superficie relacionados con la caderina (CNRs), lleva a la fosforilación de Disabled-1 (Dab-1) (Howell BW y col., 1999). Disabled-1 es una proteína adaptadora intracelular que se une a los motivos NPXY presentes en los dominios citosólicos de VLDL-R y ApoER2 (Trommsdorff M y col., 1998-1999). La fosforilación mediada por tirosinkinasa dispararía la cascada de kinasas controlando la motilidad y la forma celular actuando sobre el citoesqueleto neuronal.

### *3.II- Receptores barredores o "scavenger"*

Los receptores barredores (SR) son receptores que median la captación selectiva de los lípidos de las lipoproteínas por las células sin que medie endocitosis de la lipoproteína (Acton S y col., 1996; Ji Y y col., 1997; Stangl H y col., 1998). Fueron descritos primero en macrófagos como receptores alternativos del receptor de LDL para la captación de colesterol y lípidos, llevando al desarrollo de las células espumosas. El nombre se debe a la diversidad de los ligandos que reconocen los cuales pueden ser proteínas, ácidos nucleicos, glicoproteínas, etc. Los miembros de esta familia se clasifican en: **SR clase A** (SR-AI, SR-AII, SR-AIII y el receptor de macrófago con estructura de colágeno MARCO); **SR clase B** (SR-BI y CD36), **SR clase C** (SR-C de drosophila), **SR-clases D** (CD68), **E y F**, identificados recientemente y que no presentan similitud estructural con los anteriores (*Figura 5*) (Krieger M y col., 1997; Greaves DR y col., 1998; Kunjathoor VV y col., 2002).

Los SR unen ligandos muy diversos, pero están particularmente involucrados en la remoción de lipoproteínas modificadas por oxidación, glicosilación, etc. Algunos de éstos SR (SR-BI y CD36) también unen lipoproteínas nativas como HDL y LDL. Además de la

remoción de lipoproteínas estos receptores también participan en la adhesión y remoción de las células severamente dañadas (apoptóticas principalmente), y en la defensa contra las infecciones bacterianas. Los SR clase A y B se expresan en la placa ateromatosa y están involucrados en el desarrollo de las células espumosas y en el comienzo de la primera lesión aterosclerótica.

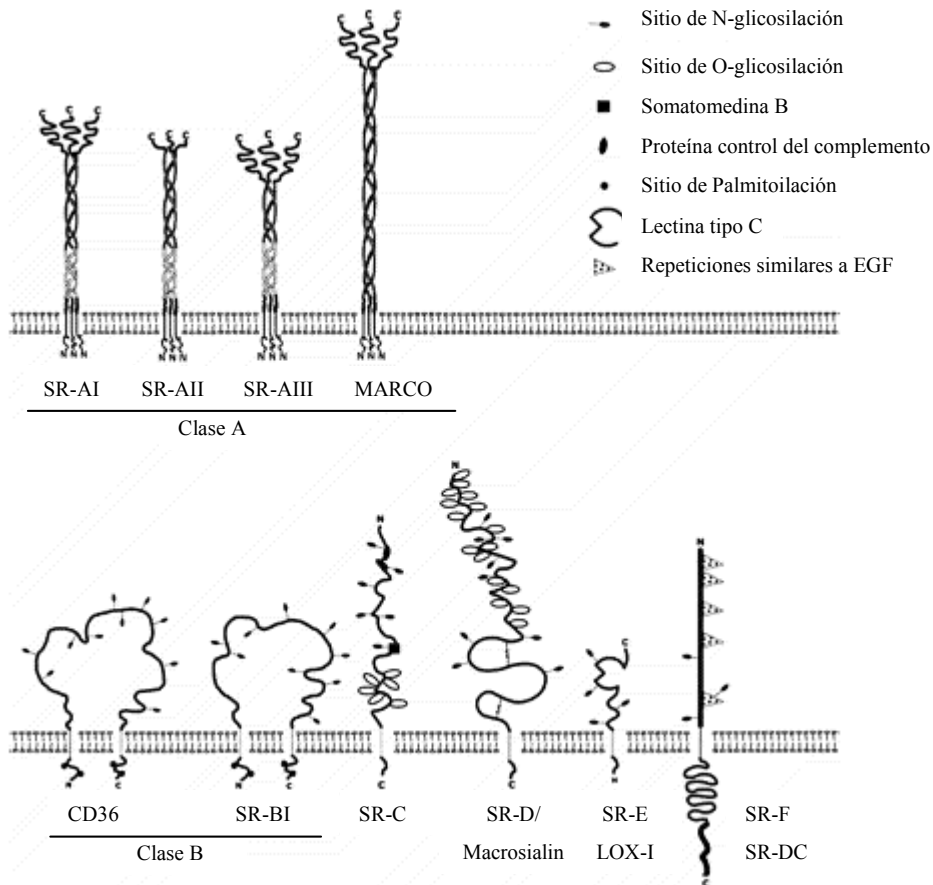


Figura 5: Clasificación de los receptores barredores y sus estructuras *propuestas* (Strickland DK y col., 2002)

---

## CAPÍTULO 4

### ATEROESCLEROSIS

La aterosclerosis es el principal proceso responsable de la patogénesis del infarto de miocardio y cerebral, gangrena y pérdida de las funciones de las extremidades. El proceso, en circunstancias normales, es una respuesta protectora a injurias efectuadas al endotelio y a las células musculares lisas de la pared arterial, que consiste en la formación de lesiones fibrosas; pero la respuesta desregulada lleva al desarrollo de la enfermedad y produce la oclusión de la arteria. Por lo tanto se considera a la aterosclerosis como una enfermedad multifactorial inducida por los efectos de varios factores de riesgo sobre un marco genético. La lesión se caracteriza por áreas vasculares que contienen células mononucleares y células musculares lisas proliferantes, así como componentes de la matriz extracelular resultando en un endurecimiento y engrosamiento de la pared arterial (ateroesclerosis). En un sentido estricto las lesiones ateroscleróticas están localizadas en la íntima; contienen además células espumosas, depósitos de cristales de colesterol formando estrías grasas y finalmente las placas ateroscleróticas.

#### *4.1- Descripción del ateroma*

Las lesiones ateroscleróticas se pueden diferenciar por sus características morfológicas en dos grandes grupos: las lesiones germinales y las avanzadas.

-Las *Lesiones Germinales o nacientes* se dividen en tres tipos morfológicamente diferentes: Lesiones tipo I, II y III. (*Figura 6*). Las lesiones tipo I y II se caracterizan por pequeños depósitos de lípidos en la pared arterial, en tanto las lesiones tipo III representan el estadio intermedio entre la lesión tipo II y las lesiones avanzadas .

Las lesiones **Tipo I** (también denominadas Lesiones Iniciales) consisten en los primeros depósitos iniciales de lípidos microscópicos químicamente detectables en la íntima y en las reacciones celulares asociadas a esos depósitos. Estas lesiones son más frecuentes en infantes y niños, sin embargo también se las encuentra en adultos, particularmente en sujetos sanos o en localizaciones de las arterias que son resistentes a la

---

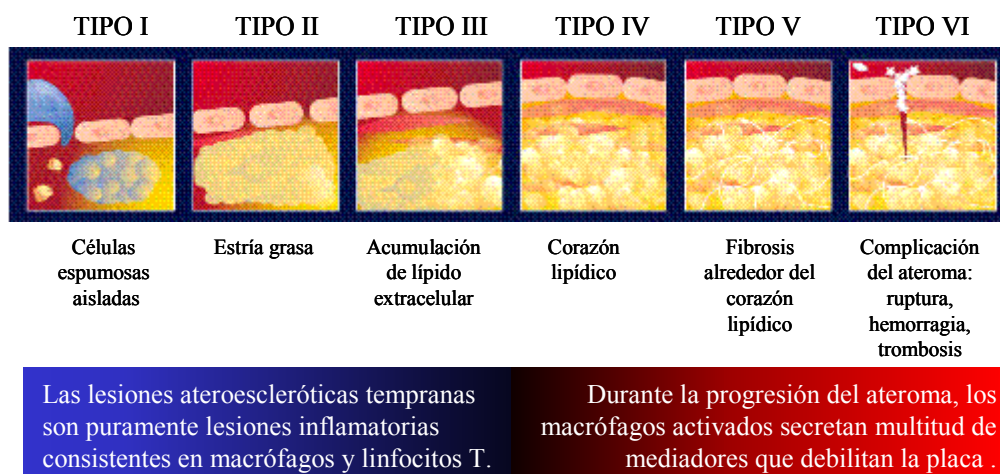
lesión. Los cambios histológicos iniciales en la íntima humana son mínimos. Se forman pequeños grupos aislados de macrófagos que contienen gotas de lípidos en su interior (Stary HC y col., 1987-1989). En las arterias coronarias estas células se acumulan preferentemente en regiones de la íntima que poseen un engrosamiento adaptativo de tipo excéntrico. Datos químicos e inmunoquímicos indican que los macrófagos espumosos de la íntima son marcadores celulares de las acumulaciones patológicas de las lipoproteínas aterogénicas particularmente en regiones de la íntima con un engrosamiento adaptativo.

Las lesiones **Tipo II** incluyen las estrías grasas (fatty streaks), que se visualizan como estrías coloreadas de amarillo, parches o manchas en la íntima superficial de las arterias. La evaluación microscópica de la evolución de las lesiones indica que las lesiones tipo II incluyen a las estrías grasas pero no todas las lesiones tipo II poseen estrías grasas. Estas lesiones se determinan por su composición y no por ser visibles macroscópicamente. Microscópicamente las lesiones Tipo II son más definidas que las Tipo I. Consisten principalmente de macrófagos espumosos estratificados en capas adyacentes y no sólo como grupos aislados de pocas células. Las células musculares lisas al igual que los macrófagos de la capa íntima también comienzan a acumular lípidos. Se observa un gran número de macrófagos que no contienen gotas de lípidos en contraposición con las lesiones Tipo I o con íntimas normales. Otras células también presentes en este tipo de lesión son los Linfocitos T pero en menor número que los macrófagos (Munro JM y col., 1987; Walker LN, 1986). La mayoría de los lípidos de este tipo de lesión se encuentran dentro de las células. La proporción de macrófagos y células musculares lisas que contienen lípidos es variable pero siempre es mayor el número de macrófagos que contienen lípidos que de células musculares lisas. Los lípidos son principalmente ésteres de colesterol (77%), colesterol libre y fosfolípidos (Insull W Jr y col., 1966).

De las lesiones tipo II generalmente presentes en una persona que posee niveles elevados de lipoproteínas aterogénicas en sangre, un pequeño sub-grupo va a proseguir a la lesión tipo III y luego a la lesión avanzada. Este pequeño sub-grupo de lesiones tipo II que colocaliza con engrosamientos específicos de la íntima en localizaciones predecibles, se las denomina **Tipo IIa** o “conducentes a la lesión avanzada”. El otro gran sub-grupo de las lesiones tipo II, que se encuentra en la íntima fina y contiene escasas células musculares lisas, se las denomina **Tipo IIb**, “resistente a la progresión” o “resistente a la lesión avanzada”. El Tipo IIb no progresa, o lo hace lentamente y sólo progresa en personas con



un muy alto nivel de lipoproteínas aterogénicas. Morfológicamente las lesiones tipo IIa difieren de la IIb por la presencia de células musculares lisas, por contener abundante matriz intercelular, por la gran acumulación de lipoproteínas y macrófagos, por la localización profunda en la íntima de las células espumosas y por la presencia de gotas de lípidos extracelulares.



*Figura 6:* Estadios de la aterosclerosis. Adaptado de “Identifying sub-clinical atherosclerotic disease: an evaluation of emerging techniques Task Force Symposium. Scuol, February 23, 2003. Jean-Charles Fruchart, Lille. France”.

La designación de lesión **Tipo III** se aplica a aquellas lesiones que forman la transición química y morfológica entre las lesiones Tipo II y los ateromas (Ateroma: Lesión Tipo IV, primer tipo de lesión considerada como avanzada por criterios histológicos: centro lipídico, desorganización de la íntima y deformidad de la arteria que predispone a la rápida progresión de la lesión y conduce a los eventos isquémicos). La lesión tipo III también se la denomina “lesión intermediaria”, “transicional” o “pre-ateroma”. Sus características histológicas son la presencia de gotas lipídicas extracelulares visibles microscópicamente que forman grupos que van a depositarse en capas de células musculares lisas que generalmente co-localizan con engrosamientos de la íntima. Estos depósitos de lípidos pueden estar libres o unidos a membranas. Los núcleos lipídicos se encuentran justo sobre las capas de macrófagos y de las células espumosas, desplazan a los proteoglicanos de la matriz intercelular y a las fibras. Las lesiones Tipo III contienen más colesterol libre, ácidos grasos, esfingomielina, lisolecitina y triglicéridos que las lesiones tipo II. Esta lesión puente entre la Tipo II y el ateroma se encuentra en regiones de las arterias propensas a la progresión de la placa.

---

-A las *Lesiones Avanzadas* se las define histológicamente como aquellas en las cuales el acúmulo de lípidos, células y componentes de la matriz extracelular incluyendo minerales, está asociado a la desorganización y engrosamiento de la íntima, así como también a la deformación de la pared arterial, y a complicaciones como fisura, hematoma y trombosis. Se las designa como lesiones tipo IV, V y VI.

La lesión **Tipo IV** consiste en una densa acumulación de lípido extracelular que ocupa una extensa pero bien definida región de la íntima. A este tipo de acumulación de lípido extracelular se lo conoce como “núcleo lipídico” (lipid core). Esta formación de lípido característico se origina a partir de una incrementada y consecuente confluencia de pequeños grupos aislados de lípidos extracelulares que caracteriza a las lesiones tipo III (Stary HC, 1989). La lesión Tipo IV, denominada **Ateroma**. El ateroma normalmente no disminuye la luz del vaso; el engrosamiento de la pared arterial estaría asociado a un incremento del tamaño de la porción externa de la arteria (Glagov S y col., 1987). Las células musculares lisas usuales y la matriz extracelular de la íntima profunda son dispersadas y desplazadas por la acumulación de partículas de lípidos extracelulares. Entre el centro lipídico y la superficie endotelial, está la íntima que contiene macrófagos y células musculares lisas con y sin inclusiones lipídicas. Los linfocitos (Jonasson L y col., 1986) y los mastocitos se encuentran también en esta región. Hay desarrollo de capilares que rodean al centro lipídico. Frecuentemente los macrófagos, las células espumosas y los linfocitos están más densamente concentrados en la periferia de la lesión. La formación del núcleo lipídico precede al incremento del tejido fibroso que va a cambiar la naturaleza de la íntima por encima del centro lipídico. La significancia clínica potencial de la lesión Tipo IV puede ser importante, aunque esta lesión avanzada no causa disminución de la luz arterial.

Las lesiones **Tipo V** se las define como lesiones en la cual se forma un prominente nuevo tejido conectivo fibroso. Cuando el nuevo tejido es parte de la lesión con un centro lipídico se la denomina **fibroateroma** o lesión **Tipo Va**. Cuando el centro lipídico y otras partes de la lesión se calcifican se la denomina lesión **Tipo Vb**. Si en la lesión tipo V está ausente el centro lipídico y los lípidos en general están disminuidos se la denomina **Tipo Vc**. Con estas lesiones las arterias disminuyen su luz y pueden desarrollar fisuras, hematomas y/o trombos y por estas razones estas lesiones son clínicamente relevantes.

---

La morbilidad y la mortalidad de la aterosclerosis es debida a las lesiones tipo IV y V en las cuales se han desarrollado alteraciones en la superficie de la lesión, hematomas o hemorragias y depósitos trombóticos. Las lesiones tipo IV y V con una o más de estas características adicionales se las denomina lesión **Tipo VI**. Éstas lesiones Tipo VI se las puede sub-clasificar en **TipoVIa** a la que posee alteraciones en la superficie, **Tipo VIb** a las que tienen hematomas o hemorragias y **TipoVIc** a las que desarrollan trombosis.

#### *4.II- Teorías Bioquímicas de la Aterogénesis*

Las principales teorías de la aterogénesis son la “Respuesta a la injuria” (Ross R, 1993), la “Respuesta a las lipoproteínas alteradas” (Steinberg D, 1997) y la “Teoría Inmunológica” (Wick G y col., 1997). A pesar de que hay distintas escuelas que adhieren a una de estas tres teorías, las mismas no se excluyen sino que confluyen en un modelo único de la formación de la placa ateromatosa (*Figura 7*).

##### *4.II.1- Hipótesis de Respuesta a la Injuria*

Esta hipótesis postula que por una alteración de la capa íntima del vaso producida por varios factores de riesgo como: injuria mecánica, lipoproteína de baja densidad (LDL) alterada químicamente, virus, toxinas, etc; se inicia una disfunción endotelial. Esta disfunción endotelial primaria se ubica principalmente en las ramificaciones del árbol arterial, produciendo como consecuencia cambios en la permeabilidad de las células, incremento en la captación de lipoproteínas, aparición de glicoproteínas específicas de adhesión en la superficie endotelial y un aumento en la liberación de factores quimiotácticos y de factores de crecimiento. Como consecuencia de todos estos cambios, las plaquetas, los monocitos y los linfocitos se activan y se adhieren a las células endoteliales y que finalmente migran a través de ellas hacia la íntima. A medida que este proceso continúa, las células migratorias alcanzan la superficie celular vascular, donde los monocitos provenientes del torrente sanguíneo se convierten en macrófagos, acumulan lípidos y se transforman en células espumosas; luego junto con los linfocitos que los acompañan van a formar las estrías grasas. Estas primeras lesiones se van a formar en aquellos sitios en donde existe una acumulación previa de células musculares lisas (que fueron atraídas desde la capa media al mismo sitio que los monocitos) y componentes de la

---

matriz extracelular. El continuo influjo de células y la proliferación descontrolada de éstas favorece la progresión de la lesión, llevando a la formación de la denominada placa fibrosa. Estudios en animales hipercolesterolémicos han confirmado la participación de 3 procesos involucrados en la formación de la lesión aterosclerótica: 1) proliferación de las células musculares lisas, macrófagos y posiblemente linfocitos; 2) formación por las células musculares lisas de la matriz del tejido conectivo comprometiendo las proteínas fibroelásticas, colágeno, y proteoglicanos; 3) acumulación de lípidos y principalmente colesterol libre y esterificado en los alrededores de la matriz y de las células asociadas.

#### *4.II.2- Hipótesis de la respuesta a las lipoproteínas alteradas*

La hipótesis se basa en el hecho de que la LDL modificada por oxidación (oxLDL) posee la propiedad de provocar la formación de la célula espumosa (Steinberg D, 1997). Existen diversas modificaciones que puede sufrir la LDL además de la oxidación; ellas son: auto-agregación, formación de complejos con proteoglicanos y disgregación por enzimas hidrolíticas pero la más extensamente estudiada es la modificación oxidativa. La oxidación de la LDL es un proceso complejo (Parthasarathy S y col., 1992) en donde pueden sufrir oxidación tanto las proteínas como los lípidos y cada uno de los distintos lípidos pueden ser atacados. La primera propiedad aterogénica descrita de la oxLDL fue su capacidad para inducir en la placa ateromatosa la acumulación del colesterol en los macrófagos (Henriksen T y col., 1981). Otra característica es que la oxLDL por sí misma es un agente quimiotáctico para los monocitos (Quinn MT y col., 1987) y para células T (McMurray HF y col., 1993) pero no para las células B. Además aumentaría la liberación del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) (Rajavashisth TB y col., 1990) y de la proteína quimioatrayente de monocitos (Cushing SD y col., 1990) en las células endoteliales, lo que facilitaría el desarrollo de la primera lesión (estría grasa) por reclutamiento de monocitos y favoreciendo su diferenciación a macrófagos tisulares.

#### *4.II.3- Hipótesis inmunológica de la aterogénesis*

La lesión temprana de la aterosclerosis, las estrías grasas común en infantes y personas jóvenes, es una lesión inflamatoria que contiene macrófagos derivados de monocitos circulantes y linfocitos.

La disfunción endotelial que resulta de la injuria de dichas células por diversos agentes, lleva a respuestas compensatorias que alteran las propiedades homeostásicas normales del endotelio. Los antígenos que pueden llevar a una reacción inmune humoral y/o celular asociada a la aterosclerosis son: 1-lipoproteínas modificadas, 2-macromoléculas parcialmente degradadas o desnaturalizadas, 3-antígenos crípticos intracelulares expuestos por la necrosis o citólisis, 4- neoantígenos: como las proteínas de shock térmico (hsp), 5- antígenos de organismos infectantes, citomegalovirus y *Clamidia pneumoniae*.

Las diferentes formas de injuria incrementan la adhesión de leucocitos y plaquetas al endotelio así como su permeabilidad. La injuria también induce al endotelio a adquirir propiedades procoagulantes en vez de anticoagulantes y liberar moléculas vasoactivas, citoquinas y factores de crecimiento. Si la respuesta inflamatoria no neutraliza efectivamente o no remueve los agentes agresores, puede continuar indefinidamente, estimulando la migración y proliferación de células musculares lisas que se ubican en el área de la inflamación para formar una lesión intermedia.

La aterosclerosis comienza como una respuesta inflamatoria debido a una reacción inmune contra las proteínas del estrés hsp60. Las hsp constituyen determinantes antigénicos de microorganismos patógenos, siendo esto importante para la inducción de una respuesta inmune humoral y celular protectora. Los anticuerpos protectores pueden reaccionar en forma cruzada con hsp, que se expresan en la célula endotelial, generando una reacción autoinmune local.

LDL modificada químicamente por las células endoteliales estresadas o LDL presente en la íntima puede ser retenida en el sitio de la inflamación. Los macrófagos y las células musculares lisas pueden captar la LDL modificada a través de los receptores barredores y transformarse en células espumosas. Estas células espumosas expresan elevados niveles de hsp60 que lleva a una estimulación local de los linfocitos T que van a reaccionar contra estas hsp60/65 perpetuando la enfermedad. Las células espumosas pueden ser eliminadas por anticuerpos citotóxicos y/o por células T y convertirse en parte del centro necrótico de la lesión.

La presencia de anticuerpos anti hsp se ha definido como un nuevo factor de riesgo para la aterosclerosis independiente de los factores clásicos como son la hipertensión, el colesterol, el sobrepeso, etc.

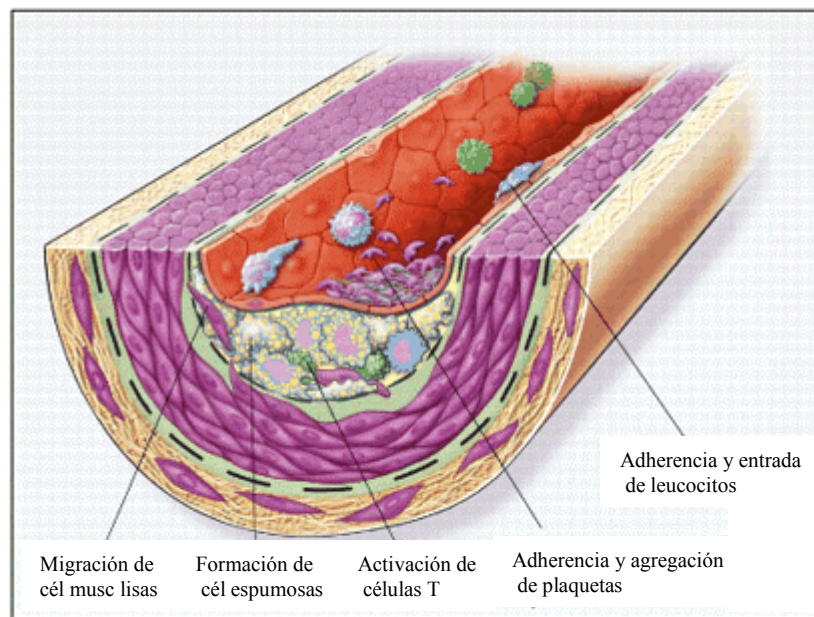


Figura 7: Formación de las estrías grasas en la Aterosclerosis. Las estrías grasas inicialmente consisten de monocitos-macrófagos llenos de lípidos (células espumosas) y de Linfocitos T. Posteriormente se incorporan un gran número de células musculares lisas. Los pasos involucrados en este proceso incluyen la migración de las células musculares lisas (que es estimulado por el factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento de fibroblastos 2 y factor de crecimiento transformante  $\beta$ ) activación de los linfocitos T (mediada por factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , IL-2 y factor estimulante de colonias granulocíticas-monocíticas) formación de células espumosas (mediada por oxLDL, factor estimulante de colonias de macrófagos, factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , IL-1) y adherencia y agregación plaquetaria (que son estimuladas por integrinas, P-selectinas, fibrina, tromboxano A2, factor tisular) (Ross R, 1999).

## CAPÍTULO 5

### POBLACIONES LINFOCITARIAS DE LA PLACA ATEROMATOSA

Los linfocitos son células que reconocen y responden en forma específica a antígenos extraños (antígenos son las sustancias que introducidas en el organismo de un vertebrado adulto inducen una respuesta inmune, dando lugar a la producción de otras sustancias denominadas anticuerpos o a la proliferación de células sensibilizadas con las que específicamente reaccionan). La especificidad de la respuesta inmune se debe a los linfocitos que son las únicas células capaces de reconocer y distinguir diferentes antígenos.

---

Estas células se encuentran en numerosos sitios de inmunización del organismos y en los tejidos linfoides que los drenan.

Los linfocitos pequeños tienen entre 8 y 10  $\mu$  de diámetro con un gran núcleo con cromatina densa. Su citoplasma es escaso y contiene mitocondrias, ribosomas, lisosomas pero no contiene organelas especializadas. Los linfocitos se originan en la médula ósea y en sus estadios iniciales de desarrollo no producen receptores de superficie para los antígenos, por lo tanto no son respondedores a los mismos. Cuando maduran comienzan a expresar receptores y antígenos, responden a la estimulación antigénica y se diferencian funcionalmente por los productos proteicos que liberan, aunque morfológicamente son similares. Una de las subclases de linfocitos son los **Linfocitos B**; las únicas células capaces de producir anticuerpos. Los receptores antigénicos de estos linfocitos son anticuerpos unidos a la membrana. La interacción de los antígenos con estos anticuerpos de membrana inicia una secuencia de reacciones que llevan a la activación del linfocito B, culminando en el desarrollo de células efectoras que activamente secretan anticuerpos. Otra sub-clase son los **Linfocitos T**, cuyos precursores provienen de la médula ósea y luego migran al timo. Estos linfocitos se dividen a su vez en distintas poblaciones funcionalmente diferentes, de las cuales las mejores definidas son los **Linfocitos T cooperadores** y los **Linfocitos T citotóxicos** (*Figura 8*). Estos subgrupos de linfocitos tienen especificidad antigénica y por lo tanto reconocen sólo a los antígenos peptídicos unidos a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígenos. En respuesta a la estimulación antigénica, las células T cooperadoras secretan hormonas denominadas citoquinas, cuya función es promover la proliferación y la diferenciación de las células T, de los linfocitos B y los macrófagos. Las citoquinas a su vez reclutan y activan los granulocitos constituyendo un importante vínculo entre la inmunidad específica y la natural. Los linfocitos citotóxicos lisan células que están infectadas con virus o con otros microorganismos intracelulares.

Los subpoblaciones de linfocitos expresan diferentes proteínas de membrana con distintas funciones. Estas proteínas sirven como marcadores fenotípicos de las poblaciones de linfocitos. Los linfocitos T cooperadores expresan CD4 y la mayoría de los linfocitos citotóxicos expresan CD8. A los linfocitos T en general se los caracteriza por la expresión de CD3 y a los linfocitos B por la expresión de CD19. La nomenclatura de CD proviene del término “cluster of differentiation” y se refiere a una molécula que puede ser

reconocida por un grupo de anticuerpos monoclonales que se utilizan para identificar una línea o estadio de diferenciación de la célula. Estos marcadores de diferenciación o CD se los puede dividir en distintas categorías: algunos son específicos y constitutivos de una línea celular (CD3, CD19, etc) y la expresión de otros varía de acuerdo al estado de activación (CD2, CD25) y diferenciación de la célula. Estas moléculas no son meramente marcadores fenotípicos sino que están involucrados en una gran variedad de respuestas linfocitarias. Las dos funciones más frecuentes atribuidas a los antígenos CD son 1) promover la interacción célula-célula y la adhesión entre ellas; y/o 2) transducción de señales que llevan a la activación del linfocito.

Los linfocitos, después de la activación, sufren cambios bien definidos. Antes de la estimulación antigénica o policlonal, los linfocitos pequeños están en un estado de reposo o en fase G0 del ciclo celular. Si los linfocitos en estado de reposo no encuentran un antígeno, probablemente morirán en unos días o semanas. La población es mantenida por el desarrollo de nuevas células a partir de sus precursores en la médula ósea. En respuesta a un antígeno o a una estimulación policlonal los linfocitos que estaban en reposo entran en la primer fase del ciclo celular G1, continuando con la fase de síntesis (S) y la segunda fase de crecimiento (G2); convirtiéndose en linfocitos grandes que se denominan linfoblastos.

Los linfoblastos tienen entre 10 a 12  $\mu$  de diámetro y un citoplasma mucho más voluminoso, mayor número de organelas y más RNA en relación a los linfocitos pequeños no estimulados. La progresión hacia la fase S del ciclo celular continúa y los linfocitos activados se dividen. Esta secuencia de eventos se denomina transformación blastogénica. La división mitótica es responsable de la proliferación de los clones de linfocitos respondedores al antígeno. Luego de la proliferación los linfocitos estimulados se diferencian desde un estado de reconocimiento del antígeno hacia un estadio efector en donde eliminan al antígeno. Las células efectoras están en un estado quiescente, no producen células efectoras a menos que sean estimuladas por antígenos. Las células vírgenes, que no han sido expuestas a antígeno específicos y las de memoria expresan distintas proteínas en superficie. Los linfocitos T vírgenes expresan una isoforma de CD45, denominada CD45A, la mayoría de los linfocitos activados y de memoria expresan una isoforma denominada CD45O.



Los linfocitos participan en innumerables patologías de origen inflamatorio. Una de ellas es la Aterosclerosis. El hallazgo de linfocitos y macrófagos en el ateroma sugiere que la respuesta inmune contribuye con la patogénesis de las lesiones ateroscleróticas (Hansson GK, 1997; Libby P, 2000; Lichtman AH y col., 1996) (ver apartado 4.II).

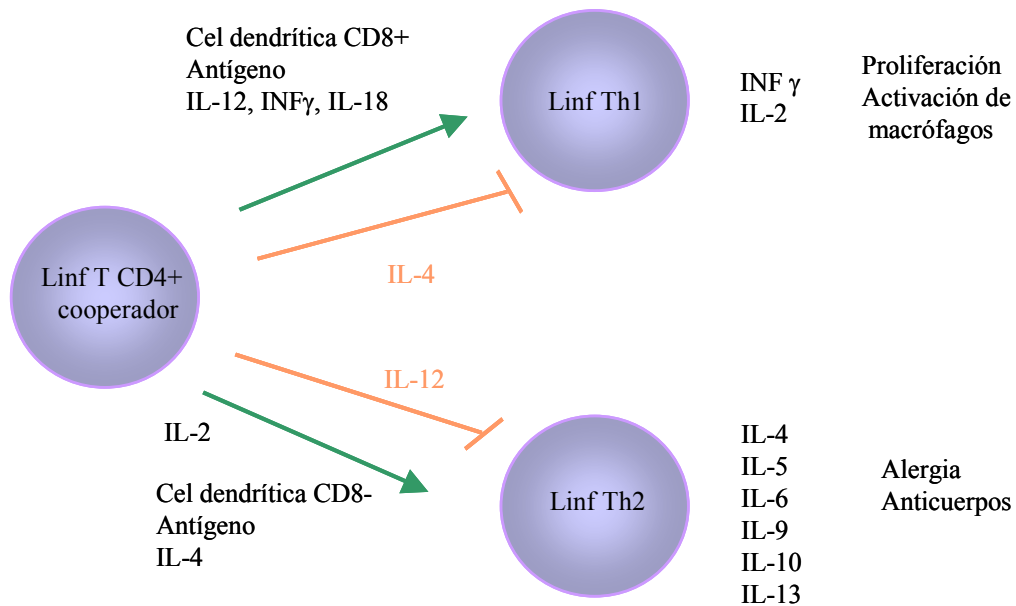


Figura 8: Diagrama de las subclases de linfocitos T cooperadores, sus productos de liberación y sus funciones generales

**OBJETIVOS**

## OBJETIVOS GENERALES

- Establecer modelos que permitan estudiar in vitro la formación del ateroma.
- Estudiar la regulación de la activación y proliferación de las células que forman la lesión aterosclerótica inicial por las lipoproteínas aterogénicas (VLDL) y antiaterogénicas (HDL).

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos se agrupan en dos grupos, uno para los experimentos realizados con HDL (A) y otro grupo para experimentos realizados con VLDL (B).

A) -Determinar si HDL afecta la respuesta linfoproliferativa de las células T inducida por diversos mitógenos. Definir si HDL produce cambios en la activación de las células T ya sea alterando la expresión de marcadores específicos de la activación y proliferación celular, o de marcadores de la respuesta inflamatoria.

B) -Determinar si VLDL afecta la respuesta linfoproliferativa de las células T inducida por diversos mitógenos. Definir si VLDL produce cambios en la activación de las células T ya sea alterando la expresión de marcadores específicos de la activación y proliferación celular, o de marcadores de la respuesta inflamatoria. Caracterizar la/s molécula/s a las que VLDL se uniría para producir sus efectos.

## **RESULTADOS**

---

## CAPÍTULO 1

### UN MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA ATEROESCLEROSIS

La Aterosclerosis, como ya se describió en el Capítulo 4 de la Introducción, se caracteriza por áreas vasculares que poseen células musculares lisas y células mononucleares en estado proliferante, así como componentes de la matriz extracelular, células espumosas y depósitos de colesterol. La primera lesión reconocible de la Aterosclerosis (denominada estría grasa) es un agregado de linfocitos T y de macrófagos llenos de lípidos dentro de la íntima. En esta lesión temprana, hay una clara preponderancia de células T sobre los macrófagos, siendo la mayoría de estas células CD4<sup>+</sup> y receptor de Interleukina 2<sup>+</sup> (IL-2R<sup>+</sup>), característica esta última de linfocitos T activados (Wick G y col., 1997). La información que se conoce actualmente de la implicancia de los linfocitos B en la aterogénesis es abundante pero circunstancial (Yla-Herttuala S y col., 1994; Dansky HM y col., 1997).

En este trabajo de tesis se diseñaron dos modelos para el estudio de la aterosclerosis utilizando cultivo de células “in vitro”; para ello se seleccionaron células abundantes en la lesión ateromatosa germinal y por ello es que se buscaron las condiciones adecuadas para trabajar con linfocitos activados semejantes a los observados en dichas lesiones. Uno de ellos consiste en células mononucleares de bazo de ratón (CMB) y el otro en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC).

En ambos modelos se utilizaron mitógenos que producen la proliferación de los linfocitos en forma inespecífica, lo cual puede ser detectado por ensayos como incorporación de precursores de ácido desoxiribonucleico radiactivos (*Figura 9*) y por los parámetros celulares cuantificables por citometría de flujo (*Figura 10*) como por ejemplo el aumento del tamaño (FW-SC) y la complejidad celular (RT-SC).

En la *Figura 9* se muestran dos gráficos de incorporación de timidina en función del tiempo de cultivo. Se pudo observar que para CMB y para PBMC la presencia de mitógenos como concanavalina A (ConA) y fitohemaglutinina (PHA), incrementan más de

10 veces la incorporación de  $[H^3]$ -timidina, indicando un aumento en la proliferación celular. Esta técnica no permite diferenciar las sub-poblaciones de células que incorporan el radiactivo de aquellas que no lo hacen.

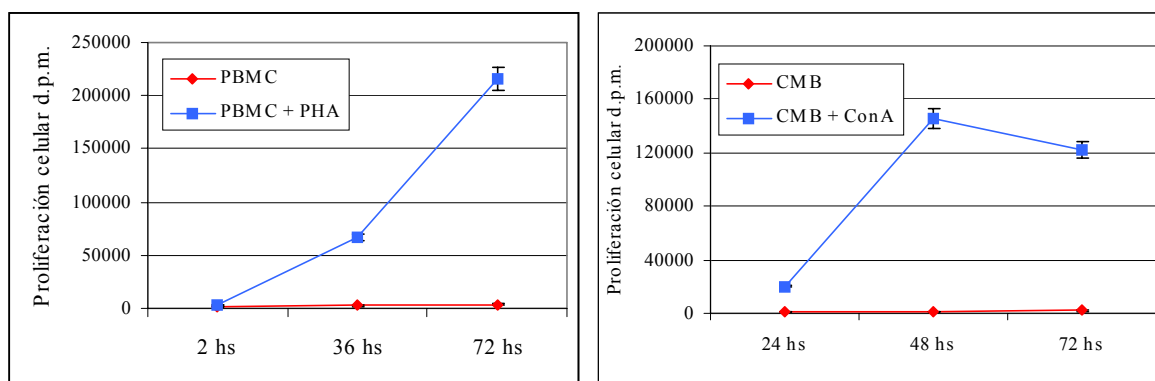


Figura 9: Proliferación de los linfocitos por la presencia del mitógeno. PBMC y CMB fueron cultivadas en presencia de mitógeno (PHA y ConA respectivamente). Los cultivos se realizaron a distintos tiempos y para evaluar la proliferación celular, se agregó a los cultivos 18 hs antes de la finalización del mismo  $[3H]$ -timidina. Una vez finalizado el cultivo, se cosecharon las células y se midió la radioactividad en un contador de centelleo líquido.

La respuesta proliferativa también se puede evaluar empleando citometría de flujo. En la Figura 10 se muestran gráficos de Fw-Sc (tamaño celular) en función de RT-Sc (complejidad celular) de células cultivadas en presencia del mitógeno a distintos tiempos. En los tres gráficos mostrados el número de células fue de 10000. En presencia del mitógeno los linfocitos proliferan, aumentando su tamaño y complejidad. Esta técnica

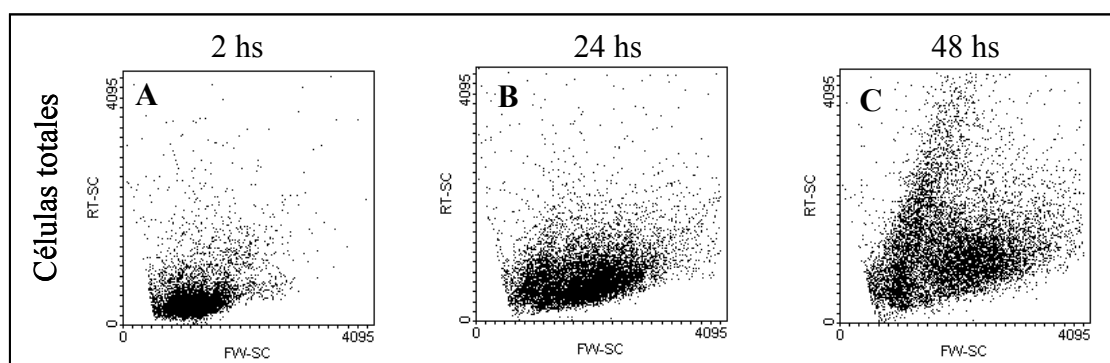


Figura 10: Proliferación de los linfocitos por la presencia del mitógeno. Los gráficos de citometría de flujo indican Fw-Sc (parámetro relacionado con el tamaño celular) vs RT-Sc (parámetro relacionado con la complejidad celular). Se cultivaron CMB + ConA a distintos tiempos y se observó el aumento de las células en estado blástico debido a la presencia de ConA.

ofrece varias ventajas; una de ellas es que permite observar la aparición de distintas poblaciones celulares de variados tamaños y complejidades, principalmente a las 48 hs de cultivo (Figura 10 C).

La estimulación con mitógenos produce un aumento en la proliferación celular en general, aumentando particularmente la población de linfocitos T  $CD4^+$ . Esta estimulación produce una diferenciación de la población de linfocitos T  $CD4^+$  desde una población uniformemente positiva para  $CD4^+$  (señalada en el gráfico con el marcador M1, ya que la otra población es  $CD4^-$  según el control realizado) a otras dos en las cuales se expresa  $CD4$  con intensidad de fluorescencia alta (Intensidad media de fluorescencia: CMB: 2770, PBMC 2437) y otra población con  $CD4$  de intensidad de fluorescencia baja (intensidad media de fluorescencia: CMB: 1120, PBMC: 908) (Figura 11 B y D). Las CMB presentan un 31% de linfocitos T  $CD4^+$ , que aumenta a 52% cuando son estimuladas con ConA. Las PBMC presentan un 43% de linfocitos T  $CD4^+$  y cuando se estimulan con PHA aumenta a 59%.

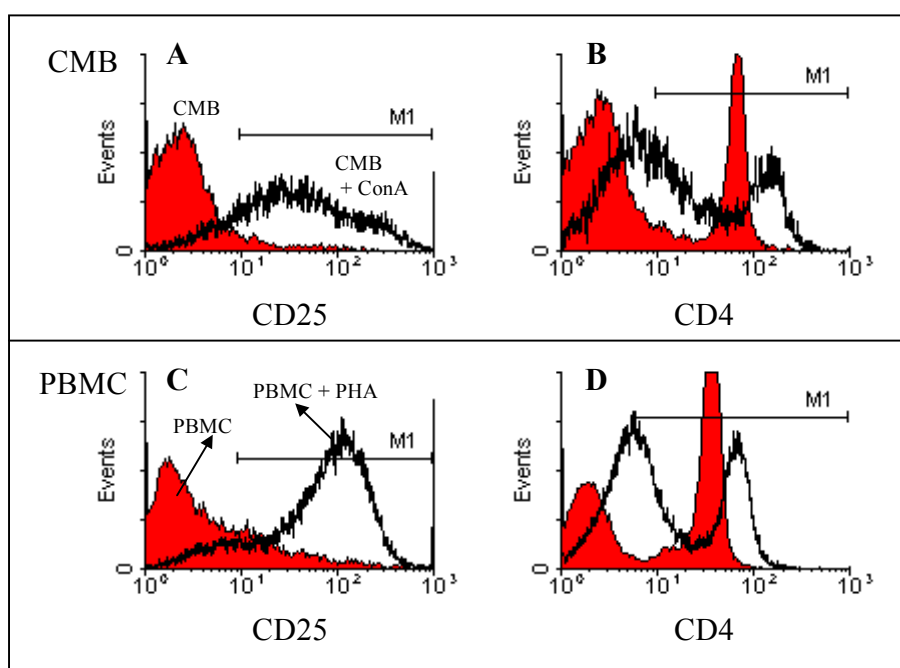


Figura 11: Efecto de la incubación con mitógeno sobre la expresión de  $CD4$  y  $CD25$  en la superficie de las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) y sobre las células de bazo de ratón (CMB). CMB fueron cultivadas por 48 hs en presencia de concanavalina A (ConA) (Paneles A y B), PBMC fueron cultivados por 72 hs (paneles C y D) con fitohemaglutinina (PHA). La expresión en la superficie de  $CD25$  y  $CD4$  fueron analizados por citometría de flujo. El eje de las x y de las y representan intensidad de fluorescencia (escala logarítmica) y número relativo de células respectivamente. Los histogramas de las células controles sin estimular se expresan en color rojo y de las células estimuladas con el mitógeno en color negro.

Otra característica de la estimulación con mitógenos es el aumento de la expresión de los marcadores de activación en la superficie de los linfocitos T. Uno de los marcadores de activación que la célula no expresa constitutivamente y que aparece cuando ésta se estimula, es el receptor de IL-2 o CD25 (*Figura 11 A y C*). CMB y PBMC sin estimular presentaron un 6,13% y un 16% de linfocitos T CD25<sup>+</sup> respectivamente, que aumentaron a 81% y 86% cuando fueron estimuladas.

Los resultados mostrados demuestran que los linfocitos cultivados por más de 48 hs en presencia de concanavalina A y fitohemaglutinina presentaron características similares a las de las células T detectadas inmunohistológicamente en las placas ateromatosas obtenidas de biopsias (Wick G y col., 1997) presentando rasgos características de linfocitos activados: células largas fusiformes con abundante citoplasma, algunas de ellas con una forma de núcleo irregular (experimentos no mostrados).

En los capítulos siguientes se mostrará como diferentes compuestos (lipoproteínas, fármacos, proteínas en general ,etc) afectan a las células linfocitarias en cultivo, como una forma de acercarnos al estudio de la interacción en un medio ambiente controlado entre las sustancias añadidas y las células T, aspecto que es imposible dilucidar in vivo.

En el Capítulo 2 se presentará la interacción de los linfocitos con la lipoproteína de alta densidad (lipoproteína antiaterogénica), en el Capítulo 3 con la lipoproteína de muy baja densidad (lipoproteína aterogénica) y en el Anexo I se presentarán estudios realizados con un antiinflamatorio de producción local (Mannan extraído de *Aloe Saponaria*).



## CAPÍTULO 2

### **REGULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS FORMADORAS DEL ATEROMA POR HDL.**

Se ha demostrado que la lipoproteína de alta densidad (HDL) regula la proliferación de las células musculares lisas y la producción de prostaglandinas (Viñals M y col., 1997), pero los efectos de la HDL sobre la proliferación de los linfocitos T son contradictorios. La HDL es una lipoproteína beneficiosa ya que existen numerosos estudios epidemiológicos que demuestran una correlación inversa entre la concentración de HDL y la frecuencia de enfermedades coronarias (Miller GJ y col., 1975; Yaari S y col., 1981; Gordon DJ y col., 1989). Una evidencia más directa de los efectos protectores de la HDL proviene de estudios realizados en modelos de animales en donde la elevación de la HDL se acompañó de una importante protección contra el desarrollo de las estrías grasas, la lesión más temprana de la aterosclerosis (Rubin EM y col., 1991; Plump AS y col., 1994; Paszty C y col., 1993; Badimon JJ y col., 1990). Aún no se conoce si el efecto protector de la HDL está relacionado con su rol en el transporte reverso de colesterol o a mecanismos no relacionados con su función en el transporte de lípidos como la activación celular y la proliferación (Parthasarathy S y col., 1990; Cockerill GW y col., 1999; Mackness MI y col., 1993).

Se estudió el efecto de HDL sobre la activación de los linfocitos, con mitógeno no específico y se determinó si HDL modifica la expresión de marcadores de activación sobre las células T (CD2, CD25, CD17) y la proporción de linfocitos T cooperadores y citotóxicos. Además se estudió si HDL produce modificaciones a nivel de mediadores característicos de la inflamación como son PGE2 y LacCer, y si altera las vías de señalización intracelular.

---

## PARTE I

### **¿PRODUCE HDL MODIFICACIONES EN LA RESPUESTA PROLIFERATIVA Y EN LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS?.**

*2.1.1- La HDL inhibe la respuesta proliferativa de las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) estimuladas, pero no modifica dicha respuesta de las células no-estimuladas.*

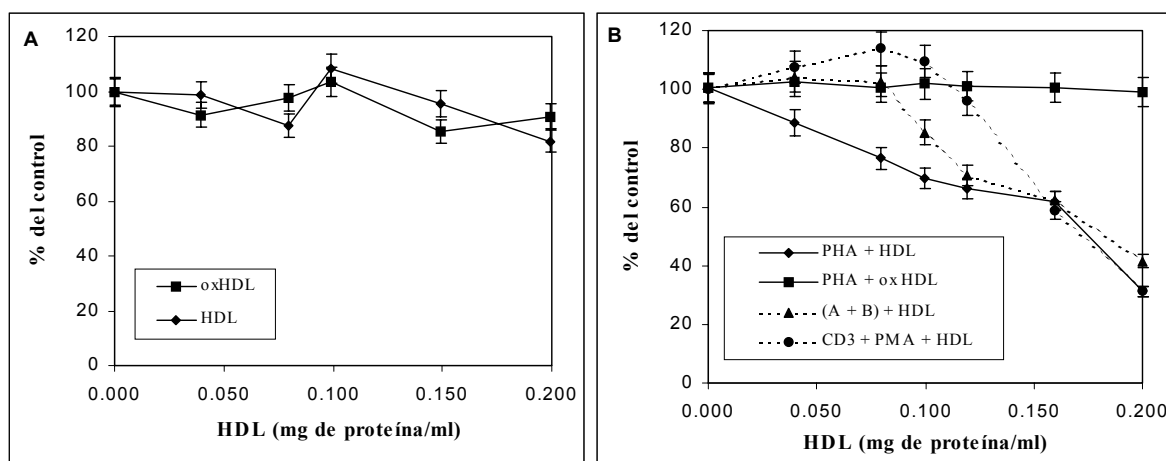
Para examinar si HDL es capaz de regular la proliferación de los linfocitos, se cultivaron PBMC no estimuladas por 72 hs en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes de HDL humana purificada nativa y oxidada. La proliferación se monitoreó siguiendo la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina en un contador de centelleo líquido.

Como se muestra en la *Figura 12 A*, cuando la HDL o la oxHDL se agregaron a las células PBMC no estimuladas no se observó aumento en la proliferación ni supresión a ninguna de las concentraciones estudiadas. Sin embargo la HDL fue capaz de suprimir la respuesta linfoproliferativa de las células T inducida por varios mitógenos: PHA (fitohemaglutinina), MLC (cultivo mixto linfocitario), o anti-CD3 + PMA (phorbol-12-miristato-13-acetato) que actúan estimulando las células a través de diferentes mecanismos (*Figura 12 B*). PHA actúa a través del CD3 y del CD2, MLC actúa a través del TCR y del CD3 y PMA a través del CD69.

En el MLC y en los cultivos estimulados con anti-CD3 y PMA, se necesitaron concentraciones mayores de HDL para alcanzar los mismos niveles de inhibición de la respuesta proliferativa inducida por PHA (*Figura 12 B*), sugiriendo un efecto preponderante sobre la coestimulación de CD2. A las 48 hs de cultivo hubo un 25 % de inhibición de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina de las células PBMC estimuladas con PHA y cultivadas en presencia o ausencia de HDL.

La inhibición observada (*Figura 12A*) parece ser un efecto específico de HDL ya que cuando se cultivó a las células PBMC con albúmina a las mismas concentraciones de

proteínas y con LDL a las mismas concentraciones de colesterol no se observó ningún efecto supresor de la proliferación. El efecto inhibitorio de la HDL sobre la respuesta proliferativa inducida por PHA de las células PBMC, sólo es ejercido por HDL en su estado nativo y no por HDL parcialmente oxidada por radiación UV. En la *Figura 12 B* puede observarse que después de oxidada HDL pierde su efecto inhibitorio ya que los niveles de radiactividad incorporada en las células PBMC estimuladas con PHA fue similar a las células cultivadas sin HDL.



*Figura 12: Efecto de la HDL y la oxHDL sobre las células mononucleares de sangre periférica humana en estado de reposo o activados.* PBMC ( $2 \times 10^5$  células / pocillo) se cultivaron en placas de 96 pocillos en presencia de concentraciones crecientes de HDL y oxHDL. Panel (A) células activadas con PHA (5  $\mu$ g/ml) ( $\blacklozenge$ ,  $\blacksquare$ ), anti-CD3 + PMA ( $\bullet$ ) o MLC ( $\blacktriangle$ ) o (B) células en estado de reposo ( $\blacklozenge$ ,  $\blacksquare$ ). Después de 54 hs de cultivo de las células estimuladas con PHA, anti-CD3 o 102 hs de MLC, se agregó  $[3H]$ -timidina y la incorporación de radiactivo fue determinada después de 18 hs de incubación. Los resultados se muestran como % del control. Los valores controles fueron los siguientes: células en reposo  $9500 \pm 1500$  d.p.m., PBMC + PHA  $165000 \pm 2000$  d.p.m., PBMC + anti-CD3 + PMA  $79000 \pm 14000$  d.p.m. y MLC  $30600 \pm 4000$  d.p.m. Los datos se informan como promedio  $\pm$  SD de determinaciones realizadas por triplicado. El experimento es uno de tres realizados con diferentes células y purificaciones de HDL

Después de 72 hs de cultivo, las células se analizaron por microscopía de contraste de fase y se observó que las células cultivadas en presencia de PHA y HDL u oxHDL formaron grumos, siendo la densidad de grumos por campo diferente ( $9 \pm 1$  vs.  $19 \pm 2$   $p < 0.0001$ , respectivamente, determinada por el test de Student como promedio del número de grumos por campo  $\pm$  DE.  $n=20$ ). Además de la diferencia en la densidad, también se observó que había diferencias en las dimensiones de los grumos. Los diámetros de los grumos (1 grumo se lo definió como un grupo de al menos cuatro células) se determinaron con fotografías digitalizadas usando el programa Metamorph 2.0. El promedio de los diámetros de los grumos de las células incubadas con PHA + oxHDL es el doble de

---

aquellos formados por células incubadas con PHA + HDL ( $83 \pm 37 \mu\text{m}$  vs.  $42 \pm 17 \mu\text{m}$  respectivamente, promedio de diámetros  $\pm$  DE,  $p < 0.0001$  determinado por el test de Student de 100 grumos).

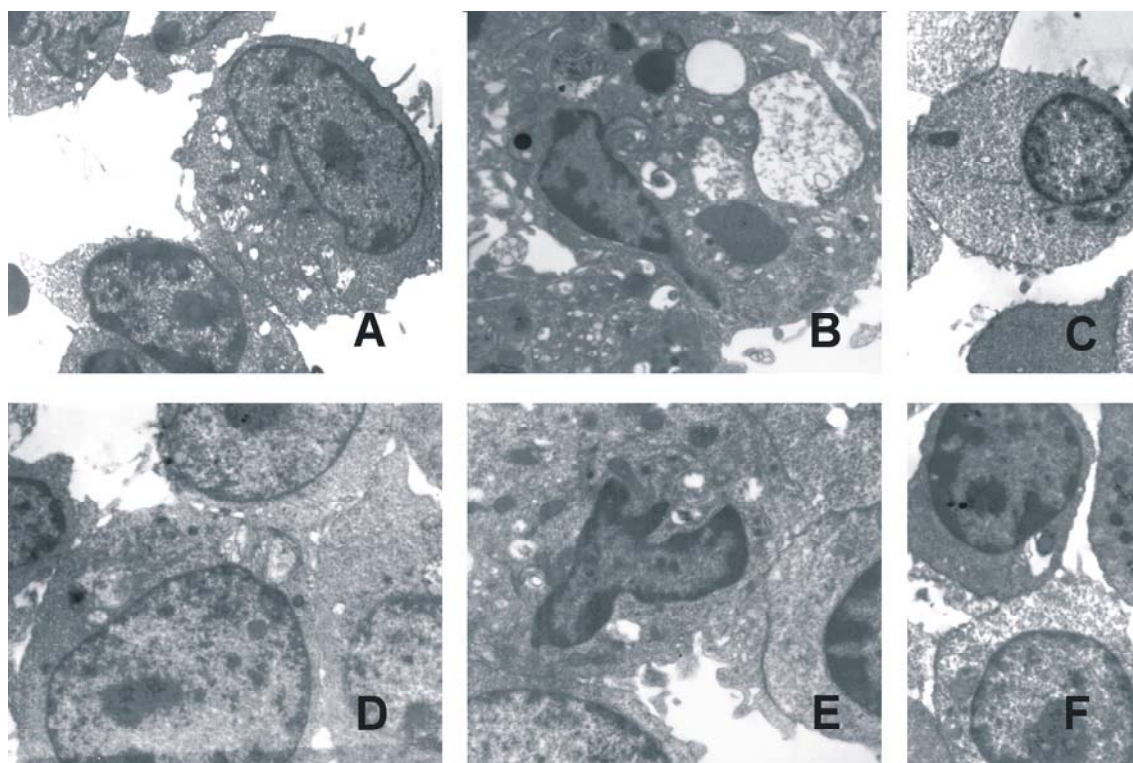
Esto fue confirmado luego de realizar cultivos en los cuales las células fueron enfrentadas (en presencia de PHA) inicialmente por 24 hs con HDL y luego por un período de 48 hs sin HDL. Se formaron grumos idénticos en densidad y dimensiones a los grumos formados cuando las células fueron cultivadas por 72 hs sin HDL ( $20 \pm 2$  vs.  $19 \pm 1$ , promedio del número de grumos por campo  $\pm$  DE.  $n=20$  y  $78 \pm 40 \mu\text{m}$  vs.  $86 \pm 33 \mu\text{m}$  promedio de diámetros  $\pm$  DE. de 100 grumos). Por lo tanto HDL produce sus efectos a tiempos cortos, es decir durante las 24 primeras horas de incubación cuando aún el mitógeno no ha producido ningún efecto visible en el linfocito (Figura 10, capítulo j de resultados).

Posteriormente se estudió si el efecto de la supresión de la respuesta linfoproliferativa inducida por la HDL es un efecto directo sobre los linfocitos (inhibición de la neuritogénesis o efecto citotóxico similar al observado en las células neuronales - Kivatinitz SC y col., 1997; Pajkrt D y col., 1996), o si HDL está actuando sobre los eventos tempranos de la activación de las células T como indica el experimento anterior.

Para descartar que la HDL produjera un efecto citotóxico directo sobre los linfocitos, se utilizó un colorante supra vital. Este colorante tiene la propiedad de ingresar a la célula sólo cuando la membrana plasmática está alterada ya que si la célula mantiene la integridad de la membrana el colorante no puede ingresar. La HDL no produjo un efecto citotóxico directo sobre los linfocitos ya que más del 95% de las células en todas las condiciones estudiadas excluyeron Tripán Blue después de 48 hs de cultivo. A las 72hs de cultivo, el 90% de las células controles y el 80% de las células cultivadas con la mayor concentración de HDL excluyeron el colorante supra-vital. Por lo tanto HDL no ejerce un efecto tóxico sobre las células.

Los linfocitos de sangre periférica incubados simultáneamente con PHA y HDL presentan apariencia de células quiescente (células redondas con escaso citoplasma y núcleos bien definidos) cuando son observados por microscopía electrónica (Figura 13 D y F). Las células PBMC incubadas simultáneamente con PHA y oxHDL tuvieron rasgos característicos de linfocitos activados (células largas fusiformes con abundante citoplasma, algunas de ellas con una forma de núcleo irregular) (Figura 13 A y C). Los linfocitos

incubados con HDL presentan rasgos de células en estado de reposo, mientras que los linfocitos provenientes de células incubadas con oxHDL tienen la apariencia de células en estado activado, apariencia similar a la que presentan las células que han sido incubadas con PHA únicamente. Por otro lado, ni HDL ni oxHDL alteraron la apariencia morfológica de los macrófagos (*Figura 13 B y E*).



*Figura 13: Microscopía electrónica de linfocitos (A, C, D, F) de sangre periférica humana y de monocitos (B, E) cultivadas en presencia de HDL y de oxHDL. PBMC fueron cultivadas por 72 hs con PHA y 0.1 mg de proteína de oxHDL/ml (Paneles A, B y C) o 0.1 mg de proteína de HDL/ml (Paneles D, E y F).*

Para descartar la probabilidad de que la HDL ejerza su efecto inhibitorio a través del secuestro del mitógeno, se realizó un experimento para comprobar si HDL debe estar presente en forma simultánea con PHA. PBMC fueron inicialmente estimuladas con PHA durante 24 hs, al cabo de ese tiempo los pocillos se lavaron para remover la PHA y luego se añadió la lipoproteína por 48 hs más. En estos experimentos la HDL fue capaz de suprimir la proliferación de los linfocitos T previamente estimulados con el mitógeno (*Figura 14*). Estos resultados demostraron que HDL no ejerce su efecto inhibitorio por secuestro de la PHA y sustentan la idea que el efecto anti-proliferativo de HDL se ejerce

sobre los linfocitos que han iniciado una respuesta blastogénica (Figuras 12 y 13), sin necesidad de que el mitógeno esté presente en forma simultánea (Figura 14).

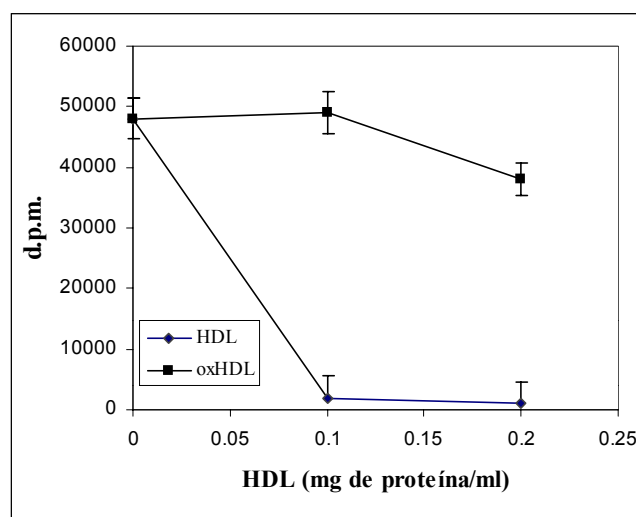


Figura 14: Efectos de HDL y ox HDL sobre células mononucleares de sangre periférica humana activadas. PBMC ( $2 \times 10^5$  células/pocillo) fueron cultivadas en placas de 96 pocillos en presencia de concentraciones crecientes de HDL (◆) y oxHDL (■). Las condiciones fueron similares a las utilizadas en la Figura 12 excepto que PHA ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) fue removida (cambiando el medio de cultivo con PHA por medio sin PHA) del cultivo después de 24 hs de incubación. Después de 54 hs de cultivo se agregó [3H]-timidina y la incorporación de radiactivo fue determinada después de 18 hs de incubación. Los datos se informan como promedio  $\pm$  DE de determinaciones realizadas por triplicado. El experimento es uno de tres realizados con diferentes células y preparaciones de HDL.

### 2.1.2- La HDL inhibe la respuesta blastogénica sin afectar la proporción relativa de linfocitos T cooperadores y linfocitos T citotóxicos.

Habiendo determinado que HDL inhibe la proliferación de los linfocitos T activados en etapas tempranas, se estudió si HDL interfiere con la respuesta blastogénica de alguna subpoblación de linfocitos específica. Estas subpoblaciones son importantes ya que en la placa ateromatosa hay una clara preponderancia de linfocitos T  $\text{CD4}^+$  (capítulo I resultados).

El complejo del receptor del linfocito T está constituido por las cadenas alpha-beta, zeta-zeta del CD3, y por la glicoproteína CD4 (o CD8) que es responsable del

reconocimiento de la cadena beta 2 del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II (MHC II) (o de la cadena  $\alpha 3$  del MHC clase I para el CD8). El fenotipo de CD4 es inherente de la subpoblación de linfocito T denominada “T cooperador” que coordina la respuesta inmune del linfocito T antígeno dependiente. Se ha demostrado que la glicoproteína CD8 se expresa principalmente en los linfocitos T citotóxicos o supresores.

Para definir las subpoblaciones de linfocitos T se realizó citometría de flujo de tres colores. Para ello se realizaron cultivos de PBMC por 48 y 72 hs con y sin PHA en presencia o ausencia de HDL (*Tabla 3*). Al cabo de ese tiempo se observó que HDL produjo una disminución significativa del número de células de las dos subpoblaciones de linfocitos T ( $CD4^+$  y  $CD8^+$ ), sin alterar el número total de células dobles negativas.

|                  | CD4 <sup>+</sup> | CD8 <sup>+</sup> | CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> | Total           |
|------------------|------------------|------------------|-----------------------------------|-----------------|
| 48 hs            |                  |                  |                                   |                 |
| PBMC + PHA       | 70.200 ± 4800    | 67.600 ± 4700    | 59.400 ± 4100                     | 197.200 ± 9600  |
| PBMC + PHA + HDL | 46.200 ± 3200    | 43.200 ± 3000    | 58.650 ± 3900                     | 148.050 ± 9200  |
| 72 hs            |                  |                  |                                   |                 |
| PBMC + PHA       | 92.000 ± 5400    | 138.600 ± 7200   | 63.600 ± 4300                     | 294.200 ± 10300 |
| PBMC + PHA + HDL | 40.200 ± 2800    | 55.200 ± 3800    | 51.000 ± 3200                     | 146.400 ± 8800  |

*Tabla 3: Efecto de HDL sobre el número de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) fueron cultivadas por 48 y 72 hs con fitohemaglutinina (PHA) con y sin HDL (0.1 mg de proteína de HDL/ml). La expresión de CD4 y CD8 en la superficie celular fueron analizados por citometría de flujo y se informa como número de células PBMC positivas del total de linfocitos T CD3<sup>+</sup>. CD indica “Cluster of Differentiation”.*

### 2.1.3- HDL inhibe la expresión de marcadores de activación de la superficie celular inducidos por un mitógeno.

La activación de las células en estado de reposo por mitógenos es un proceso de múltiples pasos (Arai T y col., 1998). Para discernir si el efecto inhibitorio de la HDL sobre la respuesta blastogénica inducida por PHA afectaba la activación del linfocito T, se evaluó por citometría de flujo el porcentaje de células T activadas (células CD3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> y

---

células CD3<sup>+</sup>/CD2<sup>+</sup>). Se realizaron cultivos de PBMC estimulados con PHA por 48 y 72 hs en presencia o ausencia de HDL. Existen dos glicoproteínas de membrana, CD25 y CD2, que son marcadores de activación de los linfocitos. El término “activación de la célula T” se refiere a una serie de eventos que son gatillados por la estimulación antigénica de la célula T, que culmina en la producción de IL-2 y en la expresión del receptor de IL-2 (Subbaramaiah K y col., 1998).

Los linfocitos, como cualquier otra célula del organismo, presentan un ciclo celular en el que se distinguen diversas fases: G0, G1, S, G2 y M. La fase G0, o quiescente, representa a células metabólicamente activas cuya situación no es de diferenciación terminal y pueden responder a estímulos entrando en el ciclo de diferenciación; la fase G1 se caracteriza por una intensa actividad sintética de proteínas y precede a la fase S en la cuál se duplica el material genético, la fase G2 precede a la M (mitosis) en la cual se dividen el núcleo y citoplasma celulares. Durante la estimulación antigénica (o con un mitógenos inespecífico), los linfocitos se activan y la transducción de esta señal al núcleo da lugar, como ya se vió, a una activación de los genes con aumento de RNA y síntesis subsiguiente de linfocinas, receptores de superficie, etc.

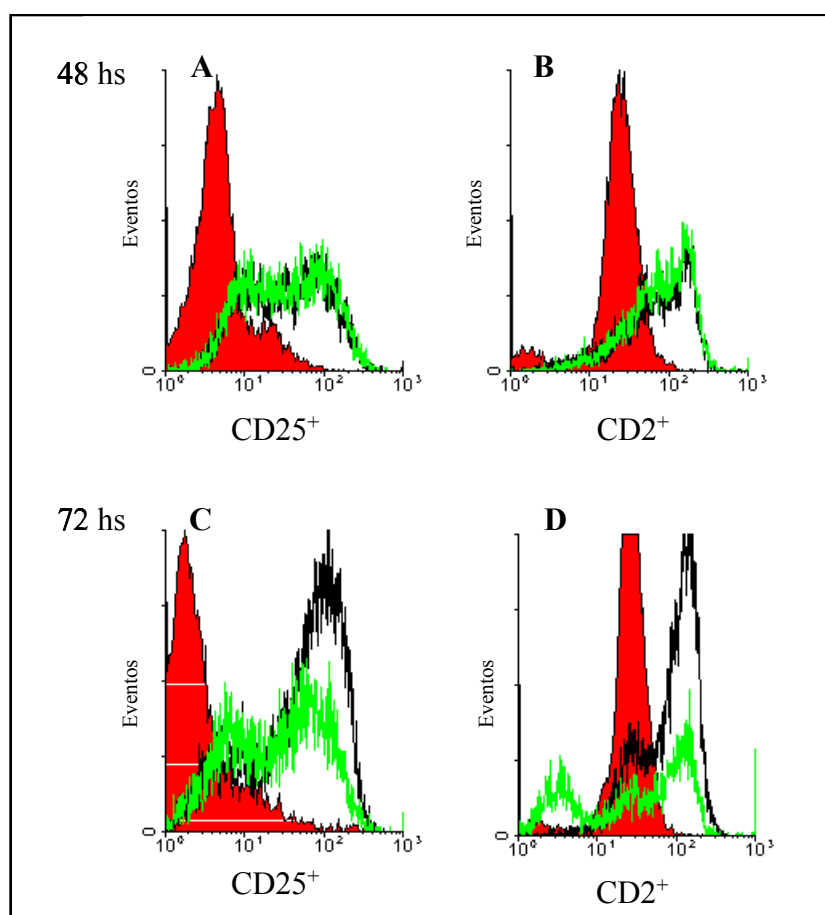
El receptor de alta afinidad de IL-2 consiste en tres subunidades diferentes: IL-2R $\alpha$  (CD25), IL-2R $\beta$ , e IL-2R $\gamma$ . La cadena IL-2R $\beta$  se expresa constitutivamente en los linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> pero no en los linfocitos T cooperadores, y aumenta su expresión después de la activación de la célula T. El IL-2R $\gamma$  se expresa constitutivamente en las células linfoides. Por el contrario el IL-2R  $\alpha$  (CD25) sólo se expresa después que la célula ha sido activada (Santana P y col., 1996; Davaille J y col., 2000; Mandal A y col., 2001; Thiele DL y col., 1983).

La glicoproteína CD2, también denominada receptor de la roseta, es un antígeno de diferenciación expresado en los linfocitos T maduros e inmaduros, y su expresión se ve incrementada después de la activación de la célula.

Luego de 48 hs de cultivo, las células que fueron cultivadas únicamente con medio (sin estímulo) presentaron un bajo porcentaje de linfocitos activados, células CD3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> o CD3<sup>+</sup>/CD2<sup>+</sup> (*Figura 15 A y B*). Al mismo tiempo, las células que fueron cultivadas en presencia del mitógeno presentaron dos poblaciones celulares: CD25<sup>+</sup> y CD2<sup>+</sup> que diferían en la densidad superficial de los marcadores (CD25<sup>+</sup>alto, CD25<sup>+</sup>bajo y CD2<sup>+</sup>alto,



CD2<sup>bajo</sup>). En los cultivos desafiados con el mitógeno se observó un considerable aumento de la proporción de linfocitos T CD25<sup>+</sup> y CD2<sup>+</sup>, comparada con las células sin estímulo (*Figura 15 A y B*). Este aumento es independiente de la presencia de HDL. Después de 72 hs de cultivo, las células cultivadas en presencia de PHA y sin HDL (*Figura 15 C y D*) desarrollan una mayor proporción de células CD3<sup>+</sup> CD25<sup>alto</sup> y CD3<sup>+</sup> CD2<sup>alto</sup>, comparadas con las células no estimuladas o con las células estimuladas después de 48 hs de cultivo. A las 72 hs, las células cultivadas en presencia de PHA y HDL simultáneamente tuvieron una menor proporción de células CD3<sup>+</sup> CD25<sup>alto</sup> y CD3<sup>+</sup> CD2<sup>alto</sup> (*Figura 15 C y D*). Por lo tanto HDL produjo una disminución en los marcadores de activación de las células T estimuladas. Este resultado está de acuerdo con la sugerencia realizada en el apartado 2.1.1 párrafo 2).



*Figura 15: Efecto de HDL sobre la expresión de CD2 y CD25 en la superficie de las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC). PBMC fueron cultivados por 48 (paneles A y B) y por 72 hs (paneles C y D) con fitohemaglutinina (PHA) (histograma negro) y 0.1 mg de proteína de HDL/ml (histograma gris). La expresión en la superficie de CD25 y CD2 fueron analizados por Citometría de Flujo. El eje de las x y de las y representan intensidad de fluorescencia (escala logarítmica) y número relativo de células respectivamente. Los histogramas de las células controles sin estimular se expresan como histogramas rellenos.*

#### 2.I.4- Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran que HDL fue capaz de suprimir la respuesta linfoproliferativa de la célula T inducida por varios mitógenos; por el contrario la oxHDL no afectó la proliferación de estas células. Otro resultado importante que contribuye a enfatizar las propiedades anti-inflamatorias de la HDL fue que la HDL inhibió la respuesta blastogénica sin afectar la proporción relativa de los linfocitos T cooperadores y citotóxicos. Este efecto de HDL indica que su acción antiproliferativa es similar a aquella que ejercen los agentes anti-inflamatorios y diferente de la producida por los inmunosupresores que inhiben principalmente la proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. HDL inhibió la expresión de dos marcadores de activación: el CD25 (receptor de IL-2) que es un marcador de activación de aparición tardía y de CD2 marcador de activación temprana. Estos resultados están de acuerdo con el concepto de que los efectos blastogénicos están relacionados con las acciones anti-inflamatorias, ya que la mayoría de las drogas anti-inflamatorias impiden la expresión del receptor de IL-2 y de CD2. Por lo tanto HDL dirige a los linfocitos T activados hacia un fenotipo de células en reposo como las drogas anti-inflamatorias no esteroideas.

## PARTE II

### **¿CUÁLES SON LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE EMPLEA HDL PARA INHIBIR LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS?.**

#### 2.II.1- HDL inhibe la liberación de prostaglandina E2 estimulada por mitógenos.

Las prostaglandinas juegan un rol clave en la regulación de la inmunidad mediada por células, modulando la activación y la proliferación de la célula T (Goodwin JS, 1989;

Della Bella S y col., 1997; Phipps RP y col., 1991; Iñiguez MA y col, 1999). La PGE<sub>2</sub> es producida a partir del ácido araquidónico por dos enzimas: la ciclooxigenasa I (COX-1) y/o la COX-2, en la lesión ateromatosa están presentes ambas enzimas (Schönbeck U y col., 1999). COX-1 se expresa en forma constitutiva y COX-2 aumenta su expresión cuando las células se activan. En las arterias normales la producción de PGE<sub>2</sub> es baja, mientras que la actividad de síntesis de PGI<sub>2</sub> es elevada, la situación inversa ocurre en las arterias con lesiones ateroscleróticas (Rolland PH y col, 1984). La presencia de PGE<sub>2</sub> es uno de los primeros cambios notables en el área de la lesión que la diferencia de la arteria normal.

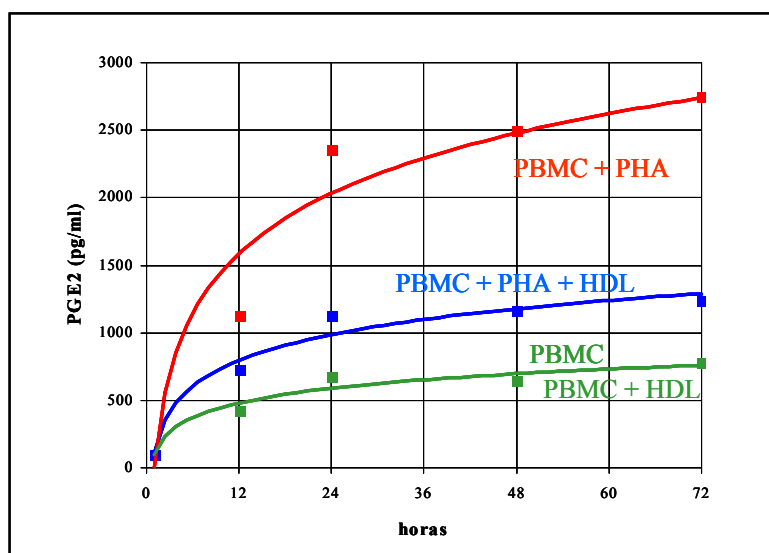


Figura 16: Efecto de HDL sobre la liberación de PGE<sub>2</sub> en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC). PBMC se cultivaron en presencia o ausencia de PHA con y sin HDL a 12, 24, 48 y 72 hs y se determinó de los sobrenadantes de los cultivos la liberación de PGE<sub>2</sub> mediante un kit comercial de ELISA. Los datos se informan como promedio  $\pm$  DE de determinaciones realizadas por triplicado. El experimento que se informa es uno de tres realizados con diferentes preparaciones de HDL.

Se considera a la PGE<sub>2</sub> un mediador característico de la inflamación, y al ser la aterosclerosis una enfermedad del tipo inflamatoria se consideró oportuno determinar si HDL produce modificaciones en la liberación de PGE<sub>2</sub>. Para esta determinación se realizó un cultivo de PBMC en presencia o ausencia de PHA con y sin HDL a 12, 24, 48 y 72 hs y se determinó en los sobrenadantes de los cultivos la liberación de PGE<sub>2</sub>. La Figura 16 muestra que tanto las células solas (PBMC) como las incubadas con HDL y sin mitógeno (PBMC + HDL) no producen PGE<sub>2</sub>. Cuando las células son estimuladas con PHA se

---

produce un aumento de tres veces en la liberación de dicha prostaglandina a partir de 12 hs de cultivo. A medida que aumenta el tiempo de cultivo de las células estimuladas con PHA también aumenta la cantidad de PGE<sub>2</sub> liberada al medio. Cuando las células fueron cultivadas con el mitógeno y con HDL (PBMC + PHA + HDL) se produjo una disminución a la mitad de la liberación de la prostaglandina, esta disminución permanece casi constante aún con el transcurso del tiempo de cultivo de las células. Con este resultado se puede afirmar que HDL produce la inhibición de la liberación de uno de los mediadores de aparición temprana característico de la inflamación.

*2.II.2- HDL afecta la incorporación de Galactosa en lípidos pero no en glicoproteínas y tampoco afecta la incorporación de fosfatos en lípidos. HDL inhibe específicamente la marcación de lactosilceramida.*

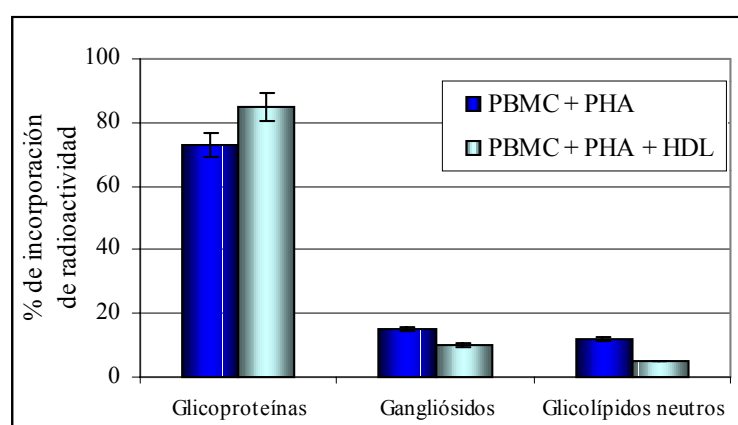
Hay una fuerte tendencia en la literatura a hacer incapié en los mediadores esfingolipídicos en la formación de la placa ateromatosa. Se propone que los glicoesfingolípidos (GSL) regulan la proliferación celular. Lactosilceramida (LacCer), un marcador de activación de los linfocitos denominado CD17 (Symington FW, 1989), estimula la proliferación *in vitro* de las células musculares lisas de la aorta (ASMCs), (Chatterjee S, 1998) contribuyendo a la progresión del ateroma. Los posibles mecanismos involucrados incluyen la modulación de las señales por parte de GSL mediante interacciones con tirosin-quinasas asociadas con receptores de los factores de crecimiento (Hakomori S y col., 1995) y a través de la formación de metabolitos de GSL que poseen importantes efectos en el crecimiento celular (Spiegel S y col., 1996). La acumulación de glicoesfingolípidos (principalmente glucosilceramida, LacCer y gangliósido GM3) en la pared de la aorta es un rasgo característico de la aterosclerosis humana (Mukhin DN y col., 1995; Prokazova NV y col., 1987). Los linfocitos humanos contienen LacCer como principal GSL neutro (Schwartzing GA y col., 1980), el cual se incrementa rápidamente cuando las células T son activadas con IL-2 (Gyimesi E y col., 1995; Symington FW, 1989).

Se realizaron experimentos de marcación metabólica para determinar si HDL produce alguna modificación en el tiempo de recambio del residuo glucídico de los lípidos

y las proteínas. Para ello se cultivaron PBMC en presencia de PHA con y sin HDL y se determinó la incorporación de  $[H^3]$ -Galactosa en los lípidos y proteínas, e incorporación de  $[^{32}P]$ -ortofosfato en los lípidos.

Los resultados obtenidos (*Figura 17*) indicaron que HDL produjo disminución en la incorporación de la radioactividad principalmente en glicolípidos neutros, una disminución de menor magnitud, se observó en la incorporación a nivel de los gangliósidos. HDL no produjo modificaciones en la incorporación de radioactividad en las Glicoproteínas.

En paralelo se realizaron cultivos en las mismas condiciones pero con el agregado de  $[^{32}P]$  ortofosfato. No se observaron modificaciones en la marcación de fosfolípidos ni en fosfoproteínas (datos no mostrados).



*Figura 17: Efecto de HDL sobre la incorporación de precursores radiactivos en glicoproteínas, gangliósidos y glicolípidos neutros, en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) estimuladas con un mitógeno. Se cultivaron PBMC por 72 hs en presencia de PHA con y sin HDL, se añadió Galactosa- $[H^3]$  las últimas 24 hs de cultivo. Las células se cosecharon y centrifugaron. El sobrenadante se descartó separando el precipitado y se midió la radioactividad incorporada en las células después de separar gangliósidos, glicolípidos neutros y glicoproteínas.*

Se analizó la proporción relativa de la radioactividad incorporada por separación de los glicoesfingolípidos en cromatografía en capa delgada. Se reveló con  $I_2$  los lípidos y la radioactividad incorporada se cuantificó por autoradiografía en placas sensibles y posterior lectura en densitómetro de barrido de radioactividad (*Figura 18*). Los resultados obtenidos indican que en las células estimuladas con PHA hay una marcación mayoritaria de GM3, lo cual es previsible ya que GM3 es el gangliósido mayoritario en los linfocitos (Kiguchi K, 1990).

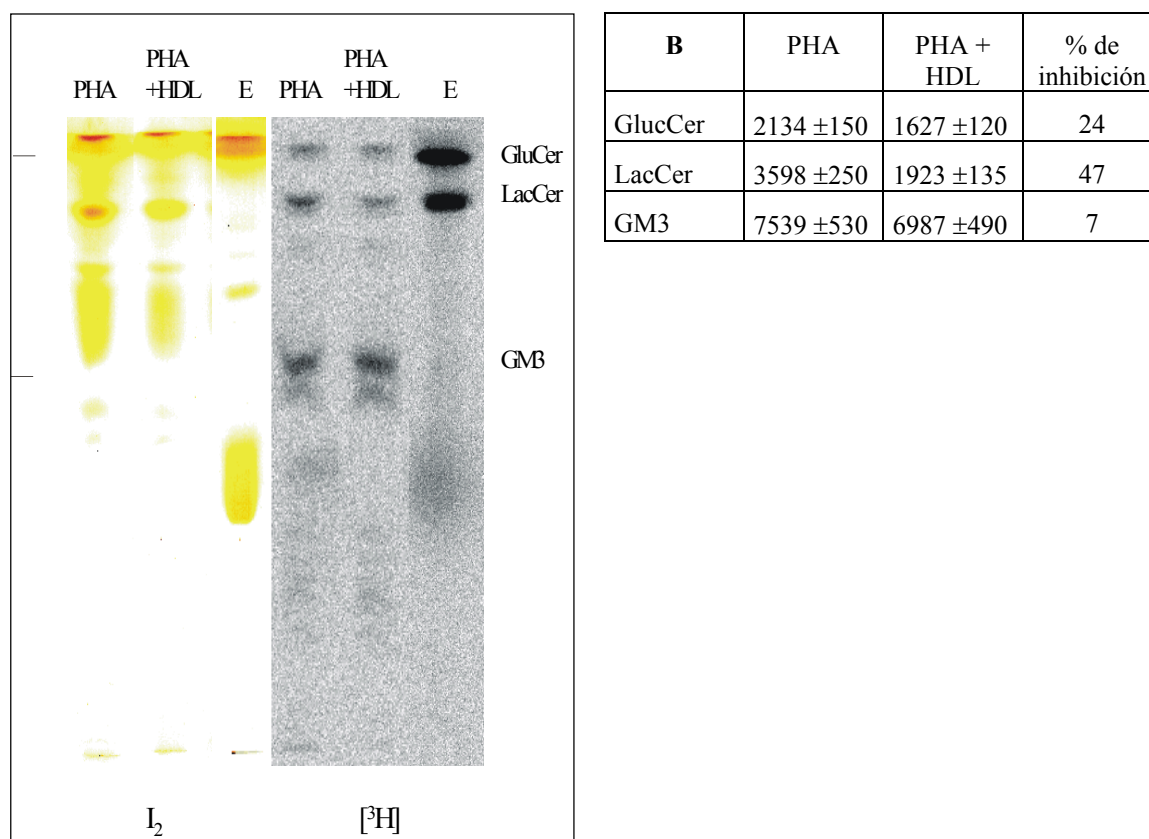


Figura 18: Efecto de HDL sobre la incorporación de precursores radiactivos en gangliósidos y glicolípidos neutros, en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) estimuladas con un mitógeno. Se cultivaron PBMC por 72 hs en presencia de PHA con y sin HDL. Galactosa-[ $^3\text{H}$ ] fue agregada las 24 últimas hs. Al cabo de ese tiempo se levantaron las células, se centrifugaron y se resuspendieron en cloroformo:metanol 2:1. Se agregó la muestra a una columna de G-25, se eluyó con cloroformo:metanol:H<sub>2</sub>O 60:30:4,5, se dejó evaporar el solvente toda la noche. Se resuspendió la muestra en cloroformo:metanol:H<sub>2</sub>O 60:30:4,5 y se sembró en una placa de HPTLC. Se realizó la corrida y posteriormente se tiñó con I<sub>2</sub> y luego se expuso la placa a la pantalla de tritio durante una semana. Posteriormente se hizo un barrido de la placa en un escáner de radioactividad (Phosphorimager SI Molecular Dynamics). Las áreas de cada banda fueron cuantificadas densitométricamente con el software Scion Image y se informan en **B**.

Cuando las células fueron cultivadas en presencia de PHA y HDL, se observó que HDL produjo una inhibición principalmente en la incorporación de la marca en LacCer, en menor cantidad en GluCer y prácticamente no inhibió la incorporación en GM3 (Figura 18 A y B). Con estos datos podemos concluir que HDL inhibe la marcación de glicolípidos neutros totales, inhibiendo proporcionalmente más la marcación de LacCer que la de GluCer. LacCer es un marcador de la activación celular y mensajero secundario en las vías de proliferación de los linfocitos T (Chatterjee S, 1998).

---

### 2.II.3- HDL estimula la fosforilación de Map Kinasa en los linfocitos

De los experimentos arriba descriptos se desprende que uno de los caminos de señalización utilizados por HDL para inhibir la respuesta blastogénica sería a través de los mensajeros secundarios lipídicos como prostaglandina E2 y LacCer. Está ampliamente documentada la relación existente entre estos mensajeros y la vía de señalización de Map kinasa (Chatterjee S, 1998; Kumar Bhunia A y col., 1996). Se ha descripto en macrófagos y fibroblastos (Han J y col., 2002) que HDL produce un aumento de la traslocación al núcleo y de la fosforilación de PPAR $\gamma$ , y un aumento de la fosforilación de las dos isoformas de Map Kinasa p44 y p42.

Las células de los mamíferos responden a estímulos externos mediante la activación de una amplia variedad de vías de señalización, que van a culminar en múltiples respuestas: proliferación, arresto del crecimiento celular, hipertrofia, diferenciación o apoptosis. En vertebrados las acciones de varios estímulos que resultan en la proliferación o en el crecimiento hipertrófico convergen en un grupo de cascadas de señalización de las kinasas, a las que colectivamente se las denomina proteín-kinasas activadas por mitógenos (Force Ty col., 1998). Otros autores han descripto que MEK, que tiene por sustrato a p44 y p42, está involucrada en la respuesta blastogénica de los linfocitos T humanos (Franklin RA y col., 1994).

Para corroborar la hipótesis que HDL produce modificaciones a nivel de Map kinasa en los linfocitos humanos de sangre periférica se realizaron cultivos de PBMC por 18 hs en ausencia de estímulo en medio deprivado de SFB. Al cabo de ese tiempo se realizó el estímulo de las células, durante 10 min, con PHA en presencia o ausencia de HDL. Se realizó un Western Blot y se marcó con anticuerpo monoclonal anti fosfo p44-p42 y se reveló por quimioluminiscencia. Las células que fueron estimuladas con PHA, presentaron bajos niveles de Map-kinasa fosforilada (*Figura 19*) mientras que en las que fueron estimuladas con PHA y HDL se observaron niveles aumentados de Map kinasa fosforilada.

Luego de una exposición al antígeno, los linfocitos maduros requieren de una intensa, prolongada y repetida proliferación para establecer una rápida respuesta inmune y generar memoria inmunológica. Debido a las características especiales de la proliferación del sistema inmune, los reguladores del ciclo celular tienen un papel fundamental en el control de las funciones inmunes, especialmente en la proliferación. MEK tiene un comportamiento dual en cuanto a la relación entre la actividad y la proliferación de las células.

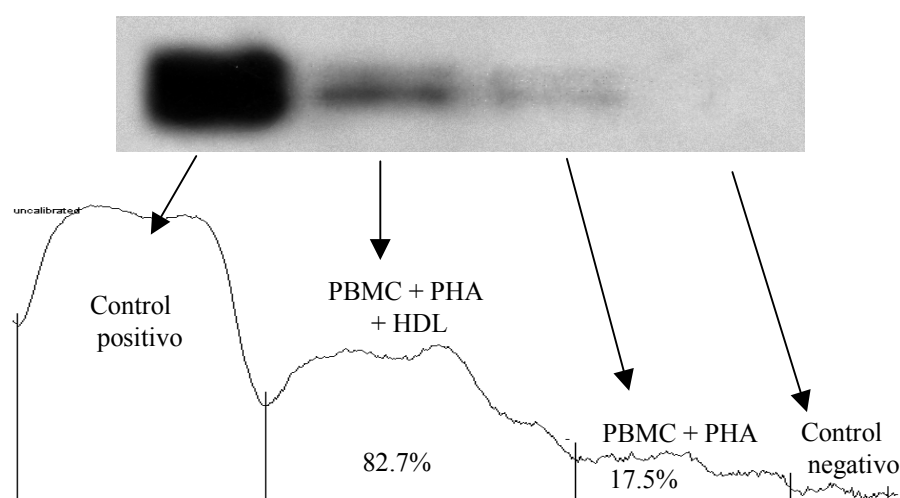


Figura 19: Se cultivaron células PBMC por 18 hs en ausencia de estímulo en medio RPMI privado de SFB. Al cabo de ese tiempo se realizó el estímulo de las células, durante 10 minutos, con PHA en presencia o no de HDL en medio RPMI 20% SFB. Las células se cosecharon, lisaron y sembraron en gel de poliacrilamida y fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con un anticuerpo monoclonal anti fosfo p44-p42, seguido del anticuerpo Proteína A- peroxidasa. Se reveló por el método de quimioluminiscencia. Como control positivo de la expresión de Map Kinasa se cultivaron en forma paralela células de ovario de hamster chino CHO-K1 en DMEM por 18 hs en ausencia de SFB y se las estimuló por 10 min con medio DMEM con 10% de SFB. Como control negativo se usó células PBMC privadas de suero y sin estimular. Las áreas de cada banda fueron cuantificadas densitométricamente con el software Scion Image y se muestra en el gráfico el % de cada banda y sus controles.

#### 2.II.4- Conclusiones

Los resultados descriptos en este capítulo muestran que:

- HDL produce una inhibición de la liberación de  $PGE_2$ , mediador lipídico temprano característico de la inflamación. Además inhibe la expresión de mediadores esfingolipídicos, principalmente LacCer.



-HDL estimula la fosforilación de Map Kinasa en los linfocitos indicando que las vías de acción de HDL conducen finalmente a la activación de las kinasas p44 y p42 (características del tejido neuronal y de los leucocitos).

Tanto la inhibición en la expresión de los marcadores lipídicos como la inhibición de la fosforilación de la kinasas indican que HDL tiene un efecto antiinflamatorio en las células mononucleares que se encuentran formando parte del ateroma.

## CAPÍTULO 3

### **REGULACION DE LA ACTIVACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS FORMADORAS DEL ATEROMA POR VLDL.**

Concentraciones fisiológicas de la lipoproteína de baja densidad (VLDL) inhiben la síntesis de DNA de los linfocitos humanos estimulados con fitohemaglutinina (PHA) probablemente a través de interacciones con un receptor de membrana. Estos resultados sugieren que la VLDL puede mantener a los linfocitos circulantes de sangre periférica en un estado no proliferante (Yi PI y col., 1981).

El efecto anti-proliferativo de la VLDL sobre los linfocitos humanos parece contradictorio con el rol aterogénico de esta lipoproteína. Se debe tener en cuenta que la naturaleza de la respuesta de las células T “in vivo” es una consecuencia de varios factores entre otros la producción de citoquinas. Las linfocitos denominados Th1 secretan IL-2 (una citoquina pro-inflamatoria) e interferón gamma, favoreciendo la respuesta inmune del tipo celular; en tanto que los linfocitos Th2 producen IL-4 y otras citoquinas que favorecen la producción de anticuerpos o sea la respuesta inmune humoral. En las lesiones ateroscleróticas, los linfocitos T activados producen IL-2 (Ishigami M y col., 1998) que podría incrementar la proliferación de las células que forman el ateroma (Hiltunen TP y col., 1998). Por la tanto, es de considerable importancia definir si VLDL es un factor que influencia la activación de las células T y la producción de citoquinas.

Debido a la gran variabilidad de la repuesta mitogénica observada con los linfocitos humanos comparada con ratones endocriados y teniendo en cuenta el hecho que los receptores de VLDL humanos y murinos son > 94% idénticos (Wyne KL y col., 1996; Kim D y col., 1996) estudiamos en primer lugar la capacidad de la VLDL humana de afectar la activación, proliferación y producción de citoquinas (característica de las células T activadas) de los linfocitos de bazo de ratón (CMB) después de la estimulación con un mitógeno y en segundo lugar estudiamos si la VLDL era capaz de unirse a los linfocitos y las características de esa unión.

---

**PARTE I****¿ PRODUCE VLDL MODIFICACIONES EN LA RESPUESTA PROLIFERATIVA  
Y EN LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS?.**

*3.1.1- La VLDL inhibe la respuesta proliferativa de la células de bazo de ratón (CMB) estimuladas, pero no dicha respuesta en las células no estimuladas.*

Existen diversas publicaciones las cuales se describen que la VLDL inhibe la síntesis de DNA de los linfocitos estimulados por mitógenos (Yi PI y col., 1981); como sólo se hace referencia a este fenómeno y no a su origen, se investigó las causas de esa inhibición. Primero, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de VLDL humana sobre la capacidad linfoproliferativa de CMB activadas y en estado de reposo. Para ello se cultivaron CMB en placas de 96 pocillos, en presencia de ConA, con o sin VLDL por un período de 24 y 48 hs. Para evaluar la proliferación celular, se agregó a los cultivos, 18 hs antes de la finalización del mismo, 1  $\mu$ Ci de [ $^3$ H]-timidina. Una vez finalizado el cultivo, se cosecharon las células y se midió la radiactividad en un contador de centelleo líquido. Se observó que concentraciones de VLDL en el rango fisiológico inhiben la incorporación de  $^3$ H-timidina en células T murinas después de 48 hs de ser estimuladas con ConA (*Figura 20*). Esta inhibición es dependiente de la concentración de VLDL siendo casi completa a los 55  $\mu$ g de proteína de VLDL /ml, mientras que el 50% de la inhibición se obtuvo con 38  $\mu$ g de proteína de VLDL /ml y por lo tanto la concentración usada en todos los experimentos sucesivos.

La VLDL no produjo efecto en la proliferación de los linfocitos a períodos cortos (24 hs) de estimulación con ConA o en células no activadas (*Figura 21*). Para descartar un posible efecto inespecífico de la VLDL, se incubó las células en las mismas condiciones que para VLDL pero en presencia de albúmina o de lipoproteína de baja densidad (LDL) a una concentración de 100  $\mu$ g de proteína /ml (*Figura 21*). Se observó que los efectos de la VLDL parecen ser específicos ya que no se observó efecto alguno sobre las células cuando se las incubó con albúmina o con LDL.

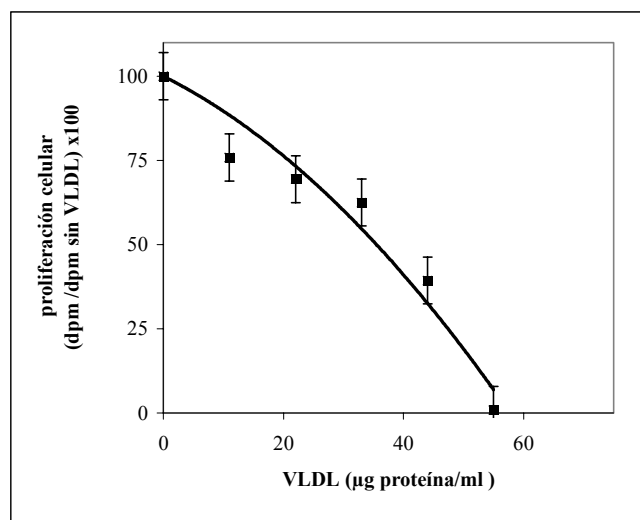


Figura 20: Inhibición de la proliferación celular dependiente de la concentración de VLDL. CMB ( $2 \times 10^5$ /pocillo) fueron cultivadas por 48 hs en presencia de ConA con diferentes concentraciones de VLDL. La  $^3\text{H}$ -timidina estuvo presente durante las últimas 18 hs del cultivo. Los datos se informan como promedio de cuatro experimentos realizados por triplicado con diferentes preparaciones de CMB y de VLDL, expresadas como (dpm)  $\pm$  DE.

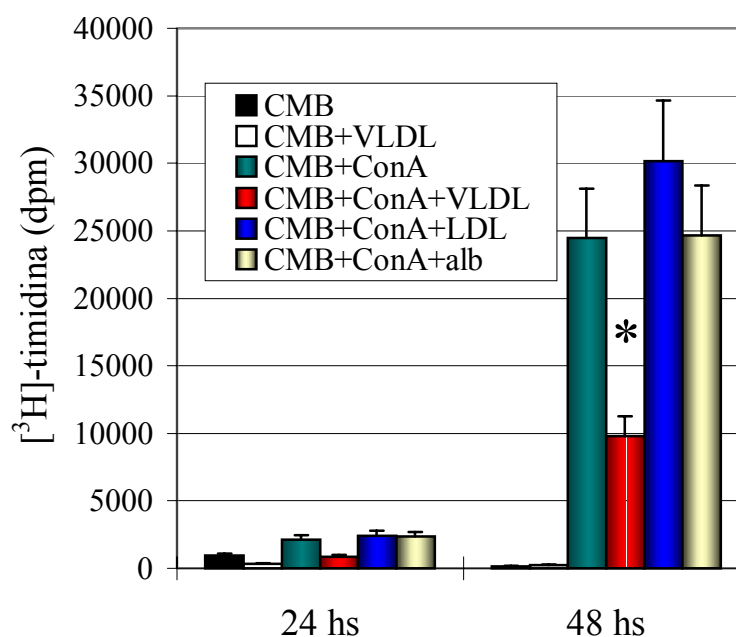


Figura 21: Efectos de las distintas lipoproteínas sobre la incorporación de  $[^3\text{H}]$ -timidina en los linfocitos. CMB ( $2 \times 10^5$ /pocillo) fueron cultivadas por 24 o por 48 hs en presencia o ausencia de ConA con o sin VLDL ( $38 \mu\text{g}$  de proteína /ml), LDL ( $100 \mu\text{g}$  de proteína /ml), y albúmina ( $100 \mu\text{g}$  de proteína /ml). La  $^3\text{H}$ -timidina estuvo presente durante las últimas 18 hs de cultivo. Los datos se informan como promedio de cuatro experimentos realizados por triplicado con diferentes preparaciones de CMB y de VLDL, expresadas como (dpm)  $\pm$  DE. \* Diferencia estadísticamente significativa entre (CMB + ConA + VLDL) y (CMB + ConA) donde  $p < 0.01$  después de 48 hs de cultivo, después de 24 hs la diferencia entre estos grupos no fue estadísticamente significativa ( $p < 0.07$ ) (test de Student). Las diferencias entre los experimentos fueron menor del 10%.

---

Para descartar un efecto citotóxico de la VLDL sobre las células se realizaron controles con Azul de Tripán, colorante supravital que no ingresa a la célula cuando ésta mantiene su membrana intacta. Después de 24 hs de cultivo, más del 95% de las células en todas las condiciones estudiadas excluyeron Azul de Tripán, y después de 48 hs de cultivo, el 90% de las células control y el 80% de las células cultivadas con las concentraciones más altas de VLDL excluyeron el colorante, por lo tanto se puede descartar un efecto citotóxico directo de la VLDL.

### 3.1.2- La VLDL inhibe la respuesta blastogénica de los linfocitos T y B.

Habiendo determinado que la VLDL inhibió la proliferación celular, se estudió si esta lipoproteína producía modificaciones en las distintas poblaciones de linfocitos: linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) y linfocitos B (CD19<sup>+</sup>). Para ello se cultivaron las células en presencia o ausencia de ConA con o sin VLDL por períodos de 24 y 48 hs. Al cabo de esos tiempos se incubaron las células con anticuerpos monoclonales anti-CD3 marcado con FITC (fluorescente verde) y con anti-CD19 marcado con PE (fluorescente naranja). Basados en la diferencia en la expresión en membrana de los marcadores se consiguió analizar por citometría de flujo las diversas poblaciones celulares. En primer lugar se observó que después de 24 hs de estimulación con ConA o cuando son co-cultivadas con VLDL no se produjeron cambios significativos en la población de las células T y de las células B (*Figura 22 A-C y G-I*). Por el contrario, después de 48 hs de cultivo, la proporción de células T en estado blástico incrementó considerablemente en presencia de ConA (*Figura 22 D vs. E*); señalado con un marcador en el eje de Fw-SC (tamaño). Cuando se realizaron los cultivos con ConA y VLDL simultáneamente, se observó una disminución significativa en la proporción de células T en estado blástico (*Figura 22 F vs. E*). Simultáneamente se determinó el efecto de ConA y VLDL sobre la población de células B (CD19<sup>+</sup>) y se observó que producen efectos similares (*Figura 22 J-L*).

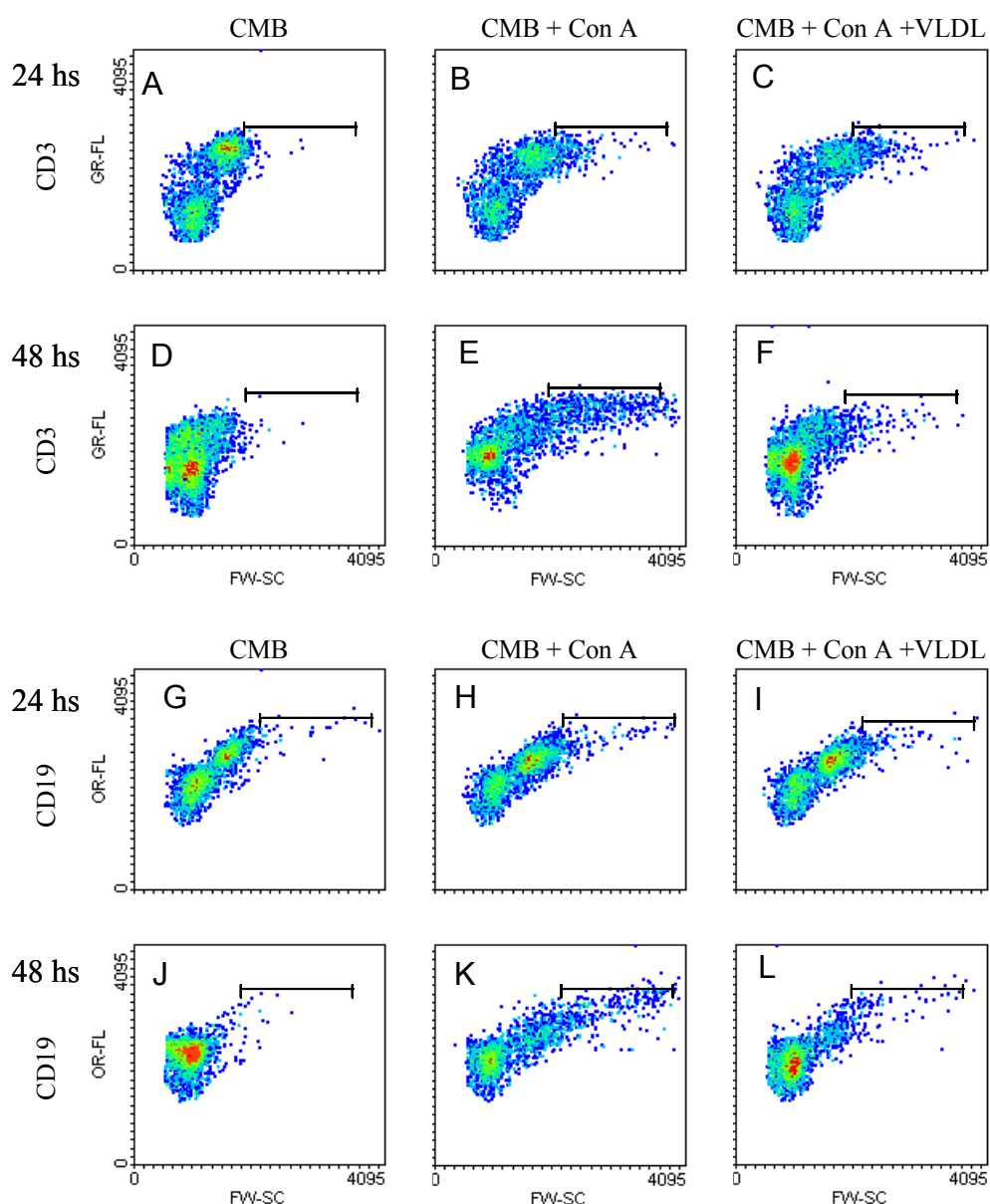
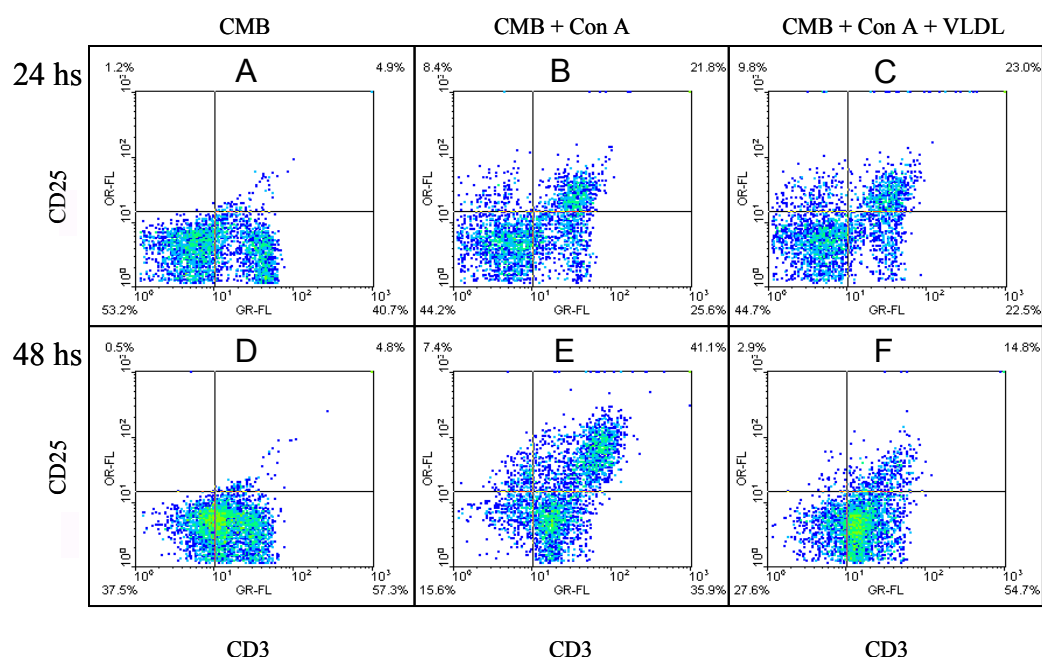


Figura 22. Análisis fenotípico de la población linfocitaria. Gráficos de “Dot-plots” de marcadores celulares de superficie de las células T (CD3) y de las células B (CD19), en CMB ( $10^6/\text{ml}$ ) en estado de reposo y estimuladas, cultivadas por 24 hs y 48 hs con y sin VLDL. Las CMB fueron marcadas con anticuerpos según lo descrito en materiales y métodos. El presente gráfico es representativo de cuatro experimentos realizados con preparaciones diferentes de CMB y VLDL. La línea dibujada a valores altos de “forward scatter” (parámetro FW-SC, se correlaciona con el diámetro de la célula) indica células en estado blástico.

### 3.1.3- La VLDL inhibe la expresión de marcadores de activación de los linfocitos inducidos por un mitógeno.

Para dilucidar si el efecto inhibitorio de la VLDL, sobre la respuesta blastogénica gatillada por la ConA, estaba afectando no sólo la proliferación sino también la activación de las células T, se evaluó el porcentaje de células T activadas (células que expresan CD3<sup>+</sup> y CD25<sup>+</sup> en forma simultánea). Para ello se realizó un cultivo de CMB en presencia o ausencia de VLDL, durante 24 y 48 hs de estimulación con ConA. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti CD3 marcado con FITC (marcador poblacional de linfocito T) y un anticuerpo monoclonal anti CD25 marcado con PE (anti IL-2R, marcador de la activación celular). A las 24 hs de cultivo se observó que las células cultivadas con medio solo (sin estímulo) presentaron un bajo porcentaje de células CD3<sup>+</sup> activadas (*Figura 23 A*, cuadrante derecho superior). Como era de esperar, a este mismo tiempo, las células cultivadas con un mitógeno tuvieron un considerable incremento en la proporción de células IL-2R<sup>+</sup> (CD25<sup>+</sup>) independiente de la presencia de VLDL (*Figura 23 B vs. C*, cuadrante derecho superior).



*Figura 23: Efecto de VLDL sobre la activación de los linfocitos T.* Se muestran gráficos de doble parámetro; en el eje de las x intensidad de fluorescencia de CD3 creciente (células T) versus intensidad de fluorescencia creciente de CD25 (células T activadas) en el eje de las y. CMB en estado de reposo y activadas ( $10^6/ml$ ) fueron cultivadas por 24 hs (panel superior) o por 48 hs (panel inferior) con o sin VLDL. Las CMB fueron marcadas con anticuerpos según lo descrito en materiales y métodos. El presente gráfico es representativo de cuatro experimentos realizados con preparaciones diferentes de CMB y VLDL.

Después de 48 hs de cultivo en presencia de ConA y sin VLDL hubo un incremento en el porcentaje de células CD3<sup>+</sup> IL-2R<sup>+</sup> comparadas con células no estimuladas (*Figura 23E vs. D*). El incremento en el nivel de células T activadas (CD3<sup>+</sup> IL-2R<sup>+</sup>) iniciadas por la

---

presencia de ConA fue casi totalmente abolido por la presencia de VLDL (*Figura 23 F vs. E*, cuadrante derecho superior).

Otro parámetro que nos brinda el citómetro de flujo es la Intensidad Media de Fluorescencia (MFCh); este parámetro es dependiente del número de moléculas en estudio por célula. Para este caso MFCh de las células positivas (dependiente del número de moléculas CD25/célula), siguió la misma tendencia que la población de las células CD25<sup>+</sup>: (MFCh: 24hs CMB: 711, CMB + ConA: 1384, CMB + ConA + VLDL: 1444 – 48hs CMB: 1028, CMB + ConA: 1740, CMB + ConA + VLDL: 1232). Observándose una clara disminución de MFCh cuando las células son co-cultivadas con ConA y VLDL.

Los experimentos realizados mediante citometría de flujo mostraron que la VLDL actúa selectivamente sobre la población de células T activadas ya que no fue posible observar ningún efecto de la VLDL sobre las células estimuladas con ConA por 24 hs.

#### *3.1.4- VLDL arresta a los linfocitos T en la fase G0/G1 del ciclo celular*

Para profundizar aun más en el conocimiento del mecanismo a través del cual la VLDL inhibe la activación de las células T, se analizó el efecto de esta lipoproteína sobre el ciclo celular de la población de células CD3<sup>+</sup> (*Tabla 4*). Se cultivaron células en presencia o ausencia de ConA con y sin VLDL por 48 hs. Se las tiño con un anticuerpo monoclonal anti CD3 marcado con FITC y posteriormente con una solución de Ioduro de Propidio (PI es un fluorocromo que se intercala en las dobles hebras del DNA indicando en qué estadio del ciclo celular se encuentra la célula). Se analizó con el citómetro de flujo para establecer en que estadio del ciclo celular se encontraban.

Los resultados mostraron que la VLDL inhibe la progresión de las células activadas al estadio S/G2/M (VLDL aumenta el % de células en G0/G1 y disminuye el % de S/G2/M); mientras que la población de células hipodiploides (SubG0/G1) no fue afectado. Estos resultados indican que el efecto supresor de la VLDL no es debido a la inducción de apoptosis, sino a una inhibición en la progresión del ciclo celular. Cuando analizamos el efecto de VLDL sobre las células no estimuladas (en estado de reposo), se observó que VLDL produce un incremento en el número de células T hipodiploides.



|                   | sub Go/G1 | Go/G1    | S/G2/M  |
|-------------------|-----------|----------|---------|
| CMB               | 8 ± 2     | 80 ± 2   | 12 ± 2  |
| CMB + VLDL        | 22 ± 4*   | 65 ± 2 * | 13 ± 3  |
| CMB + ConA        | 8 ± 2     | 42 ± 3   | 49 ± 3  |
| CMB + ConA + VLDL | 6 ± 2     | 69 ± 3*  | 25 ± 1* |

*Tabla 4: Acción de VLDL sobre las fases del ciclo celular de células CD3<sup>+</sup>. Análisis del ciclo celular de células CD3<sup>+</sup>. CMB (10<sup>6</sup>/ml) fueron cultivadas por 48 hs en presencia de ConA con o sin VLDL en un medio conteniendo 5% de SFB. Las células fueron doblemente marcadas con anti-CD3<sup>+</sup> marcada con FITC y Ioduro de Propidio. A las células T (CD3<sup>+</sup>) se las incluyó en una región y se calcularon los porcentajes de células en sub Go/G1, Go/G1 o S/G2/M. Los datos se expresaron como promedio ± SD de cuatro experimentos realizados por triplicado. Los experimentos fueron realizados con diferentes preparaciones de CMB y de VLDL.\* Diferencias estadísticamente significativas (CMB + VLDL vs CMB) y (CMB + ConA + VLDL vs CMB + ConA); p < 0.01 (test de Student).*

### *3.1.5- VLDL modificación el perfil de liberación de Interleukinas hacia una respuesta proinflamatoria*

Se han descripto diversas funciones para la interleukina 2 (IL-2), entre ellas el control de la sobrevivencia de células T, la expansión clonal, la diferenciación funcional e inducción de la progresión de las células T a través de la fase G1 hacia la fase S del ciclo celular (Cantrel DA y col., 1984). Como se describió anteriormente la VLDL produce una inhibición en el ciclo celular de los linfocitos, teniendo en cuenta esto, se investigó si la VLDL afecta la producción de las citoquinas liberadas por las células T activadas. Se analizó la producción de IL-2 e IL-4 por las células cultivadas por 24 y 48 hs en presencia o ausencia de VLDL. Ambas citoquinas se determinaron en los sobrenadantes de los medios de cultivo usando la técnica de ELISA. Después de 24 hs de estimulación con ConA, hubo un aumento significativo de citoquinas en estos sobrenadantes celulares comparados con los de las células no estimuladas (*Tabla 5*). Interesantemente, a los dos tiempos estudiados, las células cultivadas en presencia de ConA y VLDL produjeron elevados niveles de IL-2 comparados con células cultivadas con ConA sin VLDL. Las células cultivadas con ConA produjeron niveles más elevados de IL-4 que las células sin estimular, siendo los niveles mayores después de las 48 hs que a las 24 hs. La VLDL

interfirió con el aumento de los niveles de IL-4 en las células estimuladas con ConA después de 48 hs de cultivo (*Tabla 5*). La VLDL produjo una modificación en el perfil de liberación de citoquinas ya que disminuyó la liberación de IL-4 y aumentó la de IL-2.

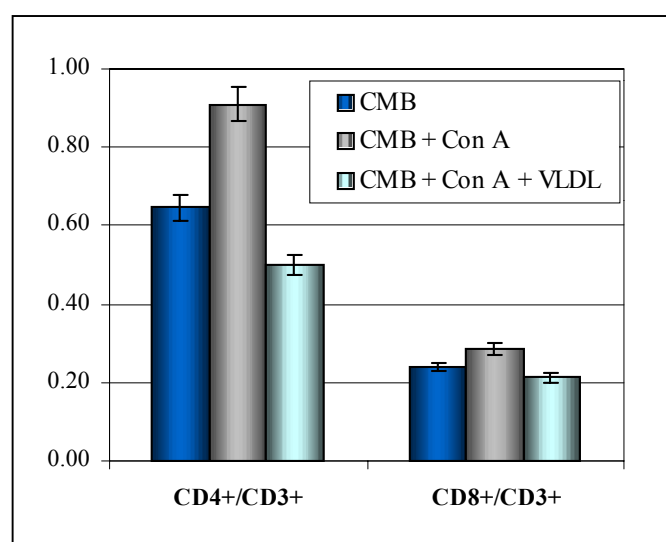
|                   | 24 hs        | 24hs        | 48 hs         | 48 hs        |
|-------------------|--------------|-------------|---------------|--------------|
|                   | IL-2 (ng/ml) | IL-4(ng/ml) | IL-2(ng/ml)   | IL-4(ng/ml)  |
| CMB               | 0.03 ± 0.02  | n.d.        | 0.02 ± 0.012  | n.d.         |
| CMB + VLDL        | n.d.         | n.d.        | n.d.          | n.d.         |
| CMB + ConA        | 5.53 ± 0.16  | 0.53 ± 0.05 | 3.12 ± 0.21   | 1.05 ± 0.06  |
| CMB + ConA + VLDL | 9.63 ± 0.15* | 0.63 ± 0.05 | 10.36 ± 0.09* | 0.53 ± 0.05* |

*Tabla 5:* CMB ( $10^6$ /ml) fueron cultivados por 24 y 48 hs en presencia o ausencia de ConA con o sin VLDL. Los datos son expresados como promedio ± DE de cuatro experimentos realizados por triplicado. n.d.: no detectable. Los experimentos fueron realizados con diferentes preparaciones de CMB y de VLDL. \* Diferencias estadísticamente significativas entre (CMB + ConA + VLDL) y (CMB + ConA)  $p < 0.01$  (test de Student).

### 3.1.6- VLDL inhibe la proliferación de los linfocitos T $CD4^+$ sin modificar los linfocitos T $CD8^+$

Dado que VLDL produjo inhibición de la proliferación de los linfocitos T, inhibición de los marcadores de activación así como modificación del perfil de liberación de citoquinas, y los antecedentes de la literatura refieren que en la placa ateromatosa están presentes principalmente linfocitos T  $CD4^+$ , se estudió si VLDL modifica preferentemente alguna población específica de linfocitos T. Para ello se realizó un cultivo de CMB en presencia o ausencia de VLDL, durante 48 hs de estimulación con ConA. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti CD3 marcado con FITC (marcador poblacional de linfocito T) y un anticuerpo monoclonal anti CD4 marcado con PE (marcador de la población de linfocitos T cooperadores) o con un anticuerpo monoclonal anti CD8 marcado con PE (marcador de la población de linfocitos T citotóxicos) y se realizó el análisis por citometría de flujo (*Figura 24*).

A las 48 hs de cultivo se observó que las células cultivadas con medio sólo presentan una mayor proporción de linfocitos T CD4<sup>+</sup> comparadas con los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Cuando éstas células son estimuladas con ConA por 48 hs se observó un aumento en el porcentaje de células CD4<sup>+</sup> sin modificaciones aparentes de la población CD8<sup>+</sup>. Las células cultivadas en presencia del mitógeno y de la VLDL presentaron una disminución significativa de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> sin modificar la de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Se concluye con estos experimentos que VLDL produce una inhibición de la proliferación de los linfocitos T CD3<sup>+</sup> principalmente de la sub-población CD4<sup>+</sup> o linfocitos T cooperadores. VLDL no produjo ninguna modificación en la proporción de los linfocitos T cooperadores y citotóxicos, rasgo opuesto al que se observa en la inflamación en donde si existe un desbalance CD4-CD8.



*Figura 24: Inhibición de la proliferación de las distintas subpoblaciones de linfocitos por VLDL.* El gráfico se informa como fracción de linfocitos T cooperadores /citotóxicos. CMB ( $2 \times 10^5$ /pocillo) fueron cultivadas por 48 hs en presencia de ConA con o sin VLDL ( $38 \mu\text{g}$  de proteína/ml). Se realizó una citometría de flujo según lo descrito en materiales y métodos, utilizando anticuerpos monoclonales anti-CD3<sup>+</sup>, anti-CD4 y anti-CD8. Los datos se informan como promedio de cuatro experimentos realizados por triplicado con diferentes preparaciones de CMB y de VLDL, expresadas como %. Hubo diferencias estadísticamente significativas entre (CMB + ConA + VLDL) y (CMB + ConA)  $p < 0.01$  después de 48 hs de cultivo (test de Student). Las diferencias entre los experimentos fue menor del 10%.

### 3.1.7- Conclusiones

Las VLDL inhibieron en forma dosis-dependiente la proliferación de células linfocíticas de bazo de ratón inducida por la presencia de ConA. El 50% de la inhibición se

observó a una concentración aproximada de los 38 ug /ml de VLDL, la cuál es similar a la fisiológica.

Este efecto antiblastogénico no es producido por LDL ni por Albúmina, lo cual sugiere un cierto grado de especificidad.

Un dato interesante es que VLDL no produjo efecto a las 24 hs cuando la respuesta de los linfocitos a ConA fue incipiente; por el contrario cuando esta respuesta se midió a las 48 hs de cultivo, VLDL disminuyó drásticamente la población de linfocitos con morfología de blastos (Fw-SC elevados) que expresan CD3 (linfocitos T) y en menor medida aquellas que expresan CD19 (linfocitos B).

El mecanismo por el que VLDL manifiesta efectos antiproliferativos se relaciona con la depleción de células T totalmente activadas ya que expresan IL-2R (Cantrel DA y col., 1984), más particularmente bloquea la progresión de estas células en el ciclo celular acumulando la población en la fase G0/G1 del ciclo celular.

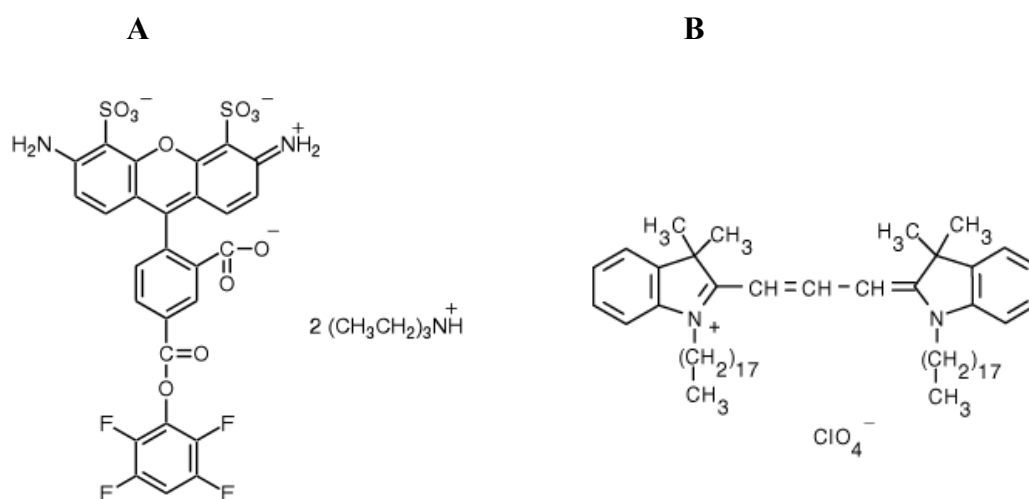
Estos resultados contrastan con las propiedades aterogénicas de esta lipoproteína ya que una inhibición de la proliferación o multiplicación de las células inhibiría el crecimiento del ateroma; sin embargo hay otras células que forman la lesión germinal y que pueden ser afectadas por factores liberados por éstas células. En apoyo de esta hipótesis se verificó que VLDL aumentaba la producción de IL-2 y disminuía la de IL-4 indicando que VLDL sería capaz de promover una respuesta inflamatoria. Esta posibilidad se ve reafirmada por el hecho de que VLDL produjo una disminución significativa de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (ver último párrafo 3.I.5).

## PARTE II

### ¿VLDL INTERACCIONA CON LOS LINFOCITOS?

#### 3.II.1- Obtención de VLDL marcada con sondas fluorescentes que se unen a la parte proteica y lipídica

Para responder a la pregunta si VLDL interacciona con los linfocitos se obtuvo VLDL marcada con dos sondas fluorescentes. Una de ellas, el DiI (perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina) es un colorante lipofílico cuya intensidad de fluorescencia es débil hasta que se incorpora en los lípidos. Es un fluorescente naranja-rojo espectralmente similar a la tetrametilrodamina que particiona en la porción lipídica de la lipoproteína. La otra sonda es Alexa 488 (Alexa Fluor 488, sal del ácido carboxílico ester succinimidilico) *Figura 25*. Es un fluorescente espectralmente similar a la fluoresceína (fluorescente verde) que produce conjugados proteicos más brillantes y más fotoestables que esta. Alexa 488 posee un grupo succinimidilico que reacciona eficientemente con aminas primarias para formar complejos estables fluorescente-proteína.



*Figura 25: Estructura molecular de las sondas fluorescentes utilizadas para marcar VLDL. A Alexa 488 y B DiI.*

Este método para marcar la VLDL con fluorescentes fue elaborado a partir de técnicas ya descriptas para la marcación de HDL con Alexa ( Gu X y col., 2000) y de LDL con DiI (Stephan ZF y col, 1993).

Para la marcación de la lipoproteína se obtuvo VLDL y se la separó en dos alícuotas. A una de ellas se le agregó una solución de DiI y se incubó por 18 hs a 37° C. A la otra alícuota de VLDL concentrada se le agregó el fluorescente Alexa 488 e incubada toda la noche a 4° C con agitación constante. La técnica recomendada por el fabricante separa la proteína marcada con el fluorescente del fluorescente libre mediante columnas cromatográficas y no fue aplicable a VLDL ya que la recuperación de la lipoproteína fue muy escasa. Se desarrolló una técnica aislando la VLDL marcada con Alexa y VLDL marcada con DiI por ultracentrifugación en gradiente salino, con el que se obtiene la lipoproteína unida al fluorescente en la parte superior del gradiente y en la inferior el fluorescente libre. A continuación de la centrifugación se dializaron las muestras contra PBS y se guardaron hasta su utilización a -20 °C. VLDL marcada con Alexa y VLDL marcada con DiI se obtuvieron por separado, y posteriormente se mezclaron para la realización de los experimentos.

La lipoproteína marcada fue controlada, por gel gradiente de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, a fin de corroborar que que no existieran agregados y/o aductos de apoproteínas entre sí, o proteólisis de las mismas causadas por el proceso de reacción con el fluorescente Alexa 488.

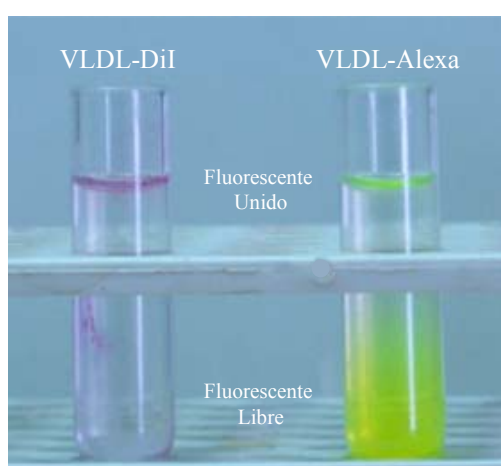


Figura 26: Separación de VLDL marcada con DiI (rojo) y con Alexa 488 (verde) del fluorescente libre por ultracentrifugación en gradiente salino

---

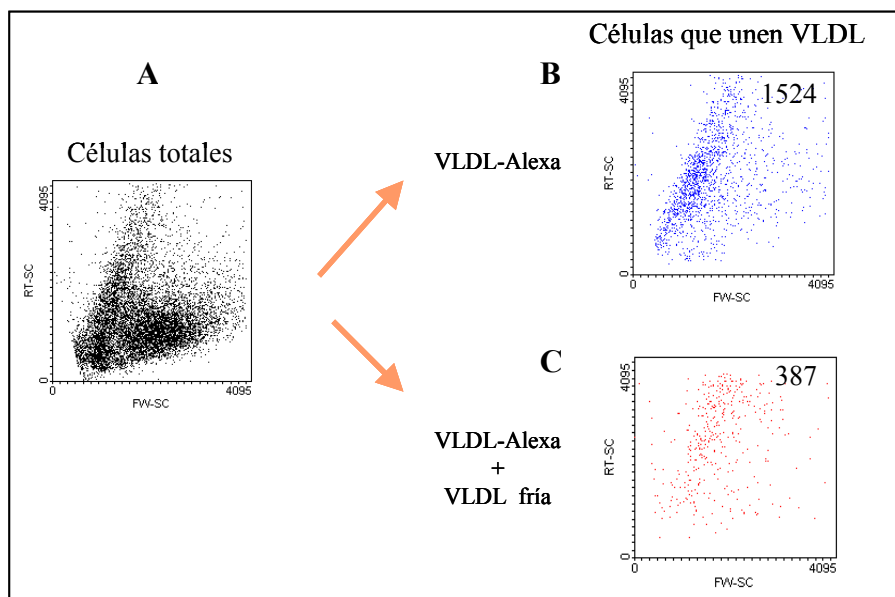
Este método es novedoso y de fácil aplicación. Permite utilizar la VLDL marcada para distintos fines como son la citometría de flujo y la microscopía de fluorescencia. Otra ventaja de este método es que no produce modificaciones estructurales de la lipoproteína, obteniéndose VLDL marcada de características similares a la VLDL nativa; esto no ocurre cuando se iodina VLDL ya que esa técnica produce la peroxidación de la lipoproteína.

### 3.II.2- VLDL se une a una subpoblación de linfocitos T activados y esa unión es específica

Se realizaron cultivos de CMB en presencia de ConA por 48 hs. Posteriormente se incubaron las células con VLDL marcada con DiI y con Alexa por 2 hs a 4 °C. Se analizó la unión de la lipoproteína a las células mediante citometría de flujo. Como se observa en la *Figura 27 A y B*, del total de células cultivadas, VLDL sólo se une a una población celular de tamaño pequeño (valores de FW-SC bajos) y rugosidad variada (valores de RT-SC en un amplio rango), y no a toda la población (*Figura 27 B*).

Posteriormente se realizó un cultivo en similares condiciones, luego de las 48 hs las células se incubaron con VLDL marcada y con distintas lipoproteínas nativas (LDL, VLDL y HDL) por 2 hs a 4° C. Se analizó por citometría de flujo si la unión de la VLDL marcada a las células era desplazada o no por la presencia de las lipoproteínas nativas. Se observó que la presencia de HDL y de LDL nativas no disminuyó la unión de VLDL a las células (número de células totales que unen VLDL:  $1524 \pm 68$ , preincubando con HDL:  $1486 \pm 52$ , preincubando con LDL:  $1510 \pm 72$ ). La presencia de VLDL nativa junto con VLDL marcada disminuyó la marca a razón de tres veces su valor (*Figura 27 C*). Estos resultados demuestran que VLDL se une en forma desplazable, específica y saturable a una población definida de linfocitos T activados sugiriendo que esta unión estaría mediada por un/os receptor/es presente/s solo en algunas poblaciones celulares.

Teniendo en cuenta las concentraciones de VLDL que se emplearon para realizar los experimentos de desplazamiento el  $K_{i50}$  (constante de inhibición del 50% de lo unido) está en el rango nanomolar (120 mg/l).



*Figura 27: Unión de VLDL a los linfocitos y desplazamiento de esa unión por VLDL fría.* Se cultivaron CMB en presencia de ConA por un período de 48 hs. Al cabo de ese tiempo se las incubó con distintas lipoproteínas (LDL, VLDL y HDL) nativas y con VLDL marcada con Alexa y con DiI según lo indicado en materiales y métodos. Se analizó por citometría de flujo la unión de VLDL marcada a las células. A representa el número total de células; B representa el número de células que unen VLDL marcada; C representa el número de células que unen VLDL cuando se las incubó con VLDL fría.

### *3.II.3-VLDL se une a los linfocitos T estimulados con ConA que presentan características morfológicas de linfocitos T en reposo*

Para estudiar la morfología de los linfocitos que unían VLDL, se realizó microscopía de fluorescencia de las células incubadas con el mitógeno por 48 hs. Luego se incubaron las células con VLDL marcada con Alexa (fluorescente verde) y con DiI (fluorescente rojo). Como se observa en la *Figura 28*, VLDL se unió solamente a linfocitos que presentan características morfológicas de células en estado de reposo (notar que en el panel inferior izquierdo de los 4 linfocitos hay solo uno teñido). La marcación con Alexa y con DiI muestra que hay una superposición de la marcación (color amarillo), indicando que VLDL se une a dominios de la membrana de los linfocitos estimulados con el mitógeno. Esta unión a la membrana se desarrolla sin que las porciones lipídicas y proteicas se separen, esto es importante ya que en el caso de los receptores tipos barredores los lípidos son internalizados y la proteína permanece en la superficie. Cuando se realizó un experimento similar empleando VLDL oxidada no hubo coincidencia de las marcas verde



y roja. Además el porcentaje de células marcadas con fue ínfimo. Esto último es similar a lo descrito para la unión de HDL a macrófagos (Krieger M y col., 1994).

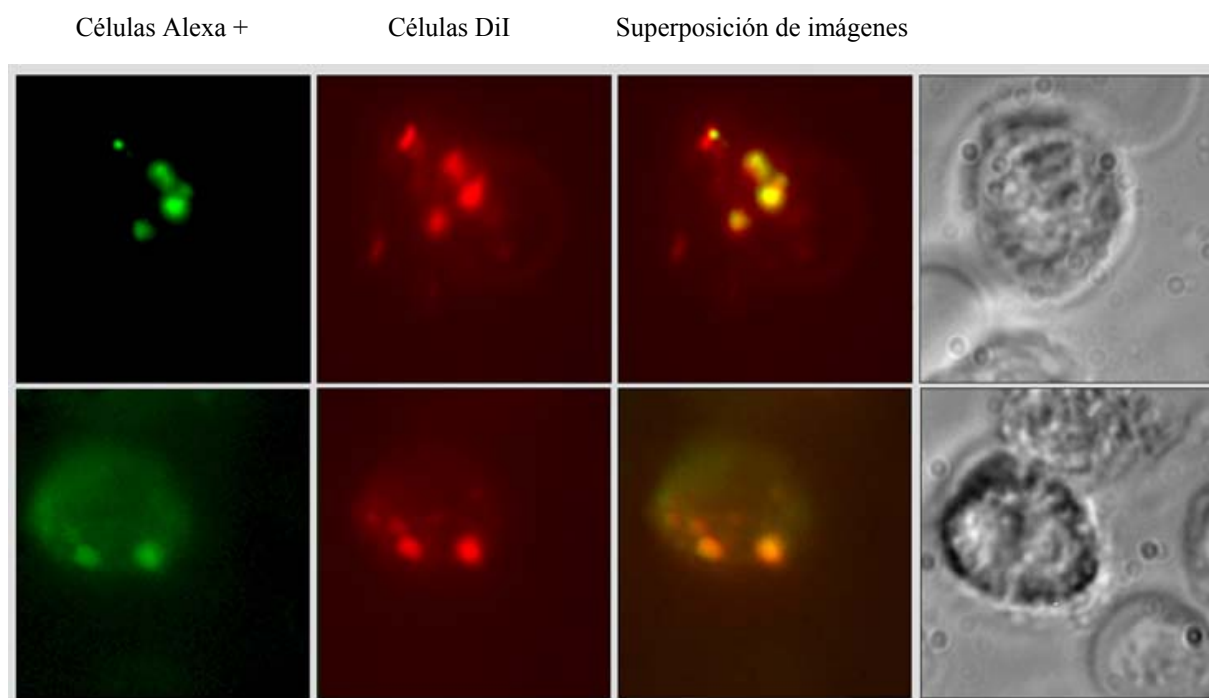


Figura 28: Visualización de la unión de VLDL a las células. Células CMB se cultivaron en presencia de ConA con VLDL por un período de 48 hs. Al cabo de ese tiempo se las incubó con VLDL marcada con Alexa (fluorescente verde) VLDL marcada con DiI (fluorescente rojo). Se muestran fotos de microscopía de fluorescencia y de fase.

### 3.II.4- VLDL se une principalmente a linfocitos T CD4<sup>+</sup>

Se estudió a qué población de linfocitos se une VLDL y si es la misma sobre la cual produce los efectos anti blastogénicos de inhibición de la proliferación. Se incubó CMB en presencia o no de ConA por 48 hs; finalizado el cultivo se incubó las células con VLDL marcada con Alexa y con un anticuerpo monoclonal anti-CD4 marcado con PE y se analizó por citometría de flujo.

Los resultados muestran (Tabla 6) que las células sin estimular presentan un bajo porcentaje (4%) de células que unen VLDL con respecto al total de células. Cuando las células fueron estimuladas con ConA se produjo un aumento considerable en el porcentaje (12%) de células que unen VLDL. El análisis de las distintas poblaciones de linfocitos demostró que VLDL se une en su mayoría a linfocitos CD3<sup>+</sup> (75%), y a un bajo porcentaje

a células CD3<sup>-</sup> (25%), probablemente linfocitos B ya que estos son abundantes en los preparados celulares de bazo de ratón. Muy llamativo es el hecho que casi exclusivamente se une a linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Cuando las células se estimularon con ConA las células que unen VLDL aumentan alrededor de tres veces, sobre todo la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (84%), concluyendo que VLDL se une principalmente a linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

|   | CMB    | CMB + ConA |
|---|--------|------------|
| % de células VLDL <sup>+</sup> del total de células | 4 ± 1  | 12 ± 2     |
| CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>                   | 75 ± 5 | 84 ± 5     |
| CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup>                   | 0      | 2 ± 1      |
| CD3 <sup>-</sup>                                    | 25 ± 3 | 15 ± 3     |

Tabla 6: Unión de VLDL a las distintas subpoblaciones de linfocitos T. Se cultivaron CMB en presencia de ConA por un período de 48 hs. Al cabo de ese tiempo se las incubó con VLDL marcada con Alexa y con anticuerpo monoclonal anti-CD4 según lo indicado en materiales y métodos. Los datos se informan como porcentaje de células CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup> y CD3<sup>-</sup>, promedio de determinaciones realizadas por triplicado.

### 3.II.5- Conclusiones

VLDL sólo se une a una población celular de tamaño pequeño (valores de FW-SC bajos) y rugosidad variada (valores de RT-SC en un amplio rango).

VLDL se une solamente a algunos linfocitos que presentan características morfológicas de células en estado de reposo. La marcación de VLDL con Alexa y con DiI demuestra que VLDL se une a dominios de la membrana de los linfocitos activados.

La unión de VLDL a los linfocitos es desplazable por VLDL nativa y no por las otras lipoproteínas, indicándonos que la unión es específica y saturable, con un Ki50 de aproximadamente  $1.5 \cdot 10^{-9}$  M.

Las células sin estimular presentan un bajo porcentaje de ellas que unen VLDL respecto al total de células. Cuando las células son estimuladas con el mitógeno se produce

---

un aumento de alrededor de tres veces en el porcentaje de células que unen VLDL. La unión de VLDL se verifica principalmente a linfocitos T CD4<sup>+</sup>, no se une a linfocitos T CD8<sup>+</sup>, pero sí se une, en un bajo porcentaje, a células CD3<sup>-</sup>.

Estos resultados indican que VLDL se une a una población definida de linfocitos T activados CD4<sup>+</sup>, sugiriendo que esta unión podría estar mediada por un/os receptor/es presente/s sólo en determinadas poblaciones celulares, ya que cumple con las características esperables de la unión de un ligando a un receptor: 1- saturabilidad, 2- desplazamiento, 3- especificidad de ligando y 4- especificidad en la distribución celular a la que se une. Faltaría demostrar si ésta interacción se relaciona con el efecto blastogénico.

### PARTE III

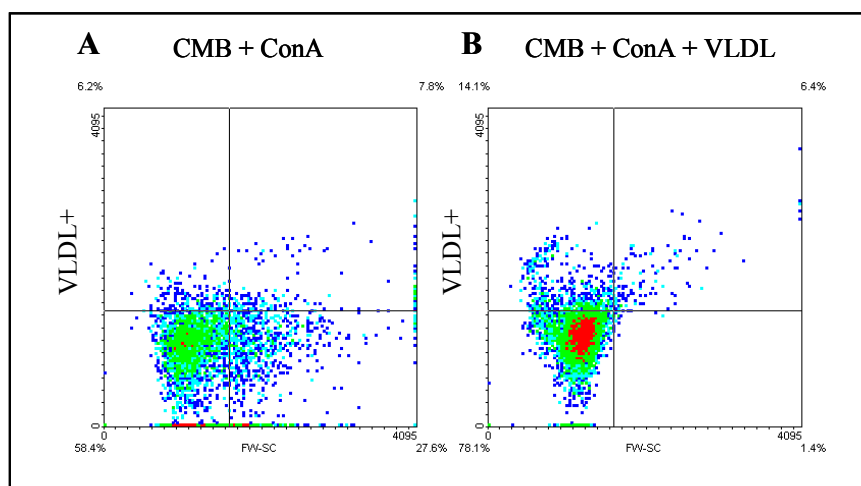
#### **A- ¿VLDL INTERACCIONA CON LAS CÉLULAS LINFOCÍTICAS EN LAS CUALES PRODUCE LA INHIBICIÓN DE LA RESPUESTA LINFOPROLIFERATIVA?**

##### *3.III.1- VLDL inhibe la proliferación de células distintas a las que se une*

Para determinar si la inhibición de la respuesta blastogénica de los linfocitos T por VLDL era debido a la interacción de VLDL con esas células, se cultivó CMB en presencia de ConA con o sin VLDL por 48 hs. Se realizó una citometría de flujo en la cual se incubaron las células con VLDL marcada con Alexa por 2 hs. Se determinó el porcentaje de células que unen VLDL y las células en las que hubo inhibición de la proliferación.

Se observó que las células cultivadas en presencia de ConA un 28% de células eran proliferantes (*Figura 29*, cuadrante derecho superior e inferior) y que en su mayoría no unían VLDL (*Figura 29 A*, cuadrante superior izquierdo). Cuando se cultivaron en presencia de ConA y VLDL por 48 hs (*Figura 29 B*), se observó hubo una inhibición de la proliferación significativa de las células que no unen VLDL (2%) (cuadrante derecho

inferior *Figura 29 A*). El total de células  $\text{VLDL}^+$  aumentó cuando se las cultivó en presencia de VLDL (cuadrantes superiores izquierdo y derecho), no observándose inhibición de la proliferación en las células  $\text{VLDL}^+$  proliferantes (*Figura 29 A*, cuadrante derecho superior), los porcentajes de células  $\text{VLDL}^+$  fueron similares en ambos casos (CMB + ConA: 8%, CMB + Con A + VLDL 7%).



*Figura 29: Determinación de la población de linfocitos T que unen VLDL marcada con la sonda fluorescente. Gráficos de doble parámetros; en el eje de las x tamaño de la célula vs intensidad de fluorescencia creciente de VLDL marcada con Alexa 488 en el eje de las y. CMB fueron cultivadas por 48 hs en presencia de ConA con (Panel B) o sin VLDL (panel A). Las CMB fueron incubadas con VLDL marcada fluorescentemente según lo descrito en materiales y métodos. El presente gráfico es representativo de cuatro experimentos realizados con preparaciones diferentes de CMB y VLDL.*

### *3.III.2- VLDL inhibe la progresión hacia la fase S/G2/M de las células T activadas, independientemente de si unen o no VLDL*

Se estudió si VLDL inhibe la proliferación de las células arrestándolas en alguna de las fases del ciclo celular, determinando si existe relación entre la inhibición de la proliferación y la progresión de las células activadas hacia el estadio S/G2/M. Esto se determinó en la sección anterior de este capítulo y se observó que VLDL, a las 48 hs de cultivo aumentó el % de células en G0/G1 y disminuyó el % de S/G2/M; mientras que la población de células hipodiploides (SubG0/G1) no fue afectado.

Se investigó si las células que no progresan en el ciclo celular son las que unen VLDL. Para ello se cultivaron células con el mitógeno y VLDL, posteriormente se las incubó con VLDL marcada con Alexa y con Ioduro de propidio (PI).

En la *Tabla 7* se muestran los datos del ciclo celular de células T ( $CD3^+$ ) obtenidos en experimentos anteriores ya mostrados en la *Tabla 4*, y los datos del ciclo celular de las células que unen VLDL. Como se puede observar, las células incubadas con el mitógeno presentan la mayoría de las células que unen VLDL en el estadio de S/G2/M (60%), mientras que las preincubadas con VLDL la mayoría de las células  $VLDL^+$  están en la fase G0/G1 del ciclo celular (62%). La pre incubación con VLDL no aumentó el % de células en la fase G0/G1 del ciclo celular indicando que la VLDL no incrementa la proporción de células susceptibles de encaminarse a la muerte celular programada. Otro dato interesante es que la inhibición de la progresión del ciclo celular es independiente de la unión de la VLDL a la célula, ya que como puede observarse en la *Tabla 7* la preincubación de las células con VLDL y el mitógeno produjo la inhibición de la progresión del ciclo celular en la fase G0/G1, con un porcentaje similar en las células  $CD3^+$  (69%) que en las células  $VLDL^+$  (62%).

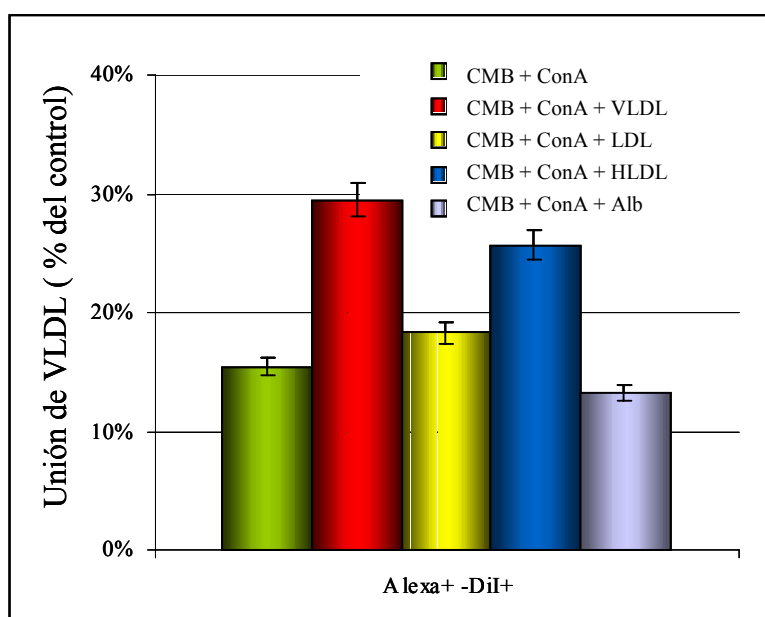
| % de células      | $CD3^+$  |        |        | $VLDL^+$ |        |        |
|-------------------|----------|--------|--------|----------|--------|--------|
|                   | SubG0/G1 | G0/G1  | S/G2/M | SubG0/G1 | G0/G1  | S/G2/M |
| 48 hs             |          |        |        |          |        |        |
| CMB               | 8 ± 2    | 80 ± 2 | 12 ± 2 | 21 ± 2   | 44 ± 2 | 33 ± 2 |
| CMB + ConA        | 8 ± 2    | 45 ± 2 | 49 ± 3 | 12 ± 3   | 26 ± 1 | 60 ± 4 |
| CMB + ConA + VLDL | 6 ± 2    | 69 ± 3 | 25 ± 3 | 11 ± 2   | 62 ± 3 | 27 ± 3 |

*Tabla 7: Modificación del ciclo celular por VLDL de las células T y de aquellas que unen VLDL.* Las células CMB ( $1 \times 10^6/ml$ ) fueron cultivadas por 48 hs en presencia o no de ConA con y sin VLDL. Al cabo de ese tiempo se las incubó con VLDL marcada con Alexa, se las fijó con Etanol 70% y posteriormente se les agregó una solución de Ioduro de Propidio (según lo descrito en materiales y métodos) para ver el contenido de DNA de las células que unen VLDL. Los datos fueron analizados por Citometría de Flujo y se informan como % de células en los distintos estadios del ciclo celular y son el promedio  $\pm$  SD de determinaciones realizadas por triplicado.

### 3.III.3- VLDL y en menor proporción HDL inducen un aumento del porcentaje de linfocitos activados que unen VLDL

Conociendo que la unión de VLDL era incrementada cuando las células se incubaron con mitógeno y VLDL, se estudió si este efecto era específico de VLDL o si otras lipoproteínas y proteínas séricas podían reproducirlo. Para ello se realizó el cultivo de CMB con ConA y con distintas lipoproteínas (LDL y HDL) y con albúmina. Al finalizar el cultivo se tiñeron las células con VLDL doblemente marcadas y se analizó la unión mediante citometría de flujo.

Los resultados obtenidos (*Figura 30*) mostraron que la preincubación con LDL no produjo un aumento significativo de las células que unen VLDL, y la preincubación con albúmina no mostró efecto alguno. La preincubación con HDL produjo un aumento del porcentaje de células que unen VLDL, pero de menor proporción comparado con el aumento que produce la preincubación con VLDL.



*Figura 30: Efecto de la preincubación con distintas lipoproteínas en la unión de la VLDL a las células.* Las células CMB fueron cultivadas por 48 hs en presencia o no de ConA, con distintas lipoproteínas (VLDL, LDL y HDL) y con albúmina por 48 hs. Al cabo de ese tiempo se incubaron las células con VLDL marcada con Alexa y con DiI. La unión se evaluó por Citometría de Flujo y los datos se informan como % de células que unen VLDL marcada con los fluorescentes y son el promedio  $\pm$  SD de determinaciones realizadas por triplicado.

## **B- CARACTERIZACIÓN DE LA/S MOLÉCULA/S QUE UNE VLDDL**

VLDDL se une a una/s molécula/s que se expresa/n principalmente en los linfocitos T CD4+ activados. Esta unión es desplazable únicamente por VLDDL nativa en concentraciones nanomolar y no por LDL ni por HDL. La expresión de esta/s molécula/s se induce por la preincubación con VLDDL y en menor medida por HDL. Esta/s molécula/s tiene/n varias de las características de los receptores descritos de lipoproteínas. Los experimentos anteriores indican que es muy poco probable que la/s molécula/s sea un receptor barredor, ya que no hay ninguna diferencia en la unión de VLDDL cuando hay lipoproteína modificadas.

Debido a la falta de disponibilidad en el mercado internacional de anticuerpos contra los receptores de las lipoproteínas, se intentó su identificación basándose en las propiedades que tienen éstos receptores de unir otras moléculas no lipoproteicas. Una de ellas es la “proteína asociada al receptor de LDL” (RAP). Esta proteína tiene la particularidad que se une solamente a la familia de receptores de LDL y no a la familia de receptores barredores. RAP se une a los distintos receptores con variadas afinidades.

### *3.III.4- La proteína asociada al receptor de LDL (RAP) inhibe la unión de VLDDL*

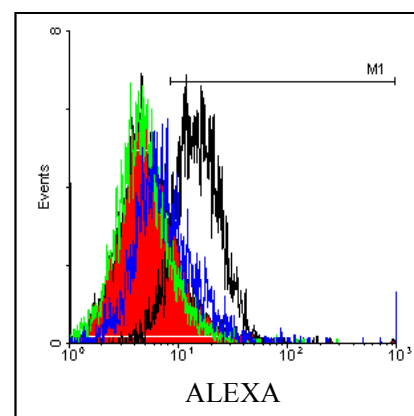
Hasta el momento en la literatura solo se ha descrito la presencia de LDL-R en los linfocitos. Por ello se realizaron ensayos con el objetivo de caracterizar la molécula a la cual se une VLDDL.

La familia de los receptores de lipoproteínas denominada “familia del receptor de LDL” (a diferencia de los “receptores barredores”) se caracteriza por unirse a una amplia variedad de ligandos entre ellos a apoE y a una proteína denominada proteína asociada al receptor (RAP). RAP es una proteína del retículo endoplásmico que interacciona fuertemente con los receptores de la familia del LDL-R. Uno de los integrantes de esta familia, el VLDDL-R une RAP con alta afinidad; esta unión inhibe fuertemente la de

cualquier otro ligando al receptor, en cambio LDL-R una RAP con baja afinidad (Bu G y col., 2000).

Basado en esta característica diferencial entre las dos grandes familias de receptores, se realizó un cultivo de CMB con ConA y VLDL por 48 hs. Al cabo de ese tiempo se les analizó por citometría de flujo, las células se pre-incubaron con RAP (a una concentración de 400nM) durante 2 hs y posteriormente con VLDL-Alexa otras 2 hs adicionales. Se determinó el % de células que unen VLDL y se observó que la preincubación con RAP produjo una inhibición de la unión de VLDL-Alexa. Se presentó una marcada disminución de la intensidad de fluorescencia de Alexa<sup>+</sup> (fluorescencia verde) como muestra el histograma de la *Figura 31 A*. En el gráfico determinamos un marcador (M1) que señala la mayor intensidad de fluorescencia (intensidad de fluorescencia positiva para Alexa); ésta fluorescencia se vio considerablemente disminuida por la preincubación con RAP. La tabla (*Figura 31 B*) indica el % de células VLDL<sup>+</sup> obtenidas de la región M1. Para CMB + ConA el % de células que unen VLDL no se vio significativamente modificado por la presencia de RAP (sin RAP: 19% de células positivas, con RAP: 14%). Cuando las células son preincubadas con VLDL el % de células que une VLDL aumenta a 88%, disminuyendo a 36% cuando las células son preincubadas con RAP.

| Pre-Incubación    | Incubación | % en M1 | MFCh |
|-------------------|------------|---------|------|
| CMB + ConA        | VLDL-Alexa | 19 ± 2  | 979  |
| CMB + ConA        | -RAP       | 14 ± 1  | 920  |
|                   | VLDL-Alexa |         |      |
| CMB + ConA + VLDL | VLDL-Alexa | 88 ± 5  | 1602 |
| CMB + ConA + VLDL | RAP        | 36 ± 3  | 1190 |
|                   | VLDL-Alexa |         |      |



*Figura 31: Inhibición de la unión de VLDL a las células por la RAP.* Se cultivaron células CMB en presencia de ConA con y sin VLDL por 48 hs. Al cabo de ese tiempo se las se pre-incubó con RAP durante 2 hs y posteriormente con VLDL-Alexa otras 2 hs, según lo descrito en materiales y métodos. Se determinó el % de células que unen VLDL mediante Citometría de Flujo. En A se muestra un Histograma de número de células en función de la intensidad de fluorescencia de Alexa, M1 indica la región de intensidad de fluorescencia que se considera positiva para Alexa. En rojo se indican las células que fueron cultivadas con ConA y posteriormente con VLDL-Alexa, en verde son las células estimuladas con ConA e incubadas con RAP y VLDL-Alexa; en negro son las células cultivadas con ConA y VLDL; seguida de una incubación con VLDL-Alexa, en azul se indican las células cultivadas con ConA y VLDL; seguida de una incubación con RAP y VLDL-Alexa. En B se muestra una tabla con los % de las células que une VLDL que están dentro de la región delimitada por M1. Los datos se informan como promedio de determinaciones realizadas por triplicado.



Con estos datos concluimos que VLDL se une a un receptor en membrana del tipo de la familia del receptor de LDL y no del tipo de los receptores barredores ya que la unión de VLDL se ve claramente inhibida por la presencia de RAP.

Este experimento también se realizó a 2 y 24 hs; se observó que VLDL se unió en muy baja proporción a las 2 hs de cultivo, incrementándose significativamente la unión cuando se cultiva a las células por 24 hs. La unión se vio inhibida en todos los casos por la presencia de RAP.

### 3.III.5- RAP se une a una proteína de membrana de un peso molecular de 90 Kda

Para profundizar aún más en el estudio del receptor que une VLDL se utilizaron lisados de CMB estimuladas por 48 hs con ConA y cultivadas en presencia o ausencia de dicha lipoproteína. Los lisados celulares fueron incubados con RAP-GST, (según lo indicado en materiales y métodos). Posteriormente se las incubó con un anticuerpo primario monoclonal anti-GST, y luego con un anticuerpo secundario de ratón anti-peroxidasa. Se reveló con el método de quimioluminiscencia aumentada.

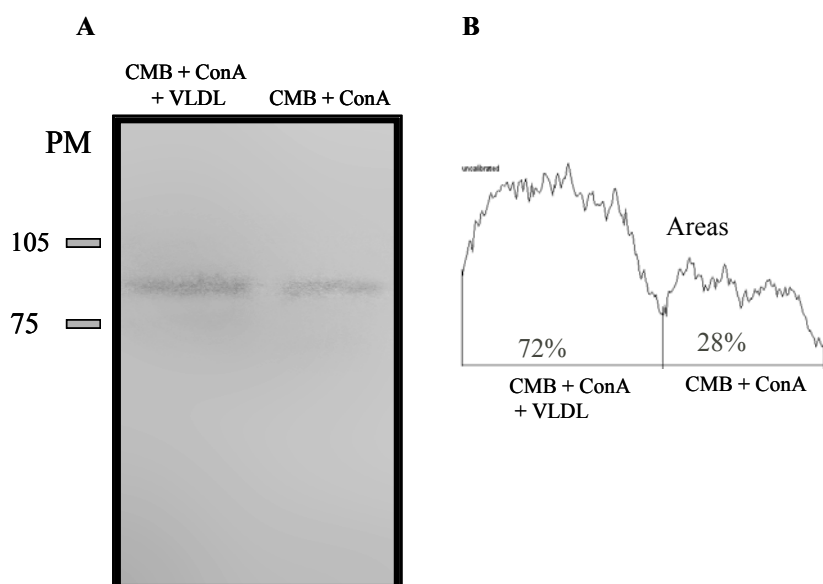


Figura 32. Expresión de la molécula que une RAP en células linfocíticas. Se cultivó células CMB en presencia de ConA con y sin VLDL por 48 hs. Al cabo de ese tiempo se lisaron las células y fueron sembradas en geles de poliacrilamida y transferidas a membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas y una de ellas (A) incubada con RAP-GST, luego con un anticuerpo monoclonal anti-GST y se reveló con el método de quimioluminiscencia. Las bandas resultantes fueron cuantificadas densitométricamente con el software Scion Image 1. En B se muestran las áreas de cada banda y los % de las mismas obtenidas por densitometría.

Como se observa en la *Figura 32 A*, RAP se unió a una proteína de membrana de un PM de aproximadamente 90 KDa, no concordando con ningún receptor de VLDL descrito hasta el momento en linfocitos T. Por densitometría se estimaron las áreas de las bandas, y se observó que la preincubación con VLDL produjo un aumento (mayor de tres veces) de la expresión del receptor que une RAP (CMB + ConA: 28%; CMB + ConA + VLDL: 72%). Debe aclararse que RAP sólo se une a la familia de receptores de LDL y no se une a otras moléculas (Melman L y col., 2001).

### 3.III.6- Conclusiones

VLDL inhibe la proliferación de células distintas a las que se une. La mayoría de las células estimuladas con el mitógeno que unieron VLDL están en la fase G0/G1 del ciclo celular. La inhibición de la progresión del ciclo celular es independiente de la unión de la VLDL a la célula, ya que la preincubación de las células con VLDL y el mitógeno produjo la inhibición de la progresión del ciclo celular, con un % similar en la fase G0/G1 tanto si son CD3<sup>+</sup> o si unieron VLDL.

La preincubación con VLDL y en menor proporción con HDL indujeron un aumento del porcentaje de linfocitos activados que unen VLDL. LDL y albúmina no producen ninguna modificación en la unión de VLDL. Estos resultados indican que VLDL también afecta a las células que unen VLDL.

VLDL se une a un receptor de membrana del tipo de la familia del receptor de LDL y no del tipo de los receptores barredores ya que la unión de VLDL se ve claramente inhibida por la presencia de RAP, por las razones indicadas en las conclusiones del punto anterior

La proteína RAP se une a un receptor de la familia de LDL-R presente en los linfocitos activados con concanavalina A, de un peso molecular de 90 kDa (similar al de VLDL-R) y ésta proteína es aumentada por la preincubación con VLDL.

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES GENERALES

Para responder al objetivo general de esta tesis de estudiar la regulación de la activación y proliferación de las células que forman la lesión aterosclerótica inicial por las lipoproteínas antiaterogénicas (HDL) y aterogénicas (VLDL), se enumeran a continuación las conclusiones a las que se ha arribado a partir de los resultados obtenidos:

### **REGULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS FORMADORAS DEL ATEROMA POR HDL.**

HDL, una lipoproteína anti-aterogénica, suprime la respuesta linfoproliferativa de la célula T inducida por varios mitógenos. Cuando esta lipoproteína es debilmente oxidada “in vitro” pierde esta capacidad.

Un resultado importante que contribuye a enfatizar las propiedades anti-inflamatorias de la HDL, es que inhibe la respuesta blastogénica sin afectar la proporción relativa de los linfocitos T cooperadores y citotóxicos, esto indica que HDL actúa en forma similar a la de los fármacos anti-inflamatorios y que es distinta de las drogas inmunosupresoras que inhiben principalmente la proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de sangre periférica humana.

Otro hallazgo importante es que HDL inhibe la expresión de los marcadores de activación CD25 (receptor de IL-2) y CD2. Estos resultados refuerzan la hipótesis que los efectos anti-blastogénicos están relacionados con las acciones anti-inflamatorias, ya que la mayoría de las drogas anti-inflamatorias impiden la expresión del receptor de IL-2 y de CD2. Estos datos corroboran que HDL dirige los linfocitos T activados hacia un fenotipo de células en reposo.

Sin duda otra vía por la que HDL ejerce un efecto anti-inflamatorio es que produce una inhibición de la liberación de PGE<sub>2</sub>, mediador temprano de la inflamación,

interfiriendo desde el comienzo con la progresión del ciclo celular de las células que se encuentran en la lesión aterosclerótica.

En cuanto a los mecanismos subyacentes al efecto antiproliferativo de HDL se encontró que produce una inhibición de la expresión de mediadores esfingolipídicos, principalmente LacCer. Además, HDL estimula la fosforilación de Map Kinasa en los linfocitos. Estos dos últimos datos refuerzan la noción de que HDL regula la progresión del linfocito T a lo largo del ciclo celular, ya que ERK1 (p44) interviene en cascadas de señalización que son consecuencia de la unión y activación del complejo del receptor de la célula T que culmina en la multiplicación celular. Esta señal produce la activación de la secuencia de señales intracelulares Ras/Raf-1/MEK/MAPK en los linfocitos humanos.

### **REGULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS FORMADORAS DEL ATEROMA POR VLDL.**

VLDL, una lipoproteína aterogénica, produce inhibición en forma dosis dependiente de la proliferación de células de bazo de ratón inducida por la presencia de ConA. El 50% de la inhibición se observó alrededor de los 38 ug /ml de VLDL. Este efecto antiblastogénico no es producido por LDL ni por albúmina, lo cual sugiere especificidad.

Un dato interesante es que VLDL no produce el efecto antiproliferativo a las 24 hs; la inhibición se observó recién después de 48 hs de cultivo. VLDL disminuye drásticamente la población de linfocitos con morfología de blastos (Fw-SC elevados) que expresan CD3 (linfocitos T) y en menor medida aquellos que expresan CD19 (linfocitos B).

Este mecanismo por el cual VLDL manifiesta efectos antiproliferativos se relaciona con el bloqueo de la progresión de las células T en el ciclo celular acumulando la población en la fase G0/G1, por lo tanto produciendo la depleción de células T totalmente activadas, o sea que expresan IL-2R.

Estos resultados contrastan con las propiedades aterogénicas de esta lipoproteína ya que una inhibición de la proliferación o multiplicación de las células inhibiría el crecimiento del ateroma; sin embargo hay otras células que forman la lesión germinal cuya proliferación puede ser afectada por factores liberados por células T. Apoyando ésta

hipótesis se detectó que VLDL aumenta la producción de IL-2 y disminuye la de IL-4 indicando que VLDL promueve una respuesta de tipo inflamatoria. Esto es concordante con el hecho que VLDL produce una disminución de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> principalmente.

Uno de los hallazgos más importantes es que VLDL marcada con sondas fluorescentes se une a una población de linfocitos de tamaño pequeño y rugosidad variada, que presentan características morfológicas de células en estado de reposo. VLDL se une a dominios de la membrana de esta población linfocitos sin internalizarse y sin que haya liberación selectiva de lípidos de la lipoproteína.

Ensayos de competencia se demostró que la unión de VLDL a los linfocitos es desplazable por VLDL nativa y no por otras lipoproteínas, indicando que la unión es específica y saturable. Esta unión se ve incrementada cuando se estimulan las células con un mitógeno, y aumenta aún más cuando se preincuban las células con el mitógeno y VLDL. VLDL se une principalmente a linfocitos T CD4<sup>+</sup>, no se une a linfocitos T CD8<sup>+</sup>, pero sí lo hace en un bajo porcentaje a células CD3<sup>-</sup>.

Estos resultados indican que VLDL se une a una población definida de linfocitos T activados CD4<sup>+</sup>, sugiriendo que esta unión estaría mediada por un/os receptor/es presente/s sólo en algunas poblaciones celulares, el/los cual/cuales tendría una constante de afinidad del orden nanomolar y que no sería/n receptores que se caracterizan por sufrir endocitosis (LDL-R) y que no participan en la liberación selectiva de lípidos de lipoproteínas (SRs).

VLDL no sólo inhibe la proliferación de las células que la unen, sino que inhibe la de las células que no unen VLDL. La mayoría de las células estimuladas con el mitógeno que unieron VLDL están en la fase G0/G1 del ciclo celular. Esta inhibición de la progresión del ciclo celular es independiente de la unión de la VLDL a la célula, ya que la preincubación de las células con VLDL y el mitógeno produce la inhibición de la progresión del ciclo celular en la fase G0/G1 unan o no VLDL.

La preincubación de las células y el mitógeno con VLDL y en menor proporción con HDL inducen un aumento del porcentaje de linfocitos activados que unen VLDL. LDL y albúmina no producen ninguna modificación en la unión de VLDL. Esto resultados indican que VLDL también afecta a las células que unen VLDL.

VLDL se une a un receptor de membrana del tipo de los de la familia del receptor de LDL (pero no LDL-R) y no del tipo de los receptores barredores ya que la unión de VLDL se ve claramente inhibida por la presencia de RAP, proteína chaperona que se une exclusivamente a la familia de LDL-R. La preincubación de las células con el mitógeno y con VLDL aumenta la expresión de la proteína que une RAP, sugiriendo por el peso molecular de la misma que VLDL se está uniendo a VLDL-R o a un receptor aún no descrito . Esta es la primera vez que se sugiere la existencia de receptor de VLDL en linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

## **DISCUSIÓN**



## REGULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS FORMADORAS DEL ATEROMA POR HDL.

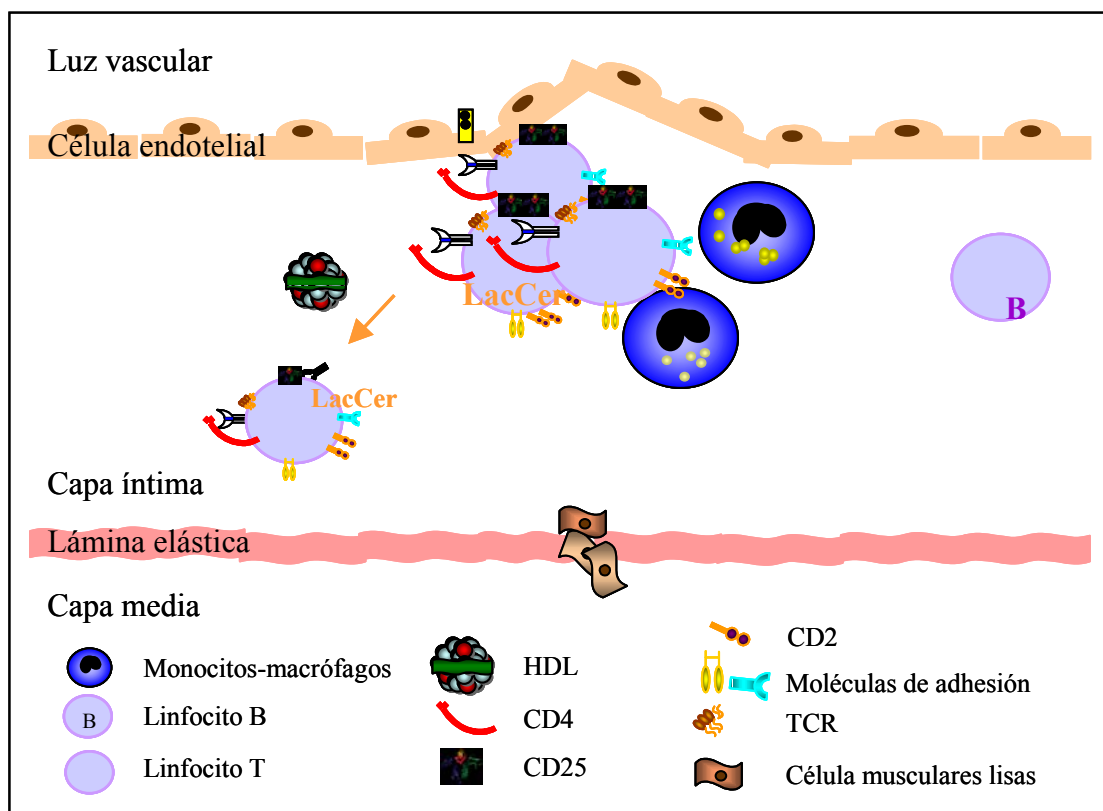


Figura 33: Vías de inhibición de la proliferación de los linfocitos T por HDL. Esquema de los resultados obtenidos en el capítulo 2 de esta tesis, en relación a la regulación de la proliferación de las células que forman las estrías grasas por HDL. Se muestra la acción de HDL sobre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados, disminuyendo la expresión de CD25, CD2 y LaCer.

La inflamación es uno de los mecanismos patológicos causante de una gran variedad de enfermedades. La reacción inflamatoria involucra complejas interacciones entre células inflamatorias (neutrófilos, linfocitos, y monocitos/macrófagos) y células vasculares (células endoteliales y células musculares lisas). La inflamación vascular se puede limitar con mecanismos contraregulatorios anti-inflamatorios que mantienen la integridad y la homeostasis de la pared vascular. Una de las señales anti-inflamatorias externas es la HDL (.Tedgui A y col., 2001).

Una de las funciones más conocidas de la HDL es la de promover el eflujo de colesterol de las células. El eflujo de colesterol de los macrófagos lleva a la reducción de la formación de las células espumosas, dando como resultado la inhibición del proceso

---

inflamatorio. Otro efecto protector de la HDL es la capacidad de inhibir la oxidación de LDL (Navab M y col., 2000).

HDL ha mostrado tener muchos efectos anti-ateroescleróticos, varios de los cuales son potencialmente anti-inflamatorios. La HDL puede unir y neutralizar lipopolisacáridos pro-inflamatorios, y puede también neutralizar los efectos de la proteína reactiva de fase aguda SAA, que es transportado predominantemente unido a HDL (Burger D y col., 2002; Artl A y col., 2000). Los resultados mostrados en el capítulo demuestran que HDL fue capaz de suprimir la respuesta linfoproliferativa de la célula T inducida por varios mitógenos. Por el contrario cuando se oxida, la HDL pierde esta capacidad.

La oxHDL que se empleó en este trabajo es una preparación de oxHDL levemente oxidada (Salmon S y col., 1992; Kivatinitz SC, y col., 1997). Los resultados, junto con los hechos, demuestran que la oxHDL levemente oxidada es menos efectiva en provocar el eflujo de colesterol de las células (Morel DW y col., 1994). La HDL de animales hipercolesterolémicos está más peroxidada que la de los animales controles (Artola RL y col., 1997), esa HDL es más susceptible que la LDL a la oxidación leve (Viani Py col., 1996), vehículo principal para el transporte de los hidroperóxidos lipídicos plasmáticos (Bowry WV y col., 1992) y esa oxHDL es citotóxica par las células en cultivo (Kivatinitz SC, y col., 1997) sugiriendo que la oxidación de HDL puede ser un factor importante en la formación del ateroma. En resumen, los sujetos normocolesterolémicos que tienen altos niveles de HDL están protegidos contra la respuesta proliferativa descontrolada de los linfocitos que lleva a la formación del ateroma, mientras que en sujetos hipercolesterolémicos este efecto antiaterogénico se pierde debido a la oxidación de la HDL.

Otro resultado importante que contribuye a enfatizar las propiedades anti-inflamatorias de la HDL es que inhibe la respuesta blastogénica sin afectar la proporción relativa de los linfocitos T cooperadores y citotóxicos. Este efecto de HDL indica que su acción antiproliferativa es similar a aquella que ejercen los fármacos anti-inflamatorios y es diferente de la de fármacos inmunosupresores que inhiben principalmente la proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Los resultados de los experimentos realizados con los marcadores de activación de los linfocitos T sugieren que los efectos anti-blastogénicos están relacionados con las acciones anti-inflamatorias, ya que la mayoría de los fármacos anti-inflamatorios impiden la expresión del receptor de IL-2 y de CD2. Por lo tanto HDL

---

dirige a los linfocitos T activados hacia un fenotipo de células en reposo como las drogas anti inflamatorias no esteroideas.

HDL produce inhibición de diversos marcadores de activación tempranos que normalmente se ven incrementados en la placa ateromatosa. Entre ellos podemos destacar la inhibición de la liberación de PGE<sub>2</sub> y de la marcación de LacCer. En las estrías grasa se acumulan grandes cantidades de LacCer conjuntamente con oxLDL, factores de crecimiento y citoquinas inflamatorias (Chatterjee S. 1998). Se ha descrito que este glicoesfingolípido estimula la proliferación “in vitro” de células musculares lisas de aorta (Chatterjee S, 1991).

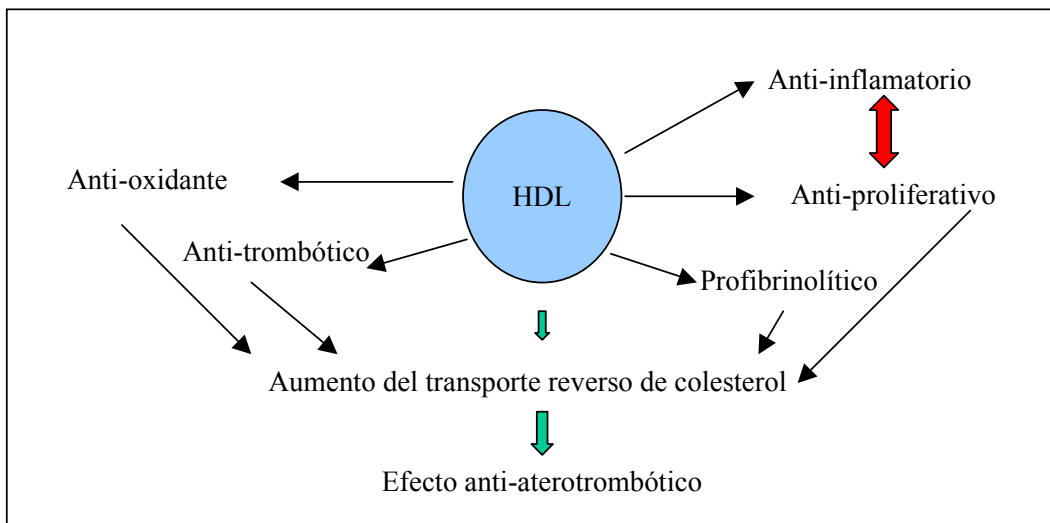
Varios estudios “in vitro” han demostrado que la PGE<sub>2</sub> induce la producción de IL-2 y la expresión de su receptor (Minakuchi R y col., 1990; Baker PE y col., 1981; Walker C y col., 1983) por lo tanto la disminución que HDL produce en la liberación de PGE<sub>2</sub> podría ser una de las causas de la disminución de CD25 (IL-2R) en estas células T y además es concordante con el papel anti-inflamatorio de HDL ya que disminuye la liberación de una citoquina pro-inflamatoria. La disminución de PGE<sub>2</sub> también es antiaterogénica ya que niveles aumentados de PGE<sub>2</sub> incrementan la expresión del receptor de LDL en las células musculares lisas y de los fibroblastos (Nield H y col., 1993).

Los receptores activados por el proliferador del peroxisoma (PPAR) son factores de transcripción que se expresan en la mayoría de las células de la pared vascular así como en las lesiones ateroscleróticas (Barbier O y col., 2002; Chinetti G y col., 2000), en donde impiden el desarrollo del proceso aterogénico, modulando los estadios tempranos de la placa. PPAR $\gamma$ , es activado por factores de crecimiento los cuales son fosforilados a través de la vía de señalización de la Map-kinasa. Se ha descrito en macrófagos y fibroblastos (Han J y col., 2002) que HDL produce un aumento de la traslocación al núcleo y de la fosforilación de PPAR $\gamma$ , y un aumento de la fosforilación de las dos isoformas de Map Kinasa p44 y p42. Los resultados obtenidos en esta tesis sobre los efectos de HDL en los linfocitos T concuerdan con estos datos de literatura, ya que se observa un claro aumento de la fosforilación de Map kinasa.

Los resultados aquí descritos sugieren que los efectos anti-ateroscleróticos de la HDL son importantes en los primeros estadios del desarrollo de la placa ateromatosa. Los hallazgos sobre HDL expanden las cualidades antiateroscleróticas de la misma

relacionando las propiedades antiproliferativas que posee con sus propiedades anti-inflamatorias (*esquema 1*).

Los resultados del capítulo 2 son de utilidad en el estudio de los mecanismos por los cuales HDL ejerce una acción de anti-inflamatoria y por lo tanto contribuirán al desarrollo de fármacos más específicos para el tratamiento o la prevención del desarrollo de la aterosclerosis y que probablemente posean menos efectos colaterales o secundarios perjudiciales para el organismo en general.



*Esquema 1:* Esquema de las múltiples acciones biológicas de HDL como un potente anti-aterotrombótico. Adaptado de Shah PK y col., 2001. A la figura se le agregó la flecha roja que interrelaciona el efecto anti-inflamatorio que describen los autores con el efecto anti-proliferativo que nuestros resultados indican.

## REGULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS FORMADORAS DEL ATEROMA POR VLDL.

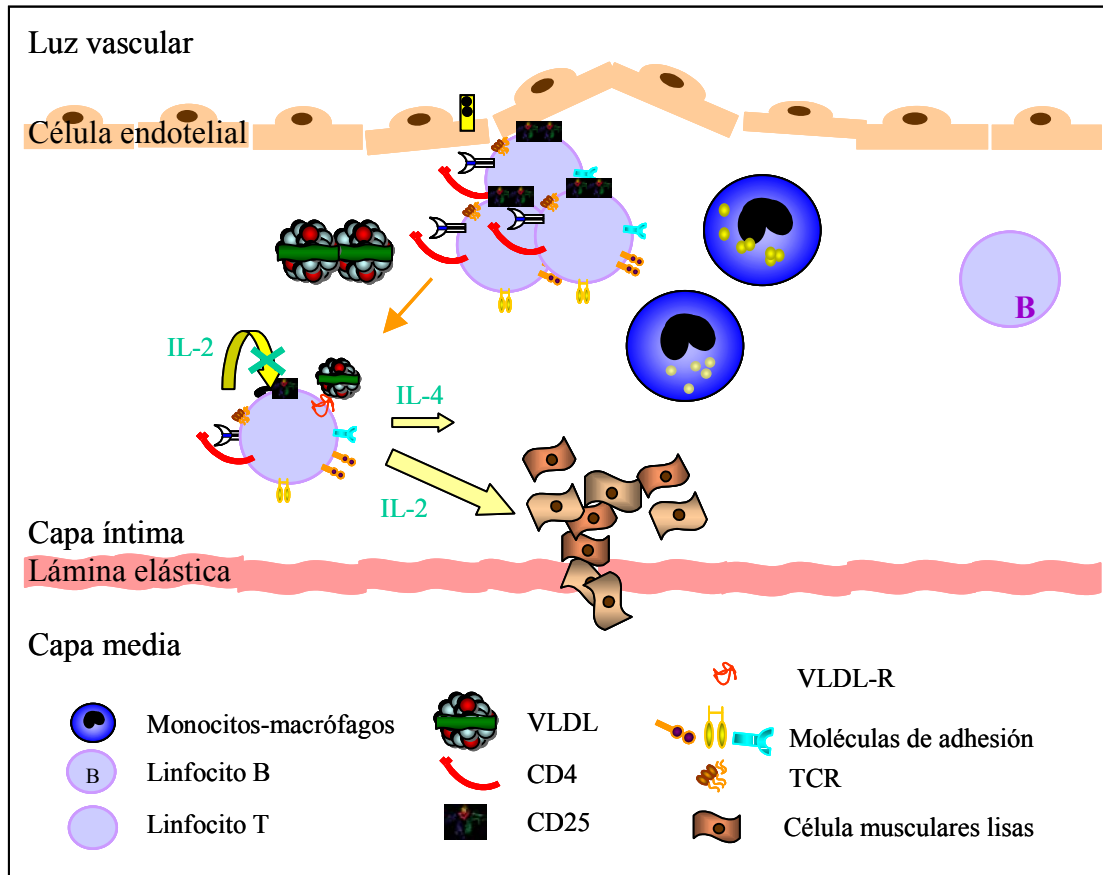


Figura 34: Vías de inhibición de la proliferación de los linfocitos T por VLDL. VLDL una lipoproteína aterogénica inhibe la proliferación de las células T presentes en la placa germinal pero produce condiciones proinflamatorias al estimular la secreción de mediadores de la inflamación como la interleukina 2 que es un estímulo para la proliferación de las células musculares lisas, también inhibe la producción de interleukina 4 que inhibe la proliferación de estas células. VLDL inhibe específicamente los linfocitos CD25+ y CD4+ que son principalmente linfocitos proliferantes. Lo que es interesante en el caso de VLDL es que cambia la proporción de linfocitos CD4+ altamente positivos que tienen características morfológicas de blastos (alto fw) en linfocitos no blásticos alterando mínimamente la expresión de CD4.

VLDL, una lipoproteína aterogénica, inhibe la proliferación de las células T presentes en la placa germinal pero produce condiciones proinflamatorias al estimular la secreción de mediadores de la inflamación como la IL-2 que es un estimulante de la proliferación de las células musculares lisas; también inhibe la producción de IL-4 que inhibe la proliferación de estas células (Geng Y y col., 1995; Ross R, 1993).

---

VLDL inhibe específicamente los linfocitos T CD25<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> que son principalmente linfocitos proliferantes (Ridgway W y col., 1998). Lo que es interesante en el caso de VLDL es que transforma los linfocitos CD4<sup>+</sup> (con alta densidad de superficie de antígeno) que tienen características morfológicas de blastos (alto Fw-SC) en linfocitos en estado de reposo (ya que disminuyen los dos marcadores de activación medidos CD4, CD25), alterando minimamente la expresión de CD8.

VLDL ejerce su efecto sobre las células previamente activadas por algún estímulo como es la presencia de un mitógeno. VLDL se une principalmente a una población de células de tamaño pequeño y variada rugosidad con características de células en reposo. Esta población celular aparece sólo después de 48 horas de estimulación y por los cálculos de la cantidad de VLDL unida se desprende que todas las células de la población son positivas. Es interesante notar que ninguno de los otros marcadores de superficie probados (CD3, CD25 y CD4) distingue entre estas dos poblaciones de células T.

Empleando experimentos de competencia se determinó que esta unión de la lipoproteína es desplazable por la propia VLDL y no por otra lipoproteína y por lo tanto es específica. Tanto de los datos de unión como de desplazamiento es factible calcular que el Kd para VLDL es del orden de 1,5 nM.

Otra característica importante de la unión es que es inhibida en forma irreversible por la proteína RAP. Esta proteína se une a toda la familia del receptor de LDL con distintas afinidades, uniéndose con baja afinidad (250 nM) a LDL-R y con alta afinidad (1-10 nM) a ApoER2, LRP y VLDL-R (Bu G y col., 2000). Esta característica excluye a otra gran familia de receptores de lipoproteínas que son los receptores barredores, ya que ellos no unen RAP.

Hasta el momento en la literatura no se ha descrito la existencia de un receptor de VLDL o ApoER2 en linfocitos; el único receptor descrito es el de LDL. El receptor al que VLDL se está uniendo no es el receptor de LDL ni ApoER2 por diversas razones. Primero: en experimentos de competición se observó que la unión de VLDL no es desplazable por la presencia de LDL sino únicamente por la presencia de VLDL, unión que es saturable y posee un Ki50 de 10<sup>-9</sup> aproximadamente. Segundo: la preincubación de las células y el mitógeno conjuntamente con VLDL produce un aumento de la expresión del receptor, con el consiguiente aumento de la unión de VLDL a las células. Este efecto es opuesto al que se observa con LDL-R, ya que la expresión de éste disminuye cuando se cultivan linfocitos

---

con el mitógeno y LDL (Chan PK y col., 1998). Tercero: al incubar las células con el mitógeno y VLDL se puede observar por western blot una banda de 90 kDa a la cuál une RAP. Este peso molecular concuerda con el peso molecular de una de las variantes del receptor de VLDL (Sakai J y col., 1994). Los otros receptores de esta familia poseen pesos moleculares mayores a 130 kDa (apoER2 y LDL-R) y mayores a 200 kDa (LRP) (Herz J y col., 1991).

Por lo tanto los datos obtenidos son sólo compatibles con la unión de VLDL a VLDL-R. No podemos descartar que se trate de un receptor aún no descrito; para ello sería necesario obtener la secuencia de aminoácidos o probar la identidad con una batería de anticuerpos monoclonales contra este receptor.

La posibilidad de que fuese una molécula diferente a las ya descritas es remota ya que las moléculas que unen RAP han sido ampliamente estudiadas (Melman L y col., 2001) e identificadas (Andersen OM y col., 2000). Una característica de RAP la diferencia de otras chaperonas y es que RAP es una chaperona especializada que funciona únicamente con los miembros de la familia de LDL-R mientras que las otras chaperonas interactúan con una amplia variedad de proteínas estructural y funcionalmente diferentes (Melman L y col., 2001).

Todos estos resultados tienden a consolidar el más actual punto de vista acerca de que la aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria sostenida por una respuesta de células T cooperadoras tipo 1 (Benagiano M y col., 2003).

Los datos presentados con respecto al aumento de la expresión del/los receptor/res de VLDL por preincubación con VLDL explican lo observado por otros investigadores con respecto a que habría una inducción de la expresión de los receptores de VLDL y de los barredores durante la progresión de la lesión aterosclerótica (Hiltunen TP y col., 1998). El estudio de las lipoproteínas y sus distintos efectos son importantes para el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas y para la prevención de la aterosclerosis, siendo un blanco eficaz el receptor de VLDL en estas células y así lograr la regulación de la activación y la proliferación de las células que forman la placa ateromatosa.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**



### **Purificación de las lipoproteínas humanas**

Las lipoproteínas humanas VLDL (lipoproteína de muy baja densidad), LDL (lipoproteína de baja densidad), y HDL (lipoproteína de alta densidad) fueron obtenidas de muestras de suero humano fresco de donantes sanos. Se purificaron por ultracentrifugación secuencial en gradientes salinos de bromuro de potasio (BrK) y Tris-HCl 10mM, a una densidad final de 1019 g/ml, 1063 g/ml y 1210 g/ml para VLDL, LDL y HDL respectivamente. Para su rápida obtención se empleó una ultracentrífuga de mesa OPTIMA TL (Beckman, Ins.) con un rotor de ángulo fijo TLA-100.2. Se centrifugó a 900000 rpm por 2 hs para cada lipoproteína. Se dializaron contra Tris-HCl 10mM, EDTA 0,01% por 24 hs con tres cambios de buffer y se esterilizaron con un filtro de 0,2  $\mu$ . Se guardaron a 4° C hasta su utilización.

### **Oxidación de las lipoproteínas**

Las lipoproteínas (40-150  $\mu$ g de proteína) fueron oxidadas siguiendo dos protocolos diferentes: 1) mediante una irradiación a una longitud de onda entre 290 y 385 nm en cuvetas de cuarzo (1 cm de paso de luz, conteniendo 1 ml de la preparación de lipoproteínas) por 30 minutos, como fue descrito por Salmon y col., 1992); 2) por el agregado de  $\text{CuSO}_4$  15  $\mu$ M (en cuvetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz y volumen final de 1,5 ml); la oxidación fue monitoreada a 37° C por registro continuo de la absorbancia a una longitud de onda de 234 nm, usando un espectrofotómetro de doble haz.

### **Purificación de células mononucleares de bazo de ratón (CMB)**

Las células mononucleares de bazo de ratón (CMB) se obtuvieron de ratones Balb-c (CNEA, Argentina) endocriados, de 6-8 semanas de edad. Se extrajeron los bazos en esterilidad y fueron colocados en cápsulas de petri con medio RPMI-1640 (SIGMA Chemical Co., USA). Los bazos se disgregaron con un cedazo, la suspensión celular se la colocó posteriormente en un tubo de 14 ml y se lo completó con medio RPMI para su lavado. Se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm en una centrífuga de mesa, se retiró el medio y se repitió la operación de lavado. Se descartó el sobrenadante y a las células se le agregó 5 ml de la solución de lisis  $\text{NH}_4\text{Cl}$  8,3 g/l en Tris-HCl 0,01 mol/l pH= 7,5

(SIGMA Chemical Co., USA), se lo homogeneizó e incubó a temperatura ambiente con agitación ocasional. Las células fueron lavadas 3 veces con RPMI-1640 5% SFB, contadas en cámara de Neubauer y sembradas en placas multipocillos.

### **Purificación de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC)**

Las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) se obtuvieron a partir de sangre de donadores sanos normocolesterolémicos. La sangre se extrajo con heparina sódica (5000 UI/ ml). Las células mononucleares se obtuvieron por centrifugación en un gradiente de Ficoll-Histopaque densidad= 1096 g/ml (SIGMA Chemical Co., USA), durante 30 minutos a 2000 rpm en un centrífuga de mesa. La nube de células mononucleares se extrajo de cada tubo con pipeta tipo Pasteur y se la colocó en tubo de 14 ml para su lavado con medio RPMI-1640. El proceso de lavado fue de 10 minutos a 1500 rpm en centrífuga de mesa y se realizó 3 veces. Las células fueron resuspendidas en medio RPMI-1640 5% de suero fetal bovino (SFB) y contadas en cámara de Neubauer para su posterior sembrado en las placas multipocillos.

### **Ensayos de proliferación celular**

Se cultivaron CMB ( $2 \times 10^5$ ) en placas de 96 pocillos por triplicado, en presencia de Concanavalina A (Con A, 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), con o sin lipoproteínas (50  $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ ) en un volumen total de 0,2 ml, en medio RPMI-1640 suplementado con 5% de SFB y gentamicina 100  $\mu\text{l}/100\text{ml}$ . Se realizaron en estufa con una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  95% de aire a 37° C por un período de 24 y 48 hs. Para evaluar la proliferación celular, se agregó a los cultivos 18 hs antes de la finalización del mismo 1  $\mu\text{Ci}$  de [ $^3\text{H}$ ]-timidina. Una vez finalizado el cultivo, se cosecharon las células y se midió la radioactividad en un contador de centelleo líquido.

Se cultivaron las células PBMC ( $1 \times 10^6$  células) en placas multipocillos (96 pocillos) por triplicado en presencia o no de fitohemaglutinina (PHA, 0,3%) con o sin HDL (50  $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ ) en medio RPMI-1640 suplementado con 5% de SFB y gentamicina 100  $\mu\text{l}/100\text{ml}$ . Se realizaron en estufa con una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  95% de aire a 37° C por

---

un período de 48 y 72 hs. Par evaluar la proliferación se utilizó la misma técnica que para CMB.

### **Determinaciones por Citometría de flujo.**

#### *Análisis fenotípico de las poblaciones de linfocitos*

Se sembraron las células CMB ( $1 \times 10^6$  células/ ml) en placas multipocillos (24 pocillos). Se cultivaron en presencia o no de Con A ( $3 \mu\text{g/ml}$ ) con o sin VLDL ( $250 \mu\text{l/pocillo}$ ) en medio RPMI-1640 suplementado con 5% de SFB y gentamicina  $100 \mu\text{l}/100\text{ml}$ . Se realizaron en estufa con una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  95% de aire a  $37^\circ \text{C}$  por un período de 24 y 48 hs. Al cabo de ese tiempo se separaron mediante centrifugación ( $1500 \text{rpm}$  10 minutos en centrífuga de mesa) las células del sobrenadante del cultivo, éste último se lo guardó a  $-20^\circ \text{C}$  para una posterior determinación de citoquinas. Las células fueron lavadas 2 veces con solución salina balanceada de HANKS que contenía 1 % de Albúmina sérica bovina (ASB) y 0,1% de  $\text{NaN}_3$ . Las células fueron contadas en un cámara de Neubauer y se determinó la viabilidad de las mismas mediante la técnica de exclusión de Azul de Tripán (colorante supravital). Las células ( $1 \times 10^6$ ) fueron incubadas con un anticuerpo anti- CD32/CD16 de ratón ( $40 \mu\text{l}/ 1 \times 10^6$  células) durante 1 hora a  $4^\circ \text{C}$  con el fin de bloquear la unión inespecífica de las inmunoglobulinas a través del receptor Fc (fragmento constante del receptor de la inmunoglobulinas). Luego del bloqueo del receptor Fc, las células fueron lavadas 3 veces con HANKS 0,5% ASB e incubadas con anticuerpos monoclonales anti-CD3 de ratón marcado con FITC (Isotiocianato de Fluoresceína) y con anti-CD19 de ratón marcado con PE (Ficoeritrina) o con anti-IL-2R (CD25) de ratón marcado con PE. Los anticuerpos ( $1 \mu\text{g}/ 1 \times 10^6$  células) fueron incubados durante 30 minutos a  $4^\circ \text{C}$  y en la oscuridad. Posteriormente las células se lavaron 3 veces con HANKS 0,5% ASB, se fijaron con paraformaldeído 2% y se guardaron a  $4^\circ \text{C}$  hasta su análisis. Para el estudio de las poblaciones linfocitarias murinas se utilizó el mismo protocolo ya descrito utilizando anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD8 marcados con PE ( $1 \mu\text{g}/ 1 \times 10^6$  células). Todos los anticuerpos para la determinación de glicoproteínas de membrana de origen murino fueron obtenidos de Pharmingen San Diego, CA, USA. El análisis de las células se realizó con un Citómetro de Flujo (ORTHO

---

Inmunocount Flow Cytometry Systems) y los datos se analizaron con el software WinMDI versión 2,7.

Para el análisis de las poblaciones linfocitarias humanas: se sembraron las células PBMC ( $2 \times 10^5$  células/ ml) en placas multipocillos (24 pocillos). Se cultivaron en presencia o ausencia de Fitohemaglutinina (PHA, 0,3%) con o sin HDL (250  $\mu$ l/ pocillo) en medio RPMI-1640 suplementado con 5% de SFB y gentamicina 100  $\mu$ l/100ml. Se realizaron en estufa con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> 95% de aire a 37° C por un período de 48 y 72 hs. El protocolo de Citometría de flujo empleado fue el mismo que para las células CMB. Los anticuerpos utilizados fueron: anticuerpo monoclonal anti-CD3 humano marcado con Rodamina, anticuerpo monoclonal anti-CD4 marcado con FITC y anticuerpo monoclonal anti CD8 marcado con Ficoeritrina. El análisis de las células se realizó de la misma forma que para CMB.

#### *Análisis del ciclo celular y contenido de DNA por el método de Ioduro de Propidio*

El contenido de DNA se determinó empleando un técnica descrita por Nicoletti y colaboradores (Nicoletti Y, 1991). Las células ( $1 \times 10^6$ /ml) fueron cultivadas por 48 hs en presencia o no de Con A, con y sin VLDL. Al cabo de ese tiempo se las marcó con un anticuerpo anti-CD3 de ratón marcado con FITC, como se describió más arriba. Las células fueron lavadas con HANKS 0,5% ASB y fijadas con 500  $\mu$ l/  $1 \times 10^6$  células de Etanol 70% en PBS bien frío (preparado y guardado a -20° C hasta su utilización). La fijación con Etanol 70% es un paso muy crítico ya que se lo debe agregar a las células gota a gota y con agitación vigorosa para evitar la formación de grumos. Se lo dejó toda la noche a 4° C, se lo lavó con PBS y se le agregó 500  $\mu$ l/  $1 \times 10^6$  células, de una solución de Ioduro de Propidio (PI 50  $\mu$ g/ ml, SIGMA Chemical Co., USA) que contenía Ribonucleasa-A (500 unidades/ ml), y se lo dejó toda la noche a 4° C y en oscuridad. (El etanol fija las células y permeabiliza las membranas permitiendo la entrada de PI a las células. PI es un fluorocromo que se intercala en las dobles hebras del DNA. La ribonucleasa-A se usa para eliminar la marcación de las dobles hebras de RNA). Se lavó con PBS 2 veces y se resuspendió en el líquido empleado en el citómetro de flujo (ISOTON-II). El análisis de las células se realizó como se describió mas arriba.

### **Determinación de Citoquinas y Prostaglandina E<sub>2</sub> en los sobrenadantes de los cultivos**

Los sobrenadantes de los cultivos de CMB ( $1 \times 10^6$ /ml) en presencia o no de Con A, con y sin VLDL durante 24 y 48 hs; se guardaron a  $-20^\circ$  C hasta su análisis, evitando ser descongelados reiteradas veces. Se realizó un ensayo inmuno-enzimático (ELISA) para la determinación de los niveles de IL-2 e IL-4 en los sobrenadantes de los cultivos.

Con los sobrenadantes de los cultivos de PBMC con y sin mitógeno en presencia o no de lipoproteína a distintos tiempos se cuantificó los niveles de prostaglandina E<sub>2</sub>. Se emplearon kits comerciales (Pharmingen, CA, USA) y se siguieron las instrucciones del fabricante.

### **Determinación de proteínas totales**

Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Lowry modificado (Peterson GL, 1977).

### **Determinación de Colesterol**

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

### **Microscopía electrónica**

PBMC fueron cultivadas con HDL, oxHDL y estimuladas con fitohemaglutinina por 72 hs, centrifugadas a 850 g por 15 min a  $4^\circ$  C, fijadas con glutaraldehído 3%, y teñidas con tetróxido de osmio 1% y posteriormente con acetato de uranilo.

## Electroforesis en geles de poliacrilamida

Para realizar electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en presencia de SDS se utilizó el sistema descrito por Laemmli (1970). La composición del gel separador fue: 10% (p/v) poliacrilamida, 0,27% (p/v) bisacrilamida (N,N-metilen-bis-acrilamida), 0,025% (v/v) TEMED (N, N,N, N, tetra-metilendiamina), 0,09% (p/v) persulfato de amonio, Tris-HCl 0,375M, pH= 8.8 y 0,1% (p/v) de SDS. La composición del gel concentrador fue: 3% (p/v) acrilamida, 0,08% (p/v) de bisacrilamida, 0,1% (v/v) TEMED, 0,15% (p/v) persulfato de amonio, Tris-HCl 0,125 M pH= 6,8 y 0,1% (p/v) SDS. Las muestras de lipoproteínas (10ug de proteína) se calentaron a 100°C durante 5 minutos en presencia de buffer de muestra: 3% (v/v) 2-mercaptoetanol, 1% (p/v) de SDS, Tris-HCl 0,0625 M pH=6,8. Junto con las muestras se sembraron en el gel marcadores de pesos moleculares conocidos. El buffer de la corrida electroforética consistió en Tris 0,0025 M-Glicina 0,2 M, pH= 8,3, conteniendo SDS al 0,1% (p/v). La electroforesis se desarrolló a temperatura ambiente, a 12V/cm hasta que las proteínas se concentraron en el gel separador, luego se le aplicó 15V/cm hasta que el frente de corrida llegó al final del gel. Se sacó el gel y se cortó el gel concentrador. Se tiñó el gel con Coomasie (Brillant blue R-250 SIGMA Catálogo N° B7920) durante 20 minutos a 55° C en baño maría. Posteriormente se lo destiñó con sucesivos cambios de una solución 5% metanol y 7,5% ácido acético. Una vez desteñido el gel se analizaron las bandas resultantes.

## Marcación metabólica: incorporación de [H<sup>3</sup>]-galactosa y [<sup>32</sup>P]-ortofosfato

Se cultivaron PBMC ( $1,5 \times 10^6$  células/ ml) en placas de 6 pocillos de volumen final 4 ml por 48 y 72 hs en presencia de PHA con y sin HDL (750 ul/ pocillo). Se agregó desde tiempo cero Galactosa-[H<sup>3</sup>] ( $3,3 \mu\text{Ci}/ 1,5 \times 10^6$  células). En paralelo se realizaron cultivos en las mismas condiciones pero con el agregado de [<sup>32</sup>P]ortofosfato ( $25 \times 10^6$  cpm/  $1,5 \times 10^6$  células). Al cabo de ese tiempo se cosecharon y se centrifugaron 15 minutos a 13200 rpm. Se separó el sobrenadante del precipitado. Al sobrenadante se le midió la radioactividad y se guardó a -20° C. Al precipitado se le agregó 500  $\mu\text{l}$  de Cloroformo:metanol (2:1 v/v), se determinó la radioactividad y se lo dejó toda la noche a -20° C. Se centrifugaron 15 minutos a 13200 rpm y se separó nuevamente el sobrenadante del precipitado. Al precipitado se le agregó 100  $\mu\text{l}$  de NaOH 0,1 N, se lo dejó toda la noche

a  $-20^{\circ}$  C y se le determinó la radioactividad. Al sobrenadante se le midió la radioactividad y después se le agregó 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada, se lo agitó y se lo dejó hasta la aparición de dos fases. Se separaron ambas fases, se midió la radioactividad y se guardó a  $-20^{\circ}$  C (Fase superior: Gangliósidos, Fase inferior: Glicolípidos neutros).

### **Cromatografía en placa fina de alta resolución**

Se cultivaron PBMC ( $1,5 \times 10^6$  células/ ml) en placas de 6 pocillos de volumen final 3 ml por 72 hs en presencia de PHA (0,3%) con y sin las distintas lipoproteínas (750  $\mu$ l/ pocillo). Durante las últimas 24 hs se agregó Galactosa-[H<sup>3</sup>] (5  $\mu$ Ci/  $1,5 \times 10^6$  células). Al cabo de ese tiempo se levantó el cultivo en frío. Se centrifugó 10 minutos a 2000 rpm, se lavó con PBS bien frío se centrifugó nuevamente y se resuspendió el precipitado en cloroformo:metanol 2:1 agitando en todo momento. Se agregó la muestra a una columna de G-25, se eluyó con cloroformo:metanol:H<sub>2</sub>O 60:30:4,5; se repitió la elusión, recolectando todo el volumen en ambos casos. Se determinaron las dpm y se dejó evaporar el solvente toda la noche a  $37^{\circ}$  C. Se resuspendió la muestra en 25  $\mu$ l cloroformo:metanol:H<sub>2</sub>O 60:30:4,5, se agitó con vortex y sembró igual cantidad de cpm en una placa de HPTLC (Cromatografía en placa fina de alta resolución). Se realizó una pre-corrida utilizando como solvente cloroformo:metanol 4:1 v/v y se dejó secar bien la placa. Posteriormente se realizó la corrida utilizando como solvente cloroformo:metanol: CaCl<sub>2</sub> 0,3%. 2H<sub>2</sub>O 60:36:8. Se dejó secar la placa y se expuso a la pantalla de tritio una semana. Posteriormente se la escaneó en un escáner de radioactividad (Phosphoimager SI Molecular Dynamics).

### **Marcación de la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) con sondas fluorescentes**

Se purificó VLDL como se describió mas arriba, se determinó la concentración de proteínas y de colesterol por las técnicas descriptas anteriormente. La lipoproteína se concentró hasta obtener una concentración de 163 $\mu$ g de proteína/ ml. Una vez concentrada se la dividió en dos alícuotas de igual volumen (500  $\mu$ l) para ser marcadas con distintos fluorescentes. A una de las alícuotas de VLDL se le agregó una solución de DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato) a una concentración final de 300  $\mu$ g de DiI por 1 mg de proteína. Se incubó por 18 hs a  $37^{\circ}$  C. A la otra alícuota de

VLDL concentrada (500  $\mu$ l ) se le agregó 50  $\mu$ l de bicarbonato de sodio 1M y la mezcla fue transferida a un vial del reactivo fluorescente Alexa 488 (Alexa 488, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) e incubada toda la noche a 4° C en agitación constante con una barra magnética. La VLDL marcada con Alexa y VLDL marcada con DiI se re-aislaron por ultracentrifugación en gradiente salino de BrK (técnica utilizada para aislar lipoproteínas descrita mas arriba), se dializaron contra PBS con tres cambios y se las guardaron alicuotadas a -20° C hasta su posterior utilización.

### **Obtención de la proteína asociada al receptor (RAP)**

La proteína asociada al receptor humana (RAP) humana se preparó como proteína de unión de la glutatión S-transferasa en *Escherichia coli* a partir de un vector de expresión pGEX-KG como se describió anteriormente (Herz J y col., 1991).

### **Determinación de la unión de lipoproteína marcada con sondas fluorescente a las células linfocitarias: citometría de flujo y microscopía de fluorescencia**

Se cultivaron CMB como se describió en el análisis fenotípico de las distintas poblaciones linfocitarias. Una vez finalizado los cultivos se cosecharon las células y se las colocó en tubos tipo eppendorf en hielo. Se lavaron con PBS, se centrifugaron 4 minutos a 3500 rpm. EL lavado se repitió 3 veces. A  $1 \times 10^6$  células se las incubó con 50  $\mu$ l de VLDL marcada con DiI (VLDL-DiI) durante 2 hs a 37° C, se lavaron 2 veces con PBS 5% albúmina sérica bovina (ASB), EDTA 2mM. Se incubó con 50  $\mu$ l de VLDL marcada con Alexa (VLDL-Alexa) por 1 hora a 4° C. Se lavó nuevamente con PBS 5% ASB, EDTA 2mM y se resuspendió en ISOTON II. Inmediatamente se las analizó en el citómetro de flujo. En forma paralela se incubaron las células con RAP 2 hs a 4° C y posteriormente con 50  $\mu$ l de VLDL-Alexa por 1 hora a 4° C. Se continuó con el mismo protocolo descrito mas arriba para su análisis por citometría de flujo.

-Para la microscopía de fluorescencia se utilizaron las mismas células que para la citometría de flujo. Las células se centrifugaron 4 minutos a 3500 rpm, se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 30  $\mu$ l de PBS. Se colocaron sobre un



portaobjeto, fueron cubiertas por un cubreobjetos y selladas con barniz. Inmediatamente fueron observadas en el microscopio de fluorescencia.

### **Western Blot**

Las células se cultivaron como se describió anteriormente; al tiempo fijado se levantaron, se colocaron en tubos tipo eppendorf en hielo. Las células se lavaron con PBS pH=7,4, se centrifugaron a 3500 rpm 5 minutos y al precipitado se lo resuspendió en 100 ul del buffer de lisis fuerte RIPA el cual poseía inhibidores de proteasas (Deoxicolato de Na 0,5% (p/v), Tritón X-100 1% (v/v), SDS 0,1% (p/v), PBS 1X, PMSF 1mM, Leupeptina 5 ug/ml, Aprotinina 10 ug/ml). Se las incubó durante 30 minutos en hielo. Al cabo de ese tiempo se centrifugaron a 10000g 10 minutos 4° C, se separó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry. Se preparó un gel de poliacrilamida al 10% y se desarrolló la electroforesis como se describió mas arriba. Se sembraron las muestras de los lisados celulares (10 ug de proteína por carril) junto con marcadores de peso molecular conocidos. Una vez corrido el gel se realizó la transferencia a membrana de nitrocelulosa. Se utilizó el método húmedo manteniéndose constante una corriente de 300 mA durante 1 hora fijándose a 150V. El buffer de transferencia consistió en el buffer de corrida mas metanol al 20% (v/v). Se coloreó la nitrocelulosa con Ponceau S al 0,2% (p/v), ácido acético al 1% (v/v). Se decoloró el gel mediante sucesivos lavados con agua destilada y se estabilizó posteriormente con Tris-HCl 10 mM pH=7,4. se bloqueó la nitrocelulosa con una solución de Bloqueo de albúmina sérica bovina al 2,5% (BSA, p/v), polivinilpirrolidona 2,5%(p/v), TBS (Tris 50mM – NaCl 200 mM) durante 2 hs a 4° C. Las incubaciones siguientes dependieron de la proteína a estudiar:

Para el estudio del receptor de VLDL se utilizaron lisados de CMB estimuladas por 48 hs con Concanavalina A y cultivadas en presencia o ausencia de dicha lipoproteína. Los lisados fueron sembrados por duplicados para ser posteriormente sometidos a distintos tratamientos. La membrana fue bloqueada e incubada con RAP-GST 200 nM durante 6 hs a temperatura ambiente y con agitación constante. Se lavó con TTBS (TBS, Tween 20 al 0,05%) tres veces durante 15 minutos. Se lo incubó con un anticuerpo primario monoclonal anti-GST (Santa Cruz ,USA) (dilución 1:400 durante 1:30 hs a temperatura ambiente y con agitación constante). Se lavó tres veces con TTBS y se la incubó con un anticuerpo secundario de ratón anti-peroxidasa (Immunotech) (dilución 1:50000, durante

1:30 hs a temperatura ambiente y con agitación constante). Se lavó nuevamente con TTBS y se reveló con el método de quimioluminiscencia “Renaissance” (NEN, Boston, MA, USA) siguiendo el protocolo descrito por esta empresa y utilizando placas de radiografía de alta sensibilidad Kodak BioMax MS. Las bandas resultantes fueron cuantificadas densitométricamente con el software Scion Image 1, NIH, USA.

Para el estudio de la fosforilación de Map kinasa, se utilizaron células PBMC cultivadas por 18 hs en ausencia de estímulo en medio RPMI-1640 deprivado de SFB. Al cabo de ese tiempo se realizó el estímulo de las células, durante 10 minutos, con PHA en presencia o no de HDL en medio RPMI-1640 20% SFB. Las células se cosecharon, lisaron y sembraron como se describió mas arriba. A la membrana de nitrocelulosa se la incubó por 2 hs con la solución de bloqueo, se lavó 3 veces con TTBS, se la incubó con el anticuerpo primario monoclonal anti fosfo p44-p42, Biolabs, Dilución 1:1000 a 4° C toda la noche en agitación constante. Se lavó 3 veces con TTBS durante 10 minutos cada lavado en agitación. Se incubó por 1:30 hs con el anticuerpo secundario Proteína A-peroxidasa (SIGMA Chemical Co., USA) Dilución 1/60000, a temperatura ambiente en agitación. Se lavó 3 veces con TTBS y una vez con TBS. Se reveló con el método de quimioluminiscencia “Renaissance” (NEN, Boston, MA, USA). Como control de la expresión de Map Kinasa se cultivaron en forma paralela células de ovario de hamster chino CHO-K1 (ATCC, USA) en medio esencial mínimo DULBECCO (DMEM, SIGMA Chemical Co. USA) por 18 hs en ausencia de suero fetal bovino y se las estimuló por 10 minutos con medio DMEM con 10% de SFB.

### **Purificación de mannan de *A. Saponaria***

Mannan de *A. saponaria* se purificó siguiendo el procedimiento descrito para mannan de *A. Vera* (McAnalley, 1990).

### **Ensayos de proliferación y activación de linfocitos incubados con mannan de *A. saponaria*.**

Las células (CMB y PBMC) se cultivaron en placas de 24 pocillos por triplicado, en presencia de concanavalina A (Con A, 3 µg/ ml) o fitohemaglutinina (PHA, 0,3%) respectivamente, con o sin mannan (0.6mg/ml) en un volumen total de 2 ml, en medio

RPMI-1640 suplementado con 5% de SFB y gentamicina 100  $\mu$ l/100ml. Se realizaron en estufa con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> 95% de aire a 37° C por un período de 96 hs. Se evaluó la proliferación por citometría de flujo. Para evaluar la activación de las células se utilizó el protocolo de citometría de flujo descrito mas arriba. Los anticuerpos utilizados fueron: anticuerpo monoclonal anti-CD3 de ratón marcado con FITC y anticuerpo monoclonal anti CD25 de ratón marcado con Ficoeritrina

**ANEXO I**

---

## MANNAN INHIBE LA RESPUESTA BLASTOGÉNICA PERO A DIFERENCIA DE LAS LIPOPROTEÍNAS AUMENTA IL-2R (CD25)

Los modelos experimentales descritos en el Capítulo I de la sección resultados también resultaron útiles en el estudio de las propiedades antiinflamatorias del gel extraído de *Aloe saponaria* (Davis RH y col, 1987,1989, 1992).

La familia de Aloe está constituida por plantas tropicales y subtropicales. Dos sustancias básicas se extraen de las hojas de aloe. Una de ellas, el gel, se extrae de la pulpa de las hojas y contiene polímeros de carbohidratos: glucomananes y ácido pécico (McAnalley BH, 1990). Una característica importante que distingue al mannan de *A. saponaria* del de *A. vera* es el contenido de antraquinona. El gel de *A. saponaria* contiene aproximadamente 98.5% de agua. El total de sólido está compuesto por 60% de polisacáridos y el resto por componentes orgánicos e inorgánicos. Los carbohidratos que se encuentran son galactosa, glucosa, manosa, ramnosa, xylosa y ácido urónico.

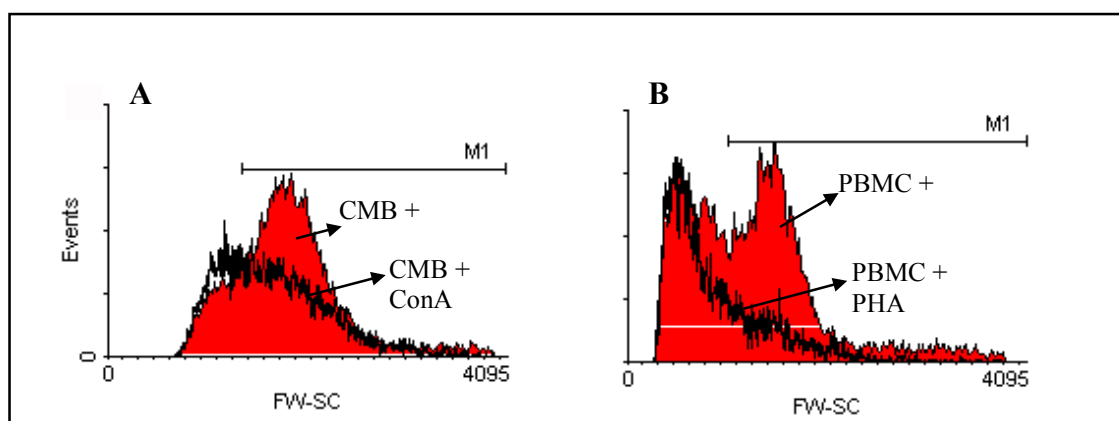
Existen datos en la literatura que reportan diversas acciones inmunoregulatorias de este polisacárido “in vivo” e “in vitro” (Reynolds T y col., 1999). Es un modulador de la inmunidad humoral y celular (Wooles WR y col., 1963), también estimula la proliferación de las células hematopoyéticas pluripotentes, células formadoras de colonias granulocíticas-monocíticas y células que van a formar colonias mieloides y eritroides (Pospisil My col., 1982; Burgaleta C y col., 1997; Maisin JR y col., 1996).

El principio activo que le confiere dichas propiedades es el Acemannan (ACM), el cual está formado por polímeros lineales del tipo 1,4  $\beta$ -D-manopiranososa (con peso molecular de 15 kDa) conteniendo un 18% de grupos acetilos (designado como Acemannan 1, y polímeros del tipo 1,4- $\alpha$ -D-manopiranososa (peso molecular 66 kDa), con un 10% de grupos acetilos, denominado Acemannan 2.

Inicialmente el interés en ACM se centró en su acción sobre las quemaduras, pero existen datos de sus propiedades antivirales y antiproliferativas “in vivo”. La mayoría de los experimentos fueron realizados con Acemannan® extraído de *A. vera*, poco se conoce sobre los efectos de mannan extraído de *A. saponaria* en el sistema inmune.

Para determinar las vías de acción del gel de *A. saponaria* en el control de la respuesta inflamatoria se lo probó en los dos modelos desarrollados en el Capítulo I. Se probó el efecto del mannan en células mononucleares humanas y murinas cultivadas en presencia y ausencia de mitógenos inespecíficos y se determinó por citometría de flujo los efectos del mannan sobre la proliferación de las células.

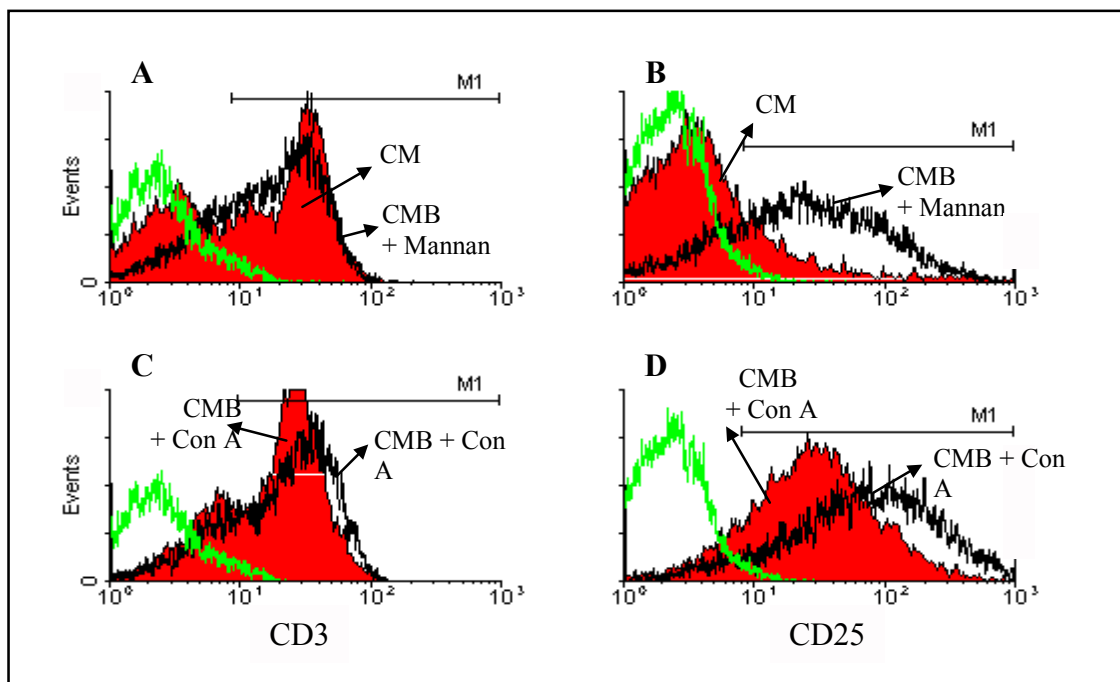
Se cultivaron células de bazo de ratón (CMB) y células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) por 96 hs en presencia o ausencia de mannan purificado y mitógenos (ConA y PHA respectivamente). Los resultados obtenidos (*Figura 35 A y B*) mostraron que mannan inhibió la respuesta linfoproliferativa inducida por el mitógeno en ambos casos, ya que la población de células de gran tamaño (células en estado blástico) fue específicamente reducida. CMB cultivadas en presencia de ConA presentaron un 80% de células con el tamaño de blastos con respecto al número total de células, esta población se redujo a 66% cuando se cultivaron las células en presencia del mitógeno y mannan (60% y 31% para PBMC + PHA y PBMC + PHA + mannan). Es interesante el hecho que las células en estado de reposo no se modificaron significativamente por el agregado de mannan (*Figura 35 A y B*).



*Figura 35: Efectos del mannan de A. Saponaria sobre el tamaño celular.* CMB y PBMC fueron cultivadas en presencia de un mitógeno con (histograma abierto negro) o sin mannan (histograma lleno rojo) (paneles A y B respectivamente). Los valores de Fw-Sc (tamaño celular) fueron determinados por citometría de flujo y representados como Fw-SC en función de número de células. Las curvas representan el promedio de datos obtenidos de tres experimentos separados.

Para discernir si el efecto inhibitorio del mannan sobre la respuesta blastogénica producida por la ConA afectaba la proporción relativa de las dos poblaciones linfocitarias (linfocitos T y B) de las células de bazo de ratón, se determinó el porcentaje de células

CD3<sup>+</sup> (linfocitos T) luego de ser cultivadas por 96 hs en presencia o ausencia de ConA, con y sin mannan. Los resultados obtenidos (*Figura 36 A*) indicaron que mannan no modificó la proporción relativa de las células T cuando las células fueron cultivadas sin el mitógeno. Cuando las células se cultivaron en presencia de ConA (*Figura 36 C*) se observó que mannan produjo modificaciones sólo en la población CD3<sup>+</sup>, mientras que no se observó efecto en la población CD3<sup>-</sup>, indicando que mannan inhibió principalmente la proliferación de los linfocitos T.



*Figura 36: Efecto de mannan de A. Saponaria sobre la expresión de CD3 y CD25 en CMB. CMB fueron cultivadas en ausencia (A-B) o en presencia (C-D) de ConA con (histograma abierto negro) o sin mannan (histograma lleno rojo), y la expresión de CD3 y CD25 se analizó por citometría de flujo a 96 hs de cultivo. Los ejes de las x y de las y representan intensidad de fluorescencia (escala de tres logaritmos) y el número relativo de células, respectivamente. Los histogramas de las células teñidas con el control de isotipo se indican con un histograma de color verde. Las curvas representan el promedio de tres experimentos realizados por separado.*

El receptor de IL-2 (IL-2R o CD25) es esencial para la expansión clonal y el crecimiento de los linfocitos T luego de una estimulación con antígenos (o mitógenos). IL-2R es un marcador de activación de los linfocitos T ya que se expresa sólo después de la activación con algún estímulo (Taniguchi T y col., 1993; Waldmann TA, 1994; Minami YT y col., 1993; Nakari TM y col., 1994). Cuando se cultivaron las células sin mitógenos, mannan produjo un incremento en la expresión de CD25 (*Figura 36 B*). Los porcentajes de CMB CD25<sup>+</sup> fue del 18% en ausencia de mannan y se incrementó a 74% cuando las células fueron cultivadas con mannan. Este hecho puede explicar alguno de los efectos

---

inmunoestimulantes del mannan observados in vivo (Harris C y col, 1991; Peng SY y col., 1991; King GK y col., 1995; Corsi MM y col., 1998; King GK y col., 1995) Los cultivos en los cuales se incunó en simultáneo mannan y ConA, se observó un aumento en la expresión de CD25<sup>+</sup> (*Figura 36 D*) comparadas con las que fueron cultivadas con el mitógeno únicamente, similar a lo observados en las células en reposo, indicando que mannan tiene un efecto inmunomodulador de la respuesta controlando la expansión celular sin interferir con la expresión del receptor de interleukina. La intensidad media de fluorescencia (MFCh) de las células positivas, que depende del número de moléculas CD25/unidad de superficie celular, sigue la misma tendencia que la población de células CD25 positivas (CMB + ConA: 2133, CMB + ConA + mannan: 2609); por lo tanto mannan incrementa la densidad de superficie del receptor de IL-2 en las células T.

En conclusión, nuestros resultados mostraron que mannan inhibió la proliferación de varios tipos celulares activados. De esta forma el efecto benéfico de mannan puede ser debido, al menos en parte, por a un efecto directo del mannan sobre las células incrementando su activación.

Esta acción podría ser realizada a través del receptor de manosa (MR) que estaría involucrado en el efecto directo del acemanan sobre una línea celular de macrófagos, inhibiendo su acción luego de una preincubación con ConA (Karaca K y col., 1995).

Se identificó una proteína denominada DEC-205 como un miembro de la familia del receptor de manosa y del receptor de fosfolipasa A2. DEC-205 fue identificada como una proteína de 200KDa (gp200) que fue reconocida por un anticuerpo monoclonal que reconoce MR6. gp200-MR6 es de gran interés debido a su expresión en las células epiteliales en la corteza de timo (de Maagd RA y col., 1985), en las células dendríticas y en bajos niveles en los linfocitos T. Además se demostró que el anticuerpo monoclonal MR6 tiene un efecto anti-proliferativo en los cultivos de células T que proliferan en respuesta a IL-4 , y además inhibe la producción de IgE dependiente de IL-4 en las célula B (Larche M y col., 1988; Weinberg RA, 1995).

Los resultados muestran que mannan al igual que HDL produce una inhibición de la respuesta blastogénica, pero a diferencia de esta aumenta la expresión del marcador de activación CD25. Estos resultados indican que las propiedades anti-inflamatorias de HDL y mannan (Davis RH y col, 1987,1989, 1992) ocurren por vías alternarivas. Los modelos



experimentales desarrollados en esta tesis permitirán caracterizar con más detalle cuales son esas vías.

Por ultimo, en un modelo distinto empleando células tumorales, los resultados obtenidos por nosotros (ver separata N° 3, anexo II) son los primeros en la literatura en demostrar un efecto directo de mannan en las células linfoides.

***REFERENCIAS***

---

**A**

- Acton S**, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. **1996**. Identification of Scavenger Receptor SR-BI as a High Density Lipoprotein Receptor. *Science* 271: 518-520.
- AldonS JL**. **2000**. Atherosclerosis. *Nature* 407: 233-241.
- Andersen OM**, Christensen LL, Christensen PA, Sørensen ES, Jacobsen C, Moestrup SK, Etzerodt M, Thøgersen H. **2000**. Identification of the Minimal Functional Unit in the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein for Binding the Receptor-associated Protein (RAP). A conserved acidic residue in the complement-type repeats is important for recognition of rap. *J. Biol. Chem.* 275: 21017-21024.
- Arai T**, Kumar Bhunia A, Chatterjee S, Bulkley GB. **1998**. Lactosylceramide stimulates human neutrophils to upregulate Mac-1, adhere to endothelium, and generate reactive oxygen metabolites in vitro. *Circ Res.* 82: 540-547.
- Arder DJ**, Castro G, Zech LA, Fruchart JC, Brewer HB Jr. **1991**. In vivo metabolism of apolipoprotein A-I on high density lipoprotein particles LpA-I and LpA4,A-11'. *J Lipid Res.* 32: 1849-1859.
- Artl A**; Marsche G; Lestavel S, et al. **2000**. Role of Serum Amyloid A During Metabolism of Acute-Phase HDL by Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 763-772.
- Artola RL**, Conde CB, Bagatolli LA, et al. **1997**. High-density lipoprotein from hypercholesterolemic animals has peroxidized lipids and oligomeric apolipoprotein A-I: its putative role in atherogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 570-574.
- Austin MA**, King MC, Vranizan KM, Krauss RM. **1990**. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation.* 82: 495-506.

**B**

- Badimon JJ**, Badimon L, Fuster V. **1990**. Regression of atherosclerotic lesions by high-density lipoprotein plasma fraction in cholesterol fed rabbits. *J Clin Invest.* 85: 1234-1241.

- 
- Baker PE**, Fahey JV, Munck A. 1981. Prostaglandin inhibition of T-cell proliferation is mediated at two levels. *Cell Immunol* 61: 52-61.
- Barbaras R**, Puchois P, Fruchart JC, Ailhaud G. 1987. Cholesterol efflux from cultured adipose cells is mediated by Lp A-I particles but not by Lp AI-AII particles. *Biochem Biophys Res Commun.* 142: 63-69.
- Barbaras R**, Puchois P, Fruchart JC, Pradines-Figueres A, Ailhaud G. 1990. Purification of an apolipoprotein A binding protein from mouse adipose cells. *Biochem. J.* 269: 767-773.
- Barbier O**, Pineda Torra I, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart JC, Glineur C, Staels B. 2002. Pleiotropic Actions of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Lipid Metabolism and Atherosclerosis. *Arterioscl, Thromb, and Vasc Biol.* 22: 717-726.
- Batley FD**, Gafvels ME, FitzGerald DJ, Argraves WS, Chappell DA, Strauss JF 3rd, Strickland DK. 1994. The 39-kDa receptor-associated protein regulates ligand binding by the very low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 269: 23268-23273.
- Benaglio M**, Azzurri A, Ciervo A, Amedei A, Tamburini C, Ferrari M, Telford JL, Baldari CS, Romagnani S, Cassone A, D'Elios MM, Del Prete G. 2003. T helper type 1 lymphocytes drive inflammation in human atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 6658-6663.
- Berman M**, Eisenberg S, Hall M, et al. 1978. Metabolism of apo B and apo C apoproteins in man: kinetic studies in normal and hyperlipoproteinemic subjects. *J lipid Res.* 19: 38-56.
- Boisvert W**, Spangenberg J, Curtiss L. 1995. Treatment of severe hypercholesterolemia in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 96: 1118-1124.
- Borhani DW**, Rogers DP, Engler JA, Brouillette CG. 1997. Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 12291-12296.

- 
- Bowry WV**, Stanley KK, Stocker R. **1992**. High Density Lipoprotein is the Major Carrier of Lipid Hydroperoxides in Human Blood Plasma from Fasting Donors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 10316-10320.
- Breckenridge WC**, Little JA, Steiner G, Chow A, Poapst M. **1978**. Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein CII. *N Engl J Med.* 298: 1265–1273.
- Brouillette CG**, Anantharamaiah GM, Engler JA, Borhani DW. **2001**. Structural models of human apolipoprotein A-I: a critical análisis and review. *Biochim Bioph Acta* 1531: 4-46.
- Brown MS**, Goldstein JL. **1996**. Michael S Brown MD, and Joseph L Goldstein MD: 1985 Nobel laureates in medicine (interview). *J Investig Med* 44: 14–23.
- Brunzell JD**, Sniderman AD, Alberts JJ, Kwiterovich PO. **1984**. Apolipoproteins B and A-I and coronary artery disease in humans. *Arteriosclerosis* 4: 79-83.
- Bu G**, Marzolo MP. **2000**. Role of RAP in the biogenesis of lipoprotein receptors. *Trends Cardio. Med.* 10: 148- 155.
- Bu G**. **1998**. RAP: a specialized chaperone and antagonist for members of the LDL receptor gene family. *Curr Opin Lipidol* 9: 149–155.
- Burgaleta C**, Golde DW. **1997**. Effect of glucan on granulopoiesis and macrophage genesis in mice. *Cancer Res.* 37: 1739.
- Burger D**, Dayer JM. **2002**. High-density lipoprotein-associated apolipoprotein A-I: the missing link between infection and chronic inflammation? *Autoimmunity Rev* 1: 111-117.

## C

- Cantrel DA**, Smith KA. **1984**. The interleukin-2 T-cell system: A new cell growth model. *Science* 224: 1312-1316.
- Cockerill GW**, Reed SC. **1999**. High-density lipoprotein—multipotent effects on cells of the vasculature. *Int Rev Cytol Surv Cell Biol.* 188: 257–297.
- Cockerill GW**, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. **1995**. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15: 1987-1994.

- Corsi MM**, Bertelli AA, Gaja G, Fulgenzi A, Ferrero ME. **1998**. The therapeutic potential of Aloe Vera in tumor-bearing rats. *Int. J. Tissue React.* 20: 115-118.
- Cox DW**, Breckenridge WC, Little JA. **1978**. Inheritance of apolipoprotein C-II deficiency with hypertriglyceridemia and pancreatitis. *N Engl J Med.* 299: 1421-1424.
- Curran T**, D'Arcangelo G. **1998**. Role of reelin in the control of brain development. *Brain Res Brain Res Rev*; 26: 285-294.
- Cushing SD**, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. **1990**. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 51: 5134-5138.
- Chan PK**, Edwards A, Lafrenière R, Parsons HG. **1998**. Improved detection of familial hypercholesterolemia by determining low density lipoprotein receptor expression in mitogen-induced proliferating lymphocytes. *J. Lipid Res.* 39: 2261-2270.
- Chatterjee S.** **1991**. Lactosylceramide stimulates aortic smooth muscle cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 181: 554-561.
- Chatterjee S.** **1998**. Sphingolipids in atherosclerosis and vascular biology. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 18: 1523-1533.
- Cheung MC**, Alberts JJ. **1984**. Characterization of lipoproteins particles isolated by immunoaffinity chromatography. Particles containing Apo A-I and apo A-II and particles containing apo A-I but not apo A-II. *J Biol. Chem.* 259: 12201-12209.
- Chinetti G**, Fruchart JC, Staels B. **2000**. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res.* 49: 497-505.

## D

- D'Arcangelo G**, Homayouni R, Keshvara L, Rice DS, Sheldon M, Curran T. Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron* 24: 471-479.
- Dansky HM**, Charlton SA, McGee Harper M, and Smith J. **1997**. T- and B-lymphocytes play a minor role in atherosclerotic plaque formation in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4642-4646.

- 
- Davaille J**, Gallois C, Habib A, et al. **2000**. Antiproliferative properties of sphingosine 1-phosphate in human hepatic myofibroblast. A cyclooxygenase-2 mediated pathway. *J Biol Chem.* 275: 34628-34633.
- Davis RH**, Leitner MG, Russo JM, Byrne ME. **1989**. Anti-inflammatory activity of Aloe vera against a spectrum of irritants. *J Am Podiatr Med Assoc* 79:263-76.
- Davis RH**, Leitner MG, Russo JM. 1987. Topical anti-inflammatory activity of Aloe vera as measured by ear swelling. *J Am Podiatr Med Assoc* 77:610-2.
- Davis RH**, Rosenthal KY, Cesario LR, Rouw GA. **1989**. Processed Aloe vera administered topically inhibits inflammation. *J Am Podiatr Med Assoc* 79:395-7.
- Davis RH**, Stewart GJ, Bregman PJ. **1992**. Aloe vera and the inflamed synovial pouch model. *J Am Podiatr Med Assoc* 82:140-8.
- De Loof H**, Rosseneu M, Yang CY, Li WH, Gotto AM Jr, Chan L. **1987**. Human apolipoprotein B: analysis of internal repeats and homology with other apolipoproteins. *J. Lipid Res.* 28:1455-1465.
- de Maagd RA**, MacKenzie WA, Schuurman HJ, Ritter MA, Price KM, Broekhuizen R and Kater L. **1985**. The human thymus microenvironment: heterogeneity detected by monoclonal anti-epithelial cell antibodies. *Immunology* 54: 745–754.
- Delerive P**, Fruchart JC, Staels B. **2001**. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol.* 169: 453–459.
- Della Bella S**, Molteni M, Compasso S, Zulian C, Vanoli M, et al. **1997**. Differential effects of cyclo-oxygenase pathway metabolites on cytokine production by T lymphocytes. *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids* 56: 177-184.
- Driscoll DM**, Getz GS. **1984**. Extrahepatic synthesis of apolipoprotein E. *J Lipid Res.* 25: 1368-1379.
- Dumon MF**, Clerc M. **1986**. Preliminary report on a case of apolipoprotein CI and CII deficiency. *Clin Chim Acta.* 157: 239–248.

## F

- Fielding CJ**, Fielding PE. **1995**. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.* 36: 211-228.

- Fojo SS**, Brewer HB Jr. **1992**. Hypertriglyceridaemia due to genetic defects in lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II. *J Intern Med.* 231: 669–677.
- Force T**, Bonventre JV. **1998**. From Molecules to Humans Growth Factors and Mitogen-Activated Protein Kinases. *Hipertensión* 31: 152.
- Franklin RA**, Tordai A, Patel H, Gardner AM, Jonson GL, Gelfand EW. **1994**. Ligation of the T cell receptor complex results in activation of the Ras/Raf-1/MEK/MAPK cascade in human T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 93: 2134-2140.
- Frykman PK**, Brown MS, Yamamoto T, Goldstein JL, Herz J. **1995**. Normal plasma lipoproteins and fertility in gene-targeted mice homozygous for a disruption in the gene encoding very low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8453–8457.
- G**
- Gafvels ME**, Paavola LG, Boyd CO, Nolan PM, Wittmaack F, Chawla A, Lazar MA, Bucan M, Angelin B, Strauss JF III. **1994**. Cloning of a complementary deoxyribonucleic acid encoding the murine homologue of the very low density lipoprotein: apolipoprotein-E receptor: Expression pattern and assignment of the gene to mouse chromosome 19. *Endocrinology* 135: 387–394.
- Geng Y**, Holm J, Nygren S, Bruzelius M, Stemme S, Hansson GH. **1995**. Expression of the macrophage scavenger receptor in atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15: 1995-2002.
- Glagov S**, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. **1987**. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 316: 1371-1375.
- Glomset JA**, Janssen ET, Kennedy R, Dobbins J. **1966**. Role of plasma lecithin:cholesterol acyltransferase in the metabolism of high density lipoproteins. *J Lipid Res.*7: 638–648.
- Goldstein JL**, Brown MS. **2001**. The Cholesterol Quartet *Science* 292: 1310-1312.
- Goodwin JS**. **1989**. Immunomodulation by eicosanoids and anti-inflammatory drugs. *Curr. Opinion Immunol.* 2: 264-268.



- Gordon DJ**, Probsfield JL, Garrison RJ, et al. **1989**. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: four prospective American studies. *Circulation* 79: 8–15.
- Greaves DR**, Gough PJ, Gordon S. **1998**. Recent progress in defining the role of scavenger receptors in lipid transport, atherosclerosis and host defence. *Curr Opin Lipidol.* 9: 425–432.
- Gu X**, Lawrence R, Krieger M. **2000**. Dissociation of the High Density Lipoprotein and Low Density Lipoprotein Binding Activities of Murine Scavenger Receptor Class B Type I (mSR-BI) Using Retrovirus Library-based Activity Dissection. *J. Biol. Chem.* 275: 9120-9130.
- Gyimesi E**, Kiss E, Suranyi P, Szegedi G. **1995**. Leukocyte Typing V (ed. Schlossman et al.) Oxford University Press 1067-1068.

## H

- Hagberg JM**, Wilund KR, Ferrel RE. **2002**. Apo E gene and gene-environment effects on plasma lipoprotein-lipid levels. *Physiol Genomics* 4: 101-108.
- Hakomori S**, Igarashi YJ. **1995**. Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling. *J Biochem (Tokyo)* 118: 1091-1103.
- Han J**, Hajjar DP, Zhou X, Gotto AM, Jr., Nicholson AC. **2002**. Regulation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor--mediated Gene Expression. A new mechanism of action for High Density Lipoprotein *J. Biol. Chem.* 277: 23582–23586.
- Hansson GK**. **1997**. Cell-mediated immunity in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 8: 301-311.
- Hansson GK**. **2001**. Immune mechanism in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21: 1876-1890.
- Hara H**, Yokomaya S. **1991**. Interaction of free apolipoproteins with macrophages. Formation of high density lipoprotein-like lipoproteins and reduction of cellular cholesterol. *J Biol. Chem* 266: 3080-3086.
- Harris C**, Pierce K, King G, Yates KM, Hall J, Tizard I. **1991**. Efficacy of acemannan in treatment of canine and feline spontaneous neoplasm. *Mol. Biother.* 3: 207-213.

- 
- Havel RJ**, Chao YS, Windler EE, Kotite L, Guo LSS. **1980**. Isoprotein specificity in the hepatic uptake of apolipoprotein E and the pathogenesis of familial dysbetalipoproteinemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4349-4355.
- Henriksen T**, Mahoney EM, Steinberg D. **1981**. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 6499-6503.
- Herz J**, Besser U. **2000**. Apolipoprotein E receptors: linking brain development and Alzheimer disease. *Nat Neurosci Rev.* 1: 51-58.
- Herz J**, Goldstein JL, Strickland DK, Ho YK and Brown MS. **1991**. 39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem* 266: 21232-21238.
- Herz J**, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl h, Stanley KK. **1988**. Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J* 7: 4119-4127.
- Herz J**. **2001**. The LDL receptor gene family: (un) expected signal transducers in the brain. *Neuron* 29: 571-581.
- Hiesberger T**, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, Herz J. **1999**. Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron* 24: 481-489.
- Hiltunen TP**, Luoma JS, Nikkari T, and Yla-Herttuala S. **1998**. Expression of LDL receptor, VLDL receptor, LDL receptor-related protein, and scavenger receptor in rabbit atherosclerosis lesions: Marked induction of scavenger receptor and VLDL receptor expression during lesion development. *Circulation* 97: 1079–1086.
- Howell BW**, Herrik TM, Cooper JA., **1999**. Reelin-induced tyrosine phosphorylation of Disabled 1 during neuronal positioning. *Genes Dev.* 13: 643-648.
- Howell BW**, Herz J. **2001**. The LDL receptor gen family: signaling functions during development. *Current Opinión Neurobiol* 11: 74-81.

---

**Hsueh WA**, Law RE. **2001**. PPAR $\gamma$  and atherosclerosis. Effects on cell growth and movement. *Arterioscl. Thromb. and Vasc Biol.* 21: 1891-1895.

**Huang Y**, von Eckardstein A, Wu S, Assmann G. **1995**. Effects of the apolipoprotein E polymorphism on uptake and transfer of cell-derived cholesterol in plasma. *J Clin Invest.* 96: 2693-2701.

## I

**Insull W Jr**, Bartsch GE. **1966**. Cholesterol, triglyceride, and phospholipid content of intima, media, and atherosclerotic fatty streaks in human thoracic aorta. *J Clin Invest.* 45: 513-523.

**Iñiguez MA**, Punzón C, Fresno M. **1999**. Induction of cyclooxygenase-2 on activated T lymphocytes: regulation of T cell activation by cyclooxygenase-2 inhibitors. *J. Immunol.* 163: 111-119.

**Ishigami M**, Swertfeger DK, Granholm NA, Hui DY. **1998**. Apolipoprotein E inhibits platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration and proliferation by suppressing signal transduction and preventing cell entry to G1 phase. *J. Biol. Chem.* 273: 20156–20161.

## J

**Ji Y**, Jian B, Wang N, Sun Y, de la Llera Moya M, Phillips MC, Rothblat GH, Swaney JB, Tall AR. **1997**. Scavenger Receptor BI Promotes High Density Lipoprotein-mediated Cellular Cholesterol Efflux *J. Biol. Chem.* 272. 20982-20985.

**Jokinen EV**, Landschulz KT, Wyne KL, Ho YK, Frykman PK, Hobbs HH. **1994**. Regulation of the very low density lipoprotein receptor by thyroid hormone in rat skeletal muscle. *J Biol Chem*;269: 26411–26418.

**Jonasson L**, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. **1986**. Regional accumulations of T cells, macrophages and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 6: 131-138.

**Jones DC**, Ding X, Daynes RA. **2002**. Nuclear receptor PPAR $\alpha$  is expressed in resting murine lymphocytes: the PPAR $\alpha$  in T and B lymphocytes is both transactivation and transrepression competent. *J Biol Chem.* 277: 6838–6845.

---

**K**

- Kane JP. 1983.** Apoprotein B: structural and metabolic heterogeneity. *Annu. Rev. Physiol.* 45: 637-650.
- Karaca K, Sharma JM, Nordgren R. 1995.** Nitric oxide production by chicken macrophages activated by acemannan, a complex carbohydrate extracted from Aloe Vera. *Int. J. Immunopharmac.* 17: 183-188.
- Kelly ME, Clay MA, Mistry MJ, Hsieh-Li HM, Harmony JA. 1994.** Apolipoprotein E inhibition of proliferation of mitogen-activated T lymphocytes: production of interleukin 2 with reduced biological activity. *Cell immunol.* 159: 124-139.
- Kiguchi K, Henning-Chubb CB, Huberman E. 1990.** Glycosphingolipid patterns of peripheral blood lymphocytes, monocytes, and granulocytes are cell specific. *J. Biochem. (Tokyo)* 107: 8-14.
- Kim DH, Iijima H, Goto K, Sakai J, Ishii H, Kim HJ, Suzuki H, Kondo H, Saeki S, Yamamoto T. 1996.** Human apolipoprotein ER2. A novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain. *J Biol Chem.* 271: 8373-8380.
- King GK, Yates KM, Greenlee PG, et al. 1995.** The effect of Acemannan Immunostimulant in combination with surgery and radiation therapy on spontaneous canine and feline fibrosarcomas. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 31: 439-447.
- King GK, Yates KM, Greenlee PG, et al. 1995.** The effects of acemannan immunostimulant in combination with surgery and radiation therapy on spontaneous canine and feline fibrosarcoma. *J. Am. Hosp. Assoc.* 1995; 31: 439-447.
- Kivatinitz SC, Favini P, Ghidoni R. 1992.** Gangliosides released by the perfused rat liver are associated to high density lipoprotein. *Biochem. International* 26: 821-829.
- Kivatinitz SC, Grabois VR, Quiroga S. 1995.** High density lipoprotein inhibits UDP-N acetylgalactosamine: Gm3, N acetylgalactosaminyltransferase and differentiation of cultured cerebral cells: comparison with a formerly described inhibitor of this enzyme. *J. Neurochemistry* 65: 775-781.

- Kivatinitz SC**, Pelsman MA, Alonso AC, Bagatolli L, Quiroga S. **1997**. High-density lipoprotein aggregated by oxidation induces degeneration of neuronal cells *J. Neurochem.* 69: 2102-2114.
- Krauss RM.** **1995**. Dense low density lipoproteins and coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 75: 53B-57B.
- Krieger M**, Herz J. **1994**. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem.* 63: 601-37.
- Krieger M**, Strickland DK. **2001**. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J. Clin. Invest.* 108: 779-784.
- Krieger M.** **1997**. The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr Opin Lipidol.* 8: 275–280.
- Kumar Bhunia A**, Han H, Snowden A, Chatterjee S. **1996**. Lactosylceramide Stimulates Ras-GTP Loading, Kinases (MEK, Raf), p44 Mitogen-activated Protein Kinase, and c-fos Expression in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* 271: 10660-10666.
- Kunjathoor VV**, Febbraio M, Podrez EA, Moore KJ, Andersson L, Koehn S, Rhee JS, Silverstein R, Hoff HF, Freeman MW. **2002**. Scavenger Receptors Class A-I/II and CD36 Are the Principal Receptors Responsible for the Uptake of Modified Low Density Lipoprotein Leading to Lipid Loading in Macrophages. *J. Biol. Chem.* 277: 49982-49988.
- L**
- Lagrost L**, Dengremont C, Athias A, de Geitere C, Fruchart JC, Lallemand C, et al . **1995**. Modulation of cholesterol efflux from Fu5AH hepatoma cells by apolipoprotein content of high density lipoprotein particles. Particles containing various proportions of apolipoproteins A-I and apo A-II. *J. Biol. Chem.* 270: 13004-13009.
- Larche M**, Lamb JR and Ritter MA. **1988**. A novel T-lymphocyte molecule that may function in the induction of self-tolerance and MHC-restriction within the human thymic microenvironment. *Immunology* 64: 101–105.

- 
- Larche M**, Lamb JR and Ritter MA. **1988**. p145-MR6: a novel T cell surface molecule with a role in tolerance to self. *Adv. Exp. Med. Biol.* 237: 413–417.
- Larche M**, Lamb JR, O'Hehir RE, Imami-Shita N, Zanders ED, Quint DE, Moqbel R and Ritter MA. **1988**. Functional evidence for a monoclonal antibody that binds to the human IL-4 receptor. *Immunology* 65: 617–622.
- Libby P**. **2000**. Changing concepts of atherogenesis. *J. Intern. Med.* 247: 349-358.
- Lichtman AH**, Cybulsky M, Luscinskas FW. **1996**. Immunology of atherosclerosis: the promise of mouse models. *Am. J. Pathol.* 149: 351-357.
- Linton MF**, Atkinson JB, Fazio S. **1995**. Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. *Science*; 267: 1034-1037.
- Liu Y**. **2000**. Uptake of HIV-1 Tat protein mediated by low-density lipoprotein receptor related protein disrupts the neuronal metabolic balance of the receptor ligands. *Nat. Med* 6: 1380-1387.

## M

- Maciejko JJ**, Holmes BA, Kotte BA, Zinsmeister AR, Dinh DM, Mao, SJ. **1983**. Apolipoprotein A-I as a marker of angiographically assessed coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 309: 385-389.
- Mackness MI**, Abbot C, Arrol S, et al. **1993**. The role of high-density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. *Biochem J.* 294: 829–834.
- Mahley RW**. **1988**. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240: 622-630.
- Maisin JR**, Kondi-Tamba A, Mattelin G. **1996**. Polysaccharides induce radioprotection of murine hemopoietic stem cells and increase the LD50/30 days. *Radiation Res.* 105: 276-281.
- Mandal A**, Zhang Z, Chou JY, Mukherjee AB. **2001**. Pancreatic phospholipase A2 via its receptor regulates the expression of key enzymes of phospholipid and sphingolipid metabolism. *Faseb J.* 8311 (10.1096/fj.00-0831fje).

- 
- Mazzone T. 1996.** Apolipoprotein E secretion by macrophages: its potential physiological functions. *Curr Opin Lipidol* 7: 303-307.
- McAnalley BH. 1990.** Process for preparation of aloe products. United States Patent 4,957,907.
- McMurray HF, Parthasarathy S, Steinberg D. 1993.** Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J Clin Invest* 92: 1004-1008.
- Melman L, Cao Z, Rennke S, Marzolo MP, Wardell MR, Bu G. 2001.** High Affinity Binding of Receptor-associated Protein to Heparin and Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Requires Similar Basic Amino Acid Sequence Motifs. *J. Biol. Chem.* 276: 29338-29346.
- Miller GJ, Miller NE. 1975.** Plasma high-density lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *Lancet* 1: 16–20.
- Miller NE. 1987.** Association of high density lipoprotein subclasses and apolipoproteins with ischemic heart disease and coronary atherosclerosis. *Am. Heart J.* 113: 589-597.
- Minakuchi R, Wacholtz MC, Davis LS, Lipsky PE. 1990.** Delineation of the mechanism of inhibition of human T cell activation by PGE<sub>2</sub>. *J. Immunol.* 145: 2616-2625.
- Minami YT, Kono T, Miyazaki T, Taniguchi T. 1993.** The IL-2 receptor complex: its structure, function and target genes. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 245-268.
- Miyata M, Smith JD. 1996.** Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat Genet* 14: 55-61.
- Morel DW. 1994.** Reduced cholesterol efflux to mildly oxidized high density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200, 408-416.
- Mukhin DN, Chao F, Kruth H. 1995.** Glycosphingolipid accumulation in the aortic wall is another feature of human atherosclerosis. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 15: 1607-1615.
- Mulhaupt HAB, Gafvels ME, Kariko K, Jin H, Arenas-Elliot C, Goldman BI, Strauss JF 3rd, Angelin B, Warhol MJ, McCrae KR. 1996.** Expression of very low density

---

lipoprotein receptor in the vascular wall: analysis of human tissues by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Am. J. Pathol.* 148: 1985–1997.

**Munro JM**, van der walt JD, Munro CS, Chalmers JA, Cox EL. **1987**. An immunohistochemical analysis of the cell composition of lesions of young adults. *Am J Pathol.* 140: 907-914.

**Musliner TA**, Krauss RM. **1988**. Lipoprotein subspecies and risk of coronary disease. *Clin. Chem.* 34: B78-83.

## N

**Nakari TM**, Robertson M, et al. **1994**. Interleukin 2 receptor  $\gamma$  chain expression on resting and activated lymphoid cells. *J. Exp. Med.* 180: 241-251.

**Navab M**, Hama SY, Anantharamaiah GM, et al. **2000**. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J. Lipid Res.* 41: 1495–1508.

**Nicoletti Y**, Migliorati G, Pagliaci MC, Grignani F, Riccardi C. **1991**. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139: 271-279.

**Nimpf J**, Schneider WJ. **2000**. From cholesterol transport to signal transduction: low density lipoprotein receptor, very low density lipoprotein receptor, and apolipoprotein E receptor-2. *Biochim Bioph Acta* 1529: 287-298.

**Nolte RT**, Atkinson D. **1992**. Conformational analysis of apolipoprotein A-I and E-3 based on primary sequence and circular dichroism *Biophys. J.* 63: 1221–1239.

## P

**Pajkrt D**, Doran J E, Koster F, et al. **1996**. Antiinflammatory effects of reconstituted high-density lipoprotein during human endotoxemia. *J Exp Med.*; 184: 1601–1608.

**Parthasarathy S**, Barnett J, Fong LG. **1990**. High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta.* 1044: 275–283.

**Parthasarathy S**, Rankin SM. **1992** Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *Prog Lipid Res* 31: 127-143.



- 
- Paszy C**, Maeda N, Verstuyft J, et al. **1993**. Apolipoprotein AI transgene corrects apolipoprotein E deficiency-induced atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* 94: 899–903.
- Patel DD**, Forder RA, Soutar AK, Knight BL. **1997**. Synthesis and properties of the very-low-density-lipoprotein receptor and a comparison with the low-density-lipoprotein receptor. *Biochem J.* 324: 371–377.
- Peng SY**, Norma IJ, Curtin J, Corrier D, McDaniel HR, Busbee D. **1991**. Decreased mortality of Normal Murine Sarcoma in mice treated with the immunomodulator Accemannan. *Mol. Biother* 3: 79-87.
- Peterson GL**. **1977**. *Analytical Chem.* 83, 346-356.
- Phipps RP**, Stein SH, Roper RL. **1991**. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol. Today* 12: 349-352.
- Plump AS**, Scott CJ, Breslow JL. **1994**. Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 9607–9611.
- Pospisil M**, Jary J, Netikova J, Marek M. **1982**. Glucan-induced enhancement of hemopoietic recovery in gamma-irradiated mice. *Experientia.* 38: 1232-1234.
- Prokazova NV**, Orekhov AN, Mukhin DN, Mikhailenko IA, Kogtev LS, Sadovskaya VL, Golovanova NK, Bergelson LD. **1987**. The gangliosides of adult human aorta: intima, media and plaque. *Eur. J. Biochem.* 167: 349-352.

## Q

- Quinn MT**, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. **1987**. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocytes/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2995-2998.

## R

- Rajavashisth TB**, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. **1990**. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage

- 
- colony-stimulating factors by modified low density lipoproteins. *Nature* 344: 254-257.
- Reilly S**, Ferrell R, Kottke B, Kamboh M, Sing C. **1991**. The gender-specific apolipoprotein E genotype influence on the distribution of lipids and lipoproteins in the population of Rochester, MN. I. Pleiotropic effects on means and variances. *Am J. Hum Genet* 49: 1155-1166.
- Reilly S**, Ferrell R, Kottke B, Kamboh M, Sing C. **1992**. The gender-specific apolipoprotein E genotype influence on the distribution of lipids and lipoproteins in the population of Rochester, MN. II. Pleiotropic effects on means and variances. *Am J. Hum Genet* 51: 1311-1324.
- Reilly S**, Ferrell R, Kottke B, Kamboh M, Sing C. **1994**. The gender-specific apolipoprotein E genotype influence on the distribution of lipids and lipoproteins in the population of Rochester, MN. III. Pleiotropic effects on means and variances. *Am J. Hum Genet* 55: 1001-1018.
- Reynolds T**, Dweck AA. **1999**. Aloe vera gel leaf: a review update. *J. Ethnopharmacol.* 68: 3-37.
- Ridgway W**, Fassò M, Garrison Fathman C. **1998**. Following Antigen Challenge, T Cells Up-Regulate Cell Surface Expression of CD4 In Vitro and In Vivo. *J. Immunol.* 161: 714-720.
- Rogers DP**, Roberts LM, Lebowitz J, Datta G, Anantharamaiah GM, Engler JA, Brouillette CG. **1998**. The lipid-free structure of apolipoprotein A-I: effects of amino-terminal deletions. *Biochemistry* 37: 11714–11725.
- Rohlmann A**, Gotthardt M, Hammer RE, Herz J. **1998**. Inducible Inactivation of Hepatic LRP Gene by Cre-mediated Recombination Confirms Role of LRP in Clearance of Chylomicron Remnants. *J. Clin. Invest.* 101: 689-695.
- Rolland PH**, Jouve R, Pellegrin E, Mercier C, Serradimigni A. **1984**. Alteration in prostacyclin and prostaglandin E2 production. Correlation with changes in human aortic atherosclerotic disease. *Arteriosc. Thromb. Vasc. Biol.* 4: 70-78.
- Ross R**, **1993** The patogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-809.

---

**Ross R, 1999.** Atherosclerosis an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine* 340: 115-126.

**Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, et al. 1991.** Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature* 353: 265–267.

## S

**Saito A, Pietromonaco S, Loo AK, Farquhar MG. 1994.** Complete Cloning and Sequencing of rat gp330/"megalin," a Distinctive Member of the Low Density Lipoprotein Receptor Gene Family. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9725-9729.

**Sakai J, Hoshino A, Takahashi S, Miura Y, Ishii H, Suzuki H, Kawarabayasi Y, Yamamoto T. 1994.** Structure, Chromosome Location, and Expression of the Human Very Low Density Lipoprotein Receptor Gene. *J Biol Chem* 269: 2173–2182.

**Salmon S, Santus R, Maziere J, et al. 1992.** Modified apolipoprotein pattern after irradiation of human high-density lipoproteins by ultraviolet B. *Biochim. Biophys. Acta* 1128, 167-173.

**Santamarina-Fojo S. 1992.** Genetic dyslipoproteinemias: role of lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II. *Curr Opin Lipidol.* 3: 186–195.

**Santana P, Llanes L, Hernandez I, et al. 1996.** Interleukin-1 beta stimulates sphingomyelin hydrolysis in culture granulosa cells: evidence for a regulatory role of ceramide on progesterone and prostaglandin biosynthesis. *Endocrinology* 137: 2480-2489.

**Schaefer EJ, Eisenberg S, Levy RI. 1978.** Lipoprotein apoprotein metabolism. *J. Lipid Res.* 19: 667-687.

**Schönbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. 1999.** Upregulated expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerosis lesions. *American Journal of Pathology* 155: 1281-1291.

**Schwartz GA. 1980.** Quantitative analysis of neutral glycosphingolipids from human lymphocyte subpopulations. *Biochem. J.* 189: 407-412.

- 
- Segrest JP**, Garber DW, Brouillette CG, Harvey SC, Anantharamaiah GM. **1994**. The amphipathic alpha helix: a multifunctional structural motif in plasma apolipoproteins. *Adv. Protein Chem.* 45: 303-369.
- Segrest JP**, Jones MK, De Loof H, Brouillette CG, Venkatachalapathi YV, Anantharamaiah GM. **1992**. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoprotein: a review of secondary structure and function. *J Lipid Res.* 33: 141-166.
- Segrest JP**, Jones MK, De Loof H, Dashti N. **2001**. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J. Lipid Res.* 42: 1346-1367.
- Segrest JP**, Jones MK, Mishra VK, Anantharamaiah GM, Garber DW. **1994**. ApoB-100 has a pentapartite structure composed of three amphipathic alpha-helical domains alternating with two amphipathic beta-strand domains. Detection by the computer program LOCATE. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol.* 14: 1674-1685.
- Segrest JP**. **1977**. Amphipathic helices and plasma lipoproteins: thermodynamic and geometric considerations. *Chem. Phys. Lipids* 18. 7-22.
- Shah PK**, Kaul S, Nilsson J, Cercek B. **2001**. Exploiting the Vascular Protective Effects of High-Density Lipoprotein and Its Apolipoproteins: An Idea Whose Time for Testing Is Coming, Part I. *Circulation* 104: 2376-2383.
- Smith J**, Miyata M, Ginsberg M, Grigaux C, Shmookler E, Plump A. **1996**. Cyclic AMP Induces Apolipoprotein E Binding Activity and Promotes Cholesterol Efflux from a Macrophage Cell Line to Apolipoprotein Acceptors *J Biol. Chem* 271: 30647-30655.
- Spiegel S**, Merrill AH Jr. **1996**. Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J.* 10: 1388-1397.
- Stangl H**, Cao G, Wyne KL, Hobbs HH. **1998**. Scavenger Receptor, Class B, Type I-dependent Stimulation of Cholesterol Esterification by High Density Lipoproteins, Low Density Lipoproteins, and Nonlipoprotein Cholesterol. *J. Biol. Chem.* 273: 31002-31008.
- Stary HC**. **1987**. Macrophages, macrophages foam cells, and eccentric intimal thickening in the coronary arteries of young children. *Atherosclerosis* 64: 91-108.

- Stary HC. 1989.** Evolution and progression of atherosclerotic lesion in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis* 9: (suppl I) I-19-I-32.
- Steinberg D. 1997.** Oxidative modifications of LDL and Atherogenesis. *Circulation* 95: 1062-1071.
- Stephan ZF, Yurachek ED. 1993.** Rapid fluorometric assay of LDL receptor activity by DiI-labeled LDL. *J.Lipid Res* 34: 325-330.
- Stockinger W, Hengstschlager-Ottvad E, Novak S, Matus AH, Ttinger M, Bauer J, Lassmann H, Schneider WJ, Nimf J. 1998.** The low density lipoprotein receptor gene family . Differential expression of two alpha2-macroglobulin receptors in the brain. *J Biol Chem.* 273: 32213-32221.
- Strickland DK, Gonias SL, Argraves WS. 2002.** Diverse roles for the LDL receptor family. *Trends Endocrinol Metabolism* 13: 66-74.
- Subbaramaiah K, Chung WJ, Dannenberg J. 1998.** Ceramide regulates the transcription of Cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 273: 32943-32949.
- Subbiah MT, Deitemeyer D, Yunker R. 1981.** Regional aortic differences in atherosclerosis susceptibility. Relationship to lipid concentration and prostaglandin biosynthesis. *Vuirchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 36: 41-46.
- Symington FW. 1989.** CDw17: a neutrophil glycolipid antigen regulated by activation. *J. Immunol.;* 142: 2784-2790.
- T**
- Takahashi S, Kawarabayasi Y, Nakai T, Sakai J, Yamamoto T. 1992.** Rabbit very low density lipoprotein receptor: A low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9252–9256.
- Tall AR, Small DM, Deckelbaum RJ, Shipley GG. 1977.** Structure and thermodynamic properties of high density lipoprotein recombinants. *J. Biol. Chem.* 252. 4701–4711.
- Taniguchi T, Minami Y. 1993.** The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell* 73: 5-8.
- Tedgui A, Mallat Z. 2001.** Anti-Inflammatory mechanism in vascular wall. *Circ Res* 88: 877-887.

---

**Thiele DL**, Kurosaka M, Lipsky P. **1983**. Phenotype of the accessory cell necessary for mitogen-stimulated T and B cell responses in human peripheral blood: delineation by its sensitivity to the lysosomotropic agent, L-leucine methyl ester. *J Immunol.* 131: 2282-2290.

**Trommsdorff M**, Borg JP, Margolis B, Herz J. **1998**. Interaction of Cytosolic Adaptor Proteins with Neuronal Apolipoprotein E Receptors and the Amyloid Precursor Protein. *J Biol. Chem* 273: 33556-33565.

**Trommsdorff M**, Gotthardt M, Heisberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimf J, Hammer R, Richardson JA, Herz J. **1999**. Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* 97: 689-701.

## V

**Viani P**, Cazzola R, Cervato G, et al. **1996**. Pyrene lipids as markers of peroxidative processes in different regions of low and high density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1315, 78-86.

**Viñals M**, Martínez-González J, Badimon JJ, et al. **1997**. HDL-induced prostacyclin release in smooth muscle cells is dependent on cy-clooxygenase-2 (Cox-2). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17: 3481-3488.

## W

**Waldmann TA.** **1994**. The interleukin-2 receptor. *J. Biol. Chem.* 266: 2681-2684

**Walker C**, Kristensen F, Bettens F, deWeck AL. **1983**. Lymphokine regulation of activated (G1) lymphocytes. I. Prostaglandin E2-induced inhibition of interleukin 2 production. *J. Immunol.* 130: 1770-1773.

**Wang CS.** **1991**. Structure and functional properties of apolipoprotein C-II. *Prog Lipid Res.* 30: 253-258.

**Wang P**, Anderson PO, Chen S, Paulsson KM, Sjogren HO, Li S. **2001**. Inhibition of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB in CD4 T cells by peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands. *Int Immunopharmacol.* 1: 803-812.

- Webb JC**, Patel DD, Jones MD, Knight BL, Soutar AK. **1994**. Characterization and tissue-specific expression of the human'-very low density lipoprotein (VLDL) receptor' mRNA. *Hum Mol Genet* 3: 531-537.
- Weinberg RA** **1995**. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81: 323-330.
- Wick G**, Romen M, Amberg A, Metzler B, Mayr M, Falk-ensammer G, and Xu Q. **1997**. Atherosclerosis, autoimmunity, and vascular-associated lymphoid tissue. *FASEB J*. 11: 1199-1207.
- Willnow TE**, Armstrong SA, Hammer RE, Herz J. **1995**. Functional Expression of Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein is Controlled by Receptor-Associated Protein in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92: 4537-4541.
- Willnow TE**, Nykjaer A, Herz J. **1999**. Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nat Cell Biol*. 1: E157- E162.
- Wlodawer A**, Segrest JP, Chung BH, Chiovetti R Jr, Weinstein, JN. **1979**. High-density lipoprotein recombinants: evidence for a bicycle tire micelle structure obtained by neutron scattering and electron microscopy *FEBS Lett*. 104: 231-235.
- Wooles WR**, Di Luzio NR. **1963**. Reticuloendothelial function and the immune response. *Science* 1963; 142:1078.
- Wyne KL**, Pathak K, Seabra MC, Hobbs HH. **1996**. Expression of the VLDL receptor in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 16: 407-415.
- Y**
- Yaari S**, Goldbourt U, Even-Zohar S, et al. **1981**. HDL and total cholesterol: association with total, cardiovascular and cancer mortality in a seven year prospective study of 10,000 men. *Lancet* 1: 1011-1015.
- YamamotoT**, Davis CG, Brown MS, Schneider WJ, Casey ML, Goldstein JL, Russell DW. **1984**. The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* 39: 27-38.
- Yi PI**, Beck G, Zucker S. **1981**. Membrane receptors for very low-density lipoprotein (VLDL) inhibitor of lymphocyte proliferation. *Blood*. 57: 1055-1064.

**Yla-Herttuala S**, Palinski W, Butler SW, Picard S, Steinberg D, Witztum JL. **1994**. Rabbit and human atherosclerosis lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 14: 32–40.

## Z

**Zerba KE**, Ferrell RE, Sing CF. **1996**. Genotype- environment interaction: apolipoprotein E gene effects and age as an index of time and spatial context in humans. *Genetics* 143: 463-478.

**Zhang WY**, Paulette M, Kruth HS. **1996**. Apolipoprotein E Produced by Human Monocyte-derived Macrophages Mediates Cholesterol Efflux That Occurs in the Absence of Added Cholesterol Acceptors. *J Biol. Chem* 271: 28641-28646.



**ANEXO II**



ELSEVIER

International Immunopharmacology xx (2004) xxx–xxx

International  
Immunopharmacology

www.elsevier.com/locate/intimp

## Mannan from *Aloe saponaria* inhibits tumoral cell activation and proliferation

M. Cecilia Sampedro<sup>a</sup>, Rodolfo L. Artola<sup>b</sup>, Mariano Murature<sup>c</sup>, Domingo Murature<sup>b</sup>, Yanina Ditamo<sup>a</sup>, German A. Roth<sup>a</sup>, Silvia Kivatinitz<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química Biológica-CIQUIBIC, Facultad Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, C5000GYA-Córdoba 5016, Argentina

<sup>b</sup>Laboratorio de Hemoderivados, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

<sup>c</sup>Cooperativa Agropecuaria, Productores y Consumidores Limitada (CAPYC) Devoto, Córdoba, Argentina

Received 5 June 2003; received in revised form 30 June 2003; accepted 31 December 2003

### Abstract

In this study, we tested the antiproliferative effects of mannan from *Aloe saponaria* using normal murine (SpMC) and human cells (PBMC) and several tumoral cell lines. Employing flow cytometry, it could be determined that mannan inhibits the proliferative response in normal and tumoral cells. Mannan affects the expression of CD3<sup>+</sup> SpMC indicating that mannan inhibits mainly T lymphocyte proliferative response. Also in SpMC cultured with or without mitogen mannan produces an increase of an activation marker (CD25). On C1498 cell line, mannan reduces CD3 expression and abolishes the CD25 expression. In conclusion, mannan has a dual beneficial effect when applied to normal and tumoral cells at the same time by inhibiting the activation of cancer cells and improving that of normal ones.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** *Aloe saponaria*; Activation; Tumoral cell; Mannan

### 1. Introduction

The Aloe family is constituted by tropical or subtropical plants characterized by lance-shaped leaves with jagged edges and in some species sharply tapered as saponaria. Although the Aloe is an original species from South Africa, it also grows in tropical and tempered areas, and has successfully been intro-

duced and cultivated in various regions of Argentina. Like most members of this group, *Aloe vera* L. (*Aloe barbadensis* Mill. or *Aloe vulgaris* Lam.) is a species that does not tolerate temperatures under 0 °C. *Aloe saponaria* (Ait.) Haw. (*Aloe latifolia* Haw.) seems to be an exception, since it can thrive in atmospheres with a minimum temperature of until -7 °C, which explains its wide distribution in the region of Córdoba, Argentina.

Two basic substances are extracted from the leaves of aloe. The so-called gel is derived from the pulp of the leaves and contains carbohydrate polymers such as glucomannanes or pectic acid [1]. One important

\* Corresponding author. Tel.: +54-3514334168; fax: +54-3514334074.

E-mail addresses: silvia.kivatinitz@fcq.unc.edu.ar, skivat@dqf.fcq.unc.edu.ar (S. Kivatinitz).

feature that distinguishes *saponaria* mannan from *vera* mannan is the content of anthraquinone (Murature, personal communication). *Saponaria* gel is composed of approximately 98.5% water. The total solid is made up of over 60% polysaccharides, while organic acids and inorganic compounds account for the remainder of the solid. The mucilage, sugars, fiber, proteins, ash, fats, aloin and resin are the major constituents of the solid [2]. The carbohydrates found are galactose, glucose, mannose, rhamnose, xylose and uronic acids.

It has been reported that the polysaccharide has diverse immunomodulatory activities in vivo as well as in vitro (reviewed in Ref. [3]). It is a modulator of cellular and humoral immunity [4] and it also stimulates proliferation of murine pluripotent hematopoietic stem cells, granulocyte macrophage colony-forming cells, and cells forming myeloid and erythroid colonies [5–7]. As well as i.v. administration of polysaccharide induces protection of murine hematopoietic stem cells against X-ray exposure, thereby decreasing the mortality of the exposed animal.

Acemannan (ACM) extracted from the plant *A. vera* and *A. saponaria* is a polydispersed b (1–4)-linked acetylated mannan. Interest in ACM was focused initially for wound healing, but there have recently been several reports on its antiviral and antiproliferative properties in vivo. Parenteral administration of ACM has been followed by a great regression of tumors such as fibrosarcomas in rats, mice, dogs and cats [8–12]. Other aloe constituents, lectins and polysaccharides have been proposed to prevent carcinogenesis. Lectin-like substances from the leaves of *A. vera* and *A. saponaria* have been shown to have haemoagglutinating properties, and fresh preparations also promoted the growth of normal human cells in culture but inhibited tumor cell growth [13]. Most of these experiments were carried out using Acemannan® but little is known about the effects of the mannan extracted from *A. saponaria* on the immune system or its anti tumoral effects.

In this study, we tested the antiproliferative effects of *A. saponaria* gel using tumoral cell lines, C1498 (mouse acute myeloid leukemia), HT29 (human colorectal adenocarcinoma), PC-12 (rat pheochromocytoma), CHO (ovary of an adult Chinese hamster), L6 (rat myoblast), NIH 3T3 (fibroblast from mouse) and normal murine and human cells.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Mannan purification

*A. saponaria* mannan purification was performed following the procedure described for *A. vera* mannan [1].

### 2.2. Purification of murine SpMC

Spleens from Balb-c mice (CNEA, Argentina) age 6–8 weeks were removed and cell suspensions were prepared by homogenization in a tissue grinder. The erythrocytes were lysed by brief incubation in 8.3 g/l NH<sub>4</sub>Cl in 0.01 mol/l Tris–HCl pH 7.5 (Red Blood cell lysing buffer, Sigma-Aldrich, MO). The cells were washed three times with RPMI-1640 medium and their viability determined by trypan blue dye exclusion was always >99%.

### 2.3. Animal treatment

Male mice from a from Balb-c strain (CNEA) were used. Animals were maintained under standard lighting and temperature conditions. All the mice were treated according to NIH regulations and the Institutional Care and Use of Animals Committee (exp. no. 15-99-40426) approved animal handling and experimental procedures. Mice under light ether anesthesia received intradermal injections in both hind feet with 0.25 ml of an emulsion constituted by 0.05 ml of phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 and 0.20 ml of complete Freund's adjuvant (CFA, Sigma-Aldrich). After 10 days of inoculation, spleens were removed and cell suspensions were prepared as indicated above. The purified protein derivative (PPD) antigen from *Mycobacterium tuberculosis* was obtained from Instituto Nacional de Microbiología “Carlos Malbrán” (Buenos Aires, Argentina).

### 2.4. Purification of human PBMC

PBMC were isolated by Fycoll-Hypaque (Histopaque, Sigma-Aldrich) from freshly drawn heparinized blood or buffy coat of healthy donors. The layer of mononuclear cells was recovered and their viability determined by trypan blue dye

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136 exclusion was always >99%. The investigation  
137 conforms to principles outlined in the declaration  
138 of Helsinki.

#### 140 2.5. Cell lines

141 In this study, we used several cell lines: C1498 is  
142 an IL-4R<sup>+</sup> spontaneously occurring C57BL/6 mye-  
143 loid leukemia; HT29 is a human colon cancer cell  
144 line; PC-12 is a cell line derived from a transplant-  
145 able rat pheochromocytoma; CHO cell line derived  
146 from an ovary of an adult Chinese hamster; L6 is a  
147 rat myoblast; and NIH 3T3 fibroblast from *Mus*  
148 *musculus* (mouse). All the cells lines were cultured  
149 in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)  
150 (Gibco Life Technologies Paisley, UK), 10% heat  
151 inactivated fetal bovine serum and 1% penicillin/  
152 streptomycin.

#### 154 2.6. Cell proliferation assays

155 Cell cultures were set up in triplicate in 24-well  
156 microculture plates and incubated at 37 °C in RPMI-  
157 1640 medium containing 10% fetal bovine serum in  
158 a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. SpMC (1 × 10<sup>6</sup> cells/ml)  
159 were cultured in the presence of concanavalin A  
160 (Con A) (3 µg/ml) with different concentrations of  
161 mannan, and as a control experiment the effects of  
162 vincristine and doxorubicin (10 ng/ml and 600 pg/  
163 ml, respectively) were tested simultaneously. SpMC  
164 (1 × 10<sup>6</sup> cells/ml) were cultured in the presence or  
165 absence of Con A (3 µg/ml) or mannan (0.6 mg/ml)  
166 in a total volume of 2 ml for 96 h. SpMC (1 × 10<sup>6</sup>  
167 cells/ml) from inoculated mice were culture in the  
168 presence or absence of Con A (3 µg/ml), PPD (15  
169 µg/ml, antigen-specific stimulation) or mannan (0.6  
170 mg/ml). Cultures were carried out for 96-h period  
171 since the mitogenic effect of Con A is fully dis-  
172 played at this time, after longer culture times most  
173 cells die and the percentage of viable cells is very  
174 low to perform this kind of experiments [14]. Cul-  
175 tures containing 1 × 10<sup>6</sup> PBMC were cultured in the  
176 presence of phytohaemagglutinin (PHA) (5 mg/ml)  
177 with or without mannan (0.6 mg/ml) in a total  
178 volume of 2 ml for 96 h [15]. The tumoral cell lines  
179 were cultured without mitogen with or without  
180 mannan (0.6 mg/ml). Cell proliferation was evaluat-  
181 ed by flow cytometry.

#### 2.7. Phenotypic analysis of lymphocyte population and the murine cell line C1498

182 Cultures of SpMC (1 × 10<sup>6</sup> cells/ml) were incubat-  
183 ed in RPMI-1640 medium (or DMEM for C1498 cell  
184 line) (24 wells/plates) at 37 °C during 96 h in the  
185 presence or absence of Con A (3 µg/ml) with or  
186 without mannan (0.1 g%) in a total volume of 2 ml.  
187 The cells were washed with Hank's balanced salt  
188 solution (HBSS) containing 1% BSA and 0.1%  
189 NaN<sub>3</sub> and preincubated with anti-mouse CD32/CD16  
190 for 1 h at 4 °C in order to block immunoglobulin non-  
191 specific binding through Fc receptor (constant frag-  
192 ment of immunoglobulin receptor). Following Fc  
193 blocking, cells were incubated with FITC-labeled  
194 anti-mouse CD3 monoclonal antibody (T lymphocyte)  
195 and PE-labeled anti-mouse IL-2R (CD25) monoclonal  
196 antibody (activated lymphocyte). Antibodies (1 µg/10<sup>6</sup>  
197 cells) were incubated for 30 min at 4 °C. The cells  
198 were washed three times with HBSS, fixed in 2%  
199 formaldehyde and stored at 4 °C in the dark until  
200 analysis. All antibodies were purchased from Phar-  
201 mingen, San Diego, CA.

#### 2.8. Platelets, erythrocytes (if any) and non-lymphoid cell were excluded from analysis by setting an appropriate gate on the forward light scatter (FW- SC) vs. 90° light scatter parameters (RT-SC)

202 FW-SC is primarily related to cell size and thus a  
203 high value is an index of blastogenic response. RT-SC  
204 (measured at 90°) is related to a variety of factors  
205 including refractive index, granularity and cell shape.  
206 We collected data from 10,000 cells in each sample  
207 using a flow cytometer (ORTHO Immuno Count Flow  
208 Cytometry System) and results were analyzed with  
209 WinMDI software version 2.7.

### 3. Results And Discussion

210 The effects of mannan on normal human and  
211 murine mononuclear cells were examined by flow  
212 cytometry. When SpMC were exposed for 96 h to  
213 different concentrations of mannan, it was found an  
214 inhibition of the blastogenic effect of Con A, a non-  
215 specific mitogen (Fig. 1). The experiment showed that  
216 with a dose of approximately 0.6 mg/ml the response  
217

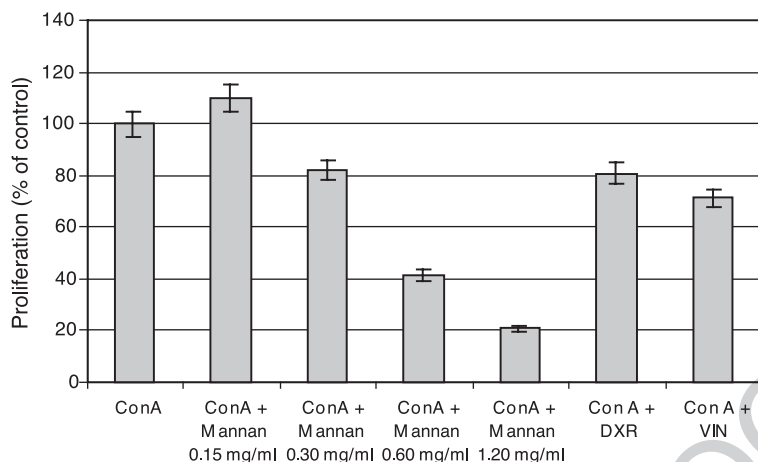


Fig. 1. Effects of different concentrations of mannan from *A. saponaria* on cell proliferation. SpMC were cultured for 96 h in the presence of the mitogen Con A and with different concentrations of mannan from *A. saponaria*. Concentrations are indicated in the figure. As control, cells were treated with doxorubicin (DXR) or vincristine (VCR) at 10 ng/ml and 600 pg/ml, respectively. Results represent the mean  $\pm$  S.E. of triplicate experiments.

226 decayed to the half; thus, this concentration was  
 227 selected to be employed in the next experiments. As  
 228 control experiments, the effects of vincristine and  
 229 doxorubicin were tested simultaneously, both these  
 230 drugs inhibited the proliferative response elicited by  
 231 Con A as previously described [16] (Fig. 1).

232 Stimulated SpMC and PBMC were cultured during  
 233 96 h in the presence or absence of purified mannan  
 234 and the mitogens (Con A or PHA, respectively). Fig.  
 235 2A and B shows that mannan inhibits the lympho-  
 236 proliferative response induced by the mitogen in both  
 237 cases, since the population of cells with higher size  
 238 (blast cells) was specifically reduced. The population

of cells with the size of blastic ones comprised 80% of  
 the total cell number in cultures of SpMC plus Con A  
 and this population was reduced to 66% of the total  
 cell number when mannan was added to the cultures  
 (60% and 31% for PBMC plus PHA and PBMC plus  
 PHA plus mannan, respectively). It is also interesting  
 that the total number of cells bearing the volume of  
 resting cells was not affected by the addition of  
 mannan (Fig. 2A and B).

To determine whether the antiblastogenic effect of  
 mannan on normal cells could be extended to blasto-  
 genic tumoral cells, the same analysis was carried out  
 employing several murine and human tumoral cell

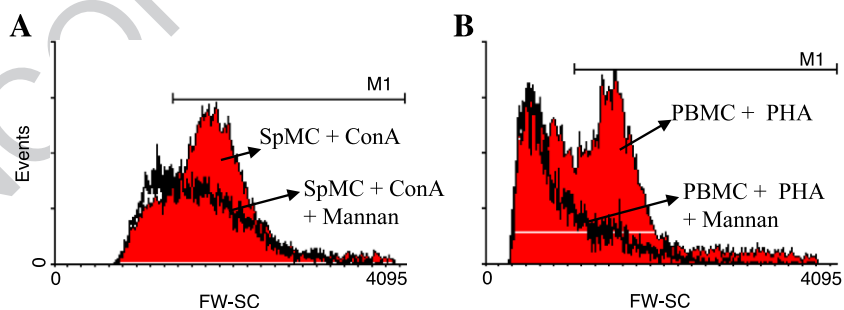


Fig. 2. Effects of mannan from *A. saponaria* on cell size. SpMC and PBMC were cultured in the presence of a mitogen with (open, black histograms) or without mannan (filled histograms) (panels A and B, respectively). Forward scatter light values (cell size) were determined by flow cytometry and represented as forward scattered versus cell number histograms. The curves display the mean of data from three separate experiments.

t1.1 Table 1

t1.2 Effect of mannan on tumoral cell proliferation

| t1.3  | Cell lines | Number of cells |             |                 |
|-------|------------|-----------------|-------------|-----------------|
|       |            |                 | plus mannan | % of inhibition |
| t1.4  |            |                 |             |                 |
| t1.5  | PC12       | 2700 ± 100      | 1360 ± 70   | 50              |
| t1.6  | CHO        | 4200 ± 200      | 580 ± 30    | 86              |
| t1.7  | L6         | 7500 ± 400      | 1590 ± 80   | 79              |
| t1.8  | NIH 3T3    | 7600 ± 400      | 720 ± 40    | 91              |
| t1.9  | C1498      | 4050 ± 400      | 1800 ± 80   | 45              |
| t1.10 | HT29       | 6500 ± 300      | 2275 ± 90   | 35              |

Tumoral cell lines were cultured for 96 h with and without mannan. The proliferation was evaluated by flow cytometry. Data are reported as mean of four experiments carried out in triplicate done with different cells and mannan preparations and expressed in number of cells ± S.D.

t1.11

252 lines. Table 1 shows that mannan inhibits spontaneous  
253 proliferation of all the lines tested.

254 In order to discern whether the inhibitory effect of  
255 mannan on the balstogenic response elicited by Con A  
256 affected or not the relative proportion of lymphocytes  
257 (T cell vs. B cell) in cultures of spleen cells, the  
258 percentage of CD3<sup>+</sup> SpMC (T cells) after 96 h of Con  
259 A stimulation and cultured with and without mannan  
260 was evaluated by flow cytometric analysis. Fig. 3A  
261 shows that mannan does not change the proportion of  
262 T cells in cultures of SpMC after 96 h of culture. Fig.

3C shows that mannan affects only CD3<sup>+</sup> SpMC, 263  
while no effect could be observed on CD3<sup>-</sup> SpMC, 264  
thus indicating that mannan inhibited mainly T lym- 265  
phocyte proliferation. 266

The multisubunit receptor of interleukin-2 cytokine 267  
(IL-2R or CD25) is both essential in mediating T-cell 268  
growth/clonal expansion following antigen (or mito- 269  
gen) stimulation, and a marker of T-cell activation 270  
since it is expressed only upon activation with the 271  
stimuli [17–20]. When cells were cultured without 272  
mitogen, mannan produced an increase in the expres- 273  
sion of CD25 (Fig. 3B). The percentages of SpMC 274  
CD25<sup>+</sup> were 18% in absence of mannan and increased 275  
up to 74% when cells were cultured with mannan. 276  
This fact could explain some of the immunostimulant 277  
effects of mannan observed in vivo. Cultures that 278  
contain simultaneously Con A and mannan had a 279  
higher proportion of the CD25<sup>+</sup> cells (Fig. 3D) than 280  
cells cultured with mitogen alone, to an extent similar 281  
to the one observed on resting cells, indicating that 282  
mannan has an immunomodulatory effect controlling 283  
the extent of the cell expansion without interfering 284  
with interleukin receptor expression. The mean fluo- 285  
rescence intensity (MFCh) of positive cells, which 286  
depends on the number of CD25 molecules/cell sur- 287  
face unit, follows the same trend as the popula- 288  
tion of CD25 positive cells (SpMC + Con A: 2133, 289

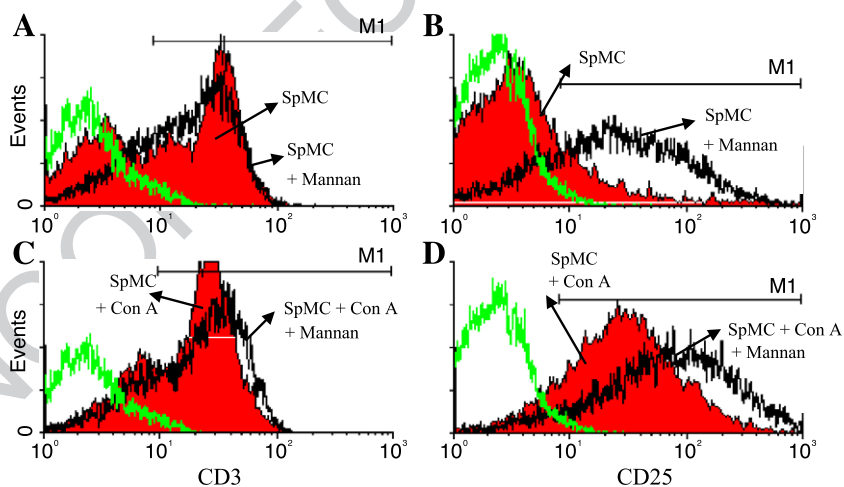


Fig. 3. Effect of mannan from *A. saponaria* on CD3 and CD25 surface expression on murine SpMC. SpMC were cultured in the absence (A–B) or presence (C–D) of Concanavalin A with (open, black histograms) or without mannan (filled histograms), and the cell-surface expression of CD3 and CD25 was analyzed by flow cytometry at 96 h of culture. The x- and y-axes represent fluorescence (three-decade log scale) and relative cell number, respectively. Histograms from cells stained with control isotype-matched mAb are indicated by an open gray histogram. The curves display the mean of data from three separate experiments.

290 SpMC+Con A+mannan: 2609); thus, mannan in-  
291 creases the surface density of IL-2 receptor on T  
292 cells.

293 To test the effect of mannan on tumoral cells, we  
294 observed the expression of the lymphocytic marker  
295 CD3 and the activation marker CD25 on C1498 cell  
296 line that has been reported to respond to IL-2 stimuli  
297 [20]. The effect of mannan on CD3 expression was  
298 similar to that observed for SpMC stimulated with  
299 mitogen (Figs. 3C and 4A). The most interesting  
300 result was that mannan abolished the expression of  
301 CD25 on this tumoral cells contrasting with the effect  
302 of mannan on normal murine cells cultured with or  
303 without mannan (Figs. 3B,D and 4B).

304 To discard the possibility that mannan inhibits the  
305 action of a non-specific stimuli like Con A and PHA  
306 but not the proliferative effect of a specific stimulus, a  
307 mouse model was employed. SpMC from mice im-  
308 munitized with CFA were stimulated in vitro with PPD  
309 for 96 h with and without mannan. The blastogenic  
310 responses to the stimulus and CD3 and CD25 expres-  
311 sion were analyzed by flow cytometry. Table 2 shows  
312 that PPD increased 20% the cells in the blastogenic  
313 region and that the presence of mannan halved the  
314 number of blastic cells. More interestingly, mannan  
315 increased the percentage of CD3–CD25<sup>+</sup> cells. The  
316 control experiment carried out employing Con A  
317 instead of PPD as in vitro challenge followed a similar  
318 trend although the number of blastic cells was higher  
319 than in the experiments of cells challenged with PPD.

320 In conclusion, our results show that mannan inhib-  
321 its proliferation of many types of normal activated and  
322 tumoral cells. We focused the study on the question if

Table 2

Effect of mannan on CD3<sup>+</sup>–CD25<sup>+</sup> SpMC proliferation

|                                   | Proliferation<br>number of<br>cells | Percentage<br>of cells<br>CD3 <sup>+</sup> –CD25 <sup>+</sup> |      |
|-----------------------------------|-------------------------------------|---|------|
| SpMC infected                     | 4400 ± 200                          | 7   | t2.4 |
| SpMC infected + PPD               | 5200 ± 300                          | 7   | t2.5 |
| SpMC infected + PPD +<br>mannan   | 2900 ± 100                          | 29  | t2.6 |
| SpMC infected + Con A             | 6500 ± 400                          | 2   | t2.7 |
| SpMC infected + Con A +<br>mannan | 2300 ± 100                          | 40  | t2.8 |

323 SpMC, infected with CFA, were cultured for 96 h in the presence or  
324 absence of Con A, with and without mannan. The proliferation of  
325 the total cells and the cells that express CD3 and CD25 were  
326 evaluated by flow cytometry. Data are reported as mean of four  
327 experiments carried out in triplicate done with different cells and  
328 mannan preparations and expressed in number of cells ± S.D. t2.9

329 this antiproliferative effect was the consequence of an  
330 antiactivation effect. To test this hypothesis, we  
331 employed lymphocytic cells since its activation  
332 markers are well known. It was found that, while  
333 mannan inhibits the expression of activation markers  
334 (CD3–CD25<sup>+</sup> cells) of tumoral cells of lymphocytic  
335 origin, it enhances its expression on normal lympho-  
336 cytes. Thus, the beneficial effects of mannan on  
337 animals bearing tumors [8–12] could be due, at least  
338 in part, to the direct effects of mannan on tumoral and  
339 normal cells inhibiting the activation of cancer cells  
340 and improving that of normal cells. This action could  
341 be exerted through the mannose receptor (MR) since it  
342 has been reported its involvement in the effect of  
343 acemannan on a macrophage cell line by inhibiting its  
344 action after pre-incubation with Con A [21].

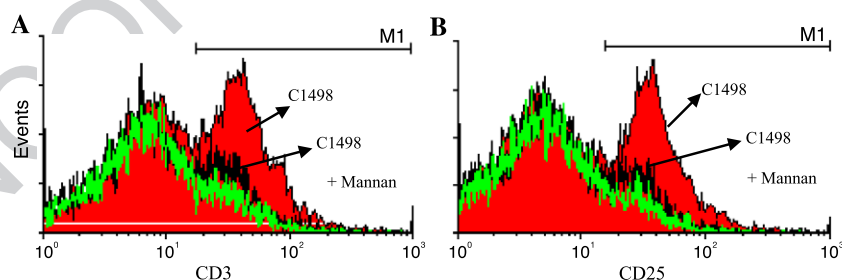


Fig. 4. Effect of mannan from *A. saponaria* on CD3 and CD25 surface expression on the tumoral cell line C1498. C1498 cells were cultured with (open, black histograms) or without mannan (filled histograms), and the cell-surface expression of CD3 and CD25 was analyzed by flow cytometry at 96 h of culture. The x- and y-axes represent fluorescence (three-decade log scale) and relative cell number respectively. Histograms from cells stained with control isotype-matched mAb are indicated by an open gray histogram. The curves display the mean of data from three separate experiments.

339 Sequence alignment identified the protein DEC-  
340 205 as a member of the mannose receptor family  
341 based on the overall structural similarity to the MR  
342 and phospholipase A2 receptor (PLA2R). DEC-205  
343 was identified as the 200-kDa glycoprotein (gp200)  
344 recognized by mAb MR6. gp200-MR6 was of interest  
345 due to its expression by epithelial cells in the cortex of  
346 the thymus [21], dendritic cells and at low levels by T  
347 lymphocytes. In addition, mAb MR6 was shown to  
348 have an anti-proliferative effect on cultures of T  
349 lymphocytes proliferating in response to interleukin-  
350 4 (IL-4) and to inhibit the IL-4-dependent production  
351 of IgE by B cells [23–26]. DEC-205 has recently  
352 been assigned the cluster of differentiation number  
353 CD205.

354 Correct control of the cell cycle results from the  
355 coordinated and sequential activation-inactivation of  
356 key regulators known as cyclin-dependent kinases  
357 (CDKs). The CDK activity is highly regulated by a  
358 number of different elements through the phases of  
359 the cycle. Since the cell cycle is a tightly regulated  
360 process, one might predict that the deregulation of  
361 some elements could cause abnormal proliferation  
362 contributing to cancer. It has been proposed that most,  
363 if not all tumors have altered the restriction check-  
364 point through an alteration of the p16/cyclinD1/pRb  
365 pathway [26]. This proposal is supported by the ratio  
366 of primary tumors and tumoral cell lines (like C1498)  
367 that display an alteration in this pathway.

368 This is the first report on the effects of mannan  
369 from *A. saponaria* on the proliferative response of  
370 normal and tumoral cells in vitro. Moreover, the  
371 results could explain the beneficial effects of aloe  
372 when employed as therapeutic agent against cancer,  
373 because it does not interfere with normal lymphocyte  
374 activation and inhibits tumoral cell proliferation and  
375 activation.

#### 376 4. Uncited reference

377 [22]

#### 378 References

379 [1] McAnalley. Process for preparation of aloe products. United  
380 States Patent 4,957,907; September 18, 1990.

- [2] Robson MC, Hegggers JP, Hagstrom WJ. Myth, magic, 381  
witchcraft or fact? *Aloe vera* revisited. *J Biol Chem* 1982; 382  
3:157–63. 383
- [3] Reynolds T, Dweck AA. *Aloe vera* gel leaf: a review update. 384  
*J Ethnopharmacol* 1999;68:3–37. 385
- [4] Wooles WR, Di Luzio NR. Reticuloendothelial function and 386  
the immune response. *Science* 1963;142:1078. 387
- [5] Pospisil M, Jary J, Netikova J, Marek M. Glucan-induced 388  
enhancement of hemopoietic recovery in gamma-irradiated 389  
mice. *Experientia* 1982;38:1232–4. 390
- [6] Burgaleta C, Golde DW. Effect of glucan on granulopoi- 391  
sis and macrophage genesis in mice. *Cancer Res* 1997;37: 392  
1739. 393
- [7] Maisin Jr, Kondi-Tamba A, Mattelin G. Polysaccharides 394  
induce radioprotection of murine hemopoietic stem cells 395  
and increase the LD50/30 days. *Radiat Res* 1996;105: 396  
276–81. 397
- [8] Harris C, Pierce K, King G, Yates KM, Hall J, Tizard I. 398  
Efficacy of acemannan in treatment of canine and feline spon- 399  
taneous neoplasm. *Mol Biother* 1991;3:207–13. 400
- [9] Peng SY, Norma LJ, Curtin J, Corrier D, McDaniel HR, Bus- 401  
bee D. Decreased mortality of normal murine sarcoma in mice 402  
treated with the immunomodulador acemannan. *Mol Biother* 403  
1991;3:79–87. 404
- [10] King GK, Yates KM, Greenlee PG, et al. The effects of ace- 405  
mannan immunostimulant in combination with surgery and 406  
radiationtherapy on spontaneous canine and feline fibrosarco- 407  
mas. *J Am Hosp Assoc* 1995;31:439–47 [es igual a la 12]. 408
- [11] Corsi MM, Bertelli AA, Gaja G, Fulgenzi A, Ferrero ME. The 409  
therapeutic potential of *Aloe vera* in tumor-bearing rats. *Int J* 410  
*Tissue React* 1998;20:115–8. 411
- [12] King GK, Yates KM, Greenlee PG, et al. The effect of ace- 412  
mannan immunostimulant in combination with surgery and 413  
radiation therapy on spontaneous canine and feline fibrosar- 414  
comas. *J Am Anim Hosp Assoc* 1995;31:439–47. 415
- [13] Winters WD, Benavides R, Clouse WJ. Effects of aloe extracts 416  
on human normal and tumor cells in vitro. *Econ Bot* 1981; 417  
35:89–95. 418
- [14] Wajner M, Santos KD, Schlottfeldt JL, Rocha MP, Wann- 419  
macher CMD. Inhibition of mitogen-activated proliferation 420  
of human peripheral lymphocytes in vitro by propionic acid. 421  
*Clin Sci* 1999;96:99–103. 422
- [15] Sampedro MC, Motrán C, Gruppi A, Kivatinitz SC. VLDL 423  
modulates the cytokine secretion profile to a proinflamma- 424  
tory pattern. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285: 425  
393–9. 426
- [16] Benini S, Manara MC, Baldini N, et al. Inhibition of insulin- 427  
like growth factor I receptor increases the antitumor activity of 428  
doxorubicin and vincristine against Ewin's sarcoma cells. *Clin* 429  
*Cancer Res* 2001;7:1790–7. 430
- [17] Taniguchi T, Minami Y. The IL-2/IL-2 receptor system: a 431  
current overview. *Cell* 1993;73:5–8. 432
- [18] Waldmann TA. The interleukin-2 receptor. *J Biol Chem* 433  
1994;266:2681–4. 434
- [19] Minami YT, Kono T, Miyazaki T, Taniguchi T. The IL-2 435  
receptor complex: its structure, function and target genes. 436  
*Annu Rev Immunol* 1993;11:245–68. 437



- 438 [20] Nakari TM, Robertson M, et al. Interleukin 2 receptor  $\gamma$  chain  
439 expression on resting and activated lymphoid cells. *J Exp Med*  
440 1994;180:241–51. 450
- 441 [21] Karaca K, Sharma JM, Nordgren R. Nitric oxide production  
442 by chicken macrophages activated by acemannan, a complex  
443 carbohydrate extracted from *Aloe vera*. *Int J Immunopharma-*  
444 *col* 1995;17:183–8. 451
- 445 [22] de Maagd RA, MacKenzie WA, Schuurman HJ, Ritter MA,  
446 Price KM, Broekhuizen R, et al. The human thymus micro-  
447 environment: heterogeneity detected by monoclonal anti-epi-  
448 thelial cell antibodies. *Immunology* 1985;54:745–54. 452
- 449 [23] Larche M, Lamb JR, O’Hehir RE, Imami-Shita N, Zanders  
ED, Quint DE, et al. Functional evidence for a monoclonal  
antibody that binds to the human IL-4 receptor. *Immunol-*  
*ogy* 1988;65:617–22. 453
- [24] Larche M, Lamb JR, Ritter MA. A novel T-lymphocyte mol-  
ecule that may function in the induction of self-tolerance and  
MHC-restriction within the human thymic microenvironment.  
*Immunology* 1988;64:101–5. 454
- [25] Larche M, Lamb JR, Ritter MA. p145-MR6: a novel T cell  
surface molecule with a role in tolerance to self. *Adv Exp Med*  
*Biol* 1988;237:413–7. 455
- [26] Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle con-  
trol. *Cell* 1995;81:323–30. 456
- 457  
458  
459  
460  
461

# HDL Directs Activated Lymphocytes to a Resting Phenotype

M.C. Sampedro<sup>1</sup>, A. Gruppi<sup>2</sup>, C. Motrán<sup>2</sup>,  
R.L. Artola<sup>1</sup> and S.C. Kivatnitz<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC, UNC-CONICET), <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, <sup>3</sup>Cátedra de Procesos Biotecnológicos, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

## Summary

Most of the cells in the atherosclerotic plaque are T cells, mainly CD4+ and interleukin-2 receptor+ (CD25+). High-density lipoprotein (HDL) regulates the proliferation of smooth muscle cells, but the effects on lymphocytes have not been studied yet. We studied the HDL effect on mitogen activated T-cells of human peripheral blood to determine whether HDL inhibits the proliferation of T-cells preventing their activation. T-cells of human peripheral blood (PBMC) were isolated and cultivated in the presence of phytohaemagglutinin (PHA) and HDL. HDL inhibits the proliferative response of PBMC induced by PHA, produces a diminution of the total number of T-cells without affecting CD4+/CD8+ ratio and maintains the lymphocytes stimulated with PHA in a non-activated state, thus diminishing the expression of CD2 and CD25. HDL has a regulatory effect on T-cells hampering plaque progression.

## Introduction

Atherosclerosis is an inflammatory disease [1, 2]. In fact, the earliest recognizable lesion of the atherosclerosis (the so-called “fatty streak”) is an aggregation of lipid-rich macrophages and T-lymphocytes within the intima [3]. Unstable plaques are particularly rich in activated immune cells, suggesting that they may initiate plaque activation. A rapid increase in the understanding of the mechanisms that govern the recruitment, differentiation, and activation of immune cells in atherosclerosis had occurred in the last few years. In these early lesions, there is a clear preponderance of T cells

over macrophages and it has been shown that most of these cells are CD4<sup>+</sup> and interleukin-2 receptor (IL-2R<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>) i.e. activated T lymphocytes [4].

Mitogen activation of T-cells involves a complex set of coordinated events leading to T-cell differentiation and proliferation. T-cell DNA replication and mitosis, although dependent on activation of the T-cell antigen-receptor complex [5], are actually determined by a critical threshold of signals generated by the interaction of IL-2 with its specific membrane receptor [6]. Once a critical density of IL-2 receptors is reached, cell cycle progression occurs provided that an adequate concentration of IL-2 is present [6]. It has been proposed that the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines may be decisive for the progression of the lesion [7, 8].

The proliferative response of cells forming the early atherosclerotic lesion to lipoproteins has been studied. Physiological concentrations of very low-density lipoprotein (VLDL), an atherogenic lipoprotein, inhibit DNA synthesis in phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes probably through interactions with a membrane receptor. These results suggest that VLDL may maintain circulating blood lymphocytes in a non-proliferative state [9]. More recently, it has been reported that VLDL inhibits lymphocyte proliferation by reducing IL-2 receptor but enhances the levels of IL-2, suggesting that one atherogenic effect of VLDL is to modulate the cytokine secretion profile of lymphocytes to a predominantly pro-inflammatory response [8]. A direct mitogenic effect of low density lipoprotein (LDL) [10-12] and suppression of the response to mitogens [13-15] have been reported depending on the type of cell, the source of lipoprotein, and its degree of oxidation.

High density lipoprotein (HDL) has been shown to regulate smooth muscle cell, and prostacyclin production [16], but to our knowledge the effects of HDL on T-lymphocyte proliferation are contradictory. HDL is considered a beneficial lipoprotein since epidemiological research shows an inverse correlation between the concentration of plasma HDL and the frequency of coronary artery disease [17-19]. More direct evidence of the protective effects of HDL comes from studies in which elevation of HDL in animal models has led to a dramatic protective effect against early atherosclerotic fatty streak formation [20-23]. It is not yet known whether the protective effects of HDL are related to their role in reverse cholesterol transport or to mechanisms unrelated to their lipid transport function, such as cell activation and proliferation [24-34].

We now address the study of HDL effects on peripheral blood cells activated with a nonspecific mitogen as a model of inflammatory response. We determined whether HDL modify T-cell expression of activation markers (CD2 and CD25) and the proportion of helper and cytotoxic lymphocytes.

## **Methods**

### *-Purification of human peripheral blood mononuclear cells*

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Fycoll-

Hypaque (Histopaque - Sigma Chemical Co.) from freshly drawn heparinized blood or buffy coat of healthy donors. The layer of mononuclear cells was recovered and their viability, determined by trypan blue dye exclusion, was always > 99%. The investigation conforms with principles outlined in the declaration of Helsinki.

PBMC depleted of accessory cells (AC) were obtained as follows. To remove AC, PBMC were treated with 5mM L-leucine-O-methyl ester (Leu-O-Me, Sigma Chemical Co.) in serum-free medium ( $5 \times 10^6$  cells per ml) at room temperature for 40 min [35]. Then the cells were incubated at 37 °C (5% CO<sub>2</sub> incubator) for 1 h in a 60 mm diameter sterile plastic petri dish. The non-adherent cells were removed and subjected to the same procedure once more. The recovered population is referred to as AC-depleted PBMC.

### *-Purification of human HDL and oxHDL*

HDL was prepared essentially as previously described [36] from healthy donor's plasma. Sequential fractionation was performed using an Optima-TLX desk-top ultracentrifuge with a rotor TLA-100.2 (Beckman Ins.) and KBr solutions at final density of 1.019, 1.063 and twice at 1.210 g/ml (to remove some contaminating albumin). The total centrifugation time was 8 h at 15 °C.

HDL was dialysed against RPMI-1640 (with three changes of 4 h each one) and sterilized by ultrafiltration. This preparation was named HDL. oxHDL was obtained by UV-irradiation at  $290 \text{ nm} \leq \lambda \leq 385 \text{ nm}$  in quartz cuvettes (1 cm light-path containing 2 ml of preparation) for 30 min [37]. HDL and oxHDL final concentration was adjusted to 0.50 mg of protein/ml. Protein determination was carried out employing a modified Lowry method [38].

### *-Lymphocyte proliferation assays*

Cell cultures were set up in triplicate in 96-well microculture plates and incubated at 37 °C in RPMI-1640 containing 5% fetal calf serum (RPMI-5) in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.  $1.25 \times 10^5$  cells were cultured with PHA (phytohaemagglutinin) (5 mg/ml) or with anti-CD3 (50 µg/ml) plus PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) (20 ng/ml) in a total volume of 0.200 ml for 72 h. AC-depleted PBMC were stimulated with anti-CD3 (50 µg/ml) plus PMA (20 ng/ml). To examine the effect of HDL on mixed lymphocyte culture (MLC),  $1 \times 10^5$  PBMC from A individual were cultured in 96-well microculture plate with the same number of allogenic cells (obtained from B individual) per well in 200 µl of complete medium during 120 h.

When lipoproteins were added to the cultures (0.040 to 0.200 mg of protein/ml as indicated in each experiment), the same volume of medium was withdrawn from the respective well.

When we evaluated the effect of the lipoproteins on previously activated T-cells, PBMC were incubated with PHA during 24 h, and the 96-well mi-

croculture plate was centrifuged during 10 min at 4 °C and 850 g and the wells washed three times with RPMI-5 to remove the PHA. Then lipoproteins were added to the cultures (0.040 to 0.200 mg of protein/ml into a final volume of 0.20 ml/well).

The cultures incubated for 48 or 72 h were pulsed with 1 µCi [<sup>3</sup>H]thymidine during the last 18 h of the culture. Cultures were interrupted by harvesting and radioactivity was measured in a liquid scintillation counter.

### *-Flow cytometric determinations*

Cultures of PBMC (1 x 10<sup>6</sup> cells/ml) were incubated in RPMI-5 (24 wells plates) at 37 °C during 48 or 72 h in the presence or in the absence of PHA (5 mg/ml) with or without HDL (250 ml/well) in a total volume of 1 ml. The cells were washed with Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) containing 1% BSA and 0,1% NaN<sub>3</sub> and preincubated with inactivated human serum for 1 h at 4°C in order to block immunoglobulin non-specific trapping through Fc receptor. Following Fc blocking, cells were incubated with anti-human CD3, with anti-human IL2 R (CD25) or with anti-human CD2 monoclonal antibody (1µg/10<sup>6</sup> cells) for 30 min at 4°C. In a parallel experiment cells were stained with Abs specific for human CD3, CD8, and CD4 to determine the percentage of each T cell subset (Cytognos, Salamanca, Spain). The cells were washed three times with HBSS and fixed in 2% formaldehyde and stored at 4°C in the dark until analysis. Ten thousand events were acquired using a flow cytometer (ORTHO Inmuno Count Flow Cytometry System) and results were analyzed with WinMDI software.

### *-Statistical analysis*

Each set of results presented in the figures is typically representative of three experiments using different donors of cell and lipoprotein with a same protocol. The results represented the mean of triplicate determinations ± SD. The significance of differences between means was calculated by the Student's t-test.

## **Results**

-HDL inhibits proliferative response of stimulated PBMC but does not modified the response of non-stimulated cells.

To examine whether HDL is able to regulate lymphocyte proliferation, non-stimulated PBMC were cultured during 72 h in the absence or in the presence of increasing concentrations of purified HDL, and monitored by [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation. As it is shown in Figure 1 A, when HDL or oxHDL were added to non-stimulated resting PBMC cultures, both lipoproteins displayed neither a mitogenic nor a suppressive activity at any of the concentrations tested. However, HDL was able to suppress the T-lymphoproliferative response induced by several mitogens: PHA

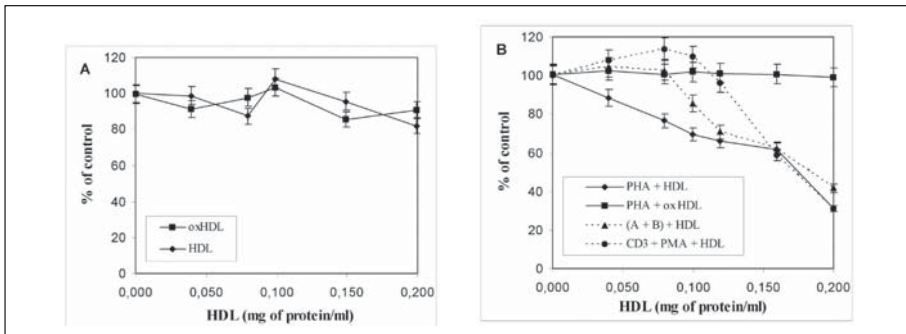


Figure 1: Effect of HDL and oxHDL on resting or activated human peripheral blood mononuclear cells. PBMC ( $2 \times 10^5$  cells/well) were cultured in 96-well microtiter plates in the presence of increasing concentrations of HDL and oxHDL. Panel (A) resting cells ( $\blacklozenge$ ,  $\blacksquare$ ) or (B) cell activated with PHA ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) ( $\blacklozenge$ ,  $\blacksquare$ ), anti-CD3 plus PMA ( $\bullet$ ) or MLC ( $\blacktriangle$ ). After 54 h of culture for cells activated with PHA or anti-CD3 or 102 h for MLC, [ $^3\text{H}$ ]-thymidine was added and uptake was determined after 18 h of incubation. Results are shown as % of control to facilitate comparison. Control values were as follows: resting cells  $9500 \pm 1500$  d.p.m., PBMC + PHA  $165000 \pm 2000$  d.p.m., PBMC + anti-CD3 plus PMA  $79000 \pm 14000$  d.p.m. and MLC  $30600 \pm 4000$  d.p.m. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD of triplicate determinations. The experiment is one of three carried out with different blood sources for PBMC and HDL purification.

(phytohaemmagglutinin), MLC (mixed lymphocyte culture), or anti-CD3 + PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) that acts through different mechanisms (Figure 1 B). PHA acts through CD3 + CD2, MLC through TCR + CD3, and PMA through CD69. In MLC and cultures stimulated with anti-CD3 plus PMA, higher concentrations of HDL were necessary to attain the same values of inhibition of the proliferative response induced by PHA (Figure 1B), suggesting a preponderant effect on CD2 costimulation. At 48 h there was 25 % of inhibition in [ $^3\text{H}$ ] thymidine incorporation between PBMC stimulated with PHA and culture in the presence or absence of HDL.

This seems to be a rather specific effect of HDL since when PBMC were incubated with albumin at the same concentration of proteins or LDL at the same concentration of cholesterol, we could not detect any suppressive effect (data not shown). The inhibitory effect of HDL on the proliferative response of PBMC induced by PHA could be exerted only by HDL in its native conformation and not by HDL mildly oxidized by UV-irradiation. It can be observed in Figure 1B that, upon oxidation, HDL loses the inhibitory effect since the level of [ $^3\text{H}$ ] thymidine incorporation in PHA-stimulated PBMC cultured with oxHDL is similar to that of cells cultured without HDL.

The next experiments in this section were designed to discern whether the suppression of the lymphoproliferative response induced by HDL was exerted directly on lymphocytes (i.e., a cytotoxic effect similar to that observed on neuronal cells in culture, [37]), or acting on an earlier event dur-

ing T-cell activation.

We discarded a direct cytotoxic effect because more than 95% of the cells in all the conditions tested excluded trypan blue after 48 h of culture. After 72h of culture, 90% of the control cells and 80% of the cells cultured with the highest concentration of HDL excluded trypan blue.

When the cells were analyze after 72 h of culture using light microscopy, it could be observed that cells incubated with PHA and HDL or oxHDL formed clumps but the density of clusters per campus was different ( $9 \pm 1$  vs.  $19 \pm 2$   $p < 0.0001$ , respectively, as determined by Student's *t* test mean number of cluster per campus  $\pm$  S.D.  $n=20$ ). Also, the dimensions of the clusters were different. The diameters of clusters (one cluster was defined as the group of at least four cells) were determined from the digitized photomicrographs by using the morphometric menu of the Metamorph 2.0 software. The average cluster diameter of cells incubated with PHA + oxHDL were twice greater than those formed by cells incubated with PHA + HDL ( $83 \pm 37 \mu\text{m}$  vs.  $42 \pm 17 \mu\text{m}$  mean diameters  $\pm$  S.D.,  $p < 0.0001$  as determined by Student's *t* test of 100 clusters). The idea that HDL is not exerting a toxic effect is further supported by the fact that the density and dimensions of the clusters formed when cells were culture (always in presence of PHA) initially for 24 h with HDL and then for a period of 48 h without HDL is identical to that of cells cultured for 72 h without HDL ( $20 \pm 2$  vs.  $19 \pm 1$  mean number of cluster per campus  $\pm$  S.D.  $n=20$  and  $78 \pm 40 \mu\text{m}$  vs.  $86 \pm 33 \mu\text{m}$  mean diameters  $\pm$  S.D. of 100 clusters).

HDL does not to exert a toxic effect directly on lymphocytes because lymphocytes from PBMC incubated simultaneously with PHA and HDL appeared normal (rounded cells with scarce cytoplasm and well-defined

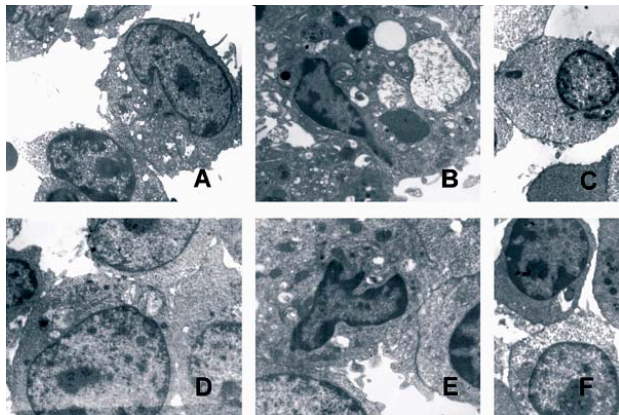


Figure 2: Electron microscopy of activated human peripheral blood mononuclear cells cultured in the presence of HDL. PBMC were cultured for 72 h with PHA and 0.1 mg of protein of oxHDL/ml (Panels A, B and C) or 0.1 mg of protein of HDL/ml (Panels D, E and F).

nucleus) when observed by electron microscopy (Figure 2 D and F). PBMC incubated simultaneously with PHA and oxHDL had the characteristic features of activated lymphocytes, (large fusiform cells containing abundant cytoplasm, some cells with irregular nuclear shape, Figure 2 A and C). Thus, lymphocytes from PBMC incubated with HDL had the morphological features of resting lymphocytes, while lymphocytes from cells incubated with oxHDL had the same appearance of activated lymphocytes of PBMC incubated with PHA alone. On the other hand, neither HDL nor oxHDL altered macrophage morphological appearance (Figure 2 B and E). In order to know if HDL inhibits the mitogenic effect of PHA due to sequestration of the mitogen, an experiment was performed to prove if HDL must be present simultaneously with PHA. PBMC were initially stimulated with PHA during 24 h, the plates were washed to remove the PHA and then lipoproteins were added to the wells. In this set of experiments, HDL was able to suppress the proliferation of T-cells previously stimulated with the mitogen (Figure 3). These results demonstrated that HDL does not exert its inhibitory effect by PHA sequestration and support the idea that the antiproliferative effects of HDL are exerted on lymphocytes that had been directed to a blastogenic response (Figure 1 and 2), and that the simultaneous presence of the mitogen is not necessary (Figure 3).

-HDL inhibits blastogenic response without affecting relative proportion of helper T lymphocyte and cytotoxic T lymphocyte.

T lymphocyte receptor complex includes the alphabeta zeta chains of CD3, and glycoprotein CD4 (or CD8) that is responsible for recognition

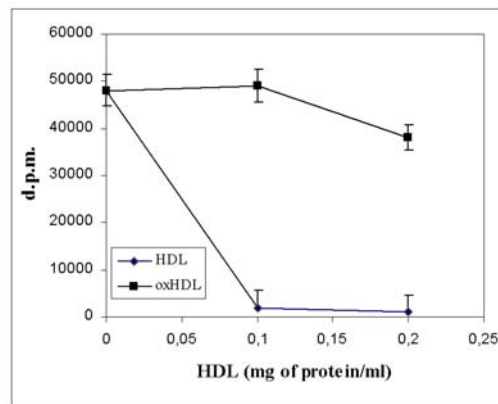


Figure 3: Effect of HDL and oxHDL on activated human peripheral blood mononuclear cells. PBMC ( $2 \times 10^5$  cells/well) were cultured in 96-well microtiter plates in the presence of increasing concentrations of HDL ( $\blacklozenge$ ) and oxHDL ( $\blacksquare$ ). The conditions are similar to those of Figure 1 except that PHA ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) was removed from the cultures after 24 hours of incubation. After 54 h of culture, [ $^3\text{H}$ ]-thymidine was added and uptake was determined after 18 h of incubation. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD of triplicate determinations. The experiment is one of three carried out with different blood sources for PBMC and HDL purification.



Table 1: Effect of HDL on the number of CD4 and CD8 positive cells. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were cultured for 48 and 72 h with phytohaemagglutinin (PHA) with or without of HDL (0.1 mg of protein of HDL/ml). The cell-surface expression of CD4 and CD8 were analyzed by flow cytometry and is presented as number of positive PBMC gating on CD3<sup>+</sup> T-lymphocytes. CD indicates cluster of differentiation.

|                  | CD4 <sup>+</sup> | CD8 <sup>+</sup> | CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> | Total   |
|------------------|------------------|------------------|-----------------------------------|---------|
| <i>48 hs</i>     |                  |                  |                                   |         |
| PBMC + PHA       | 70,200           | 67,600           | 59,400                            | 197,200 |
| PBMC + PHA + HDL | 46,200           | 43,200           | 58,650                            | 148,050 |
| <i>72 hs</i>     |                  |                  |                                   |         |
| PBMC + PHA       | 92,000           | 138,600          | 63,600                            | 294,200 |
| PBMC + PHA + HDL | 40,200           | 55,200           | 51,000                            | 146,400 |

of beta2-chain of MHC II class molecule (or alpha3-chain of MHC I class molecule for CD8). CD4 phenotype is inherent in T helper subpopulation, which coordinate the immune response to T-dependent antigens. Glycoprotein CD8 has been shown to be primarily expressed on cytotoxic and suppressor T lymphocytes. To define the T-cell subpopulation(s) we used three color flow cytometry. After 48 or 72 h of culture, HDL inhibited the expression of both molecules CD4 and CD8 reducing the number of both types of T-cells (helper and suppressor/cytotoxic lymphocytes), but did not interfere with the total number of double negative cells (Table 1).

-HDL inhibits the expression of surface activation markers induced by mitogen.

The activation of resting T-cells is a multiple step process [39, 40]. To discern whether the inhibitory effect of HDL on the blastogenic response elicited by PHA was affecting T-cell activation, we evaluated the percentage of activated T-cells (CD3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> cells and CD3<sup>+</sup> CD2<sup>+</sup> cells) by flow cytometric analysis after 48 and 72 h of PHA stimulation. Both CD25 and CD2 are considered markers of lymphocyte activation. The term "T-cell activation" refers to events triggered by antigen stimulation of T cells that culminate in IL-2 production and IL-2 receptor expression [41]. The high affinity IL-2R consists in three distinct subunits: IL-2R $\alpha$  (CD25), IL-2R $\beta$ , and IL-2R $\gamma$ . The IL-2R $\beta$  chain is expressed constitutively in CD8 cytotoxic T-cells but not in CD4 helper T-cells and is further induced upon T-cell activation. The IL-2R $\gamma$  is expressed constitutively in lymphoid cells. In contrast, IL-2R $\alpha$  (CD25) is expressed only upon activation [42-45]. The E-rosette receptor (CD2) is a differentiation antigen expressed on immature and mature T lymphocytes, and its expression is increased upon activation of T-cells [46].

We observed that after 48 h of culture, the cells cultured with medium alone (without stimulus) presented a low percentage of activated CD3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> or CD3<sup>+</sup> CD2<sup>+</sup> cells (Figure 4 A and B). At the same time, in the cultures with mitogen there are two populations of CD25<sup>+</sup> and CD2<sup>+</sup> cells that differ in the surface density (CD25<sup>high</sup> vs. CD25<sup>low</sup> and CD2<sup>high</sup> vs. CD2<sup>low</sup>).

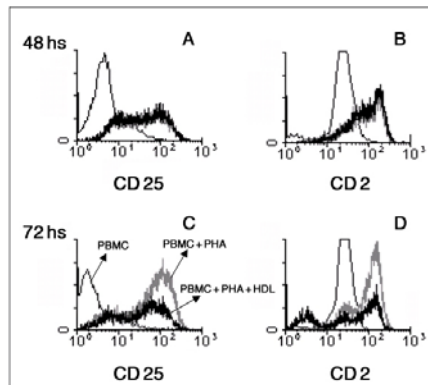


Figure 4: Effect of HDL on CD2 and CD25 surface expression on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). PBMC were cultured for 48 (panels A and B) and 72 h (panels C and D) with phytohaemagglutinin (PHA) (gray histogram) and 0.1 mg of protein of HDL/ml (black histograms) and the cell-surface expression of CD25 and CD2 were analyzed by flow cytometry. The x- and y-axes represent fluorescence (three-decade log scale) and relative cell number respectively. Histograms from control cells are indicated by a soft black histogram.

In mitogen challenged cultures there is a proportion of CD25<sup>+</sup> and CD2<sup>+</sup> cells noticeably higher, irrespectively of HDL presence, than in non stimulated cells (Figure 4 A and B). After 72 h of culture, cells culture in the presence of PHA without HDL (Figure 4 C and D) developed a higher proportion of CD3<sup>+</sup> CD25<sup>+high</sup> and CD3<sup>+</sup> CD2<sup>+high</sup> cells when compared with the non-stimulated cells or with stimulated cells after 48 h. After 72 h, cultures that contain PHA and HDL simultaneously had a lower proportion of the CD3<sup>+</sup> CD25<sup>+high</sup> and CD3<sup>+</sup> CD2<sup>+high</sup> cells (Figure 4 C and D).

## Discussion

Inflammation is a basic pathological mechanism that underlies a variety of diseases. The inflammatory reaction involves the complex interactions between inflammatory cells (neutrophils, lymphocytes, and monocytes/macrophages) and vascular cells (endothelial cells and smooth muscle cells). The vascular inflammation can be limited by anti-inflammatory counterregulation mechanisms that maintain the integrity and homeostasis of the vascular wall. One of the external anti-inflammatory signals is the HDL [47].

The best-known function of HDL is the promotion of cholesterol efflux from cells. Efflux of cholesterol from macrophages leads to a reduction in foam cell formation. As a result, the inflammatory process is inhibited. Therefore, HDL is anti-inflammatory, thus protecting against the development of atherosclerosis. Another protecting effect of HDL is the ability to inhibit the oxidation of LDL [48].

In addition to HDL's cholesterol efflux properties, antioxidant properties, and ability to inhibit adhesion molecule expression in endothelial cells, HDL has been shown to have many other effects, several of which are potentially anti-inflammatory. HDL can bind and neutralize the proinflammatory lipopolysaccharides, and may also neutralize the effects of the acute phase reactant SAA, that is transported predominantly bound to HDL [49-50].

Our results show that HDL was able to suppress the T-lymphoproliferative response induced by several mitogens. Interestingly enough, oxHDL could not suppress T-lymphocytes proliferation. Thus, if the suppressive effect we describe here is relevant in preventing ASCVD probably oxHDL would not be active as its native counterpart.

The oxHDL we employed here is a mildly oxidized HDL preparation [51-52]. Our results together with the facts that mildly oxHDL are less effective in provoking cholesterol efflux [53], that the HDL from hypercholesterolemic animals is more peroxidized than that of controls [54], that HDL is more susceptible than LDL to mild oxidation [55], that it is the principal vehicle for circulating plasma lipid hydroperoxides [56] and that oxHDL is cytotoxic to cells in culture [52] suggest that the oxidation of HDL could be an important factor in atheroma formation. In summary, we think that normocholesterolemic subjects that have high levels of HDL are protected against an uncontrolled proliferative response of lymphocytes leading to atheroma growing, while in hypercholesterolemic subjects this anti-atherogenic effect is lost due to the oxidation of HDLs.

Another important result that contributes to emphasize the anti-inflammatory properties of HDL is that HDL inhibits the blastogenic response without affecting relative proportion of helper T-lymphocyte and cytotoxic T-lymphocyte. This effect of HDL indicates that its antiproliferative action is similar to that of anti-inflammatory compounds and different from that of immunosuppressors that inhibit mainly the proliferation of CD4 phenotype lymphocytes. The results of experiments done with T-cell activation markers further strengthen the fact that antiblastogenic effects of HDL are related to an anti-inflammatory action, since most anti-inflammatory drugs impeded the expression of IL-2R and CD2 [57]. Thus HDL directs activated lymphocytes to a resting phenotype like non-steroidal anti-inflammatory drugs.

## References

- [1] HANSSON GK. Immune mechanism in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21: 1876-1890; 2001.
- [2] ALDONS JL. Atherosclerosis. *Nature* 407: 233-241; 2000.
- [3] ROSS R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-808; 1993.
- [4] WICK G, ROMEN M, AMBERG A, *et al.* Atherosclerosis, autoimmunity, and vascular-associated lymphoid tissue. *FASEB J.* 11: 1199-1207; 1997.

- [5] MEUER SC, HUSSEY R, CANTRELL DA, *et al.* Triggering of the T3-Ti antigen-receptor complex results in clonal T-cell proliferation through an interleukin 2-dependent autocrine pathway. *Proc Nat Acad Sci* 81: 1509-1513; 1984.
- [6] CANTRELL DA AND SMITH KA. The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. *Science* 224, 1312-1316; 1984.
- [7] VADIVELLO PK, STANTON HR, COCHRAN FW, *et al.* Interleukin-4 inhibits human smooth muscle cell proliferation. *Artery* 21: 161-181; 1994.
- [8] SAMPEDRO MC, MOTRÁN C, GRUPPI A, *et al.* VLDL modulates the cytokine secretion profile to a proinflammatory pattern. *Biochem Biophys Res Comm.* 285: 393-399; 2001.
- [9] YI PI, BECK G, ZUCKER S. Membrane receptors for very low-density lipoprotein (VLDL) inhibitor of lymphocyte proliferation. *Blood* 57: 1055-1064; 1981.
- [10] BJÖRKERUD B AND BJÖRKERUD S. Contrary Effects of Lightly and Strongly Oxidized LDL With Potent Promotion of Growth Versus Apoptosis on Arterial Smooth Muscle Cells, Macrophages, and Fibroblasts *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 16: 416-424; 1996.
- [11] CHATTERJEE S. Role of oxidized human plasma low density lipoproteins in atherosclerosis: effects on smooth muscle cell proliferation. *J Mol Cell Biochem* 111: 143-147; 1992.
- [12] AUGÉ N, PIERAGGI MT, THIERS JC, *et al.* Proliferative and cytotoxic effects of mildly oxidized low-density lipoproteins on vascular smooth-muscle cells. *Biochem. J.* 309: 1015-1020; 1995.
- [13] NAKAYASU T, MACY M, OKANO Y, *et al.* Plasma lipoproteins can suppress accessory cell function and consequently suppress lymphocyte activation. *Exp Cell Res.* 163: 103-116; 1986.
- [14] OKANO Y, MACY M, CARDIN AD, *et al.* Suppression of lymphocyte activation by plasma lipoproteins: modulation by cell number and type. *Exp Cell Biol.* 53: 199-212; 1985.
- [15] HSU KL, GHANTA VK, HIRAMOTO R. Immunosuppressive effect of mouse serum lipoproteins. *J. Immunol.* 126: 1901-1913; 1981
- [16] VIÑALS M., MARTÍNEZ-GONZÁLEZ J, BADIMON JJ, *et al.* HDL-induced prostacyclin release in smooth muscle cells is dependent on cyclooxygenase-2 (Cox-2). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17: 3481-3488; 1997.
- [17] MILLER GJ AND MILLER NE. Plasma high-density lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *Lancet* 1: 16-20; 1975.
- [18] YAARI S, GOLDBOURT U, EVEN-ZOHAR S, *et al.* HDL and total cholesterol: association with total, cardiovascular and cancer mortality in a seven year prospective study of 10,000 men. *Lancet* 1: 1011-1015; 1981.
- [19] GORDON DJ, PROBSFIELD JL, GARRISON RJ, *et al.* High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: four prospective American studies. *Circulation* 79: 8-15; 1989.
- [20] RUBIN EM, KRAUSS RM, SPANGLER EA, *et al.* Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature* 353: 265-267; 1991.
- [21] PLUMP AS, SCOTT CJ, BRESLOW JL. Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclero-

- sis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 9607–9611; 1994.
- [22] PASZTY C, MAEDA N, VERSTUYFT J, *et al.* Apolipoprotein AI transgene corrects apolipoprotein E deficiency-induced atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* 94: 899–903; 1993.
- [23] BADIMON JJ, BADIMON L, FUSTER V. Regression of atherosclerotic lesions by high-density lipoprotein plasma fraction in cholesterol fed rabbits. *J Clin Invest.* 85: 1234–1241; 1990.
- [24] GLOMSET JA. The plasma lecithin:cholesterol acetyltransferase reaction. *J Lipid Res.* 9: 155–167; 1968.
- [25] JOHNSON WJ, MAHLBERG FH, ROTHBLAT GH, *et al.* Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1085: 273–298; 1991.
- [26] ZHONG S, SHARP DS, GROVE JS, *et al.* Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J Clin Invest.* 97: 2917–2923; 1996.
- [27] PARTHASARATHY S, BARNETT J, FONG LG. High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta.* 1044: 275–283; 1990.
- [28] COCKERILL GW, REED SC. High-density lipoprotein—multipotent effects on cells of the vasculature. *Int Rev Cytol Surv Cell Biol.* 188: 257–297; 1999.
- [29] MACKNESS MI, ABBOT C, ARROL S, *et al.* The role of high-density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. *Biochem J.* 294: 829–834; 1993.
- [30] NAVAB M, IMES SS, HAMA SY, *et al.* Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in co-cultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest.* 88: 2039–2046; 1991.
- [31] WATSON AD, BERLINER JA, HAMA SY, *et al.* Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidised low density lipoprotein. *J Clin Invest.* 96: 2882–2891; 1995.
- [32] TAUBER JP, CHENG J, GOSPODAROWICZ D. Effect of high and low density lipoproteins on proliferation of cultured bovine vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 66: 696–708; 1980.
- [33] LEVINE DM, PARKER TS, DONNELLY TM, *et al.* In vivo protection against endotoxin by high density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 12040–12044; 1993.
- [34] PAJKRT D, DORAN JE, KOSTER F, *et al.* Antiinflammatory effects of reconstituted high-density lipoprotein during human endotoxemia. *J Exp Med.* 184: 1601–1608; 1996.
- [35] THIELE DL, KUROSAKA M, LIPSKY P. Phenotype of the accessory cell necessary for mitogen-stimulated T and B cell responses in human peripheral blood: delineation by its sensitivity to the lysosomotropic agent, L-leucine methyl ester. *J Immunol.* 131: 2282–2290; 1983.
- [36] KIVATINITZ SC, FAVINI P, GHIDONI R. Gangliosides released by the

- perfused rat liver are associated to high density lipoprotein. *Biochem. International*. 26: 821-829; 1992.
- [37] KIVATINITZ SC, PELSMAN MA, ALONSO A DEL C, *et al*. High-density lipoprotein aggregated by oxidation induces degeneration of neuronal cells. *J. Neurochem*. 69: 2102-2114; 1997.
- [38] PETERSON GL. *Analytical Chem*. 83: 346-356; 1977.
- [39] DUSTIN ML AND CHAN AC. Signaling takes shape in the immune system. *Cell* 103: 283-294; 2000.
- [40] PATEL VP, MORAN M, LOW TA, *et al*. A molecular framework for two-step T cell signaling: Lck Src Homology 3 mutations discriminate distinctly regulated lipid raft reorganization events. *J Immunol*. 166: 754-764; 2001.
- [41] MUELLER DL, JENJINS MK, SCHATZ RH. *Annu Rev Immunol*. 7: 445-475; 1989.
- [42] TANIGUCHI T, MINAMI Y. The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell* 73: 5-8; 1993.
- [43] WALDMANN TA. The interleukin-2 receptor. *J Biol Chem* 266: 2681-2684; 1994.
- [44] MINAMI YT, KONO T, MIYAZAKI T, *et al*. The IL-2 receptor complex: its structure, function and target genes. *Annu Rev Immunol*. 11: 245-268; 1993.
- [45] NAKARI TM, ROBERTSON M, *et al*. Interleukin 2 receptor  $\alpha$  chain expression on resting and activated lymphoid cells. *J Exp Med*. 180: 241-251; 1994.
- [46] REDELMAN D. Simultaneous increased expression of E-rosette receptor (CD2, T11) and T cell growth factor receptor on human T lymphocytes during activation. *Cytometry* 8: 170-183; 1987.
- [47] TEDGUI A AND MALLAT Z. Anti-Inflammatory mechanism in vascular wall. *Circ Res* 88: 877-887; 2001.
- [48] NAVAB M, HAMA SY, ANANTHARAMAIAH GM, *et al*. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J. Lipid Res*. 41: 1495 – 1508; 2000.
- [49] BURGER D, DAYER JM High-density lipoprotein-associated apolipoprotein A-I: the missing link between infection and chronic inflammation? *Autoimmunity Rev* 1:111-117; 2002.
- [50] ARTIL A; MARSCHÉ G; LESTAVEL S, *et al*. Role of Serum Amyloid A During Metabolism of Acute-Phase HDL by Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 763-772 ;2000.
- [51] SALMON S, SANTUS R, MAZIERE J, *et al*. Modified apolipoprotein pattern after irradiation of human high-density lipoproteins by ultraviolet B. *Biochim. Biophys. Acta* 1128, 167-173; 1992.
- [52] KIVATINITZ SC, PELSMAN MA, ALONSO A, *et al*. High-density lipoprotein aggregated by oxidation induces degeneration of neuronal cells. *J. Neurochem*. 69, 2102-2114; 1997.
- [53] MOREL DW. Reduced cholesterol efflux to mildly oxidized high density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 200, 408-416; 1994.
- [54] ARTOLA RL, CONDE CB, BAGATOLLI LA, *et al*. High-density lipoprotein from hypercholesterolemic animals has peroxidized lipids and oligomeric apolipoprotein A-I: its putative role in atherogenesis. *Biochem. Biophys.*

Res. Commun. 239, 570-574; 1997.

- [55] VIANI P, CAZZOLA R, CERVATO G, *et al.* Pyrene lipids as markers of peroxidative processes in different regions of low and high density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1315, 78-86; 1996.
- [56] BOWRY WV, STANLEY KK AND STOCKER R. High Density Lipoprotein is the Major Carrier of Lipid Hydroperoxides in Human Blood Plasma from Fasting Donors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 10316-10320; 1992.
- [57] DÉAGE V, BURGER D AND DAYER JM. Exposure of T lymphocytes to leflunomide but not to dexamethasone favors the production by monocytic cells of interleukin-1 receptor antagonist and the tissue-inhibitor of metalloproteinases-1 over that of interleukin-1 $\beta$  and metalloproteinases. *European Cytokine Network* 9: 663-668; 1998.