

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE FIOLOGIA CELULAR

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

ANALISIS DE LA FUNCION ENDOCITICA Y DE LA
EXPRESION DEL RECEPTOR PEPENADOR O "SCAVENGER"
BAJO CONDICIONES DE ESTRES OXIDATIVO.

T E S I S

Q U E P R E S E N T A

M E N I B B R O C I O A G U I L A R G A Y T A N

P A R A O B T E N E R E L G R A D O D E

D O C T O R A E N C I E N C I A S B I O M E D I C A S



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Jaime Mas Oliva.

Durante la realización de este trabajo se recibió una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el número de becario 85783 y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM.

Este trabajo también recibió apoyos económicos del programa de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) con los números de proyectos 201303 y el 102301.

A mis padres por su cariño incondicional, su paciencia y su apoyo en todo momento.

A mi familia porque sé que siempre están conmigo.

A Natalia por su gran amistad, apoyo y cariño.

A mis amigos Gaby Soid, Gaby Velasco, Male, Dulce, Valentín y Paty por su amistad y por su ayuda que siempre me brindaron.

A José por su amor y su apoyo en la última parte del doctorado.

ÍNDICE

RESÚMEN	8
ABSTRACT	9
ABREVIATURAS	10
INTRODUCCIÓN	
El colesterol.....	13
La aterosclerosis.....	13
Clasificación de las lipoproteínas.....	15
Metabolismo de las lipoproteínas:	
Vía exógena.....	17
Vía endógena.....	18
Metabolismo de las lipoproteínas de alta densidad (HDL).....	21
Características del metabolismo de las lipoproteínas de baja densidad (LDL).....	23
Receptor de las LDL.....	27
Receptor pepenador o "scavenger".....	29
clase A (RS-AI).....	29
clase B (RS-BI).....	32
Estrés oxidativo, aterosclerosis y receptores "scavenger".....	36
OBJETIVOS	
Objetivo general.....	40
Objetivos particulares.....	40
MATERIAL Y MÉTODOS	
Aislamiento de las LDL.....	42
Acetilación de las LDL.....	45
Yodinación (marcaje radiactivo).....	45
Incorporación de yodo radiactivo.....	47
Medición de la incorporación de yodo radiactivo y actividad específica.....	48
Líneas celulares	

Células de ovario de hámster chino (CHO).....	49
Células CHO-RSA.....	50
Células C6 (glioma de rata)	50
Células PC12 (feocromocitoma de rata).....	50
Células RAW de rata.....	50
Macrófagos peritoneales de ratón.....	51
Medición de las especies de oxígeno reactivas (ROS).....	51
Citometría de flujo.....	52
Medición de la viabilidad celular por el método de azul tripán.....	52
Ensayos de internalización de ¹²⁵ I-Ac-LDL a los receptores "scavenger".....	52
Ensayos de unión de ¹²⁵ I-Ac-LDL a los receptores "scavenger".....	53
Lisados celulares y extracción de proteínas.....	53
Ensayo inmunológico de proteínas ("western blot")	
RS-AI.....	54
RS-BI.....	54
Extracción del ARN total.....	55
Transcripción reversa.....	56
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	57
Diseño de oligonucleótidos para el gen del RS-AI de bovino.....	58
Ligación del producto de PCR y transformación de las células competentes.....	60
Identificación de las colonias bacterianas que contienen los plásmidos recombinantes.....	60
Obtención del ADN plasmídico por el método de la lisis alcalina.....	61
Análisis de los plásmidos recombinantes.....	61
Secuenciación del ADN.....	62
RESULTADOS	
Ligandos específicos para cada receptor "sacvenger".....	64
Detección citométrica de la producción de ROS.....	66
Curso temporal de la viabilidad celular.....	70

Ensayos de internalización de Ac-LDL a través del RS-AI y del RS-BI.....	70
Ensayos de internalización de LDL a través del R-LDL.....	73
Efecto del estrés oxidativo sobre las Ac-LDL.....	73
Ensayos de unión de Ac-LDL al RS-AI y RS-BI.....	76
Efecto del estrés oxidativo sobre la expresión del RS-AI y del RS-BI.....	76
Efecto del estrés oxidativo sobre los niveles de ARN del RS-AI.....	77
DISCUSIÓN	
RS-AI.....	83
RS-BI.....	86
CONCLUSIONES	90
PERSPECTIVAS	93
APÉNDICE I	95
APÉNDICE II	98
APÉNDICE III	100
APÉNDICE IV	101
APÉNDICE V	102
REFERENCIAS	104

RESUMEN

Los receptores pepenadores o "scavenger" AI y BI son proteínas de membrana que unen principalmente lipoproteínas de baja densidad (LDL) modificadas químicamente. Estas lipoproteínas son internalizadas por endocitosis mediada por receptor o por la internalización selectiva de sus lípidos a través de la membrana celular. Muchos de los estudios sobre estos receptores se enfocan en la participación de diversas moléculas como factores de crecimiento, LDL oxidadas y especies de oxígeno reactivas (ROS) producidas intracelularmente en la regulación de la actividad de ambos receptores. El objetivo principal de este trabajo fue conocer el efecto de las ROS producidas extracelularmente sobre la actividad del receptor RS-AI en células CHO-RSA y CHO, así como del RS-BI en células C6 y PC12, a través de la internalización de LDL acetiladas (Ac-LDL) marcadas radiactivamente con yodo-125. Se diseñó un sistema de producción de radicales libres por la adición de 30 μM de ter-butil hidroperóxido (TBH) a células en cultivo cada hora durante 5 hr. La internalización de las Ac-LDL por el RS-AI se compitió con un exceso molar de fucoídina y la internalización por el RS-BI con un exceso molar de las Ac-LDL sin marcar. Los resultados mostraron que, bajo nuestras condiciones, las ROS producidas extracelularmente provocaron una disminución en la internalización de las ^{125}I -Ac-LDL en todas las líneas celulares estudiadas. El estrés oxidativo no alteró la unión de los ligandos a los receptores, así como tampoco su expresión, medida por ensayos de "western blot" y por RT-PCR. De igual forma se demostró que las Ac-LDL expuestas directamente al TBH fueron reconocidas e internalizadas por los receptores scavenger. De forma interesante ambos receptores RS-AI y RS-BI fueron mas susceptibles a la presencia del TBH dado que no se observaron cambios en la internalización de las LDL por el receptor de LDL. Estos resultados muestran que el efecto producido por las ROS extracelulares sobre la función y la expresión del RS-AI y del RS-BI es muy diferente al efecto reportado con ROS producidas intracelularmente. Bajo nuestras condiciones de ensayo, estas ROS pudieran estar dañando directamente residuos importantes dentro de cada proteína receptora que pudiera afectar el proceso de internalización. Tambien se podría pensar en una posible modificación de los lípidos de membrana cercanos a estos receptores y la alteración este mismo proceso. Cambios en la internalización de estas lipoproteínas a través de estos receptores pueden explicar como diferentes ligandos, al no ser internalizados, pueden acumularse de forma extracelular causando daño celular. Se reporta por primera vez la presencia del RS-BI en células de C6 (glioma de rata) y en células PC12 (feocromocitoma de rata) y el efecto del estrés oxidativo extracelular sobre su función y expresión.

ABSTRACT

Scavenger receptors AI and BI are cell surface membrane proteins that bind chemically modified low density lipoproteins (LDL). These receptors mediate the uptake of cholesterol from modified LDL by receptor mediated endocytosis or by the selective uptake of HDL's cholesteryl esters. Several studies show that scavenger receptor activity can be regulated by growth factors, oxidized LDL or by intracellular production of reactive oxygen species (ROS). Scavenger receptor activity regulation has attracted considerable attention since they participate in the massive uptake of cholesterol from modified LDL and they can convert cultured macrophages into cholesteryl ester filled foam cells, similar to those in atherosclerotic plaques. ROS play an important role in the oxidation of core lipids and proteins of lipoproteins leading to their recognition by scavenger receptors, regulation of the scavenger receptor activity and vascular dysfunction during the atherosclerotic process. We investigated the role of oxidative stress produced extracellularly in the scavenger receptor activity class A type I (SR-AI) on CHO cells and CHO cells transfected with the SR-AI gene. We also studied the role of extracellular oxidative stress on SR-BI activity on C6 cells (rat glioma) and PC12 cells (rat pheochromocytoma) through the internalization of ^{125}I -Acetylated LDL particles (^{125}I -Ac-LDL). *Ter*-butyl hydroperoxide (TBH) was used as an oxidative agent. This study shows that extracellularly produced ROS exclusively alter the endocytic capacity of the SR-AI and SR-BI. Interestingly, ROS did not damage the ligand binding, nor the ligands directly exposed to the oxidant effect of TBH. We did not find changes in mRNA expression and protein levels studied by western blot and RT-PCR assays. Since we did not observe important changes in LDL internalization through the LDL receptor when normal and oxidative stress conditions we used. We infer that the structural differences among these receptors most play and important role in the susceptibility to oxidative stress. ROS produced by exogenous agents do not have the same effect upon the receptor as intracellularly produced ROS. Changes found in Ac-LDL uptake by SR-AI and SR-BI under extracellularly oxidative stress conditions could help to explain how it is that several ligands to these receptors can not be internalized and eliminated, therefore stimulating their extracellular accumulation and cell damage. For the first time we report the presence of SR-BI on C6 and PC12 cells.

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ABC1	Proteína llamada cassette transportador de colesterol que une ATP
ACAT	Transferasa de acil colesterol acil coenzima A
Ac-LDL	LDL acetilada
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
AGE-BSA	Albúmina sérica bovina modificada por extremos glicosilados avanzados
Apo	Apolipoproteína
β A	Péptido beta amiloide
BCA	Ácido bicinconflico
BSA	Albúmina sérica bovina
CETP	Proteína transferidora de ésteres de colesterol
CHO	Células de ovario de hámster chino
CHO-RSA	Células CHO transfectadas con el gen del RS-AI
CML	Células del músculo liso
DCFH ₂ -DA	Dicloro-fluorescein diacetato
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMSO	Dimetil sulfóxido
EGF	Factor de crecimiento epidermal
Gly-BSA	BSA glicosilada
HMGCoA reductasa	Reductasa de hidroximetil glutaril coenzima A
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
LCAT	Transferasa de lecitín acil colesterol
LDL	Lipoproteínas de baja densidad

LH	Lipasa hepática
LPL	Lipasa lipoprotéica
LPS	Lipopolisacárido
LTA	Ácido lipoteicoico
Ma-BSA	BSA maleilada
Ma-LDL	LDL maleilada
MCSF	Factor estimulante de macrófagos en colonia
Ox-HDL	HDL oxidadas
Ox-LDL	LDL oxidadas
PBS	Amortiguador de fosfatos
PBS-BSA	PBS con BSA
PBS-MCF	PBS sin magnesio y sin calcio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PPA	Proteína precursora del péptido beta amiloide
R-LDL	Receptor de las LDL
ROS	Especies de oxígeno reactivas
RS-AI	Receptor "scavenger" clase A tipo I
RS-BI	Receptor "scavenger" clase B tipo I
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SNC	Sistema nervioso central
TBH	<i>ter</i> -butil hidroperóxido
TCA	Ácido tricloroacético
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

INTRODUCCIÓN

El colesterol es un lípido que pertenece al grupo de los esteroides y es considerado como el esteroide de mayor importancia en todos los tejidos animales (1). Las células de muchos órganos y tejidos satisfacen sus requerimientos de colesterol a través de la biosíntesis endógena (2). Sin embargo, diversos tipos celulares han adquirido mecanismos para internalizar el colesterol exógeno a través de las lipoproteínas plasmáticas (3). Las células que internalizan el colesterol exógeno disminuyen la biosíntesis del colesterol y la expresión del receptor membranar que capta las lipoproteínas que transportan el colesterol, en respuesta a la carga de colesterol (4). Las células han desarrollado diversos mecanismos para prevenir la acumulación del colesterol. Uno de ellos es la esterificación del colesterol, el cual es mediado por la enzima microsomal transferasa de acil-colesterol (ACAT, por sus siglas en inglés "acyl-cholesterol acyltransferase") (5). Otros mecanismos son el eflujo celular del colesterol, así como también la síntesis de esteroides y de ácidos biliares, que pueden ayudar a limitar la acumulación del colesterol libre intracelular en las células esteroideogénicas y en los hepatocitos respectivamente (5, 6). El exceso de colesterol permite su cristalización intracelular y la formación de oxisteroides, los cuales pueden ser citotóxicos al activar vías apoptóticas y causar daño a la integridad física de las membranas y a las estructuras intracelulares (7, 8). La interacción de los anillos hidrofóbicos del colesterol con los grupos acilo de los ácidos grasos saturados de los fosfolípidos en la membrana celular, es crítica para la formación de regiones conocidas como balsas líquidas ordenadas ("liquid-ordered rafts"). El exceso de colesterol puede cambiar o dañar la función de algunas proteínas de membrana en estas regiones (9, 10). La importancia que tiene la acumulación del colesterol en exceso puede apreciarse cuando los macrófagos repletos de colesterol se convierten en células espumosas en las lesiones ateroscleróticas (11, 12).

ATEROSCLEROSIS

La arteriosclerosis se refiere a un grupo de trastornos que tienen en común el engrosamiento y la pérdida de elasticidad de las paredes arteriales. Dentro de este término se incluye la variante conocida como aterosclerosis.

La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial y progresiva que se caracteriza por la acumulación de lípidos y de elementos fibrosos en las grandes arterias (13). Los sitios preferidos para el inicio de las lesiones en las arterias son aquellos donde hay un mayor flujo dinámico de la sangre (14). La lesión temprana de la aterosclerosis consiste en la acumulación de macrófagos repletos de colesterol, llamados células espumosas. En humanos, estas lesiones conocidas como estrías grasas, se pueden observar en la aorta en la primera década de la vida, en las arterias coronarias en la segunda década y en las arterias cerebrales en la tercera y cuarta décadas de la vida. La importancia de las estrías grasas es que son las precursoras de las lesiones avanzadas que se caracterizan por la acumulación de detritos celulares necróticos llenos de lípidos y por el crecimiento de células del músculo liso (CML) en la pared arterial. Estas placas se calcifican, se ulceran y son irrigadas por vasos sanguíneos pequeños que van creciendo con la lesión. Las lesiones avanzadas pueden bloquear el flujo sanguíneo, formar trombos y dar como resultado el infarto al miocardio (15).

El nivel elevado de colesterol en el plasma humano, es considerado como un factor etiológico muy importante en la patogénesis de la aterosclerosis (16, 17). El colesterol es transportado en el plasma por las lipoproteínas de baja densidad o LDL (por sus siglas en inglés "low density lipoprotein"). Goldstein et al., dilucidaron la vía de entrada del colesterol a las células (18). El componente proteico de la LDL, la apolipoproteína (apo) B-100, es reconocida por un receptor específico en la membrana celular. El complejo ligando-receptor es internalizado, la apo B-100 se degrada en los lisosomas, mientras que el colesterol es enviado a una poza de colesterol (18, 19). Cuando los niveles de colesterol intracelular se elevan, las células regulan la síntesis del colesterol, inhibiendo la actividad de la reductasa de 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A (HMGCoA), que participa en la síntesis intracelular del colesterol y al mismo tiempo se activa la enzima ACAT que disminuye el nivel de colesterol libre. Los estudios de Goldstein y Brown permitieron entender que los altos niveles del colesterol en el plasma de los pacientes con hipercolesterolemia familiar se debían a una reducción en la eliminación de las LDL por ausencia del receptor de LDL. Sin embargo, estos estudios no explicaban la acumulación del colesterol en la

placa aterosclerótica (16, 20, 21). Goldstein et al., observaron que los macrófagos que no tienen el receptor para la apo B-100 eran capaces de acumular colesterol cuando se incubaban con las LDL acetiladas químicamente (22). De esta forma se demostró una segunda vía de internalización del colesterol (23). Esta vía implicaba un nuevo receptor llamado receptor pepenador o "scavenger", el cual reconoce solamente a las LDL modificadas y su actividad no disminuye por los niveles altos de colesterol intracelular. Por ello, los macrófagos pueden acumular grandes cantidades de lípidos y convertirse en células espumosas (23). Sin embargo, dado que la acetilación ocurre *in vitro*, otros estudios demostraron que las LDL oxidadas *in vivo* pueden ser reconocidas por el receptor "scavenger" de los macrófagos (21, 24-26). Este descubrimiento condujo a la investigación de los mecanismos de oxidación de las LDL, el papel de los radicales libres en dicha oxidación y su efecto en el proceso aterosclerótico (27, 28).

CLASIFICACIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS

Las lipoproteínas son partículas pseudomicelares solubles en agua, formadas por lípidos (triacilgliceroles, colesterol y fosfolípidos) unidos a una o más proteínas específicas llamadas apolipoproteínas. La estructura de estas macromoléculas está sujeta a cambios constantes, debido a las interacciones entre ellas, con enzimas y con sus receptores. En el plasma existe un continuo ingreso de partículas nacientes así como una remoción constante de partículas viejas, dando como resultado una gran heterogeneidad en las moléculas de las lipoproteínas.

En el plasma se encuentran diferentes lipoproteínas que desempeñan papeles importantes en el transporte y en el metabolismo de los lípidos. Estas se han clasificado de forma general, de acuerdo a su densidad, en: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad o VLDL (por sus siglas en inglés "very low density lipoprotein"), de densidad intermedia o IDL ("intermediate density lipoprotein"), de baja densidad o LDL ("low density lipoprotein") y de alta densidad o HDL ("high density lipoprotein"). Los quilomicrones y las VLDL son el principal transporte de los triacilgliceroles y colectivamente se denominan lipoproteínas ricas en triacilgliceroles dado que, bajo condiciones normales de dieta y tiempo de residencia en el plasma, los triacilgliceroles constituyen su principal

componente (29, 30). Esta división resulta incompleta ya que, como se verá más adelante, las lipoproteínas experimentan un continuo intercambio de sus componentes durante su metabolismo y todas pertenecen al mismo flujo metabólico (Fig. 1).

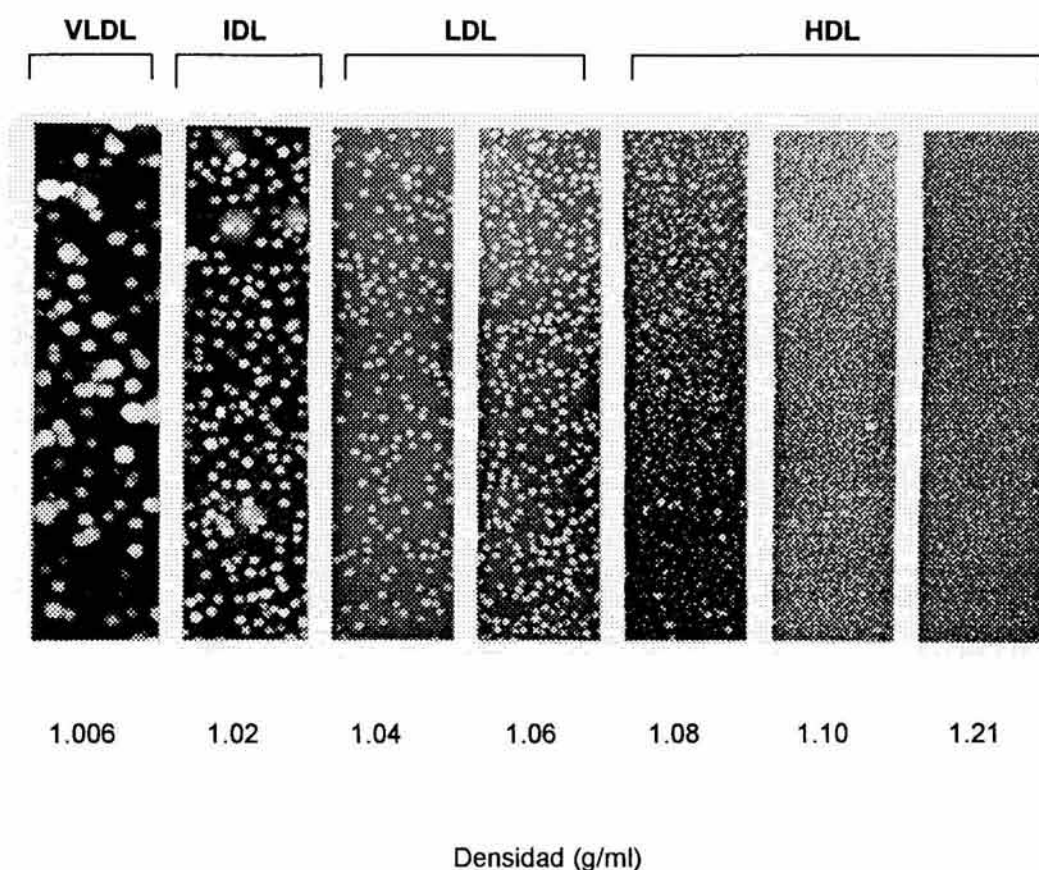


Figura 1. Lipoproteínas plasmáticas humanas. Microfotografías de cada uno de los distintos grupos de lipoproteínas que se clasifican, en forma general, de acuerdo a su densidad en quilomicrones con una densidad de 0.93 g/ml, VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad) con una densidad de 0.93 a 1.006 g/ml, IDL (lipoproteínas de densidad intermedia) con una densidad de 1.006 a 1.019 g/ml, LDL (lipoproteínas de baja densidad) con una densidad de 1.019 a 1.063 g/ml y HDL (lipoproteínas de alta densidad) con una densidad de 1.063 a 1.5 g/ml.

METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS

El metabolismo de los lípidos se divide en forma general en dos: el metabolismo exógeno que es el conjunto de procesos a través de los cuales el organismo utiliza los lípidos contenidos en la dieta y el metabolismo endógeno, que incluye el transporte, el almacenamiento y la utilización de los lípidos sintetizados por el organismo.

Vía Exógena

Los lípidos ingeridos en la dieta se emulsifican con las sales biliares y se hidrolizan en la luz del tubo digestivo por la acción de las lipasas de origen pancreático. Los ácidos grasos contenidos en el colesterol esterificado, en los fosfolípidos y en los triacilgliceroles, liberados por la acción de las lipasas, penetran a la célula endotelial de la mucosa intestinal como ácidos grasos libres (31).

En las células epiteliales de la mucosa intestinal se vuelven a sintetizar los triacilgliceroles a partir del fosfato de glicerol y de los ácidos grasos libres (32). Dentro del enterocito una fracción del colesterol es reesterificado por la acción de la ACAT (33) y junto con las apolipoproteínas A_I (apo A-I), apo A-IV y la apo B-48 (al parecer esta última apolipoproteína sólo se sintetiza en el intestino), dan origen a los quilomicrones. Los quilomicrones son liberados a los conductos linfáticos y pasan a la circulación sanguínea e intercambian componentes de superficie con las HDL. Las apos E, C-II y C-III pasan de las HDL a los quilomicrones, mientras que la apo A-I pasa de los quilomicrones a las HDL (34). La apo C-II adquirida de las HDL actúa como cofactor para la activación de la lipasa lipoprotéica (LPL, por sus siglas en inglés "lipoprotein lipase"), que hidroliza los triacilgliceroles contenidos en los quilomicrones a ácidos grasos y monoglicéridos y convierte los quilomicrones en partículas más pequeñas denominadas remanentes de quilomicrones (Fig. 2) (35). Este fenómeno ocurre en las paredes de los capilares en donde la LPL se encuentra unida a la superficie endotelial por glicosaminoglicanos. Se piensa que la apo C-III evita que la LPL sea eliminada de manera prematura por los receptores hepáticos específicos (36, 37). Los ácidos grasos liberados (> 75%) por la LPL pueden atravesar el endotelio vascular y ser utilizados para la

obtención de energía en el músculo o son almacenados en el tejido adiposo. La apo E presente en los remanentes de quilomicrones permite el reconocimiento e interacción de los mismos por receptores hepáticos para su eliminación del plasma sanguíneo (38). El receptor del quilomicrón es distinto al receptor para el catabolismo de las VLDL y al parecer reconoce a la apo E más que a la apo B-48. De esta forma llegan al hígado el colesterol y los fosfolípidos provenientes de la dieta. La velocidad de eliminación de los quilomicrones varía de una especie a otra, para el hombre es de 6 h en promedio. La incorporación del colesterol de los remanentes de quilomicrón por el hígado, disminuye la síntesis hepática de colesterol y la actividad del receptor para la apo B/E (39, 40).

Vía endógena

La vía endógena se subdivide en dos partes: una relacionada con la función y el metabolismo de las lipoproteínas que contienen apo B-100 (VLDL-IDL-LDL) y otra con las lipoproteínas que contienen apo A-I (HDL).

En el hepatocito se sintetizan los componentes que van a dar origen a las VLDL. La apo B-100 se une a los triacilgliceroles, al colesterol esterificado, a pequeñas cantidades de fosfolípidos y a la apo E (41). Se conoce que el ensamblaje de las partículas de VLDL dentro del hígado puede ser heterogéneo, dando como resultado más de una especie de partículas VLDL (42, 43). Una vez ensambladas, las VLDL pasan a la circulación sanguínea en donde, en forma análoga a lo que ocurre con los quilomicrones, se lleva a cabo la transferencia de lípidos y apolipoproteínas con las HDL. Las HDL reciben los triacilgliceroles de las VLDL después de que actúa la LPL. En cambio los ésteres de colesterol son transferidos de las HDL a las VLDL por la proteína transferidora de ésteres de colesterol o CETP (por sus siglas en inglés "cholesteryl ester transfer protein") asociada principalmente con las HDL (44). Las VLDL reciben la apo C-II de las HDL (Fig. 2) (39, 40). Como se mencionó anteriormente, esta apolipoproteína es un cofactor necesario para que se active la LPL (37, 38). Esta enzima hidroliza los triacilgliceroles presentes en las VLDL y las convierte progresivamente en partículas más pequeñas conocidas como IDL o remanentes de VLDL (o

también VLDL pequeñas), que pueden ser capturadas por los receptores hepáticos para la apo B/E presentes en estas partículas. La fracción de IDL que no es capturada por el hígado se transforma en las LDL por la hidrólisis adicional de sus triacilgliceroles por la lipasa hepática (HL, por sus siglas en inglés "hepatic lipase") y la transferencia de las apos E y C de las IDL a las HDL (Fig.2) (45). Estas LDL conservan pequeñas cantidades de triacilgliceroles y transportan principalmente ésteres de colesterol en su centro y en su superficie solamente apo B-100. En condiciones normales, el destino de las LDL es su captación por el receptor para las LDL (R-LDL) presente en muchos tejidos o por los receptores específicos con alta afinidad para la apo B-100, localizados principalmente en el hígado (16). Las LDL unidas al receptor siguen una secuencia ordenada de eventos que incluyen la unión, la internalización y la degradación de la lipoproteína por un proceso conocido como endocitosis mediada por receptor (16).

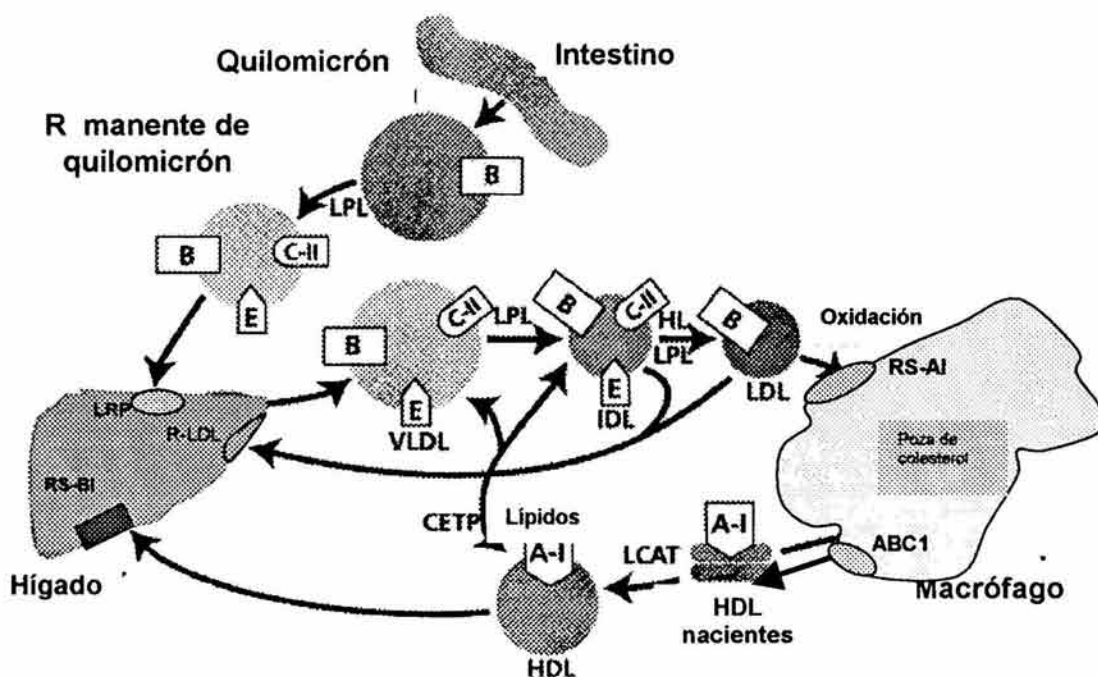


Figura 2. Metabolismo lipoprotéico: Vía exógena. Los lípidos ingeridos en la dieta atraviesan las células intestinales para la formación de los quilomicrones con la adquisición de la apo B-48 (B). Los triacilglicéridos dentro de los quilomicrones son hidrolizados por la LPL usando la apo C-II como cofactor y generando los remanentes de quilomicrones los cuales son reconocidos por los receptores para la apo B/E en el hígado. **Vía endógena.** Las VLDL son secretadas por el hígado al plasma sanguíneo, en donde los triacilglicéridos son hidrolizados por la LPL produciendo las moléculas intermedias llamadas IDL. Algunas de estas IDL son reconocidas por receptores para la apo B/E para ser eliminadas por el hígado. La mayoría de las IDL son hidrolizadas por la lipasa hepática dando origen a las LDL. Si las LDL son oxidadas pueden ser internalizadas vía receptores "scavenger" como el receptor "scavenger" clase A en los macrófagos o el receptor "scavenger" clase B en el hígado. **(3) Las partículas HDL** nacientes se forman por componentes tanto del hígado como del intestino, son secretadas como partículas que contienen principalmente fosfolípidos y apo A-I. Estas HDL interactúan con células periféricas para la eliminación del colesterol libre a través de la proteína transportadora ABC1. El colesterol en estas HDL es esterificado por la enzima LCAT usando como cofactor a la apo A-I, formándose así las HDL esféricas o maduras. Los ésteres de colesterol son llevados al hígado para su eliminación a través del receptor "scavenger" clase B o transferidos a lipoproteínas que contienen apo B-100 por la CETP. ABC1, proteína transportadora de colesterol que une ATP; CETP, proteína que transfiere ésteres de colesterol; HL, lipasa hepática; LCAT, transferasa de lecitín acil colesterol; R-LDL, receptor de LDL; RS-AI, receptor "scavenger" clase A tipo I; RS-BI, receptor "scavenger" clase B tipo I. Tomado de Kwaterovich (41).

Metabolismo de las HDL

Las HDL son partículas centrales en la regulación del catabolismo de las lipoproteínas. Los componentes de las HDL participan en el proceso catabólico intravascular que involucra a las lipoproteínas ricas en triacilgliceroles y el control del transporte extracelular del colesterol (20). Las HDL regulan el flujo dinámico de los constituyentes de las otras lipoproteínas, lo cual ocurre continuamente durante la cascada metabólica de las lipoproteínas. Este flujo se relaciona con el intercambio y la transferencia de lípidos y apolipoproteínas a través de reacciones enzimáticas y proteínas transferidoras de lípidos (Fig. 2) (46). Varias especies de HDL son formadas, degradadas y regeneradas, y esto ocurre a través de la aceptación y donación de lípidos y apolipoproteínas (46). Las HDL se forman inicialmente como HDL nacientes, al parecer en la circulación sanguínea. Sus componentes se originan en parte en el hígado y en parte en el intestino, como fosfolípidos asociados a las apo A-I y apo A-II. Estas HDL nacientes o discoidales maduran rápidamente adquiriendo colesterol libre y apolipoproteínas E y C de otras lipoproteínas, cambiando a una forma esférica (47). La apo A-I activa a la transferasa de lecitina de colesterol (LCAT, por sus siglas en inglés "lecithin cholesterol acyltransferase") presente en las HDL nacientes para la esterificación del colesterol libre y su almacenamiento como éster de colesterol en el centro de la partícula, para después ser transferido a otras lipoproteínas o a membranas celulares. De esta forma la LCAT participa en la maduración de las HDL, cambiando la distribución de las subclases de HDL y su composición. La CETP redistribuye los ésteres de colesterol formados por la LCAT desde su sitio de síntesis en las diferentes subclases de HDL hacia las lipoproteínas ricas en triacilgliceroles (44). Las HDL son partículas heterogéneas divididas principalmente en HDL₂ (menos densas que contienen apo A-I) y HDL₃ (más densas que contienen apo A-I y apo A-II). De estas fracciones la que muestra una relación inversa más clara con la incidencia de la aterosclerosis es la HDL₂, en tanto que la HDL₃ parece ser relativamente inerte (48). La captación de las partículas de HDL por diferentes células como los hepatocitos, enterocitos, adipocitos, fibroblastos y células corticales suprarrenales, para la adquisición de colesterol, se lleva a cabo por su captación por el receptor llamado pepenador o "scavenger" clase B tipo I (RS-BI) (49). Este proceso es facilitado por una

proteína transportadora que une ATP llamada cassette ABC1 (por sus siglas en inglés "ATP-binding cassette transporter") (50, 51). El eflujo o salida del colesterol es el primer paso en el transporte reverso, mediante el cual, el colesterol es finalmente eliminado por el organismo (Figuras 2 y 3).

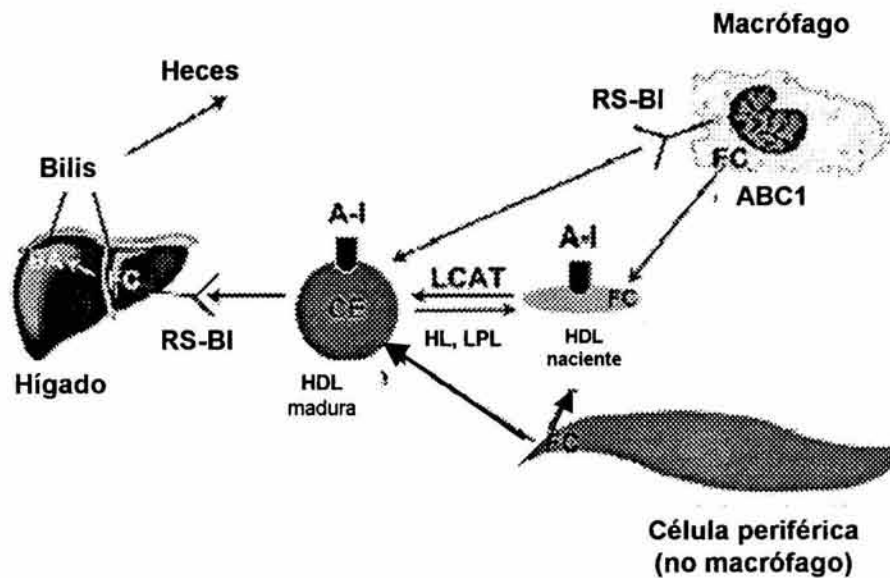


Figura 3. Metabolismo de las HDL y transporte en reversa al hígado del colesterol. Los macrófagos y las diversas células, liberan el colesterol libre a los aceptores extracelulares. La apo A-I interactúa con las células periféricas y adquiere fosfolípidos y colesterol libre a través del transporte facilitado por la proteína ABC1. Las HDL maduras adquieren el colesterol de los macrófagos a través del receptor RS-BI. El colesterol no esterificado o colesterol libre en las HDL es tomado selectivamente por el hígado a través del RS-BI. El hígado secreta el colesterol libre directamente en la bilis y lo convierte en sales biliares y los esteroides biliares son excretados en las heces. El colesterol esterificado en las HDL también puede ser transferido a las lipoproteínas que contienen apo B en intercambio por triacilglicerol a través de la acción de la CETP. La HL y la LPL hidrolizan los triacilglicerol presentes en las HDL convirtiéndolas en partículas más pequeñas para su catabolismo. CE, colesterol esterificado. Tomado de Rader (48).

CARACTERÍSTICAS DEL METABOLISMO DE LAS LDL

La formación de las LDL depende del catabolismo de las VLDL. Su transformación se relaciona con la progresiva pérdida de los triacilglicérols del núcleo de las VLDL y eventualmente de las IDL y la transferencia de lípidos (fosfolípidos y colesterol libre) y apolipoproteínas E y C a las HDL. Este proceso deja una partícula enriquecida en ésteres de colesterol en su centro y prácticamente una sola apolipoproteína, la apo B-100. Por estudios cinéticos se sabe que todas las LDL se originan de las VLDL con la formación del intermediario de IDL (Fig. 2) (41), es decir, que el hígado no secreta LDL directamente. Las LDL aisladas de plasma humano tienen un rango de densidad entre 1.019 - 1.063 g/ml y varían en masa molecular de 2 a 3.5×10^6 y en diámetro de 200 a 250 Å (Fig. 4). Estas variaciones se deben a la cantidad de lípidos en el centro de la partícula más que a su contenido proteico (52). El componente proteico de la partícula de LDL, la apo B-100, tiene una masa molecular alrededor de 500 KDa. Del 5 al 9% de la masa de la apo B-100 está conformada por cadenas de galactosa, manosa, glucosa y residuos de ácido siálico (16). El componente lipídico consiste principalmente de ésteres de colesterol en el centro y está rodeado por fosfolípidos y colesterol libre (16). Muchos tejidos tienen la capacidad de reconocer, utilizar y eliminar a las LDL, por lo cual las LDL son el principal transporte de colesterol para la síntesis de membranas y otras funciones celulares (53). La célula adquiere colesterol a través del R-LDL, un receptor de alta afinidad en la superficie celular que une a las LDL. La unión de las LDL con su receptor es el primer paso en el metabolismo de las LDL. Las células toman a la lipoproteína por un mecanismo conocido como endocitosis mediada por receptor, utilizan el colesterol, suprimen la síntesis endógena de colesterol y disminuyen el número de receptores en la superficie celular (18). Así las células son capaces de controlar la cantidad de colesterol que entra, aseguran un abastecimiento adecuado y evitan una excesiva acumulación intracelular del mismo. Durante la endocitosis mediada por receptor, la unión de la lipoproteína al receptor provoca la formación de una región membranal cubierta por proteína clatrina del lado intracelular. Una vez formados los pozos cubiertos de clatrina, éstos se invaginan y se fusionan con los endosomas o también llamados receptosomas. El pH ácido de los endosomas permite la disociación de la lipoproteína del

receptor. El receptor regresa a la superficie celular, a través del transporte vesicular y se fusiona con la membrana celular. Una vez en la superficie, el receptor une otra lipoproteína e inicia otro ciclo de endocitosis (Fig. 5). El endosoma con la molécula de LDL que se disoció del receptor, se fusiona con un lisosoma. El componente proteico es hidrolizado a aminoácidos y los ésteres de colesterol son hidrolizados por una lipasa ácida, liberando el colesterol para la síntesis de la membrana plasmática, los ácidos biliares, las hormonas esteroideas o se almacena en forma de gotas de ésteres de colesterol citoplásmico (20). Por otra parte, una esterasa transforma el colesterol esterificado en colesterol libre que abandona el lisosoma. El colesterol libre que ha salido de los lisosomas viaja al retículo endoplásmico rugoso en donde ejerce tres efectos importantes: 1) disminuye la síntesis de la HMGCoA que cataliza y regula el primer paso en la biosíntesis *de novo* del colesterol; 2) aumenta la actividad de la enzima ACAT, que se encarga de la reesterificación del colesterol libre y 3) disminuye la síntesis de los receptores para LDL y por lo tanto el número de los receptores en la membrana celular, lo que evita la acumulación de colesterol dentro de las células (20).

Cuando se excede la capacidad celular de depuración de estas lipoproteínas, se prolonga su permanencia en el plasma. Las LDL en el plasma se pueden modificar en su estructura química y ahora son captadas por otro tipo de receptores que las reconocen (20, 54). Estos receptores, conocidos como receptores pepenadores o "scavenger", se localizan principalmente en los macrófagos del sistema reticuloendotelial que se encuentran diseminados en todo el organismo (22). Se han identificado *in vitro* los tipos de modificaciones de la molécula de LDL que permiten su reconocimiento y su captura por estos receptores. Sin embargo, no se ha establecido el mecanismo a través del cual ocurren estos cambios en forma exacta *in vivo* (55). Después de la unión de la LDL modificada al receptor "scavenger", la lipoproteína es internalizada, lo que desencadena eventos similares a lo que ocurren en el receptor de LDL no modificada. Excepto que la retroalimentación negativa sobre la síntesis del receptor no ocurre en este caso, permitiendo la acumulación del colesterol y la transformación de los macrófagos en células espumosas (23, 56).

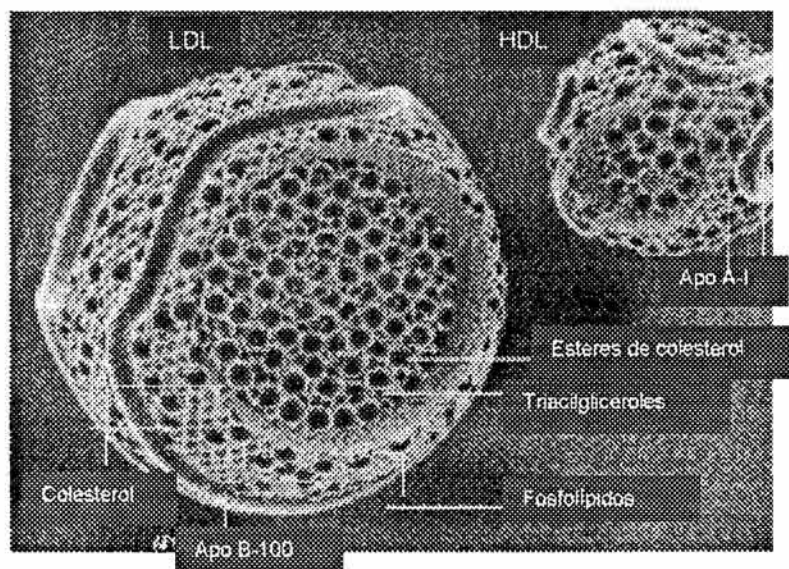


Figura 4. Lipoproteínas de baja densidad. Estas partículas son el catabolismo final de las VLDL. Tienen un diámetro de aproximadamente 20 nm y forman el 40 a 50% de la masa total de las lipoproteínas circulantes en el plasma humano. Están constituidas por 6% de triacilglicerol, 8% de colesterol libre, 25% de apolipoproteína B-100 y 42% de ésteres de colesterol. Las LDL son catabolizadas a través de su unión específica a un receptor de membrana llamado receptor de LDL, el cual se localiza principalmente en el hígado (61%) y en tejidos periféricos (6%). El porcentaje restante es eliminado de la circulación por un mecanismo independiente de receptor. Tomado de Libby (57).

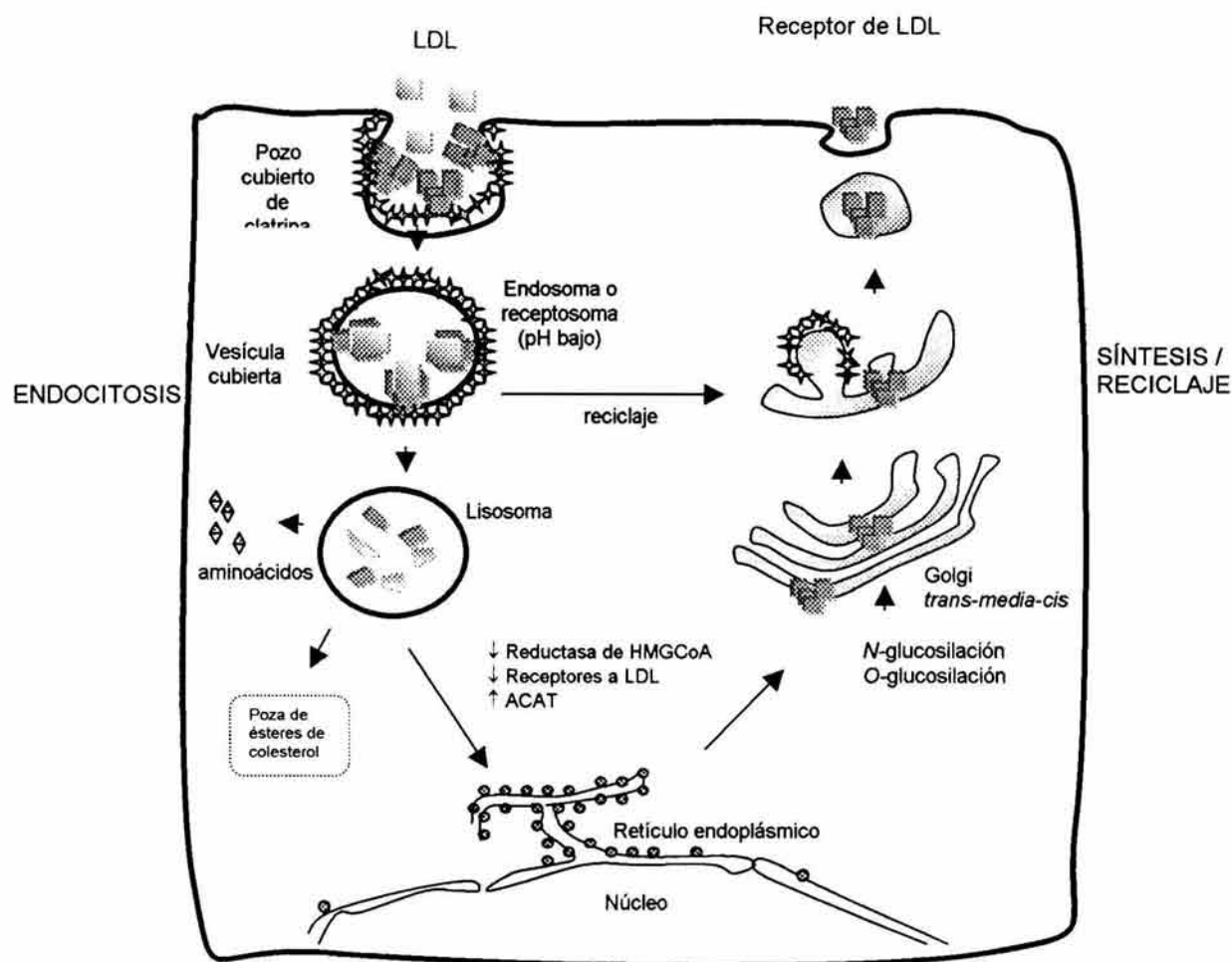


Figura 5. Biosíntesis y reciclamiento del receptor de LDL. El receptor de LDL es una proteína integral de membrana y es sintetizado como un precursor en el retículo endoplásmico. Este receptor contiene cadenas de carbohidratos con unión *N*-manosa y un centro de *O*-glicosilaciones (*N*-acetil-galactosamina). Después de atravesar el complejo de Golgi, llega a la superficie celular en donde une e internaliza una molécula de LDL a través de la formación de pozos cubiertos de clatrina que se fusionan con un endosoma. El receptor es reciclado a la superficie celular para la unión de otra partícula de LDL. La endocitosis mediada por receptor de LDL modificadas químicamente también ocurre vía formación de pozos cubiertos de clatrina (20).

EL RECEPTOR DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD

El receptor de LDL es una glicoproteína de membrana que tiene una masa molecular de 160 KDa (Fig. 6). El receptor de LDL fue purificado por Schneider et al., en 1982 de la corteza suprarrenal de bovino y está formado por 839 aminoácidos (58). El dominio amino terminal es extracelular y es el sitio de unión a las LDL, está formado por 292 aminoácidos y tiene una secuencia de 40 aminoácidos que se repiten siete veces con alguna variación. Cada repetición de 40 aminoácidos contiene seis residuos de cisteínas formando puentes disulfuro. Esta región rica en cisteínas tiene cargas negativas y se piensa que éstas son complementarias a los residuos positivos en la apo E. El segundo dominio está formado por aproximadamente 400 aminoácidos, tiene un 35% de homología a una porción del dominio extracelular del precursor del factor de crecimiento epidérmico (EGF). El tercer dominio está formado por 58 aminoácidos con 18 residuos de serina o treonina. El cuarto dominio es la región transmembranal y está formada por 22 aminoácidos poco conservados entre el bovino y el humano. El quinto dominio de 50 aminoácidos es el dominio carboxilo terminal y citoplásmico que está altamente conservado entre diferentes especies. Se ha descrito la secuencia de aminoácidos que es necesaria para su asociación con los componentes de los pozos cubiertos de clatrina para que se lleve a cabo la internalización. Esta secuencia NPXY (asparagina-prolina-X-Y, donde X y Y son cualquier aminoácido) es importante para que se lleve a cabo la endocitosis y el tránsito del receptor dentro de la célula (16, 59, 60).

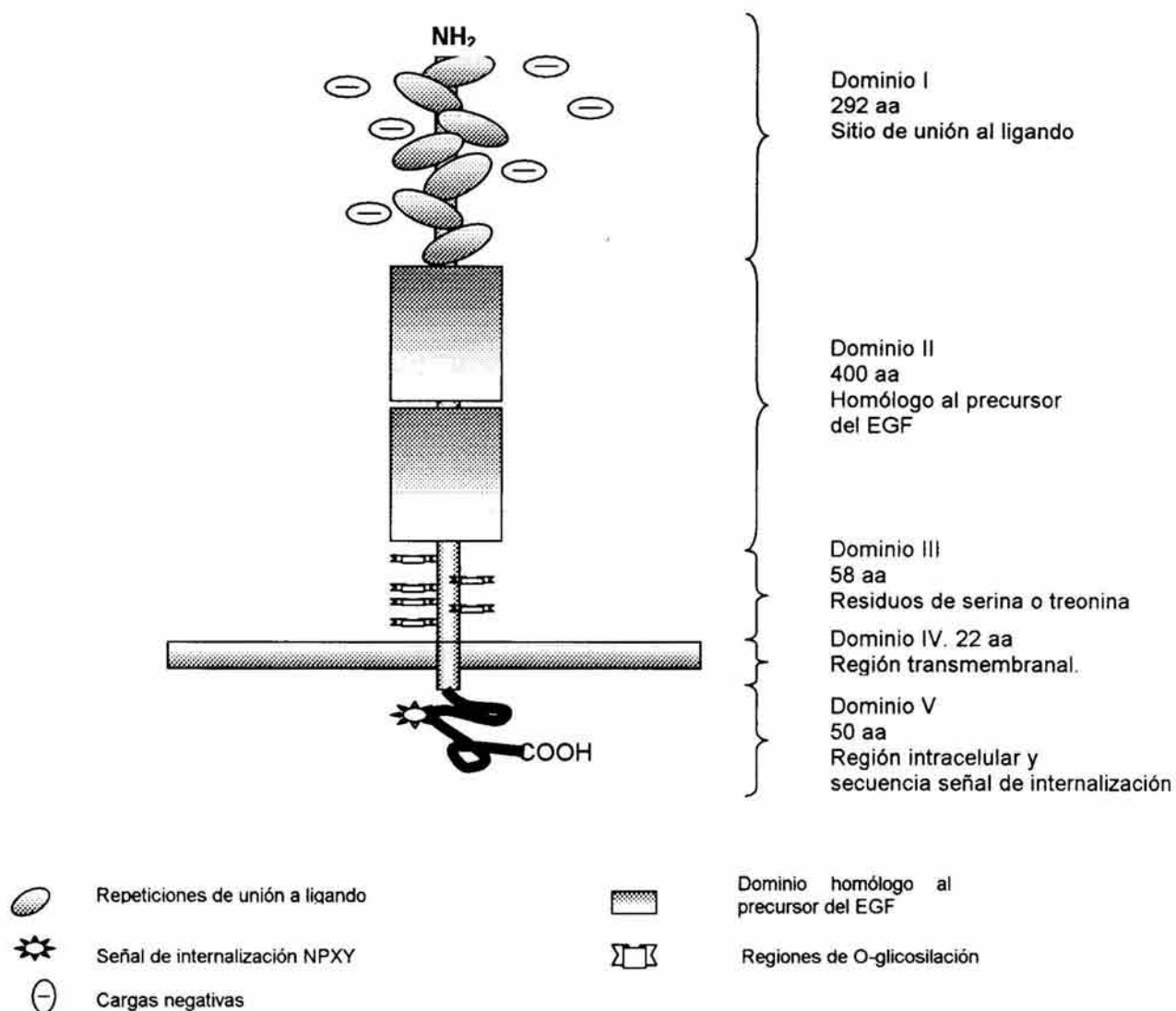


Figura 6. Estructura del receptor de LDL. El receptor de LDL es una glicoproteína de membrana de 839 aminoácidos en su forma madura. Una principalmente LDL y este mecanismo lo hace a través del reconocimiento de sus apolipoproteínas B y E. La secuencia señal citoplásmica NPXY (asparagina-prolina-X-Y) es característica de los receptores que se internalizan en la célula por el proceso conocido como endocitosis mediada por receptor. EGF, factor de crecimiento epidermal. aa, aminoácidos (20, 61).

RECEPTORES "SCAVENGER"

El receptor pepenador o "scavenger" (RS) fue descubierto por Goldstein et al., al estudiar el mecanismo por el cual se deposita y acumula el colesterol en la pared arterial durante la formación de la placa aterosclerótica (22). Este receptor atípico, se definió como el receptor de las LDL acetiladas y ahora es llamado receptor "scavenger" de los macrófagos, en donde inicialmente se describió (22). Estos investigadores demostraron que la actividad del RS de los macrófagos es la internalización de grandes cantidades de LDL modificadas químicamente. Una de las características distintivas del receptor "scavenger" es su amplia unión de diferentes moléculas. Los ligandos definidos para este receptor comprenden moléculas polianiónicas, aunque no todos los polianiones son ligandos para el RS (62). Esta amplia especificidad de unión de ligandos y su expresión en los macrófagos fue la pauta para conocer su participación en condiciones fisiológicas y patológicas, así como en la respuesta inmune asociada a los macrófagos y su participación durante los procesos inflamatorios (63). Con base en su habilidad para internalizar las LDL modificadas químicamente se han descrito toda una familia de receptores "scavenger". De acuerdo con Krieger et al., (62) su clasificación es la siguiente: el RS clase A está formado por RS-AI, RS-AII, RS-AIII y el receptor con una estructura parecida a la colágena o MARCO (por sus siglas en inglés "macrophage receptor with collagenous structure"); la clase B consiste de RS-BI, RS-BII y CD36 y estos receptores se encuentran concentrados en regiones de la célula llamadas caveolas. El CD36 participa en la adhesión celular. La clase C contiene el dRS-CI de *Drosophila*. En la clase D se encuentra el CD68/macrosialina (parecidos a mucina), en la clase E, está el receptor LOX-1 y en clase F se encuentra el receptor "scavenger" con región parecida al factor de crecimiento epidermal o SREC (por sus siglas en inglés "scavenger receptor expressed by endothelial cells").

RECEPTOR "SCAVENGER" CLASE A

El receptor "scavenger" clase A (RS-AI) fue el primer receptor "scavenger" descrito. El RS-AI juega un papel central en la aterogénesis, pero aún falta esclarecer su contribución exacta (64). Entre los ligandos descritos para el RS-AI se incluyen las LDL acetiladas (Ac-LDL), las LDL oxida-

das (Ox-LDL), las LDL maleinadas (Ma-LDL), la albúmina sérica bovina glicosilada (Gly-BSA), los poli-ribonucleótidos (poli-G y poli-I, pero no poli-A o poli-T o C), los polisacáridos como el dextrán sulfato y la fucoidina, el lipopolisacárido (LPS) y el ácido lipoteicoico (LTA), siendo estos últimos componentes de bacterias. Así también los fosfolípidos aniónicos como la fosfatidilserina, productos secretados por plaquetas, el péptido beta amiloide (β A) y la proteína precursora del beta amiloide (PPA) en el sistema nervioso central (61, 62, 65).

EL RS-AI es una glicoproteína trimérica transmembranal que existe en dos formas principales, tipos I y II, los cuales son generados por edición y empalme alternativo del mismo gen. Los dos tipos comprenden seis dominios (Fig. 8). Los dominios I-V se encuentran en ambos receptores, pero el dominio VI solo se restringe al RS-A tipo I (62). El ADN complementario (ADNc) del receptor murino tipo I está formado por 1457 pares de bases (pb) y codifica para una proteína de 454 aminoácidos, con un masa de aproximadamente 240 KDa, mientras que el ADNc del receptor tipo II codifica para una molécula de 350 de aminoácidos (66). Se ha demostrado que el dominio parecido a colágena es la región de unión al ligando, este dominio tiene varias cisteínas, las cuales forman una región rica en cargas positivas que específicamente interactúan con las cargas negativas de los ligandos (67). La expresión del RS-AI se ha demostrado principalmente en los macrófagos, así como también en las células endoteliales del revestimiento del hígado, los sinusoides suprarrenales, en las células endoteliales de las vénulas postcapilares en los nódulos linfáticos, pero no en el endotelio de las aortas (68-71). También en las células del músculo liso y en las lesiones ateroscleróticas (72). La expresión del RS-AI en los macrófagos está bajo la influencia de varias citocinas y factores de crecimiento como el interferón- γ , el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), el M-CSF ("macrophage colony stimulating factor") y el factor de crecimiento derivado de plaquetas o PDGF ("platelet derived growth factor") los cuales son producidos localmente en las lesiones ateroscleróticas y pueden inhibir la actividad del RS-AI a nivel tanto transcripcional como postranscripcional (73-77). El aumento en la expresión del RS-A I y II se induce por ésteres de forbol en las CML y en los fibroblastos. Este proceso se lleva a cabo a través de la proteína cinasa C (78).

Todos los ligandos conocidos hasta el momento se unen a ambos receptores. La unión de ligandos a este receptor es poco usual, no sólo por su amplia especificidad sino porque no muestran competencia recíproca, es decir, si un ligando compite eficientemente por la unión de un segundo ligando, el segundo ligando no compite o compite parcialmente por la unión del primero (79). Se ha descrito la secuencia de aminoácidos del dominio citoplásmico, que es necesaria para su asociación con los componentes de los pozos cubiertos de clatrina, para que se lleve a cabo el proceso de internalización. Esta secuencia descrita como VXFD (val-X-fenil alanina-aspartico, donde X es cualquier aminoácido) es importante para que se lleve a cabo la endocitosis y el tránsito del receptor en el interior de la célula (Fig. 7) (80, 81).

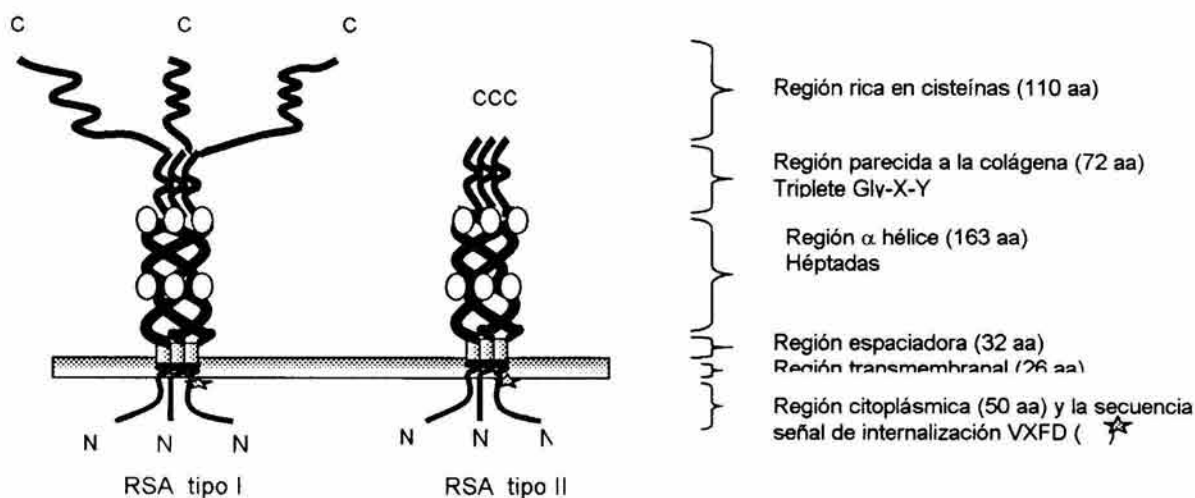


Figura 7. Estructuras del receptor "scavenger" clase A, tipos I y II. El RS-AI tipo I es una molécula homotrimérica formada por seis dominios. La región amino terminal citoplásmica (dominio I) contiene la secuencia para la internalización por endocitosis mediada por receptor. El dominio II es la región transmembranal. El dominio III es una pequeña región espaciadora. El dominio IV tiene una estructura α hélice súperenrollada y está conformado por repeticiones de aminoácidos alifáticos. El dominio V es la región parecida a la colágena la cual comprende 24 repeticiones del triplete Gly-X-Y, donde X y Y pueden ser cualquier aminoácido. El dominio VI es la región rica en cisteínas. El RS-AI tipo II tiene los primeros cinco dominios del tipo I y carece del dominio VI rico en cisteínas. Las cisteínas en la posición de la región espaciadora participan en la formación de los puentes disulfuro para la unión covalente de las cadenas que conforman la estructura del receptor. Las cisteínas en el dominio citoplásmico parece que no participan en la formación de los puentes disulfuro. aa, aminoácidos (61).

RECEPTOR "SCAVENGER" CLASE B TIPO I

El receptor "scavenger" clase B tipo I (RS-BI) es el primer receptor descrito para las HDL (Fig. 8) y lleva a cabo la transferencia de lípidos de las HDL a las células a través de la internalización selectiva de lípidos (82, 83). El RS-BI es un miembro de la super familia de proteínas CD36 y fue identificado en roedores como un ortólogo de CLA-1 en humanos, llamado hRS-BI (84). Muchos de los miembros de la familia CD36 comparten hasta un 35% de identidad con el RS-BI. El RS-BI es una glicoproteína de 509 aminoácidos, con un masa de 57 KDa y se detecta con anticuerpos como una glicoproteína con un masa de 82-85 KDa (83, 85). Tiene una estructura tipo herradura en la cual los extremos amino y carboxilo terminales son citoplásmicos. La proteína esta *N*-glicosilada y el dominio extracelular (aminoácidos 37-439 de la proteína humana), contiene varios puentes disulfuro (ver figura 8). En su extremo citoplásmico tiene sitios para la fosforilación con las proteínas cinasas A y C (83, 86, 87). Los ARN mensajeros (ARNm) del RS-B son generados por la edición y el empalme alternativo del mismo gen. El RS-BI ha sido clonado del humano, de la rata, del ratón y del bovino (85, 88-90). Ambas proteínas, RS-BI y RS-BII, están acetiladas y se agrupan en los dominios ricos en colesterol, tipo caveola, en la membrana plasmática de las células en cultivo (85, 91). El RS-BI une una gran variedad de ligandos entre los que se incluyen las Ac-LDL, las Ox-LDL, las Ox-HDL, la Ma-BSA, el péptido β A, los fosfolípidos aniónicos, las células apoptóticas, así como las HDL, las LDL y las VLDL no modificadas, con una gran afinidad (83, 86). El RS-BI, al igual que RS-A I, también muestra el fenómeno de la competencia no recíproca, es decir, que un primer ligando compite eficientemente por la unión de un segundo ligando, mientras que el segundo ligando no puede competir o compite sólo parcialmente por la unión del primero. Se sugiere que el RS-BI tiene varios sitios que tienen diferentes propiedades de unión con los distintos ligandos (83, 86, 92, 93).

El RS-BI se expresa en los tejidos esteroideogénicos como la glándula suprarrenal y el ovario, en donde, esta expresión depende de la acción de hormonas tróficas como la hormona adenocorticotrópica o ACTH (94-96). Participa de forma muy importante, en el transporte en reversa al hígado del colesterol (49, 97).

También se expresa en niveles bajos en otros tejidos como en la superficie apical de las células de absorción del intestino delgado proximal, en las glándulas mamarias de roedores preñados, en las células deciduales proximales del útero y en los trofoblastos también de roedores (83, 89, 94, 97, 98). La expresión del RS-BI está presente en los astrocitos y las CML vascular en el cerebro del ratón y del humano sano y en los enfermos con Alzheimer (99, 100). En la microglía sólo se expresa durante la etapa neonatal y ésta expresión disminuye en la etapa adulta (101). El RS-BI también se expresa en los macrófagos de las placas ateroscleróticas, en las células espumosas y se eleva durante la diferenciación de los monocitos en macrófagos (102-104). Interesantemente, las Ox-LDL disminuyen la expresión del RS-BI en los macrófagos del humano y del ratón (105).

El transporte del colesterol por las HDL, desde los tejidos periféricos hacia el hígado, se llama transporte en reversa del colesterol (105, 106). El colesterol contenido en las HDL, es internalizado en forma selectiva a través del RS-BI presente en el hígado para su eliminación en forma de sales biliares (Fig. 9). El RS-BI también participa en la unión y en el flujo bidireccional del colesterol esterificado y del colesterol libre, así como de otros lípidos entre las HDL y las células. El flujo de colesterol esterificado de las HDL a las células, se lleva a cabo por un mecanismo no endocítico en el cual no existe la degradación de ningún componente de la partícula de HDL, como sucede en la endocitosis mediada por receptor. El movimiento de las moléculas de colesterol en las HDL hacia la célula se lleva a cabo por un proceso pasivo que depende del contenido de colesterol dentro de la membrana plasmática (Fig. 10) (106-110). Se ha reportado que en algunas circunstancias el RS-BI puede internalizar a la HDL por endocitosis (86) y se ha observado también el proceso de retroendocitosis (111).

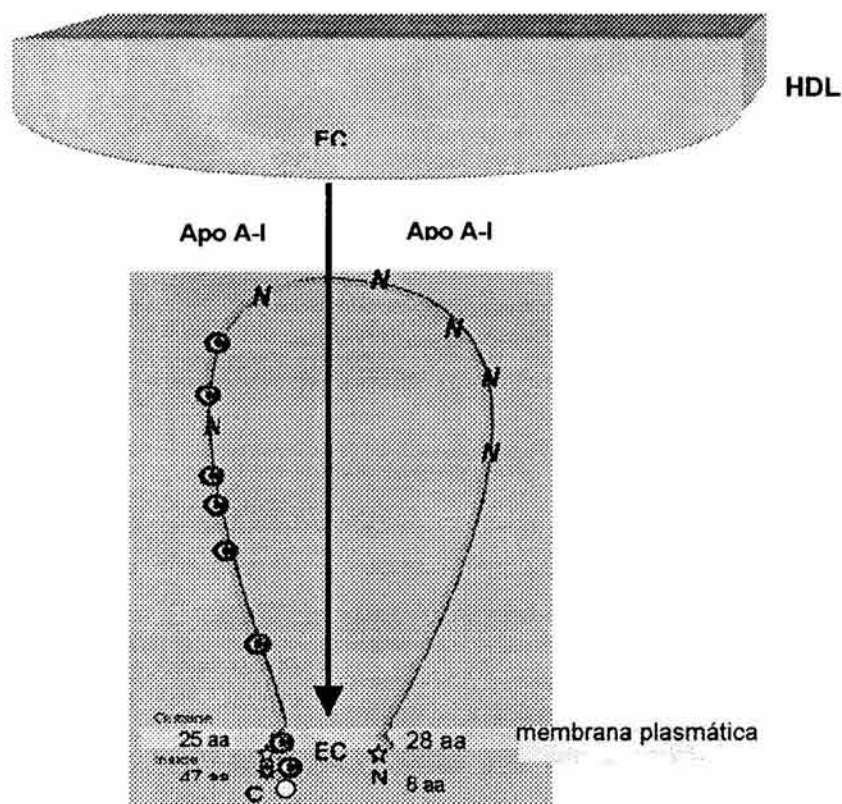


Figura 8. Modelo de la topología del RS-BI. El RS-BI es una glicoproteína de 509 aminoácidos, con un gran dominio extracelular de 403 aminoácidos. Los extremos N- y C- terminales de 28 y 25 residuos se encuentran anclados a la membrana plasmática y tiene dos dominios intramembranales de 18 residuos de aminoácidos cada uno. Este receptor está *N*-glicosilado y se encuentra palmitoilado sobre los residuos de cisteína (C), en el extremo C-terminal, en los dominios citoplásmicos y en el transmembranal. Una molécula de HDL se une al RS-BI a través de la apo A-I presente en la superficie de la HDL. El RS-BI forma un canal no acuoso que sirve como conducto para que las moléculas de ésteres de colesterol (EC) se difundan desde la HDL hacia la membrana plasmática en favor del gradiente de concentración. No se conoce si sólo participa uno o dos receptores en la formación del canal. ☆ PKC y ★ PKA sitios de fosforilación ○ CLAMP/PDZK1 proteína moduladora de la toma selectiva de lípidos por el RS-BI. Tomado de Krieger, Conelly y Williams (49, 107).

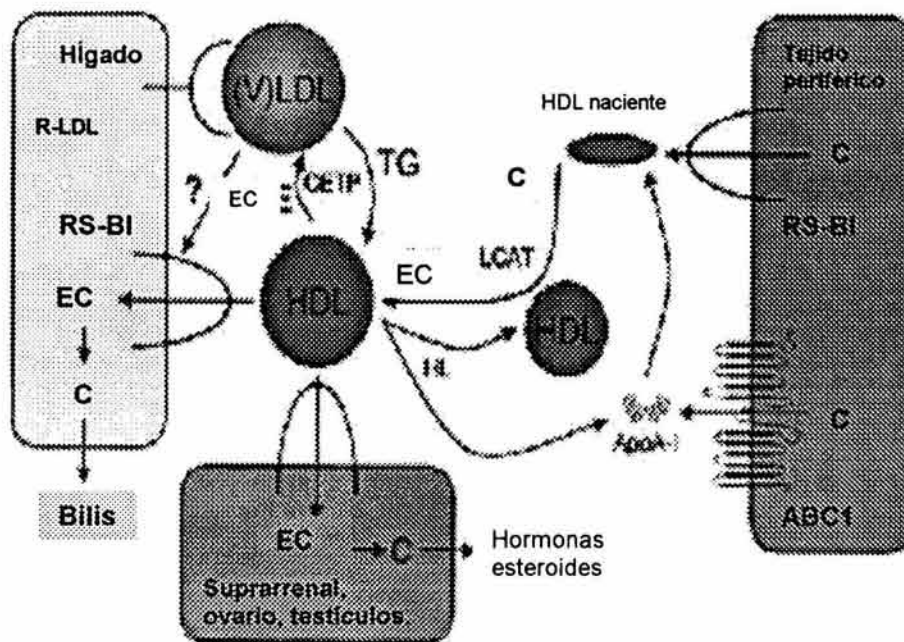


Figura 9. Participación del RS-BI en el transporte en reversa del colesterol. El flujo de colesterol a través del RS-BI y de la proteína ABC1, es el primer paso en el transporte en reversa del colesterol. La maduración de las HDL nacientes en esféricas, debido a la esterificación del colesterol por la LCAT, permite la internalización de los ésteres de colesterol a través del RS-BI en el hígado o en tejidos esteroideogénicos, donde son hidrolizados y excretados en la bilis como colesterol biliar o para la formación de hormonas esteroides. En el humano, una parte de los ésteres de colesterol en las HDL son transferidos a las (V)LDL por la CETP, para ser eliminados por la vía del R-LDL. Otra parte de los ésteres de colesterol de las (V)LDL se internalizan selectivamente a través del RS-BI. La HL aumenta la internalización selectiva de los ésteres de colesterol por el RS-BI y renueva la poza de apo A-I para el eflujo de colesterol. C, colesterol; EC, ésteres de colesterol. Tomado de Rhainds (112).

ESTRÉS OXIDATIVO, ATEROSCLEROSIS Y RECEPTOR "SCAVENGER"

Los radicales libres son átomos o moléculas que contienen uno o más electrones no apareados. La producción de radicales libres ocurre por la adición o remoción de un electrón en una reacción de óxido-reducción y pueden producirse durante el metabolismo normal oxidativo de la célula. Existe un amplio grupo de radicales libres que pueden ser formados por sistemas vivos, entre los que se encuentran, algunos metales de transición como el hierro y el cobre, las especies de nitrógeno reactivas (RNS por sus siglas en inglés "reactive nitrogen species"), los radicales de carbono (los cuales son importantes intermediarios en la peroxidación de lípidos) y las especies de oxígeno reactivas. Las ROS son derivados del oxígeno que son más reactivos que el oxígeno molecular en su estado basal y se incluyen los radicales del oxígeno como el superóxido y el radical hidroxilo, y derivados no radicales como el oxígeno atómico, el ozono y el peróxido de hidrógeno (112a). La producción de ROS se asocia principalmente con el metabolismo celular del oxígeno, en donde, el oxígeno es un aceptor terminal de electrones durante la fosforilación oxidativa y su reducción tetravalente se asocia con la producción de fosfatos de alta energía. Sin embargo, la reducción univalente secuencial da como resultado la formación de intermediarios reactivos de oxígeno (112b). Las ROS son ampliamente estudiadas porque juegan papeles importantes dentro de los sistemas biológicos como moléculas de señalización, pueden inducir o suprimir la expresión de genes o inducir la muerte celular (113).

En los organismos aerobios la producción de RNS y de ROS se encuentra en un balance que se mantiene por los sistemas de defensa antioxidantes. Si este balance se encuentra a favor de las especies reactivas puede ocurrir daño a moléculas (como al ADN, a las proteínas y a los lípidos) que pueden llegar a ser reparadas o reemplazadas. Este balance en favor de las especies reactivas con respecto a los sistemas de defensa antioxidante se le da el nombre de estrés oxidativo (112b). Cuando las células toleran el estrés oxidativo se le conoce como adaptación y los sistemas de defensa se restauran para regresar el balance oxidante/antioxidante. Pero si la célula sufre un exceso o tiene una deficiencia ante el estímulo oxidativo entonces hay un daño irreversible y la célula expuesta a un estrés oxidativo muy severo puede morir.

El estrés oxidativo puede participar de manera importante en la patogénesis de enfermedades degenerativas como la enfermedad de Alzheimer y la aterosclerosis, aunque generalmente el estrés oxidativo es una consecuencia, mas que la causa principal de la enfermedad (112b).

La aterosclerosis se desarrolla en personas con altos niveles LDL ricas en colesterol. El origen de la aterosclerosis aún no esta muy claro, pero una teoría es el daño oxidativo (57, 114), en donde, el daño inicial al endotelio vascular se puede dar por daño mecánico, infección viral, exposición a toxinas etc. Este evento es seguido por la unión de monocitos de la circulación sanguínea que penetran en la pared vascular y se convierten en macrófagos. Tanto los monocitos como los macrófagos se activan y dañan a las células vecinas por la secreción de peróxido de hidrógeno, superóxido, óxido nítrico y enzimas hidrolíticas. El superóxido puede reaccionar con el óxido nítrico y formar peroxinitrito. De esta forma se piensa que las ROS y las RNS participan en el inicio y en el desarrollo de la aterosclerosis (115). Por estudios *in vitro*, se conoce que los mismos macrófagos, las células endoteliales vasculares, las CML y los linfocitos secretan moléculas que pueden oxidar a las LDL (114, 116-118). El evento de la peroxidación de las LDL tambien incluye cambios en la apo B100. Básicamente se forman aldehídos citotóxicos que se unen a los residuos de lisinas en la apo B-100. La modificación de las lisinas hace que la proteína tenga menos cargas positivas. Unas vez modificadas, las LDL son reconocidas por los receptores "scavenger" presentes en los macrófagos. Estas LDL peroxidadas tambien pueden atravesar la pared vascular y causar daño a las células endoteliales. Por estudios *in vitro*, se sabe que estas LDL oxidadas pueden activar la expresión de moléculas de adhesión que atraen a células fagocíticas y dañan la producción de óxido nítrico (119, 120). Las LDL oxidadas son internalizadas por los receptores "scavenger" para ser eliminadas y proteger la pared vascular. Pero como éstos receptores no tienen una regulación negativa con la carga de colesterol, los macrófagos se llenan de grandes cantidades de lípidos y sintetizan proteínas de respuesta al estrés oxidativo (119, 120). Finalmente los macrófagos mueren y liberan enzimas proteolíticas y metales de transición que contribuyen al aumento de la lesión aterosclerótica.

De esta forma dentro de la teoría de la oxidación, la oxidación de las LDL, en el microambiente de la pared del vaso sanguíneo, contribuye significativamente al desarrollo de la aterosclerosis (57, 112b).

En 1997 Mietus-Snyder y cols. (78) al estudiar CML de aorta de conejo y de humano (células que normalmente no expresan este receptor), demostraron que el estrés oxidativo intracelular, provocado por ésteres de forbol y ROS, incrementó la actividad y la expresión del RS-AI. Este incremento correlacionó con la activación de factores de transcripción a través de la activación de la proteína cinasa C. Estos mismos autores también demostraron que la combinación del peróxido de hidrógeno (100 μM) y del vanadato (10 μM), adicionado a estas células, provocaba de igual forma un aumento en la expresión y en la actividad del RS-AI con la producción intracelular de ROS (78). Finalmente la presencia de Ox-LDL a los mismos cultivos, provocó un aumento en la actividad y en la expresión del RS-AI con un incremento del estrés oxidativo intracelular. Interesantemente la presencia de las Ac-LDL no tuvo ningún efecto parecido al de las Ox-LDL (78). Con fundamento en los trabajos de Mietus-Snyder et. al., en el presente trabajo estudiamos el efecto de las ROS producidas en forma extracelular sobre la función del receptor "scavenger" AI y BI. Se midió la internalización de las Ac-LDL en presencia de las ROS producidas exógenamente para conocer si podrían afectar directamente la actividad del receptor a diferencia de los tratamientos que provocan estrés oxidativo intracelular.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- El presente estudio está enfocado a dilucidar el efecto de las ROS producidas extracelularmente sobre la función y la expresión del receptor "scavenger"

OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseñar las condiciones de estrés oxidativo, por la adición del *ter*-butil hidroperóxido (TBH) en cultivos celulares que expresan los receptores "scavenger" AI y BI.
- Evaluar las ROS producidas por el TBH sobre la viabilidad celular.
- Evaluar la función de los receptores "scavenger" AI y BI a través de la unión y la internalización de las partículas LDL modificadas químicamente por acetilación en las líneas celulares: CHO (ovario de hámster chino), CHO-RSA (transfectadas con el gen del RS-AI), C6 (glioma de rata) y PC12 (feocromocitoma de rata).
- Evaluar la expresión del RS-AI y del RS-BI en condiciones de estrés oxidativo extracelular mediante la técnica de inmunotransferencia o "western blot".
- Evaluar la expresión del ARNm del RS-AI bajo condiciones de estrés oxidativo extracelular por reacción en cadena de la polimerasa o PCR.
- Caracterizar la presencia del RS-BI en células C6 y PC12 por ensayo de inmunotransferencia o "western blot".

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIALES GENERALES

La preparación de las soluciones utilizadas en esta tesis se mencionan en el apéndice. Los reactivos utilizados para cultivo celular fueron obtenidos de Gibco, Life Technologies (Gaithersburg, MD). El material de plástico utilizado para cultivo celular fue obtenido de Nalgen Nunc (Rochester, NY). Los reactivos utilizados para biología molecular fueron obtenidos de Perkin Elmer (Branchburg, New Jersey).

AISLAMIENTO DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL)

Los paquetes de plasma humano fueron donados por el Dr. Víctor Manuel Noffal del banco de sangre del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, SSA. Estos paquetes se obtuvieron de donadores sanos ayunados toda la noche y fueron tipificados previamente para VIH, VDRL, PRR, HB, Ags y HCV.

El aislamiento de las partículas de LDL humanas ($d = 1.019 - 1.063$ g/ml) se llevó a cabo por el método de ultracentrifugación secuencial (ver apéndices II y III) como a continuación se describe (Fig. 10). Cada paquete de plasma (250-300 ml) se mezcló lentamente con estreptomycin (0.1%), benzamidina (0.01%), inhibidor de tripsina (0.01%), DTNB (1.5 mM), PMSF (1 mM) y gentamicina (160 mg) a 4°C. Posteriormente se adicionó bromuro de potasio (KBr) para ajustar la densidad del plasma a 1.019 g/ml (121). Este ajuste se hizo considerando la densidad inicial del plasma como 1.0 g/ml, en donde:

gramos de KBr = volumen de plasma x un factor de conversión de densidad

gramos de KBr = volumen de plasma inicial x 0.01906

El plasma y el KBr se mezclaron suavemente con agitación constante durante 30-60 min a 4°C. Esta mezcla se adicionó a tubos "QuickSeal" (Beckman) de 39 ml y se sellaron con calor de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Se llevó a cabo la primera centrifugación a 4°C durante 18-20 h. Se usó un rotor 60 Ti con una velocidad de 49 K.

Al finalizar la centrifugación se observaron dos fracciones: la superior que correspondía a las IDL y VLDL y la inferior que contenía a las LDL y a las HDL. Los tubos se cortaron con un cortador de tubos (Beckman) para separar ambas fracciones. Se descartó la fracción superior y la fracción inferior se ajustó a una densidad de 1.05 g/ml con KBr, en donde:

$$\text{gramos de KBr} = \text{volumen de plasma de la fracción de } 1.019 \text{ g/ml} \times 0.0436$$

El plasma y el KBr se mezclaron lentamente bajo agitación constante durante 30-60 min a 4°C. Esta mezcla se adicionó a tubos "QuickSeal" como se mencionó anteriormente. La segunda centrifugación se llevó a cabo bajo las mismas condiciones durante 24 h. Después de este tiempo, se sacaron los tubos y se obtuvieron dos fracciones: la superior que correspondía a las LDL y la inferior a las HDL. Se descartó la fracción inferior como ya se describió y la fracción superior se ajustó a una densidad a 1.063 g/ml con KBr.

$$\text{gramos de KBr} = \text{volumen de plasma de la fracción de } 1.05 \text{ g/ml} \times 0.034$$

El plasma con el KBr se mezclaron con agitación lenta y constante durante 30 min a 4°C y se adicionó a los tubos "QuickSeal".

La tercera centrifugación se llevó a cabo bajo las mismas condiciones durante 18 h. Después de este tiempo se sacaron los tubos y se recuperó la fracción superior (color naranja) de 1.063 g/ml que contenía a las LDL. Esta fracción se dializó utilizando una membrana tubular de celulosa (Cellu•Sep) en un volumen total de 10-12 litros de amortiguador de diálisis (NaCl 150 mM/EDTA 0.24 mM) durante 48 h a 4°C. Se hizo un cambio del mismo amortiguador a las 24 h. Después de la diálisis, las LDL se centrifugaron a 10,000 rpm durante 30 min a 4°C utilizando un rotor Sorvall SS-34. El sobrenadante se filtró a través de un filtro estéril de 0.45 µm (Millipore). Se determinó la cantidad de proteína por el método del ácido bicinónico o BCA (Pierce). Las LDL se guardaron a 4°C antes de ser acetiladas.

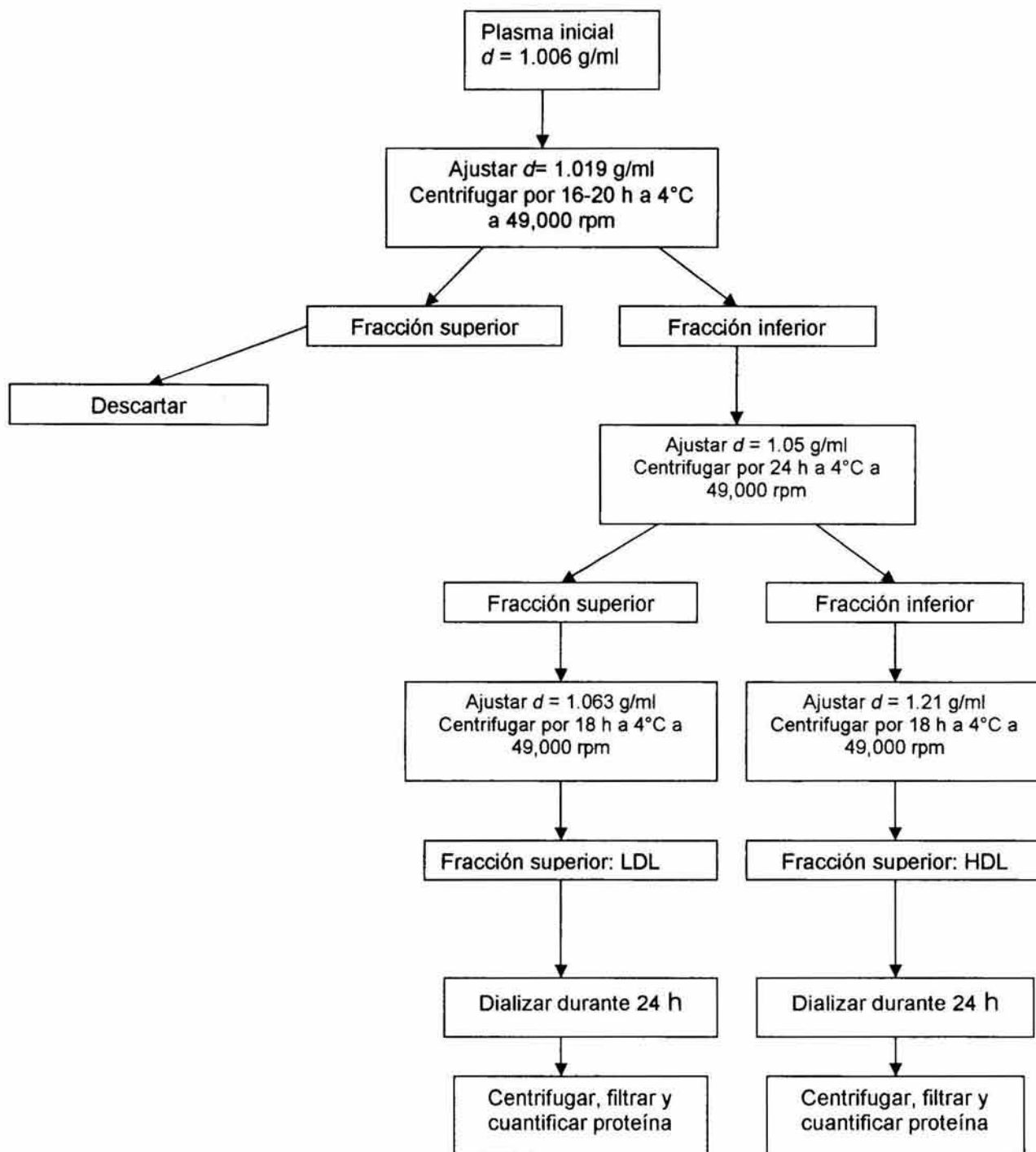


Figura 10. Diagrama de aislamiento de LDL y HDL por centrifugación diferencial.

ACETILACIÓN DE LDL

Las LDL se acetilaron con acetato de sodio y ácido acético anhídrido siguiendo el protocolo descrito en (122, 123). Se preparó un volumen igual al de las LDL obtenidas, de una solución de acetato de sodio saturado. Esta solución se adicionó poco a poco a las LDL en agitación lenta y continua a 4°C. Una vez mezcladas las LDL con el acetato de sodio saturado, se adicionó ácido acético anhidro en cantidades de 1.5-2 µl cada 15 min durante 1 h hasta que la masa total del anhídrido igualó 1.5 veces la masa de proteína de las LDL. Este procedimiento también se realizó en agitación lenta y constante a 4°C. Las Ac-LDL se dializaron en 6-8 litros de amortiguador de diálisis descrito anteriormente, durante 24 h a 4°C. Las Ac-LDL se centrifugaron a 10,000 rpm durante 30 min a 4°C usando un rotor Sorvall SS-34. El sobrenadante obtenido se filtró través de un filtro estéril de 0.45 µm (Millipore). Se determinó la concentración de proteína por el método del BCA.

MARCAJE RADIOACTIVO DE Ac-LDL Y LDL CON YODO-125

La yodinación o marcaje radiactivo de las Ac-DL y de las LDL se llevó a cabo por el método de Iodogen (Iodo-Gen, Pierce) (Fig. 10). Previamente, resina Sephadex G-25 grado superfino (Sigma Chemicals) se resuspendió en amortiguador PBS-BSA (2 mg/ml) toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se empacaron columnas con esta resina (usando jeringas de 1 ml) y se lavaron con PBS (5-6 ml por columna). La cantidad de columnas a preparar, se consideró tomando en cuenta la concentración de Ac-LDL o LDL en mg/ml a yodinar y que por cada columna se adicionan 0.2 ml de lipoproteínas. Por otro lado, se adicionó 1 mg de "Iodogen" y 0.4 ml de cloroformo a tubos de vidrio de 12-15 ml. Se tomó en cuenta que a cada tubo se le adiciona el mismo volumen de lipoproteínas a yodinar. El cloroformo se evaporó con nitrógeno gaseoso, hasta dejar un fondo blanco uniforme en cada tubo. Una vez evaporado el cloroformo se adicionaron 50 µCi de yodo-125 (¹²⁵I-"labeled sodium iodide") y 0.4 ml de las Ac-LDL o LDL a cada tubo de vidrio y se dejaron incubar de 8-10 min a temperatura ambiente. Durante este tiempo se centrifugaron las columnas durante ~10 seg a una velocidad de 500 rpm. A cada columna se le adicionaron 0.2 ml de las

lipoproteínas radiactivas y se volvieron a centrifugar bajo las mismas condiciones, las fracciones obtenidas se recuperaron en un solo tubo. Cada columna se lavó con 0.2 ml de amortiguador de diálisis (EDTA/NaCl) y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. También se recuperaron estas fracciones en otro tubo. Se determinó la concentración de proteína de ambas recuperaciones por el método del BCA.

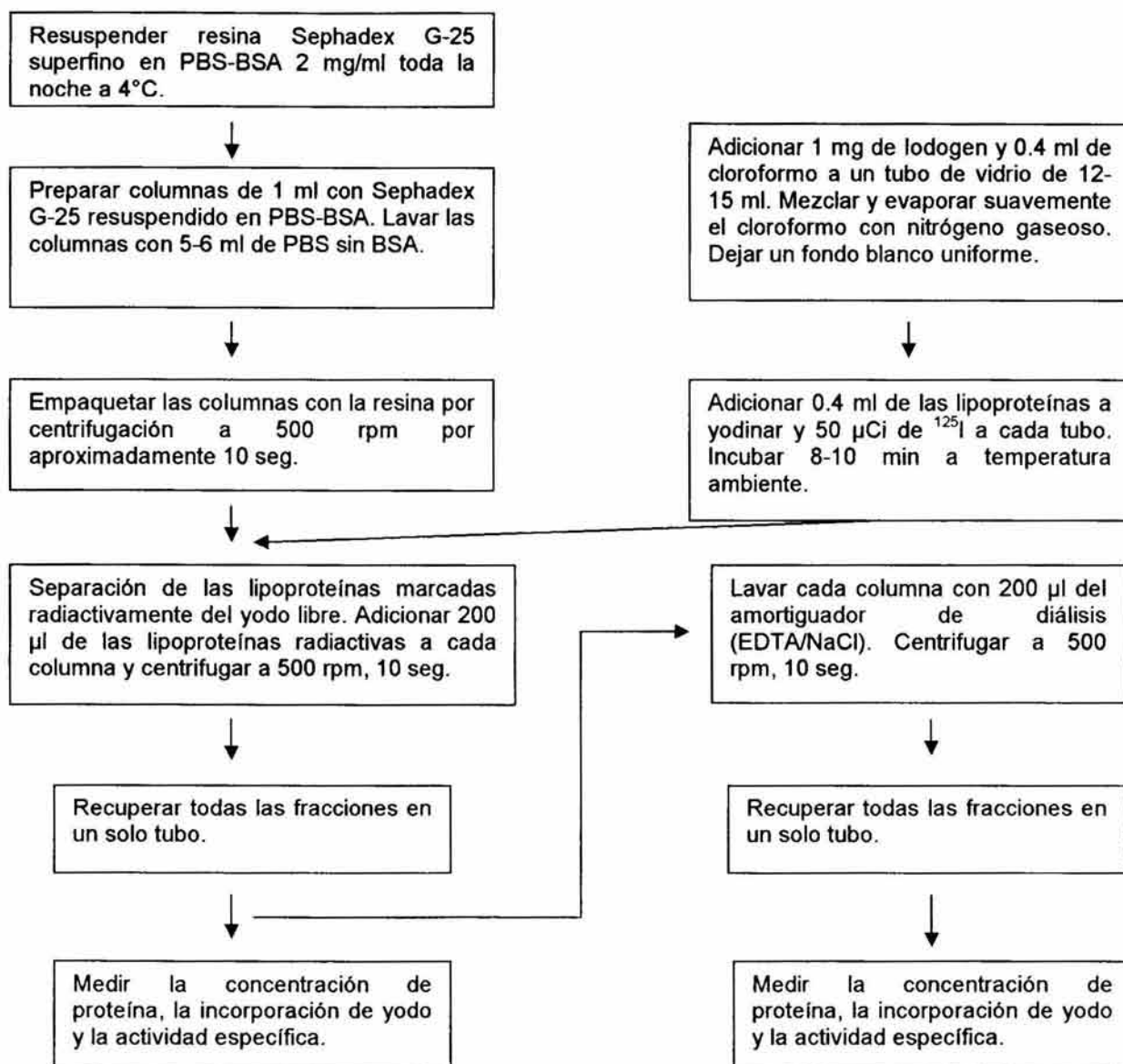


Figura 11. Diagrama de marcaje radiactivo de las LDL con yodo-125.

INCORPORACIÓN DE YODO-125

A dos tubos de vidrio (12-15 ml) se les adicionó 5 ml de PBS-BSA (2 mg/ml), 0.06 ml de desoxicolato de sodio al 1% y 0.005 ml de cada una de las dos fracciones recuperadas de la yodinación, respectivamente. Se dejaron incubar 10 min a temperatura ambiente. Se tomaron 0.5 ml de cada mezcla y se adicionó esta cantidad a cada dos tubos (Eppendorf) que contenían 0.5 ml de PBS y 0.5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 30% previamente. Se dejaron incubar 30 min a 4°C. Se centrifugaron a máxima velocidad durante 15 min a 4°C, se tomaron 0.3 ml del sobrenadante y se colocaron en tubos para contador de radiación gama (Packard). Ver figura 12.

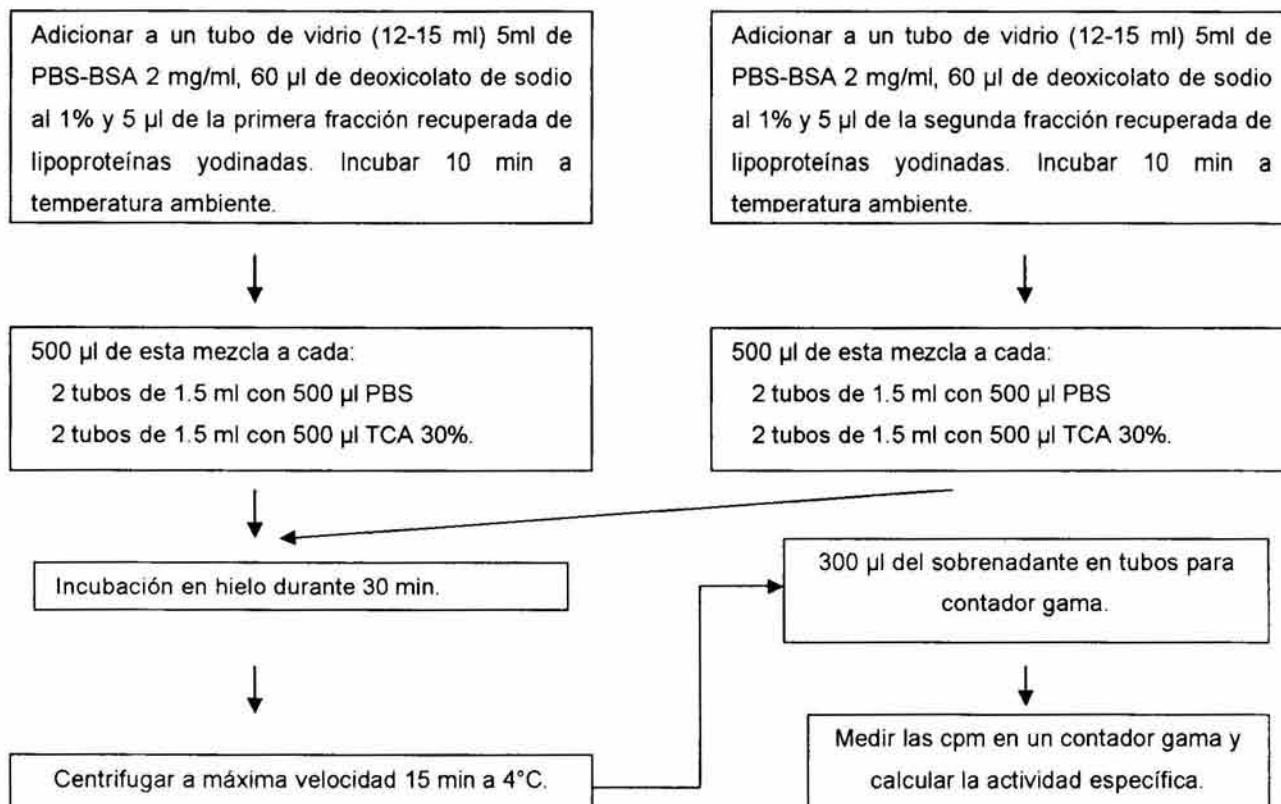


Figura 12. Diagrama de incorporación de yodo radiactivo a la fracción de LDL.

MEDICIÓN DE LA INCORPORACIÓN DE YODO Y DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA

Una vez obtenidas las cuentas por minuto (cpm) se calculó el porcentaje de radiactividad incorporada a las lipoproteínas y la actividad específica.

cpm (TCA) = cuentas por minuto obtenidas de medir la radiactividad incorporada en las lipoproteínas después de precipitar con TCA al 30%.

cpm (PBS) = cuentas por minuto obtenidas de medir la radiactividad incorporada en las lipoproteínas después de precipitar con PBS.

Cuentas específicas = cpm (PBS) - cpm (TCA)

Porcentaje de incorporación de $^{125}\text{Yodo}$ = $[\text{cpm (PBS)} - \text{cpm (TCA)}] / \text{cpm (PBS)} \times 100$

Este porcentaje fue mayor al 70% para poder utilizar las lipoproteínas radiactivas en forma onfiabile.

Actividad específica

Si en 5 ml de PBS-BSA ----- habían 5 μl de $^{125}\text{I-Ac-LDL}$

Si se tomaron 0.5 ml ----- entonces habían $x = 0.5 \mu\text{l}$ de $^{125}\text{I-Ac-LDL}$

Estos 0.5 μl de $^{125}\text{I-Ac-LDL}$ ----- se llevaron a 1 ml con PBS o TCA 30%.

entonces se tenían $x = 0.15 \mu\text{l}$ de $^{125}\text{I-Ac-LDL}$ ----- si se tomaron 0.3 ml para medir en el contador gama.

Por lo tanto, si solo 0.15 μl de $^{125}\text{I-lipoproteínas}$ se determinaron en el contador gama, entonces las cpm que hay en un volumen de: 0.15 μl = **cpm específicas**

Tomando en cuenta que la concentración de proteína obtenida de la fracción que contiene a las ^{125}I -lipoproteínas se expresa en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ entonces, si se considera lo siguiente:

Si 1 μl ----- contienen 1 μg (varía de preparación a preparación)

entonces 0.15 μl ----- contienen $x = 0.15 \mu\text{g} = 150 \text{ ng}$

= Si 150 ng ----- tienen x *cpm específicas* determinadas previamente

= entonces 1 ng de ^{125}I -Ac-LDL ----- tienen x *cpm específicas*

Por lo tanto:

La actividad específica es igual a las *cpm específicas* por nanogramo de ^{125}I -lipoproteínas. El valor de actividad específica varía de acuerdo a la concentración de lipoproteínas utilizadas en cada iodación.

Los datos de actividad específica se usaron para calcular la internalización de lipoproteínas marcadas radiactivamente en cada ensayo.

LÍNEAS CELULARES

Cultivo de células de ovario de hámster chino (CHO)

La línea celular CHO fue donada por el Dr. Robert Pitas del Instituto Gladstone de Enfermedades Cardiovasculares en San Francisco, California, USA. Esta línea celular se usó como un control negativo, dado que no expresan el gen del RS-AI. Las células se crecieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y medio "Nutrient Mixture F-12" (F12) (50/50, v/v), se suplementó con suero fetal bovino (SFB) al 10%, usando como antibióticos la penicilina (50 U/ml) y la estreptomycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 . Esta línea celular se creció 24 hr antes de ser cultivada a una densidad de 10,000 células/ cm^2 en pozos de 9.6 cm^2 . El cultivo se dejó crecer de 24 a 48 h hasta alcanzar una confluencia de 85-90%, antes de llevar a cabo los ensayos de internalización.

Cultivo de células de ovario de hámster chino transfectadas con el gen del RS-AI bovino (CHO-RSA)

La línea celular CHO-RSA fue donada por el Dr. Robert Pitas del Instituto Gladstone de Enfermedades Cardiovasculares en San Francisco, California, USA. Esta línea celular fue transfectada en forma estable con el gen del RS-AI bovino por lo que sobreexpresa el receptor "scavenger" tipo AI. Se cultivó de igual forma que las células CHO control.

Cultivo de células de glioma de rata (C6)

La línea celular C6 proveniente de un tumor de glia de rata fue adquirida de la "American Type Culture Collection" (ATCC, USA). Esta línea celular se creció en medio DMEM suplementado con SFB al 10% y usando como antibióticos la penicilina (50 U/ml) y la estreptomycinina (50 µg/ml) a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Esta línea celular se creció 24 h antes de ser cultivada a una densidad de 15,000 células/cm² en pozos de 9.6 cm². El cultivo se dejó crecer de 24 a 48 h hasta alcanzar una confluencia de 85-90%, antes de llevar a cabo los ensayos de internalización.

Cultivo de células de feocromocitoma de rata (PC12)

La línea celular PC12 proveniente de un feocromocitoma de la glándula suprarrenal de rata fue adquirida de ATCC. Esta línea se cultivó de forma similar a la línea celular C6 durante 24 a 48 h hasta alcanzar una confluencia de 85-90% antes de llevar a cabo los ensayos de internalización.

Cultivo de células de macrófagos de ratón (RAW)

La línea celular RAW 264.7 proveniente de monocitos-macrófagos de ratón fue adquirida de ATCC. Esta línea celular se creció en medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 10% y usando como antibióticos la penicilina (50 U/ml) y la estreptomycinina (50 µg/ml), a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Esta línea celular se cultivó varios días antes de ser estimulada con Ac-LDL, para observar la expresión del ARN mensajero (ARNm) del RS-AI como previamente se describió en (124).

Cultivo primario de macrófagos peritoneales de ratón

Los macrófagos peritoneales se obtuvieron de ratones Swiss-Webster mediante lavado peritoneal. Brevemente, cada ratón de aproximadamente 6 semanas de edad fue estimulado intraperitonealmente con 1 ml de aceite mineral ligero estéril (Sigma Chemicals) 5 a 7 días antes del sacrificio. Los animales fueron sacrificados con cloroformo y sangrados por punción cardiaca. Los ratones fueron fijados con alfileres en una charola con parafina y se les quitó la piel del abdomen. Se inyectaron 5 ml de solución de Alsever (ver apéndice I) en el peritoneo cuidando de no dañar ningún órgano. Se hizo una pequeña incisión y se recogió el exudado en un tubo cónico de 15 ml estéril. Se lavó la cavidad peritoneal de 3 a 4 veces con solución de Alsever y se recuperó el exudado en el mismo tubo. Se centrifugó a 1300 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. El aceite del sobrenadante se retiró con una pipeta estéril y se resuspendió el botón celular. Se adicionó 1 ml de NaCl al 0.2%, se agitó suavemente y se adicionó NaCl al 1.6%, se volvió a agitar suavemente y se llevó a 15 ml con solución de Alsever. Se centrifugó bajo las mismas condiciones, se retiró el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 1 ml de medio DMEM suplementado con 10% de SFB. Se contó el número de células en una cámara de Neubauer y los macrófagos fueron cultivados en medio DMEM durante 24 h antes de aislar el ARN total.

PRODUCCIÓN Y MEDICIÓN DE ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVAS (ROS)

La producción de especies reactivas en forma extracelular, se llevó a cabo por la adición de *ter*-butil hidroperóxido o TBH (Sigma Chemicals) directamente a los medios de cultivo. La detección de la producción de ROS se midió por la conversión de "2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate" (DCFH₂.DA) no fluorescente (Molecular Probes) a un compuesto fluorescente "2',7'-dichlorofluorescein diacetato" (DCF) por citometría de flujo (125, 126) usando el programa "CELL QUEST" en un equipo FacsCalibur (Becton Dickinson).

ENSAYO DE CITOMETRÍA DE FLUJO

La detección fluorométrica de las ROS producidas por la adición de TBH se llevó a cabo después de cultivar a las células durante 5 h en ausencia de SFB. Pasado este tiempo se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron con verseno (Gibco, Life Technologies) y se resuspendieron en 1 ml de PBS en tubos para citómetro (FALCON). El DCFH₂.DA se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma Chemicals) a una concentración final de 400 μ M y almacenado a -20°C. Las células en suspensión se incubaron con 4 μ M de DCFH₂.DA (concentración final) durante 15 min, en presencia o ausencia de distintas concentraciones de TBH. La distribución de la fluorescencia emitida por la adición de TBH en cada línea celular estudiada, se muestra como un histograma.

MEDICIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

La determinación de la viabilidad celular se llevó a cabo mediante la técnica de exclusión usando el colorante azul tripán (Sigma Chemicals). A 20 μ l de células resuspendidas en PBS se les adicionó un volumen igual de la solución de azul tripán al 0.4%. Las células viables fueron contadas usando una cámara de Neubauer al microscopio óptico. Se obtuvo el promedio de 5 mediciones independientes por cada alícuota de células.

ENSAYOS DE INTERNALIZACIÓN DE LAS ¹²⁵I-LIPOPOTEÍNAS

Cada una de las líneas celulares a estudiar se crecieron en placas de cultivo de 6 pozos (9.6 cm²) como se describió previamente. Antes de realizar los ensayos, las células se incubaron a 37°C durante 1h en medio sin SFB. Después de este tiempo, se cambió el medio sin SFB y se adicionó la cantidad de lipoproteínas radiactivas respectivamente. Cada punto de la curva se realizó por triplicado y se incluyeron 5, 10, 20 y 40 μ g/ml de ¹²⁵I-Ac-LDL o ¹²⁵I-LDL. Otro triplicado se corrió al mismo tiempo, al cual se le adicionó el competidor respectivo (fucoidina, Ac-LDL o LDL) en un exceso molar, de acuerdo a cada una de las concentraciones mencionadas. Los ensayos

control de internalización (sin TBH) y los de estrés oxidativo (en presencia de TBH) se realizaron al mismo tiempo, bajo las mismas condiciones en cada una de las líneas celulares. El ambiente oxidativo se creó por la adición de 30 μ M de TBH, aproximadamente cada hora, a cada cultivo celular. Las células fueron monitoreadas al microscopio constantemente para observar su integridad. Las células con los ligandos respectivos se dejaron interaccionar durante 4 h más a 37°C, bajo una atmósfera de 5% de CO₂. Después de este tiempo se retiró el medio radiactivo y las células se lavaron 5 veces, dos veces con 2 ml de PBS-MCF/BSA 2 mg/ml por cada pozo y un tercer lavado con 10 min de incubación. Los dos últimos lavados se hicieron con PBS-MCF sin BSA. Posteriormente, las células se solubilizaron con 1 ml de NaOH 0.1N y se colocaron en tubos para contador gama. Se midió la concentración de proteína de cada tubo por el método del BCA. La internalización específica se calculó como la diferencia entre la internalización total y la internalización obtenida con el competidor. Cada punto representa el promedio de cada triplicado con una desviación menor al 10%. Los resultados se expresaron como ng de ¹²⁵I-Ac-LDL internalizada por mg de proteína (127).

ENSAYOS DE UNIÓN DE LIPOPROTEÍNAS MARCADAS RADIATIVAMENTE.

Estos ensayos se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones y procedimientos descritos para los ensayos de internalización, excepto que se realizaron a una temperatura de 4°C (127).

LISADOS CELULARES Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

La obtención de proteínas por lisis celular de los cultivos correspondientes, se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Meytus-Snyder et al., (128). Se llevaron a cabo ensayos de internalización de lipoproteínas sin marcaje radiactivo durante 5 h a 37°C, bajo condiciones control y condiciones de estrés oxidativo. Al final de este tiempo se lavaron las células con verseno y se resuspendieron en un amortiguador de extracción (ver apéndice I). La lisis celular se llevó cabo con un homogenizador Dounce. Los homogenizados fueron fraccionados por centrifugación a 100,000 x g por 30 min a 4°C y se recuperaron los sobrenadantes.

El botón se resuspendió en el mismo amortiguador de extracción con 0.5% de tritón y se volvió a homogenizar y centrifugar de igual forma. Se cuantificó la cantidad de proteína por el método del BCA y las proteínas se guardaron a -20°C. Ambas fracciones se usaron para llevar a cabo los ensayos de "western blot".

ENSAYOS DE INMUNOTRANSFERENCIA TIPO "WESTERN BLOT"

Las proteínas obtenidas después de la lisis celular (30 µg) fueron fraccionadas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS (dodecil sulfato de sodio) al 10%. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en una cámara húmeda (BioRad) aplicando una corriente de 80 mA a 4°C toda la noche, usando como acarreador la solución de transferencia (ver apéndice I). La transferencia de las proteínas se verificó por la tinción de las membranas con rojo de Ponceau (Sigma Chemicals). Las membranas se enjuagaron con la solución amortiguadora TTBS para quitar el colorante y se dejaron incubando 2 h a 37°C en la solución de bloqueo (ver apéndice I). Después de este tiempo, las membranas se lavaron cuatro veces con TTBS. Se hicieron dos lavados de 10 min y dos lavados de 5 min e inmediatamente se incubaron con el primer anticuerpo. Se uso un anti-RS-AI (Serotec) en una dilución 1:500 para membranas con lisados de células CHO y CHO-RSA. Este anticuerpo se diluyó en TTBS con leche al 1% y las membranas se dejaron incubando 1 h a 37°C. Después de este tiempo, las membranas se lavaron de acuerdo a las condiciones arriba mencionadas. Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-rata unido a peroxidasa (Serotec) en una dilución 1:5,000 en TTBS con leche al 1%. Los lavados finales fueron dos de 10 min en TTBS con leche al 5%, dos lavados de 10 y 5 min en TTBS solo. Los ensayos de "western blot" usando el anticuerpo anti-colágena (CHEMICON International) se llevaron a cabo bajo condiciones similares. El anticuerpo primario se usó en una dilución 1:2,500. Como anticuerpo secundario se usó un anti-conejo (Gibco, Life Technologies) en una dilución 1:5,000. El revelado se realizó por quimioluminiscencia usando el kit ECL "Western blotting detection system plus" (Amersham, Pharmacy) por la reacción de peroxidasa, siguiendo las ins-

trucciones del proveedor. La exposición de la quimioluminiscencia en las membranas se hizo en placas "Biomax Light-1" (Eastman Kodak).

Las proteínas obtenidas después de la lisis celular para las líneas C6 y PC12 (30 µg) se fraccionaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS al 6%. La transferencia de las proteínas a las membranas de nitrocelulosa se realizó en condiciones similares a lo descrito previamente para los lisados de células CHO y CHO-RSA. El ensayo de "western blot" se llevó a cabo bloqueando las membranas toda la noche a 4°C en agitación lenta, usando una solución de TTBS con leche al 5% y "Tween" al 1%. Al día siguiente se incubaron las membranas durante 3 h a 37°C con un anticuerpo anti RS-BI (Calbiochem) en una dilución 1:3,000. Después de este tiempo, se lavaron las membranas con la misma solución. Se hicieron 2 lavados de 15 min y dos de 10 min. Como anticuerpo secundario se usó un anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1:6,000 durante 1 h a 37°C en la misma solución. Los lavados finales fueron cuatro de 15 min cada uno en TTBS sin leche. El revelado y la exposición se llevaron a cabo en las condiciones anteriormente descritas.

EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

Todo el material y reactivos utilizados para trabajar con ARN fueron tratados como se indica en Sambrook y Maniatis para la inhibición de ARNsas (128a). La obtención del ARN total se llevó a cabo por el método de Trizol (Gibco, Life, Technologies) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Se llevaron a cabo ensayos de internalización de Ac-LDL o LDL durante 5 h en condiciones control y condiciones de estrés oxidativo de acuerdo a lo descrito previamente. Después de este tiempo se lavaron las células con 2 ml de versene y se les adicionó 1 ml de Trizol por cada caja de 56.7 cm² mezclado suavemente y pasando esta mezcla varias veces con una pipeta. Las células disueltas en el Trizol se transfirieron a tubos de 1.5 ml estériles y se dejaron incubar de 3 a 5 min a temperatura ambiente. A cada tubo se le adicionó 0.2 ml de cloroformo por cada 1 ml de Trizol usado inicialmente, se mezclaron suavemente y se volvieron a incubar bajo iguales condiciones. Se centrifugaron a 12,000 x g por 15 min a 4°C. La fase superior acuosa se

transfirió a otro tubo y el ARN se precipitó con 0.5 ml de alcohol isopropílico dejando incubar por 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12,000 x g por 10 min a 4°C. La pastilla de ARN se lavó con 1 ml de etanol al 75%, se mezcló en vórtex y se centrifugó a 7,500 x g durante 5 min a 4°C. El botón obtenido se dejó secar un poco y se resuspendió en 30-50 µl de agua DEPC. El ARN fue cuantificado midiendo su absorbancia a 260 nm y 280 nm, en donde 1 D.O a 260 nm equivale a 40 ng ARN/µl. Para observar la integridad del ARN obtenido, se corrió un gel de agarosa al 1%. Los geles de agarosa para ARN se prepararon como a continuación se describe: se pesaron 0.56 g de agarosa y se mezclaron con 56 ml de agua DEPC, esta mezcla se disolvió en el horno de microondas hasta quedar un volumen de 35 ml. Se dejó enfriar un poco, se adicionaron 10 ml de formaldehído y 11 ml de buffer 5X de corrida para ARN (ver apéndice I). Esta mezcla se vació a una cámara de electroforesis horizontal lavada previamente con peróxido de hidrógeno al 3% en agua DEPC por 15 min. La muestra de ARN se preparó en un volumen final de 20 µl que contenía 3.5 µl de formaldehído, 10 µl de formamida al 10%, 2 µl de buffer 5X de corrida para ARN y 4.5 µl de muestra de ARN. Esta mezcla se calentó a 65°C durante 15 min y se dejó enfriar en hielo. Pasado este tiempo se adicionaron 1-3 µl de bromuro de etidio concentrado y preparado en agua DEPC, se mezcló y se cargó en el gel. La corrida se llevó a cabo a 100 volts durante aproximadamente 1 h.

TRANSCRIPCIÓN REVERSA

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se llevó a cabo por la transcripción reversa (RT) de 3 µg de ARN total usando el kit "GeneAmp RNA" (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se incubaron previamente 3 µg de ARN, 2.5 µM de oligo (dT) y 2.5 µM de hexámeros a 65°C por 10 min e inmediatamente se transfirieron a hielo. Enseguida se adicionó una mezcla que contenía MgCl₂ (5 mM), amortiguador 10X (final1X), cada uno de los dNTPs (1 mM), el inhibidor de ARNasas (1 U/µM) y 2.5 U/µl de la enzima MuLV ("murine leukemia virus") transcriptasa reversa hasta completar un volumen final de 25 µl. La reacción se incubó 45 min a 42°C e inmediatamente a hielo. El ADNc se mantuvo a -20°C.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Los ADNc fueron amplificados por PCR usando pares de oligonucleótidos específicos y siguiendo las instrucciones del proveedor (Perkin Elmer). Previo a la reacción de PCR, el ADNc fue desnaturado incubándolo a 99°C por 5 min y finalmente a hielo. Por cada reacción de 100 µL de reacción, las concentraciones finales de cada uno de los reactivos utilizados fueron las siguientes:

- 1 µl de ADNc
- 1.25 µl de Buffer 10X (concentración final 1X)
- 1.5 mM de MgCl₂
- 10 mM de dNTPs
- 0.2 µM de cada un de los oligonucleótidos
- 2.5 U de "AmpliTaq" ADN polimerasa.

Las amplificaciones se llevaron a cabo usando un termociclador 9600 de Perkin Elmer (New, Jersey, USA). Las condiciones utilizadas para la amplificación del gen del RS-AI de bovino transfectado en células CHO-RSA fueron las siguientes:

95°C	5 min	}	30 ciclos
95°C	15 seg		
56°C	30 seg		
72°C	30 seg		
72°C	10 min		
4°C	∞		

Las condiciones utilizadas para la amplificación del gen de β-actina fueron las siguientes:

95°C	5 min	}	25 ciclos
95°C	30 seg		
55°C	30 seg		
72°C	30 seg		
72°C	10 min		
4°C	∞		

Todas las amplificaciones fueron observadas por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% preparados para correr muestras de ADN, usando como amortiguador TAE 1X (ver apéndice I).

DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA EL GEN DEL RS-AI BOVINO.

El diseño de los oligonucleótidos para la amplificación del gen del RS-AI bovino en células CHO-RSA se realizó con base en la secuencia descrita para la especie *Bos taurus* de la región amino terminal de 50 aminoácidos (150 nucleótidos). Número de acceso X51689 (67). Las secuencias de los oligonucleótidos fueron las siguientes (Figuras 13 y 14):

Oligo sentido: 5'- ATG GCA CAG TGG GAT GAC TTT - 3'

Oligo antisentido 5'- TTT ATA AGA CTT CAT CCT CTC 3'

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen de la β -actina fueron los siguientes:

Oligo sentido 5'- GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG - 3'

Oligo antisentido 5'- GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG - 3'

RS-AI Tipo I de Bovino

MAQWDDF	PDQQEDTDSCTESVKFDARSVTALLPPHPKNGPTLQ	ERMKSYKTALITLYLIVFVVLVPIIGIVAA
Sentido		Antisentido
QLLKWETKNCTVGSVNADISPSPEGKNGSEDEMRFREAVMERMSNMESRIQYLSDNEANLLDAKNFQNF SIT		
TDQRFNDVLFQLNSLLSSIQEHENIIGDISKSLVGLNNTTVLDLQFSIETLN GRVQENAFKQQEEMRKLEERIY		
NASAEIKSLDEKQVYLEQEIKGEMKLLNNTNDLRLKDWEHSQTLKNI TLLQGPPGPPGKEKGRGPPGQNGIP		
GFPGLIGTPGLKGRGISGLPGVRGFPGPMGKTGKPLNGQKQKGEKGSMSQRQSNTVRLVGGSGPHEGRV		
EIFHEGQWGTVCDDRWE LRGLLVVCRSLGYKGVQSVHKRAYFGKGTGPIWLNEVFCFGKESSIEECRIRQWGV		
RACSHDEDAGVTCTT		

Figura 13. Oligonucleótidos para amplificación del gen del RS-AI de bovino. Se muestra la posición de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la región citoplásmica de 50 aminoácidos (150 nucleótidos) en la secuencia aminoacídica descrita para el RS-AI de bovino, número de acceso en Pubmed (51689).

RSA Tipo I de Bovino

5' GTCTTTAGGACATATGAAGTATGGCACAGTGGGATGACTTTCCTGATCAGCAAGAGGACACTGACAGCTGTACAGAGTC

Sentido

TGTGAAGTTCGATGCTCGCTCAGTGACAGCTTTCCTCCCATCCTAAAAATGGCCCAACTCTTCAAGAGAGGATGAA

Antisentido

GTCTTATAAACTGCACTGATCACCCCTTATCTCATTGTGTTTGTAGTTCTCGTGCCCATCATTGGCATAGTGGCAGCTCA

GCTCCTGAAATGGGAAACGAAGAATTGCACGGTTGGCTCAGTTAATGCAGATATATCTCCAAGTCCGGAAGGCAAAGGAAA

TGGCAGTGAAGATGAAATGAGATTTCGAGAAGCTGTGATGGAACGCATGAGCAACATGGAAAGCAGAATCCAGTATCTTTC

AGATAATGAAGCCAATCTCCTAGATGCTAAGAATTTCCAAAATTTTCAGCATAACAACATGATCAAAGATTTAATGATGTTCT

TTTCAGCTAAATTCCTTACTTTCCTCCATCCAGGAACATGAGAATATCATAGGGGATATCTCCAAGTCATTAGTAGGTCT

GAACACCACAGTACTTGATTTGCAGTTCAGTATTGAAACACTGAATGGCAGAGTCCAAGAGAATGCATTTAAACAACAAGA

GGAGATGCGTAAATTAGAGGAGCGTATATAACAATGCATCAGCAGAAATTAAGTCTCTAGATGAAAAACAAGTATATTTGGA

ACAGGAAATAAAAGGGGAAATGAACTGTTGAATAATATCACTAATGATCTGAGGCTGAAGGATTGGGAACATCTCAGAC

ATTGAAAAATATCACTTTACTCCAAGGTCTCTGGACCTCCAGGTGAAAAAGGAGATAGAGGCCCTCTGGACAAAATGG

TATACCAGGCTTTCCAGGTCTAATAGGTACTCCAGGTCTTAAAGGTGATCGGGGGATCTCTGGTTTACCTGGAGTTCGAGG

ATTTCCAGGACCAATGGGGAAGACCGGGAAGCCAGGACTTAATGGACAAAAAGGCCAGAAGGGAGAAAAAGGGAGTGGAAAG

CATGCAAAGACAATCTAATACAGTCCGACTGGTGGGTGGCAGCGGCCCTCACGAAGGCAGAGTGGAGATTTTTCACGAAGG

CCAGTGGGGTACGGTGTGTGACGACCGCTGGGAACTGCGTGGAGGACTGGTCGTCGCAGGAGCTTGGGATACAAAGGTGT

TCAAAGTGTGCATAAGCGAGCTTATTTTGGAAAAGGTACGGGTCCAATATGGCTGAATGAAGTATTTTGTTCGGGAAAGA

GTCATCCATTGAAGAGTGCAGAATTAGACAGTGGGGTGTGAGAGCCTGTTCGCACGACGAAGATGCTGGGGTCACTTGCAC

TACATAATGCATCATATTTTTCATTACATTTTTTAAACTGTTATAAAGTGATTTTTTTCCTTTGCTTCACTAAAATCAGCT

TAATTAATATTTAAGAACTAAGAATTTTATCCACAGAAAAGGAATATTTAAAAATCACTGGATAAACAGTCAAAGAAAA

TATTTATCAATCATTAATAAGCATATTTAACACCTTCATACTTACTGTATAAAATAGCTTCATATTTGATTCAAATACCA

GAACCATTTCAACTTCTCTAGGTTTTTAAGTGG- 3'

Figura 14. Oligonucleótidos para amplificación del gen del RS-AI de bovino. Se muestra la posición de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la región citoplásmica de 150 pb (50 aminoácidos) del gen del RS-AI de bovino. Número de acceso en Pubmed (51689).

LIGACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO EN UN VECTOR Y TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

La ligación del producto amplificado por PCR se llevó a cabo utilizando el kit "Zero Blunt TOPO PCR cloning" de Invitrogen (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del proveedor (ver apéndice IV):

Cantidad	Reactivo
0.5 – 4 μ l	de producto de PCR
1 μ l	de solución salina
1 μ l	del vector "pCR 4Blunt-TOPO"
la necesaria hasta completar 6 μ l finales	agua estéril

Esta reacción se mezcló suavemente y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 min, después de este tiempo la reacción se colocó en hielo. Se tomaron 2 μ l de esta reacción, se adicionaron a células competentes DH5 α (TOP) y se dejaron incubar por 30 min en hielo. Al final de este tiempo se dio un choque térmico durante 45 seg a 42°C e inmediatamente se paso a hielo. Se adicionaron 250 μ l de medio SOC y las bacterias se dejaron crecer a 37°C, durante 1 h en agitación (200 rpm). Las células transformadas con el ADN ligado se esparcieron en cajas petri precalentadas a 37°C que contenían medio LB selectivo con ampicilina (100 mg/ml) y se dejaron creciendo a 37°C toda la noche.

IDENTIFICACIÓN DE LAS COLONIAS BACTERIANAS CON LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

Grupos de 5 colonias bacterianas se resuspendieron en 30 μ l de agua estéril. Las bacterias se lisaron por ebullición durante 15 min y se centrifugaron a máxima velocidad por 15 min. Se recuperó el sobrenadante y se tomaron de 1 a 5 μ l para llevar a cabo una reacción de PCR, utilizando los oligonucleótidos universales T7 y T3 del plásmido "pCR 4Blunt-TOPO". Las amplificaciones se observaron en geles de agarosa al 1%.

Las colonias candidatas en las que se observó el producto amplificado, se analizaron individualmente por la extracción de los plásmidos por medio del método de lisis alcalina.

OBTENCIÓN DEL ADN PLASMÍDICO POR EL MÉTODO DE LISIS ALCALINA

La purificación de los plásmidos se realizó de acuerdo con las instrucciones del proveedor usando el kit "QIAGEN" (QIAGEN Plasmid Mini Handbook). Se inoculó una colonia bacteriana transformada con el plásmido de interés en 50 ml de medio LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina. Se dejó crecer en agitación constante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se centrifugó este cultivo y la pastilla bacteriana se lavó con 1 ml de la solución STE centrifugando a máxima velocidad por 15 min. La pastilla obtenida se resuspendió en 300 µl de la solución P1 y se añadieron 300 µl de la solución de lisis P2 mezclando cinco veces suavemente por inversión. La mezcla se dejó incubar en hielo por 5 min. Para neutralizar, se añadió la solución P3, se mezcló suavemente y se dejó incubar en hielo 5 min más. Posteriormente se centrifugó a máxima velocidad por 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se pasó a través de una columna "QIAGEN-tip 20" previamente equilibrada con 1 ml de amortiguador QBT. La columna se lavó 4 veces con 1 ml de amortiguador QC. El ADN se eluyó de la columna con 800 µl de amortiguador QF y se precipitó con 0.7 volúmenes de isopropanol. La mezcla se centrifugó a 10,000 rpm por 30 min a 4°C y la pastilla se limpió con 1 ml de etanol al 70% para remover trazas de sales. Se volvió a centrifugar y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente para resuspenderse en 30 µl de agua estéril. El ADN plasmídico se cuantificó y se almacenó a -20°C.

ANÁLISIS DE LOS PLÁSMIDOS

Para conocer la presencia de los insertos clonados después de la lisis alcalina de las bacterias, se llevó a cabo la digestión de 0.5-1 µg de plásmido con 0.5-1 U de la enzima de restricción Eco RI (Gibco, Life Technologies) en un volumen final de 30 µl en presencia de la solución amortiguadora respectiva. La digestión del plásmido se realizó a 37°C toda la noche.

SECUENCIACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO

La secuenciación del ADN se llevó a cabo por secuenciación automática en un equipo "ABI PRISM TM DNA Sequencing" (Perkin Elmer) en la unidad de Biología Molecular del IFC de la UNAM. Se utilizaron los oligonucleótidos universales T7 y T3 para el plásmido "pCR 4Blunt-TOPO", que flanquean el sitio de policonación. Para cada reacción se utilizaron 500 ng de plásmido y 5 pM de cada par de oligonucleótidos.

RESULTADOS

LIGANDOS ESPECÍFICOS PARA CADA RECEPTOR "SCAVENGER"

Los receptores "scavenger" AI y BI han alcanzado gran importancia en la literatura científica, principalmente por su participación en la eliminación y la acumulación del colesterol en el proceso aterosclerótico. La caracterización de estos receptores, así como los distintos elementos dentro de la familia de los receptores "scavenger", se llevó a cabo por sus propiedades de unión de ligandos, específicamente de LDL modificadas químicamente (61, 81, 86, 129-132). Los ligandos que diferencian a ambos receptores se encuentran en la tabla I. Se ha reportado que el RS-BI no une ligandos como la fucoídina y el ácido poliinosítico, los cuales son ligandos específicos para el RS-AI (82, 86, 130, 132).

En este trabajo, los ensayos realizados para la caracterización del RS-AI se llevaron a cabo compitiendo las ^{125}I -Ac-LDL con fucoídina por la unión al receptor. Los experimentos realizados para la caracterización del RS-BI, se hicieron compitiendo a las Ac-LDL marcadas radiactivamente con las mismas Ac-LDL frías (sin marcaje radiactivo). En un inicio, para dilucidar si podía estar presente el RS-AI en las líneas C6 y PC12, se hicieron ensayos de competencia con fucoídina, pero no se tuvo éxito. De esta forma, se decidió usar las mismas Ac-LDL frías como competidoras y definir la presencia del RS-BI en células C6 y PC12 por el ensayo de "westernblot".

Tabla I. Diferentes tipos de ligandos para el RS-AI y el RS-BI

Grupo	RS-AI	RS-BI
Lipoproteínas modificadas y proteínas modificadas	Ac-LDL, Ox-LDL, Ma-LDL, Ma-albúmina	LDL, HDL, VLDL, Ac-LDL, Ox-LDL, Ox-HDL, Ma-BSA, AGE-BSA.
Fosfolípidos	Fosfatidil serina	Liposomas aniónicos de fosfatidil serina y fosfatidil inositol
Polianiones	Polinosina y poliguanosina	No une
Polisacáridos	Fucoidina, Dextrán	No une
Productos bacterianos	LPS y LTA	Ácido lipoteicoico
Lípidos	NO	Colesterol libre y esterificado, triacilgliceroles y fosfolípidos.
Proteínas	Péptido β A	Péptido β A.
Misceláneo	Asbestos	No une

Ligandos que se unen preferentemente a cada receptor. Una característica común entre los ligandos es que son moléculas polianiónicas, aunque no todas las moléculas polianiónicas son ligandos para estos receptores. β A, beta amiloide; LDL, lipoproteínas de baja densidad; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad; HDL, lipoproteínas de alta densidad; BSA, albúmina sérica bovina; LPS, lipopolisacáridos; LTA, ácido lipoteicoico; AGE ("advanced glycation end-products"), proteínas glicosiladas; Ac-, moléculas acetiladas; Ox-, moléculas oxidadas y Ma-, moléculas maleiladas.

DETECCIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVAS EN CADA LÍNEA CELULAR

Se estudió la respuesta oxidativa de cada una de las líneas celulares, por la adición directa de diferentes concentraciones de TBH a los medios de cultivo. En la Figura 15 se muestra cada uno de los histogramas obtenidos en células CHO y CHO-RSA y en la figura 16 se muestra cada uno de los histogramas obtenidos en células C6 y PC12. La fluorescencia emitida por cada una de las líneas celulares se desplazó hacia la derecha, es decir, a valores relativos de intensidad de fluorescencia mayores conforme se incrementó la concentración de 30 a 50, 100 y 500 μM de TBH. Las células que generaron mayor cantidad de radicales libres fueron las células CHO-RSA con valores relativos de intensidad de fluorescencia que variaron desde 512 con 30 μM de TBH (basal) hasta valores de 8720 con 500 μM de TBH, es decir, incrementos de fluorescencia de ~480, 1262, 1373 y 1703 % con respecto a la basal. Mientras que las células que generaron menos cantidad de radicales libres fueron las PC12 con valores de fluorescencia relativos que variaron desde 138 hasta 1274, es decir, incrementos de fluorescencia de ~231, 366, 470 y 923 % con respecto a su basal (ver tabla 2). Estos valores fueron obtenidos como el valor mas alto en cada pico de fluorescencia. Aún, cuando todas las líneas celulares respondieron al estímulo oxidativo conforme se incrementaba la concentración del TBH, estos resultados muestran que cada línea celular tienen características propias que hacen que esta respuesta (producción de radicales libres) sea diferente con respecto a las demas. Por lo tanto, la producción de radicales libres de los cultivos celulares estudiados, por la adición de TBH, fue un método adecuado para mantener a las células en un ambiente oxidativo.

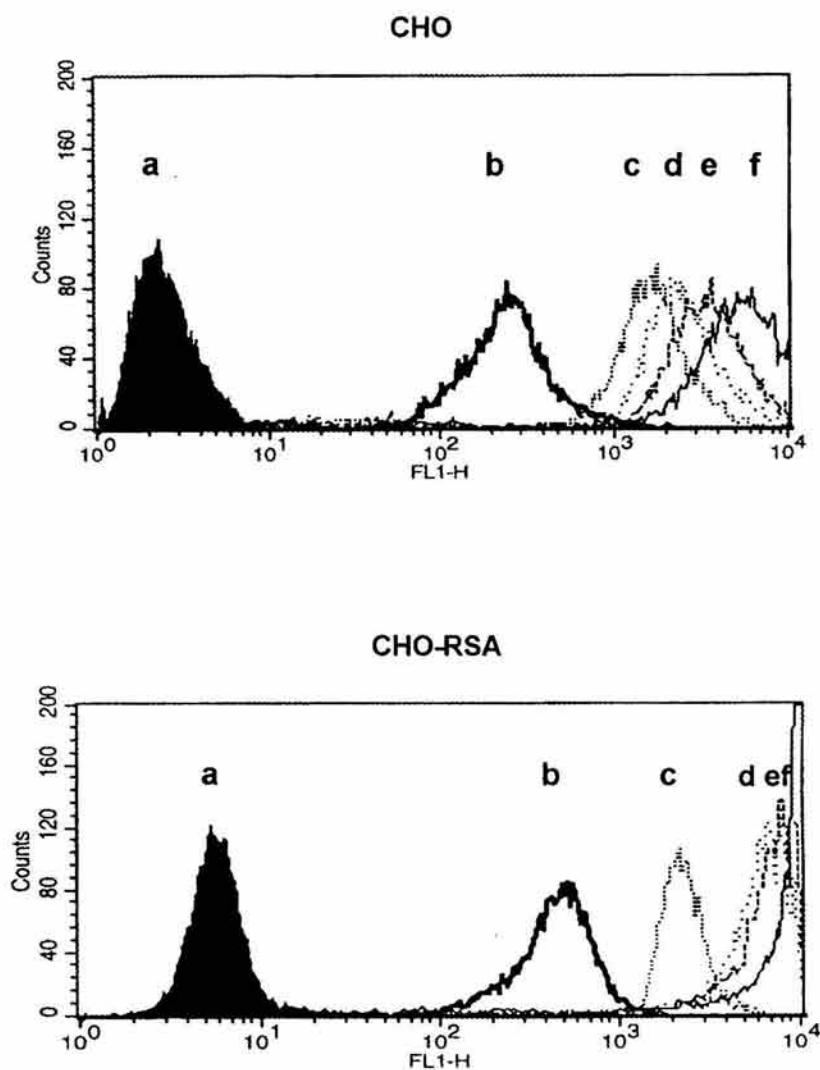


Figura 15. Análisis por citometría de flujo de la fluorescencia emitida por células CHO y CHO-RSA estimuladas con TBH. Células CHO y CHO-RSA en cultivo fueron lavadas, recuperadas y resuspendidas en amortiguador de fosfatos PBS (pH 7.4). La suspensión se dividió en alícuotas para determinar las condiciones oxidativas. Cada histograma muestra: (a) fluorescencia intrínseca de cada línea celular en ausencia de TBH y DCFH-DA. (b) fluorescencia basal de células por la adición de $4 \mu\text{M}$ de DCFH-DA por 15 minutos. (c) Fluorescencia emitida por células CHO y CHO-RSA después de estimularse con (c) 30, (d) 50, (e) 100 y (f) $500 \mu\text{M}$ de TBH y $4 \mu\text{M}$ de DCFH-DA por 15 minutos.

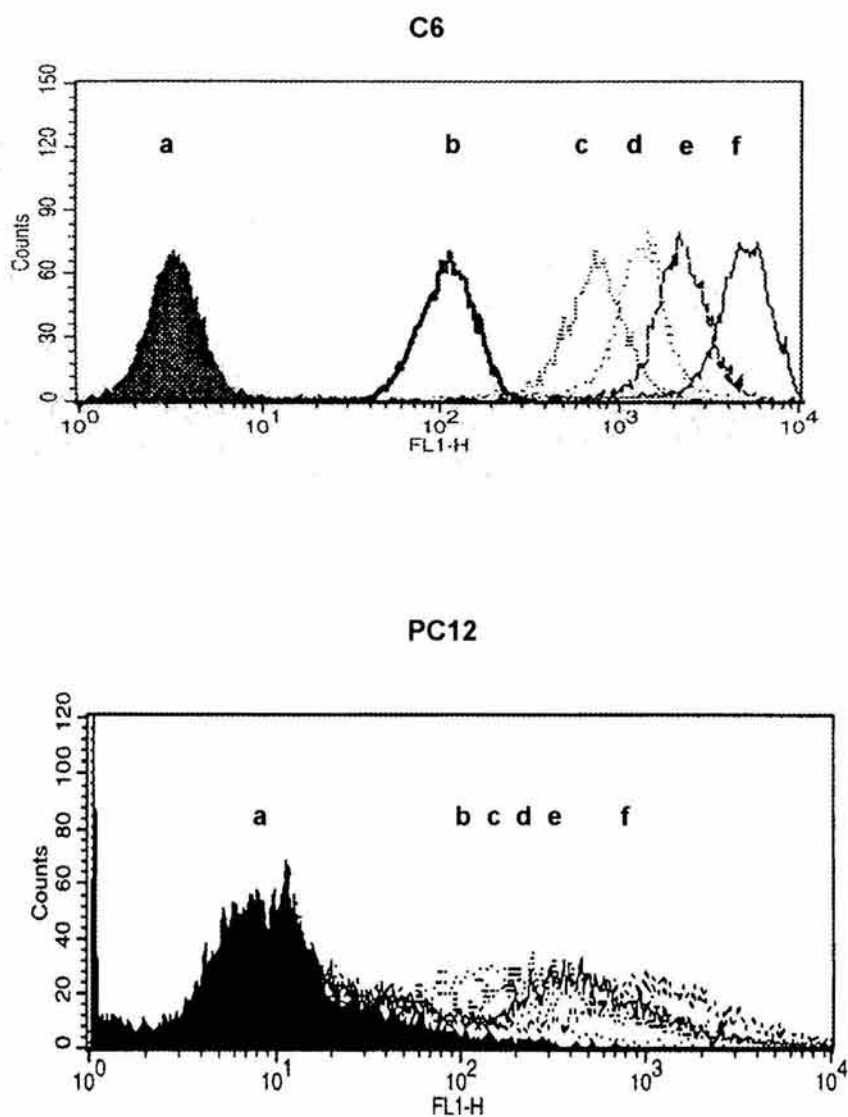


Figura 16. Análisis por citometría de flujo de la fluorescencia emitida por células C6 y PC12 estimuladas con TBH. Células C6 y PC12 en cultivo fueron lavadas, recuperadas y resuspendidas en amortiguador de fosfatos PBS (pH 7.4). La suspensión se dividió en alícuotas para determinar las condiciones oxidativas. Cada histograma muestra: (a) fluorescencia intrínseca de cada línea celular en ausencia de TBH y DCFH-DA. (b) fluorescencia basal de las células por la adición de 4 μM de DCFH-DA por 15 minutos. (c) Fluorescencia emitida por células C6 y PC12 después de estimularse con (c) 30, (d) 50, (e) 100 y (f) 500 μM de TBH y 4 μM de DCFH-DA por 15 minutos.

Tabla II
Valores de intensidad de fluorescencia relativos después de la adición de TBH en cada línea celular.

	Líneas celulares			
	CHO	CHO-RSA	C6	PC12
Sin estimular	3	6	4	7
DCFH-DA (basal)	268	512	122	138
DCFH-DA + 30 μ M TBH	1716	2458	843	319
DCFH-DA + 50 μ M TBH	2738	6464	1458	506
DCFH-DA + 100 μ M TBH	3868	7033	2482	649
DCFH-DA + 500 μ M TBH	5601	872	5376	1274

Valores de intensidad de fluorescencia relativos obtenidos de cada pico de fluorescencia emitido por la por la conversión del DCFH (no fluorescente) al DCF (fluorescente) por la adición de 30, 50, 100 y 500 μ M de TBH en células CHO, CHO-RSA, C6 y PC12. Sin estimular es la fluorescencia natural de las células en ausencia de DCFH y TBH. La basal es la fluorescencia emitida por las células en presencia de 4 μ M de DCFH solamente.

CURSO TEMPORAL DE LA VIABILIDAD CELULAR

Una vez establecida la respuesta oxidativa de cada línea celular, se examinó la viabilidad celular a diferentes concentraciones de TBH. La viabilidad se midió por el método de exclusión con azul tripán. Inicialmente se adicionó el TBH a las células a tiempo cero y se dejó interaccionar por 5 h. Bajo estas condiciones se observó, en los primeros minutos del ensayo, que las células se recuperaban del daño inicial causado por este hidropéroxido, es decir, regresaban a su forma y a su tamaño normal. Por esta razón se decidió adicionar el TBH a las células en cultivo aproximadamente cada hora durante el tiempo empleado en un ensayo de internalización. Se examinaron diferentes concentraciones que variaron desde 30 μM , 50 μM y 100 μM de TBH. En la figura 17 se muestran las viabilidades de cada una de las líneas celulares estudiadas expresadas como el porcentaje de células viables a partir de tiempo cero. Como se puede observar la concentración de 100 μM fue la más letal. Las células CHO-RSA y las C6 mostraron una mayor resistencia al efecto oxidante del TBH. Mientras que las células CHO y PC12 mostraron mayor sensibilidad a partir de 50 μM de TBH. En general, la adición de 30 μM de TBH a cada hora tuvo efectos menos letales en cada una de las líneas celulares estudiadas, manteniéndose una viabilidad por arriba del 50%. Aunque las células no se observaron completamente normales al microscopio, la concentración de 30 μM de TBH permitió mantener una mejor condición de ambiente oxidativo para llevar a cabo los ensayos de internalización.

INTERNALIZACIÓN DE Ac-LDL A TRAVÉS DEL RS-AI Y DEL RS-BI.

Los ensayos de internalización de ^{125}I -Ac-LDL se hicieron bajo condiciones control (en ausencia de TBH) y bajo condiciones de estrés oxidativo (en presencia de TBH) como se indicó anteriormente. Se muestran las internalizaciones de 5, 10, 20 y 40 μg de ^{125}I -Ac-LDL después de 5 h de ensayo. En células CHO y CHO-RSA, cada punto se compitió con un exceso molar de fucoidina, ligando específico para el receptor RS-AI. en células C6 y PC12 cada punto se compitió con Ac-LDL frías para el receptor RS-BI. En cada gráfica se muestran los resultados de la diferencia de la internalización total menos la internalización en presencia del competidor. Como se

puede observar en la figura 18, el estrés oxidativo producido de forma extracelular, disminuyó de forma importante la internalización de las ^{125}I -Ac-LDL a través de cada uno de los receptores "scavenger". Este efecto fue similar en todas las líneas celulares estudiadas. Las células CHO que no tienen el gen del RS-AI no muestran ninguna internalización.

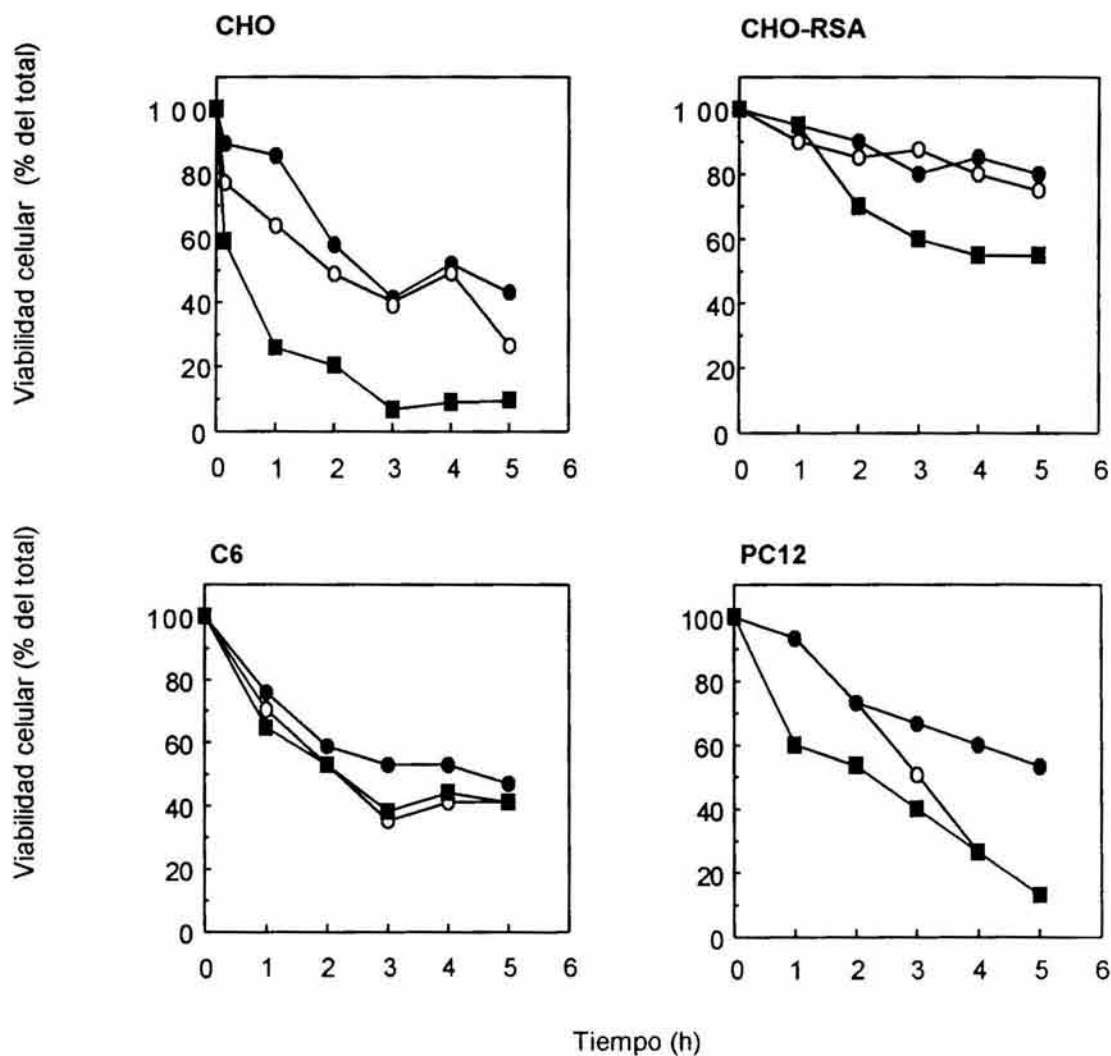


Figura 17. Curso temporal de la viabilidad celular. Las monocapas de cada una de las líneas celulares se incubaron con 30 μM (●), 50 μM (○) y 100 μM (■) de TBH, adicionado cada hora durante 5 h. Después de este tiempo, las células se recuperaron y se resuspendieron en PBS. La viabilidad se midió por el método de exclusión con azul tripán. La viabilidad celular se expresa como el porcentaje de células viables, con respecto al total contado a tiempo cero. Cada punto representa el promedio ± desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. La desviación estándar está contenida en cada

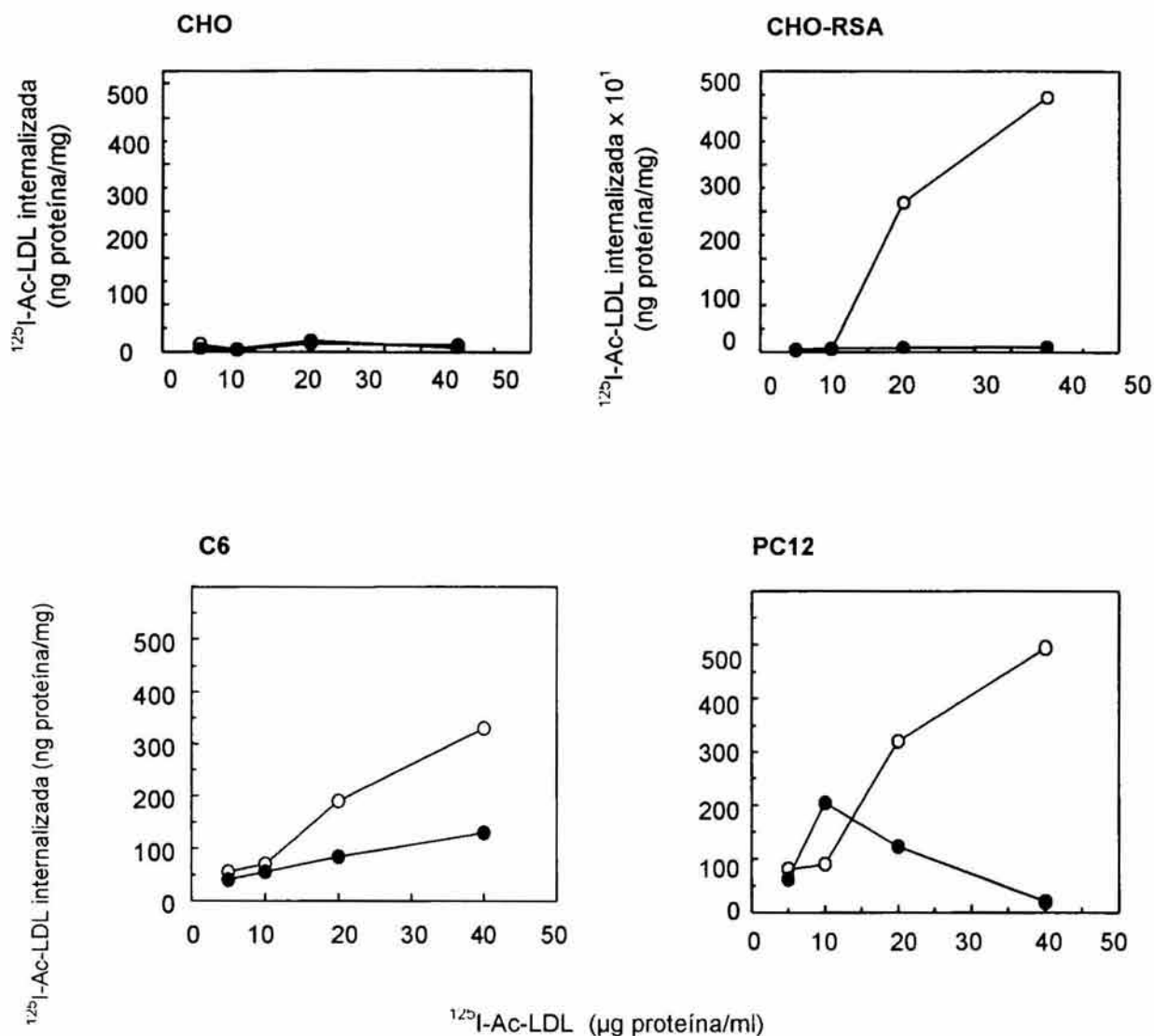


Figura 18. Internalización de ^{125}I -Ac-LDL a través del receptor "scavenger" AI. Cada línea celular se incubó a 37°C con distintas concentraciones de ^{125}I -Ac-LDL en condiciones control (○) y condiciones de estrés oxidativo (●) adicionando $30\ \mu\text{M}$ de TBH cada hora. La internalización específica se midió como la diferencia entre la internalización total y la internalización en presencia de un exceso molar del competidor no marcado radiactivamente (fucoidina para el RS-AI y Ac-LDL para el RS-BI). Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. La desviación estándar está contenida en cada punto.

INTERNALIZACIÓN DE LDL A TRAVÉS DEL RECEPTOR DE LDL

Se llevó a cabo la internalización de LDL en condiciones control y en condiciones de estrés oxidativo. Esto se hizo con el objeto de descartar que la disminución de la internalización de las Ac-LDL, en condiciones de estrés oxidativo, no fuera un daño general producido por la presencia del hidroperóxido en los cultivos celulares. Como se muestra en la figura 19, el estrés oxidativo producido por el TBH no alteró la internalización de las ^{125}I -LDL a través del R-LDL, al compararse con el control. El efecto fue similar en las cuatro líneas celulares estudiadas. Estos resultados indican que los radicales libres producidos de forma exógena por el TBH afectan particularmente las funciones de internalización del RS-AI así como también al RS-BI.

EFFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO DIRECTAMENTE SOBRE LAS ^{125}I -Ac-LDL Y SU INTERNALIZACIÓN A TRAVÉS DEL RECEPTOR "SCAVENGER".

Se realizaron ensayos de internalización con ^{125}I -Ac-LDL expuestas previamente al TBH. Esto se hizo con el objeto de conocer si el estrés oxidativo producido por el TBH pudiera estar dañando directamente a las lipoproteínas y alterando su reconocimiento por el receptor para ser internalizadas. Las ^{125}I -Ac-LDL (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) se dejaron incubar a 37°C durante 5 h adicionando 30 μM de TBH cada hora (condición oxidativa) y en condición control (sin TBH). Después de este tiempo, estas lipoproteínas se adicionaron a células en cultivo en medio sin SFB y se dejaron incubando 5 h mas en ausencia de TBH. En la figura 21 se muestran los resultados obtenidos, los cuales no muestran cambios significativos entre ambas condiciones analizadas, en todas las líneas celulares estudiadas. Estos resultados indican que la exposición directa de las partículas lipoprotéicas a los radicales libres producidos por el TBH, no les causa ningún daño porque son reconocidas e internalizadas por los receptores "scavenger".

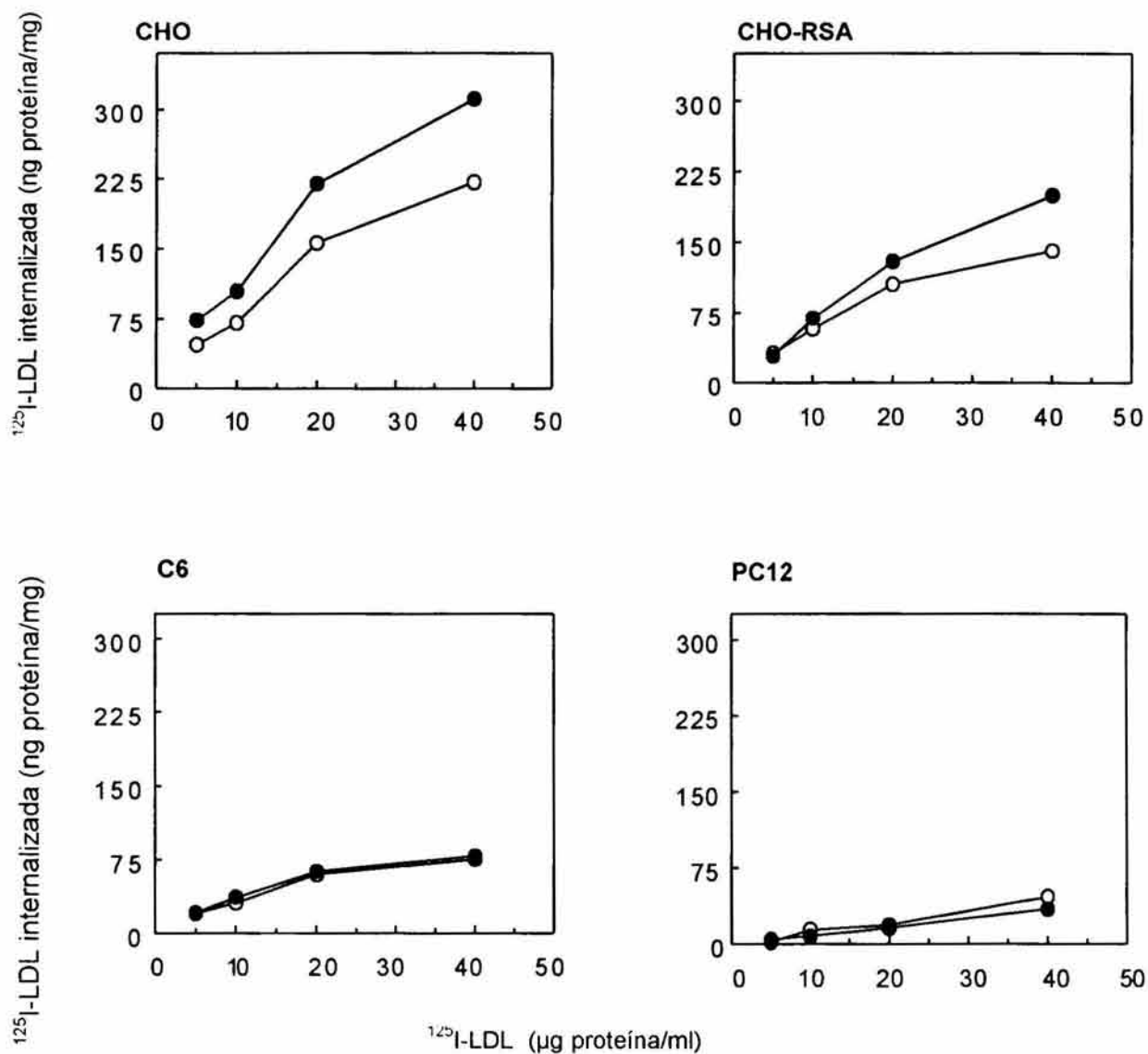


Figura 19. Internalización de ^{125}I -LDL a través del receptor de LDL. Cada línea celular se incubó a 37°C con distintas concentraciones de ^{125}I -LDL en condiciones control (o) y condiciones de estrés oxidativo (•) adicionando $30 \mu\text{M}$ de TBH cada hora. La internalización específica se midió como la diferencia entre la internalización total y la internalización en presencia de un exceso molar del competidor no marcado radiactivamente (LDL). Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. La desviación estándar está contenida en cada punto.

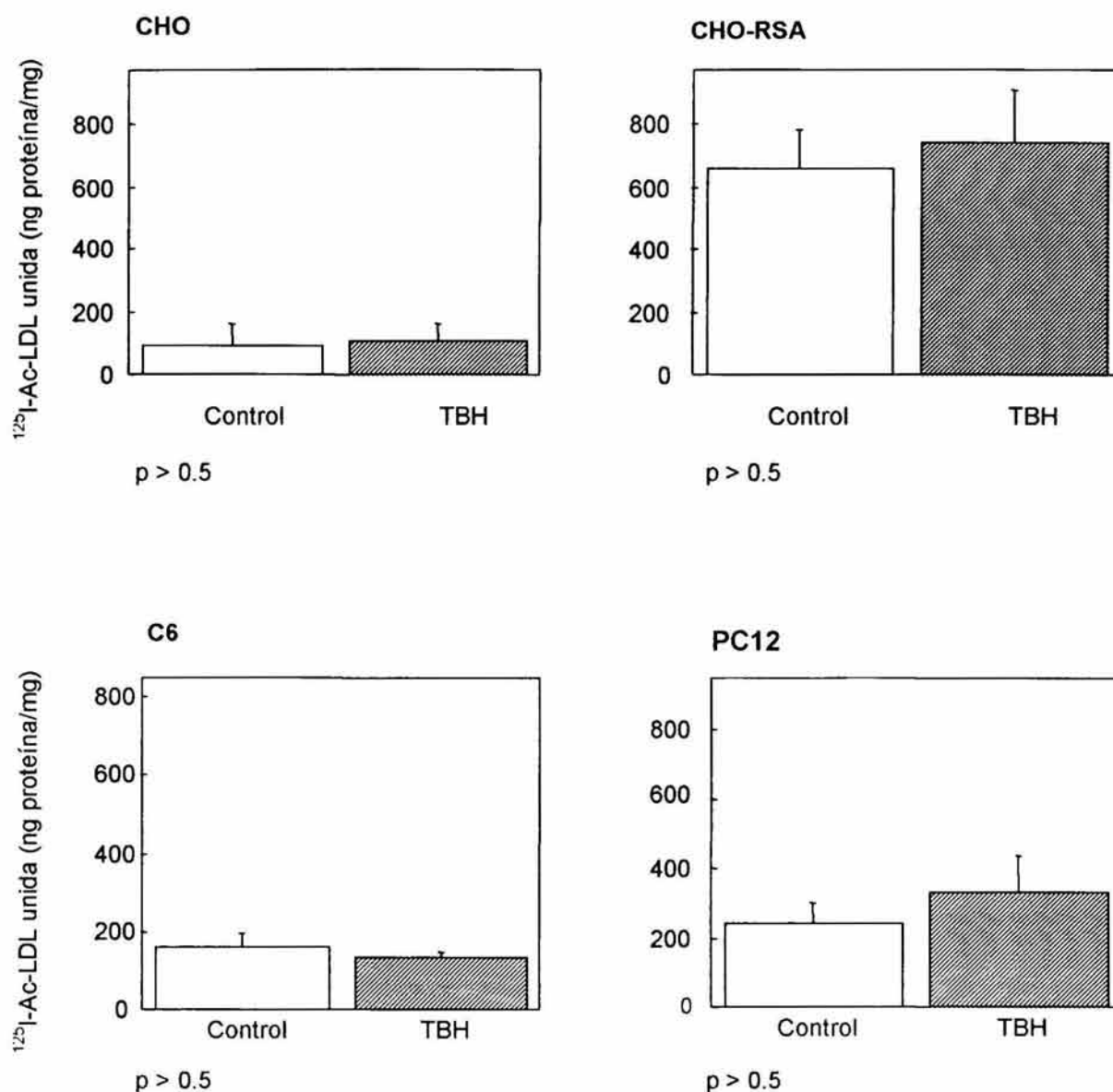


Figura 21. Efecto del estrés oxidativo directamente sobre las Ac-LDL. Se incubaron 40 μg de ^{125}I -Ac-LDL en ausencia (barras blancas) o presencia de 30 μM de TBH (barras diagonales) a 37°C durante 5 h. Posterior a este tiempo se recuperaron las Ac-LDL y se adicionaron a células en cultivo durante 5 h en condiciones normales para medir la internalización de estas partículas como se describe en la sección de Material y métodos. Se analizaron la condición control y la condición oxidativa de cada línea celular por el método de ANOVA usando el programa "Stat View" para determinar diferencias significativas entre ambas condiciones.

EFFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE LA UNIÓN DE LAS 125 I-Ac-LDL AL RECEPTOR "SCAVENGER".

Se llevaron a cabo los ensayos de unión de las 125 I-Ac-LDL a cada receptor "scavenger", en las cuatro líneas celulares. Esto se hizo con el objeto de descartar que la disminución en la internalización observada en células sometidas a condiciones de estrés oxidativo, se debiera a que los receptores no estuvieran uniendo las lipoproteínas acetiladas. Se evaluó ésta unión a distintas concentraciones de 125 I-Ac-LDL a ambos receptores "scavenger", en condiciones control y condiciones de estrés oxidativo por la adición de 30 μ M de TBH. Como se puede observar en la figura 20, el estrés producido por la presencia del TBH no alteró el reconocimiento y la unión del ligando por cada uno de los receptores "scavenger", al compararse con sus respectivos controles.

EFFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR "SCAVENGER".

Se llevaron a cabo ensayos de "western blot" para conocer si los radicales libres producidos por el TBH estuvieran disminuyendo la expresión de los receptores "scavenger" y por lo tanto la internalización de las Ac-LDL. Se tomó en cuenta que el TBH es un agente lipofílico que también puede producir radicales libres. Se obtuvieron lisados celulares después de llevar a cabo un ensayo de internalización de Ac-LDL en condiciones de estrés oxidativo y en condiciones control. Como se muestra en la figura 22, los niveles de proteína detectados usando un anticuerpo anti-RS-AI en células CHO-RSA, no muestran diferencias en la expresión proteica al compararse ambas condiciones. Para corroborar estos resultados, se llevó a cabo otro ensayo de "western blot" usando un anticuerpo anti-colágena con la finalidad de detectar la región parecida a la colágena que forma parte del sitio de unión al ligando en el RS-AI. De igual forma no se observaron cambios en la expresión de éste receptor. En el ensayo llevado a cabo en lisados de células CHO no se observa señal debido a que estas células carecen del receptor RS-AI. La figura 23 muestra los resultados de "western blot" obtenidos para las células C6 y PC12 usando el anticuerpo anti-RS-BI,

en donde tampoco se observan diferencias en la expresión de éste receptor al comparar ambas condiciones en cada línea celular. También se llevó a cabo el ensayo de "western blot" en células RAW de macrófagos, que expresan el RS-BI. Este ensayo se usó como control de la expresión del RS-BI en células C6 y PC12 (Fig. 23).

EFFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE LOS NIVELES DE ARN DEL RS-AI

Para conocer si el estrés oxidativo producido por el TBH, hubiera afectado la expresión del gen del RS-AI, se analizaron los niveles del ARNm. Se aisló el ARN total de cultivos de células CHO y CHO-RSA después de la internalización de Ac-LDL en condiciones control y de estrés oxidativo. Se llevó a cabo una transcripción reversa y a continuación se amplificó el gen del RS-AI, a partir de ADNc, por la técnica de PCR utilizando los oligonucleótidos específicos para el RS-AI de bovino. Como control de la amplificación se usó el gen de la β -actina utilizando el mismo ADNc. Los resultados obtenidos en células CHO-RSA se muestran en la figura 24. Se observa que la expresión del gen del RS-AI se mantiene sin cambios al compararse la expresión en condiciones normales y condiciones de estrés oxidativo. Estos resultados indican que las condiciones utilizadas en nuestro estudio para generar radicales libres de forma exógena no cambian la expresión del RS-AI a nivel de ARNm.

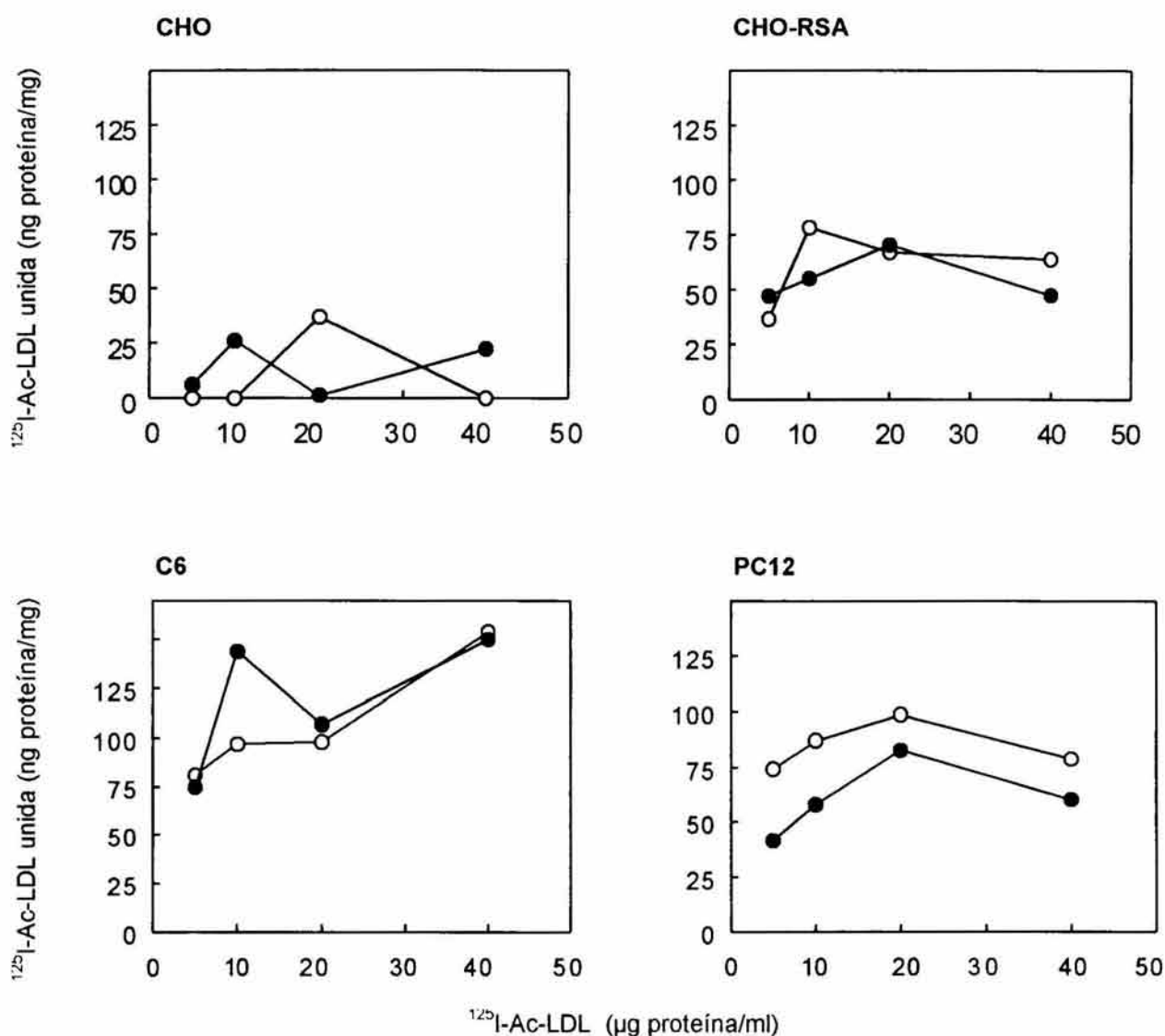


Figura 20. Unión de ^{125}I -Ac-LDL a través del receptor "scavenger" A-I. Cada la línea celular se incubó a 4°C con distintas concentraciones de Ac-LDL marcadas radiactivamente bajo en condiciones control (○) y condiciones de estrés oxidativo (●) adicionando $30 \mu\text{M}$ de TBH cada hora. La unión específica se midió como la diferencia entre la unión total y la unión en presencia de un exceso molar del competidor no marcado radiactivamente (fucoidina para el RS-AI y Ac-LDL para el RS-BI). Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos realizados en triplicado. La desviación estándar está contenida en cada punto.

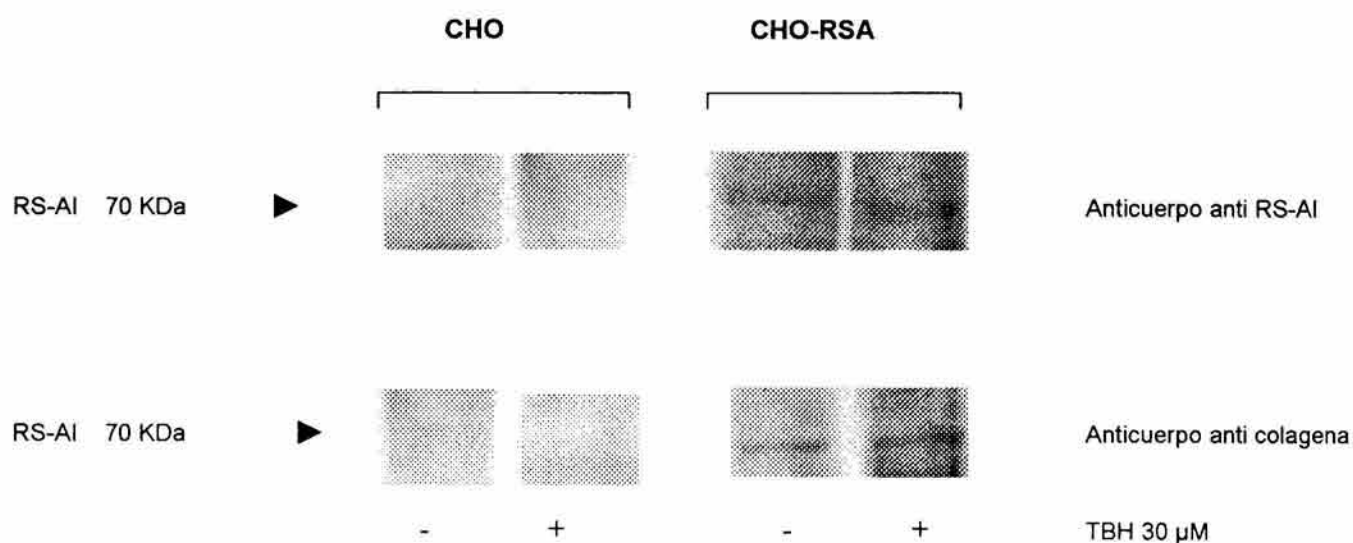


Figura 22. Efecto del estrés oxidativo sobre la expresión de RS-AI. Cada línea celular se incubó con 40 μg de Ac-LDL en ausencia (-) o presencia (+) de 30 μM de TBH adicionado cada hora durante un tiempo de 5 h. Los lisados celulares se fraccionaron de acuerdo a Mietus-Snyder et al. (128). Las proteínas se aislaron y se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en una cámara húmeda toda la noche. El panel superior muestra la señal detectada con el anticuerpo anti-RS-AI y el panel inferior muestra la señal obtenida con el anticuerpo anti-colágena usado como control, que reconoce a la región parecida a la colágena dentro del RS-AI.

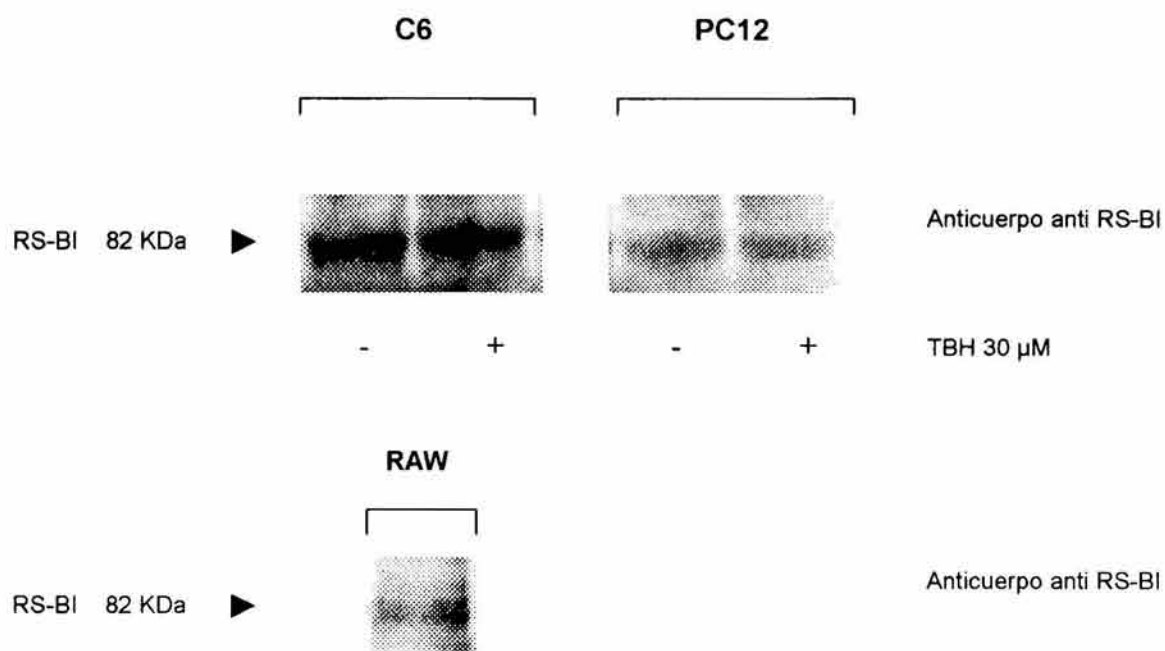


Figura 23. Efecto del estrés oxidativo sobre la expresión de RS-BI. Cada línea celular se incubó con 40 μg de Ac-LDL en ausencia (-) o presencia (+) de 30 μM de TBH adicionado cada hora durante un tiempo de 5 h. Los lisados celulares se fraccionaron de acuerdo a Mietus-Snyder et al. (128). Las proteínas se aislaron y se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 6% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en una cámara húmeda toda la noche. El panel superior muestra la señal detectada usando el anticuerpo anti-RS-BI en células C6 y PC12. El panel inferior muestra la señal obtenida usando el anticuerpo anti RS-BI en células RAW control.

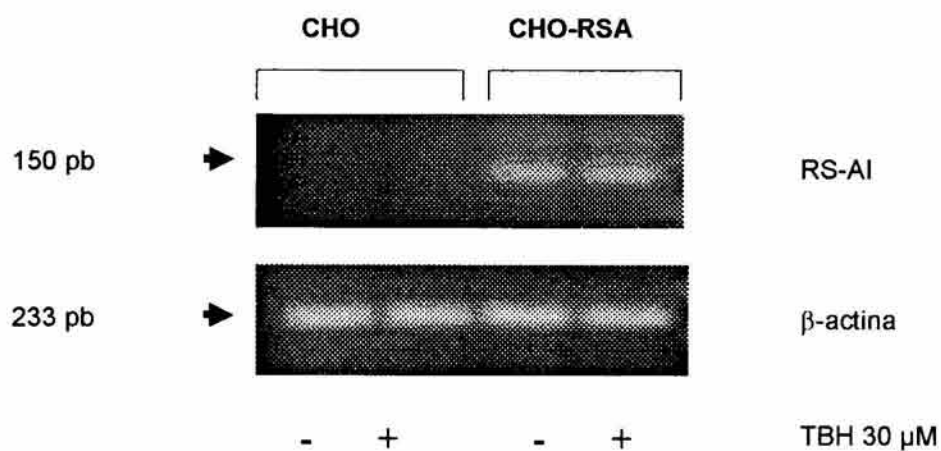


Figura 30. Amplificación por PCR del gen del RS-AI. Se cultivaron células CHO y CHO-RSA en condiciones control en ausencia de TBH (-) y en condiciones de estrés oxidativo en presencia de 30 μM de TBH (+). Se preparó ADNc y se amplificó el gen del RS-AI por PCR. Se usó un par de oligonucleótidos que flanqueaban la región citoplásmica de 50 aminoácidos, los cuales fueron diseñados con base en la secuencia descrita para el gen del RS-AI de bovino. pb, pares de bases.

DISCUSIÓN

EL ESTRÉS OXIDATIVO

El TBH es un hidroperóxido orgánico ampliamente usado como un inductor de estrés oxidativo (133). Existen diferentes reportes acerca del efecto que tiene el TBH sobre diversos tipos celulares. Cada tipo celular responde de forma diferente y la concentración a la cual puede observarse muerte celular varía desde 10 μM en los fibroblastos, 25 μM en las células periendotheliales de la retina, 200 μM en los astrocitos, 150 μM en las células PC12 y hasta 2 mM en hepatocitos (134-138). Se ha observado que el TBH decae con el tiempo, disminuyendo su concentración, aún en ausencia de células (134-138). Los resultados de curso temporal de la viabilidad mostraron que 30 μM de TBH adicionado aproximadamente cada hora a células en cultivo, mantuvo un ambiente oxidativo constante. Nosotros observamos que si se adicionaba una sola dosis de TBH al inicio del ensayo, éste era rápidamente eliminado por las células regresando a su morfología normal. Por esta razón se decidió adicionar el TBH aproximadamente cada hora en una concentración de 30 μM , vigilando que las células no entraran a muerte celular a través de medir su viabilidad por exclusión con azul tripán y observando su morfología al microscopio.

EL EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE LA FUNCIÓN DEL RS-AI

En este trabajo se encontró que los radicales libres producidos por la adición de TBH en forma continua, disminuyeron de forma importante la internalización de las Ac-LDL a través del RS-AI. Este efecto fue similar en todas las líneas celulares estudiadas.

Varios estudios han demostrado que diferentes citocinas y factores de crecimiento pueden aumentar o disminuir la actividad y la expresión del RS-AI en macrófagos donde, algunos de estos cambios se han asociado con la producción de estrés oxidativo intracelular (73-77, 81). Estudios más recientes han demostrado que el estrés oxidativo intracelular, causado por la presencia de las Ox-LDL o por la combinación de los ésteres de forbol con el vanadato, incrementa la expresión y la actividad del RS-AI en CML de aorta de humano y de conejo, células que normalmente no expresan este receptor (78, 128, 139).

Tomando en cuenta los resultados obtenidos, las especies reactivas producidas por el TBH, actúan sobre la actividad del RS-AI de forma muy distinta a como lo hacen las ROS producidas de forma intracelular. Los resultados obtenidos en cuanto a la unión del ligando al receptor, no mostraron diferencias al compararse las condiciones normales con las condiciones de estrés oxidativo. Este fenómeno fue similar en todas las líneas celulares estudiadas. El reconocimiento de las Ac-LDL tampoco se vio afectado por la exposición directa a los radicales producidos por el TBH. Aunque en este trabajo no se midió el grado de oxidación a las Ac-LDL por el TBH en ausencia de células, probablemente la concentración utilizada de este hidroperóxido provocó una oxidación mínima a las lipoproteínas para que fueran reconocidas e internalizadas por el RS-AI, debido a que las LDL altamente oxidadas producen muerte celular (139).

EL EFECTO DEL TBH SOBRE LA INTERNALIZACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS TRAVÉS DEL RS-AI Y EL R-LDL

La descomposición del TBH produce radicales alcoxilo en presencia de iones metales como el hierro o el cobre y estos radicales pueden acelerar la reacción en cadena de la peroxidación de lípidos. Se conoce que el daño principal a la membrana celular ocasionado por el estrés oxidativo, es la peroxidación de lípidos lo que causa daño en la estructura y por lo tanto afecta la función normal de la membrana.

Entre algunos de los daños provocados por la lipoperoxidación se encuentran la disminución de la fluidez de los lípidos, la inactivación de enzimas y la alteración covalente de biomoléculas (140, 141). Mazhul et al., estudiando la dinámica intramolecular de las proteínas de membrana en fibroblastos de hámster, por la fluorescencia del triptofano, encontraron que la adición del TBH a éstas células, en un rango de concentración de 0.5 a 2 mM durante 60 min, formó pocos productos de peroxidación de lípidos (142). Los autores demostraron que las proteínas de membrana son el principal blanco de oxidación por el TBH. El aumento en el movimiento o la dinámica intramolecular de las proteínas de membrana, en tiempo de milisegundos

correlacionó con la concentración del TBH y coincidió con una disminución en la viabilidad celular. La dinámica intramolecular se realiza a nivel de grandes fragmentos de cadenas polipeptídicas, dominios y subunidades de las proteínas, es decir que se presenta en aquellas proteínas que presentan rigidez conformacional, siendo estos fragmentos el blanco principal del TBH (142). Los resultados obtenidos muestran una disminución de la internalización de las Ac-LDL a través del RS-AI por la presencia del TBH en los medios de cultivo, mientras que no se observaron cambios en la internalización de las LDL a través del R-LDL. Ambos receptores tienen residuos y por lo tanto estructuras muy diferentes que están controlando la rigidez conformacional de cada proteína. De igual forma deben de haber residuos de aminoácidos que estén más expuestos y por lo tanto son más susceptibles a la oxidación por el TBH usado bajo nuestras condiciones. Tampoco se descarta la posibilidad que el TBH esté afectando a los lípidos, modificando a su vez la fluidez de la membrana celular y por lo tanto está alterando la dinámica intramolecular de ambos receptores, siendo más susceptible el RS-AI.

Por otro lado, Sullivan et al., demostraron que el TBH (2-8 mM) puede causar daño oxidativo a proteínas de membrana por un mecanismo diferente al daño oxidativo producido a los lípidos de la membrana de eritrocitos (143). Ellos observaron que solamente las proteínas del citoesqueleto formaban agregados de alto peso molecular conforme se incrementaba la concentración del TBH (143, 144). Probablemente el TBH, usado bajo nuestras condiciones y en las líneas celulares estudiadas, está dañando de forma importante no solo la estructura del RS-AI, sino que los cambios en las proteínas del citoesqueleto se pudieran reflejar en la disminución del proceso de endocitosis y por lo tanto en la internalización de las Ac-LDL. Esto con base en que no se observó disminución en la unión de las lipoproteínas al receptor.

EFFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RS-AI

Los radicales libres producidos por la adición del TBH a los cultivos celulares, no modificaron la expresión del RS-AI ni tampoco el nivel del ARNm. Sin embargo, varios estudios han mostrado que

el estrés oxidativo producido intracelularmente por la adición de ésteres de forbol, pervanadato o LDL medianamente oxidadas, a CML de aorta, incrementa el nivel del ARNm del RS-AI, así como su expresión y por lo tanto su actividad (78, 139). Como ya se mencionó, el TBH es un lipoperóxido que puede entrar a la célula y también causar peroxidación de lípidos intracelularmente. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el estrés oxidativo producido por la adición exógena del TBH daña directamente a la proteína del receptor más que tener un algún efecto en posibles vías que participen en la expresión del receptor, a diferencia de como lo hace el estrés oxidativo intracelular.

EL RECEPTOR "SCAVENGER" B-I

El RS-BI se reconoció inicialmente como un receptor "scavenger" que une Ox-LDL, Ac-LDL y LDL nativas (82, 145, 146). Actualmente se conoce que el RS-BI internaliza selectivamente los ésteres de colesterol de las HDL, por un mecanismo distinto a la endocitosis mediada por receptor de las LDL, mecanismo que aún no está completamente dilucidado (147).

En este trabajo se reporta por primera vez la presencia del RS-BI en las células C6 y PC12 por ensayos de "western blot". Con respecto a las células C6, éstas son células de un tumor de glía de rata inducido por inyecciones con N-nitroso-metil-urea y se utilizan como células diferenciadas del tipo astrocítico (148, 149). La expresión del RS-BI se ha reportado en astrocitos de ratón y de humano (101). Aún cuando no se conoce la función exacta del RS-BI en éstas células, se propone que participa en el intercambio selectivo de colesterol y de otros lípidos entre estas células y las HDL (101). Algunos otros estudios muestran que los astrocitos murinos también pueden endocitar a las partículas de HDL, así como otras lipoproteínas (150, 151). El RS-BI además de internalizar a las lipoproteínas, en algunos casos también pueden ser degradadas intracelularmente después de su endocitosis (83, 112, 152, 153). En este trabajo, no solo se reporta la presencia del RS-BI en las células C6 y PC12 sino que también pueden llevar a cabo la internalización de las Ac-LDL a través de este receptor.

Hasta el momento no hay estudios que muestren el efecto del estrés oxidativo sobre la función del RS-BI. En este trabajo se encontró que el estrés oxidativo producido exógenamente por la adición del TBH a los cultivos celulares, causó una disminución en la internalización de las Ac-LDL a través del RS-BI tanto en las células C6 como en las células PC12, sin cambios en el reconocimiento y en la unión de éstas lipoproteínas por el receptor. Probablemente los radicales producidos por la presencia del TBH, no solo estén afectando la estructura del receptor directamente, sino que también se esté dañando indirectamente la función del receptor a través del daño a los lípidos de la membrana, como lo propuesto para el RS-AI. Este resultado es importante, dado que el intercambio de lípidos entre las lipoproteínas (como las HDL y las LDL) y las células, a través el RS-BI, depende en gran parte de cambios en la organización lipídica de la membrana (154-157). La inserción del RS-BI en la membrana plasmática causa una redistribución generalizada del colesterol en dominios llamados caveolas y ésta redistribución juega un papel importante en el mecanismo de liberación del colesterol de las lipoproteínas a las células a través del RS-BI (85, 154, 157-159). Por lo que el daño oxidativo a lípidos de la membrana plasmática juega un papel importante en la correcta función del RS-BI. Quizás el TBH usado bajo nuestras condiciones afectó a los lípidos de la membrana de éstas células y alterando la función endocítica del RS-BI, dado que no se observaron cambios en la unión y en la expresión del receptor bajo condiciones de estrés oxidativo en ambas líneas celulares. Además se ha demostrado que los cambios en el orden lipídico de la membrana dependen no solo del grado de oxidación sino también del estado de ordenación de los lípidos antes de la oxidación (160).

Con respecto a las células PC12, éstas se originaron de un feocromocitoma de rata, el cual es un tumor maligno de células cromafines de la médula suprarrenal. Estas células se originan de la cresta neural embrionaria y pueden sintetizar y almacenar grandes cantidades de catecolaminas y pueden ser utilizadas, por su origen y actividad, como células neuronales (161, 162). Esta es la primera vez que se reporta que el RS-BI se encuentra presente en un feocromocitoma de rata. El RS-BI presente en la glándula suprarrenal, se expresa de forma importante en las células corticales (94, 95, 163), mientras que en la médula su expresión es muy baja (94, 95).

La expresión del homólogo humano llamado CLA-1 es muy alta en tumores como el síndrome de Cushing, mientras que en el feocromocitoma de la médula suprarrenal es nula su expresión (164, 165).

En este trabajo se encontró que las células PC12 pueden unir e internalizar Ac-LDL y esta internalización se disminuye por la presencia del TBH en los cultivos celulares, en forma similar a lo observado en células CHO-RSA y C6. Estos resultados también muestran que las condiciones usadas en este trabajo, no cambiaron la expresión del receptor, así como tampoco la unión de las Ac-LDL al mismo.

Las células PC12 también se utilizan como un modelo neuronal, hasta el momento la expresión del RS-BI en cerebro se ha reportado solamente en regiones específicas como en las células endoteliales, las células de los capilares cerebrales, las leptomeninges y en el parénquima del cerebro de humano y de rata en el estado adulto (99, 100, 166, 167). Aunque las neuronas y la glía expresan varios receptores para lipoproteínas, muchos de los cuales unen apo E (168-170), no existen reportes acerca de la expresión del RS-BI en neuronas directamente.

La expresión del RS-BI observada en células C6 y PC12 por el ensayo de "western blot" fue confirmada por la señal obtenida en células de macrófagos RAW, usadas como un control de la expresión de este receptor (171). Husseman et al., proponen que las ROS, los factores de crecimiento y/o las citocinas proinflamatorias producidas como resultado de la activación de la microglía, astrocitos y/o neuronas, responsables de la expresión del RS-AI, son incapaces de inducir los mismos efectos sobre la inducción o inhibición de la expresión del RS-BI (99). Estudios con ratones deficientes para los genes RS-BI y apo E, demuestran que el RS-BI protege contra la aparición temprana de la aterosclerosis, sin embargo los mecanismos por los cuales las HDL, la apo A-I y el RS-BI ejercen este efecto protector son complejos y aún no se han definido.

CONCLUSIONES

-
- En condiciones de estrés oxidativo, se observó una disminución en la internalización de las Ac-LDL a través del RS-AI.
 - Cuando las lipoproteínas se expusieron directamente al oxidante TBH, no se vió afectado el reconocimiento de las Ac-LDL por el RS-AI.
 - La unión de las Ac-LDL al RS-AI no se vio afectada por el estrés oxidativo.
 - Los niveles de ARNm y de la proteína del RS-AI no cambiaron en las células expuestas al estímulo oxidante.
 - El estrés oxidativo causado por el TBH extracelular disminuyó la función endocítica del RS-AI a diferencia del estrés oxidativo intracelular reportado por otros autores.
 - Probablemente el estrés oxidativo producido por el TBH este afectando directamente a la estructura proteica del RS-AI, sin descartar cambios en la fluidez por daño a los lípidos de la membrana celular.
 - Cambios en la internalización de Ac-LDL por el estrés oxidativo producido exógenamente, ayudarán a explicar como es que ligandos, como las Ox-LDL y el péptido β A no se pueden internalizar y por lo tanto ser eliminados.
 - La disminución en la internalización de las Ac-LDL por el estrés oxidativo producido exógenamente, ayudará a explicar la acumulación extracelular de ligandos como las Ox-LDL y el péptido β A con el consecuente daño al ambiente celular normal.
 - Se describe por primera vez la presencia del RS-BI en células C6 y PC12.
 - Las condiciones de estrés oxidativo usadas en este trabajo disminuyeron la internalización de las Ac-LDL a través del RS-BI, en células C6 y PC12 .
 - El estrés oxidativo no alteró la capacidad de reconocimiento y de unión de las Ac-LDL al RS-BI en las células C6 y PC12.
 - El estrés oxidativo no alteró los niveles de la proteína del RS-BI en las células C6 y PC12.
 - Probablemente el estrés oxidativo producido por el TBH este afectando directamente a la estructura proteica del RS-BI, sin descartar cambios en la fluidez por daño a los lípidos de la membrana celular.

- La presencia del RS-BI en células C6, probablemente se relacione con el metabolismo de las HDL y las LDL y el transporte del colesterol a células astrocíticas con gran actividad metabólica.
- La función del RS-BI en células PC12 (tipo neuronal) falta aún por definirse.

PERSPECTIVAS

Este trabajo abre distintas posibilidades en el estudio del estrés oxidativo sobre las proteínas de membrana durante procesos inflamatorios. En este trabajo se encontró que las ROS producidas de forma extracelular alteran la función de los receptores "scavenger" de forma diferente a lo reportado con respecto a las ROS producidas de forma intracelular. Sería importante conocer cual es el daño que pueden provocar estos radicales producidos por el TBH directamente sobre las proteínas y los lípidos de la membrana celular. Como se mencionó en la discusión, los radicales producidos por la descomposición del TBH también pueden atacar a lípidos de la membrana y este daño ser independiente del daño a proteínas integrales.

Otra posibilidad es el evaluar el efecto del estrés oxidativo producido por diferentes ligandos como las fibrillas β A, las Ox-LDL o las mismas HDL sobre la función endocítica de los receptores "scavenger". También será importante conocer los niveles de expresión del gen para el RS-BI en las líneas celulares C6 y PC12 bajo condiciones normales como de estrés oxidativo usadas en este trabajo. El estudio del gen del RS-BI en células C6 y PC12 permitirá conocer su presencia en otros tipos celulares diferentes hasta lo ahora reportado, así como también su expresión bajo condiciones de estrés oxidativo extracelular, intracelular, su regulación y posibles nuevas funciones.

El estudio del estrés oxidativo sobre la función endocítica de los receptores RS-AI y RS-BI permitirá entender mejor el papel que juega este fenómeno en la actividad de estos receptores en procesos donde existe una gran producción de radicales libres en forma natural como lo es la aterosclerosis y la enfermedad de Alzheimer, durante la eliminación de moléculas que son tóxicas para las células y que también son ligandos para estos receptores, como lo son las fibrillas β A y las Ox-LDL.

APÉNDICES

APÉNDICE I

Agua-DEPC: Se preparó de acuerdo a la metodología descrita por Sambrook y Maniatis. Por cada 500 mL de agua desionizada se le adicionó 500 μ L de dietilpirocarbonato o DEPC (Sigma, Chemicals), y se dejó bajo agitación toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se esterilizó a 15 lb de presión por 30 min.

Alsever: Glucosa 20.5 g, citrato de sodio 8 g, ácido cítrico 0.55 g, NaCl 4.2 g, se ajusta pH a 6.1 y se afora a 1L con agua inyectable. Se esteriliza en autoclave a 15 libras de presión durante 15 min.

Amortiguador de diálisis: EDTA 0.24 mM pH 7.6 y NaCl 150 mM.

Amortiguador para cargado de proteínas (loading buffer) 5X: Tris base 1.5 M pH 6.8, (4.1 ml), glicerol 50% (10 ml), beta mercaptoetanol 25% (5 ml), SDS 10% (2 gr), azul de bromotimol 5 mg (0.0125 gr). Estas cantidades son para preparar 20 ml.

Amortiguador para cargado de ADN (loading buffer) 6X: 30% de glicerol, 0.25% de azul de bromofenol y 0.25% de xylen cianol FF. Todo se disuelve en agua estéril.

Amortiguador para cargado de ARN (loading buffer) 2X: 50% glicerol, 1 mM EDTA (pH 8), 0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de xylen cianol FF. Se disuelve en agua tratada con DEPC.

Amortiguador de corrida de proteínas 5X: Tris 25 mM (15.1 gr), glicina 250 mM (94 gr) pH 8.3, SDS 0.1% (50 ml de SDS 10%). Estas cantidades son para preparar 1 L.

Amortiguador de corrida para geles de ARN 5X: MOPS 0.1 M pH 7.4, Acetato de sodio 40 mM pH 7, EDTA 5mM pH 8. Estas cantidades son para prepara un litro de solución en agua DEPC.

DCFH₂-DA: Dicloro fluorescein diaceato. Se disuelve en dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración final de 400 μ M, se almaca a -20° C en oscuridad.

DNTB: 5, 5'-Dithio-bis (2- ácido nitrobenzoico). Se prepara a una concentración final de 1 mM

Gel de poliacrilamida al 5% (gel concentrador): 0.5 ml de acrilamida al 30%, 0.38 ml de Tris 1.5 M pH 6.8, 0.030 ml de SDS al 10%, 0.030 ml de PSA (persulfato de amonio) al 10%, 0.003 ml de TEMED.

Gel de poliacrilamida al 8% (gel de corrida): 1.82 ml de acrilamida al 30%, 1.9 ml de Tris 1.5 M pH 8.8, 0.070 ml de SDS al 10%, 0.070 ml de PSA (persulfato de amonio) al 10%, 0.004 ml de TEMED.

Medio LB: Bactotripton 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM.

Medio SOB: Bactotripton 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.05%, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM.

Medio SOC: SOB + 1/50v glucosa 20 %, 1/100v MgSO₄ 1 M.

MOPS: Ácido 3(*N*-morfolino)propanosulfónico en agua DEPC, pH 7.4.

PBS: Amortiguador de fosfatos con una concentración final de 0.01 M. Contiene 0.0027 M de KCl y 0.137 M NaCl a pH 7.4.

PBS-BSA: PBS + Albúmina sérica bovina 2 mg/ml

PBS-MCF: 10X. KCl 2 g/l, KH₂PO₄ 2 g/l, NaCl 80 g/l, Na₂HPO₄·7H₂O 2.16 g/l ó Na₂HPO₄ anhidro 1.14 g/l.

PBS-MCF/BSA: PBS-MCF con 2mg/ml de albúmina sérica bovina fracción V (Sigma).

PMSF ("Phenyl methyl sulfonyl fluoride"): preparar una solución stock 100 mM en isopropanol y almacenar a -20°C.

Poliacrilamida al 30%: acrilamida al 29% y bis-acrilamida al 1%.

Ponceau: Ponceau 2 g, ácido tricloro acético 30 g, ácido sulfosalicílico 30 g, agua hasta completar 100 ml. Diluir una parte de la solución stock con nueve partes de agua para preparar la solución de trabajo. Ponceau S (Sigma) es ácido 3-hidroxi-4-(2-sulfo-4-[4-sulfofenilazo]-fenil-azo)-2,7-naftalen disulfónico.

P1: Tris 50 mM, EDTA 10 mM, RNAsa A 100 µg/ml.

P2: NaOH 200mM, SDS 1%.

P3: Acetato de potasio 3M pH 5.5.

QBT: NaCl 750 mM, MOPS 50 mM pH 7, isopropanol 15%, triton X-100 15%.

QF: NaCl 1.25 M, Tris 50 mM pH 8.5, isopropanol 15%.

QC: NaCl 1M, MOPS 50 mM pH 7, isopropanol 15%.

Solución de bloqueo para "western blot": TTBS + leche baja en grasa al 5%.

Solución de transferencia: Tris base 25mM (15.1375 gr), glicina 192 mM (72.096 gr), metanol 20% (1000 ml). Estas cantidades son para preparar 5 L.

STE: NaCl 100 mM, Tris 100 mM, EDTA 1mM, pH 8.

TAE 50X: Tris base 242 g, ácido acético glacial 57.1 ml, 100 ml de EDTA 0.5 M pH 8. Estas cantidades son para preparar un litro de solución.

TBS 10X: NaCl 0.5 M, Tris base 20 mM + 800 ml de agua. Ajustar pH a 7.5 con HCl y ajustar a 1litro. Autoclavear a 15 lb de presión por 15 min.

TTBS 1X: TBS diluído 10 X del stock + Tween.

TEMED: N, N, N', N'- Tetrametil-etil-ene-diamina.

Versene: 0.2 g/l de EDTA.4Na (0.53 mM) en PBS.

APÉNDICE II

**Factores para Hacer Ajustes de Densidad con Bromuro de Potasio (KBr) para Cambiar de
una Densidad a Otra**

1.006 → 1.019		1.020 → 1.075	
gKBr = V ₁	(0.0185)	gKBr = V ₁	(0.0810)
1.006 → 1.020		1.020 → 1.08	
gKBr = V ₁	(0.0199)	gKBr = V ₁	(0.0886)
1.006 → 1.040		1.020 → 1.087	
gKBr = V ₁	(0.0491)	gKBr = V ₁	(0.0994)
1.006 → 1.080		1.020 → 1.125	
gKBr = V ₁	(0.1092)	gKBr = V ₁	(0.746)
1.006 → 1.087		1.020 → 1.215	
gKBr = V ₁	(0.120)	gKBr = V ₁	(0.31)
1.006 → 1.10		1.040 → 1.060	
gKBr = V ₁	(0.1405)	gKBr = V ₁	(0.0291)
1.006 → 1.21		1.040 → 1.063	
gKBr = V ₁	(0.3265)	gKBr = V ₁	(0.0336)
1.019 → 1.040		1.040 → 1.080	
gKBr = V ₁	(0.0303)	gKBr = V ₁	(0.0591)
1.019 → 1.060		1.040 → 1.090	
gKBr = V ₁	(0.0599)	gKBr = V ₁	(0.0742)
1.020 → 1.040		1.050 → 1.063	
gKBr = V ₁	(0.0288)	gKBr = V ₁	(0.034)
1.020 → 1.050		1.050 → 1.080	
gKBr = V ₁	(0.0436)	gKBr = V ₁	(0.0443)
1.020 → 1.060		1.050 → 1.10	
gKBr = V ₁	(0.0584)	gKBr = V ₁	(0.074)
1.020 → 1.063		1.050 → 1.125	
gKBr = V ₁	(0.0629)	gKBr = V ₁	(0.11359)
1.050 → 1.215		1.080 → 1.10	
gKBr = V ₁	(0.2647)	gKBr = V ₁	(0.0299)
1.060 → 1.080		1.080 → 1.21	
gKBr = V ₁	(0.0295)	gKBr = V ₁	(0.208)

1.060 → 1.087		1.087 → 1.21	
gKBr = V ₁	(0.0401)	gKBr = V ₁	(0.195)
1.060 → 1.090		1.090 → 1.21	
gKBr = V ₁	(0.0446)	gKBr = V ₁	(0.192)
1.063 → 1.087		1.095 → 1.21	
gKBr = V ₁	(0.0356)	gKBr = V ₁	(0.184)
1.063 → 1.090		1.1 → 1.21	
gKBr = V ₁	(0.04011)	gKBr = V ₁	(0.176)
1.063 → 1.095		1.125 → 1.215	
gKBr = V ₁	(0.04773)	gKBr = V ₁	(0.1444)
1.063 → 1.10			
gKBr = V ₁	(0.0553)		
1.063 → 1.125			
gKBr = V ₁	(0.0938)		
1.063 → 1.21			
gKBr = V ₁	(0.235)		
1.063 → 1.215			
gKBr = V ₁	(0.2438)		
1.075 → 1.021			
gKBr = V ₁	(0.216)		
1.080 → 1.10			
gKBr = V ₁	(0.0299)		

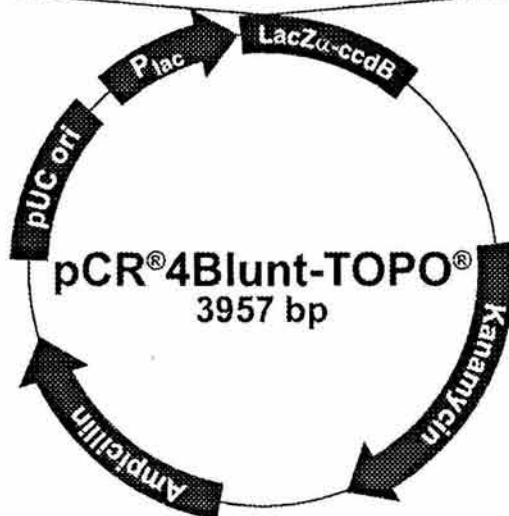
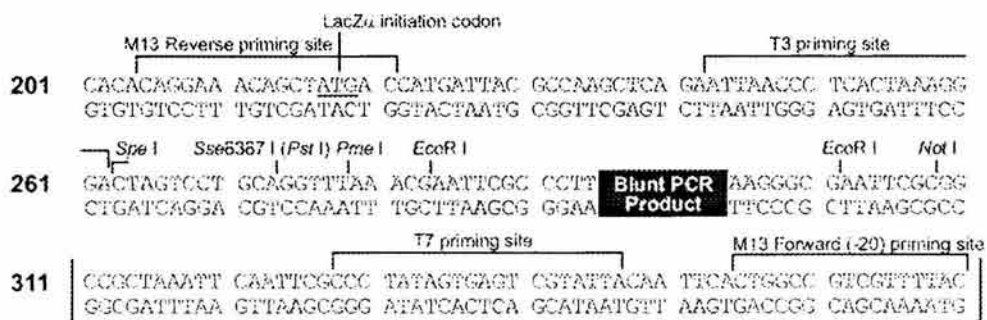
OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN DE LDL

Volumen de plasma _____
 Benzamidina (0.01%) _____
 Inhibidor de Tripsina (0.01%) _____
 DNTB (1.5 mM = 1396.4 g/mol) _____
 PMSF (1 mM) _____
 Gentamicina (1 ampolleta de 160 mg/ 2ml) _____
 Estreptomycin (0.01%) _____

1. Ajustar ρ plasma a 1.019 con KBr. $grKBr = Vol (0.01906)$
 2. Centrifugar 16-20 hr a 4°C a 49 K (60 Ti) _____ a _____
 3. Descartar parte superior y recuperar inferior (~2/3). inf _____ sup _____
 4. Ajustar ρ parte inferior a 1.05 con KBr = Vol (0.0436) vol _____ gKBr _____
 5. Centrifugar 2224 hr a 4°C a 49 K (60 Ti) _____ a _____
 6. Recuperar parte superior vol _____
 7. Ajustar ρ parte superior a 1.063 con KBr = vol (0.034) vol _____ gKBr _____
 8. Centrifugar 18 hr a 4°C a 49 K (60Ti) _____ a _____
 9. Recuperar fracción superior naranja de LDL vol _____
- Fracción inferior descartarla.
10. Dializar LDL en 10-12 litros de amortiguador 150 mM NaCl/0.24 mM EDTA pH 7.4 (0.01%).
Por 36-48 hr. Hacer dos cambios.
 11. Centrifugar dializado a 10,000 rpm / 30 min a 4°C y esterilizar en filtro Millipore 0.45 μ m al
mechero. vol _____
 12. Cuantificar proteína y ajustar densidad con el amortiguador anterior a una concentración final
= 20-40 mg/ml.
 13. Guardar a 4°C.

APÉNDICE IV

Vector de clonación pCR 4Blunt-TOPO de Invitrogene



Mapa de pCR 4Blunt-TOPO. Se muestran las posiciones y las secuencias de los oligonucleótidos T7 y T3, así como el sitio de clonación. La secuencia completa del vector se encuentra en la página web (www.invitrogen.com).

APÉNDICE V
ARTÍCULOS PUBLICADOS

Aguilar-Gaytán, R., y Mas-Oliva, J. EL Receptor "pepenador" y su importancia en procesos amiloidóticos. Gac. Med. de Mex. (2002) 138:445-460.

El receptor "pepenador" y su importancia en procesos amiloidóticos

Rocío Aguilar-Gaytán,* Jaime Mas-Oliva*

Recepción versión modificada 01 de febrero del 2002; aceptación 04 de febrero del 2002

Resumen

El receptor pepenador (RPA) también conocido como "receptor scavenger" pertenece a una amplia familia de receptores que se agrupan con base en sus propiedades de unión a una serie de ligandos importantes. El RPA fue caracterizado inicialmente por su participación en el depósito del colesterol en la pared arterial durante la formación de la placa aterosclerótica. De igual forma se ha involucrado en el mecanismo de defensa del hospedero en contra de organismos patógenos infecciosos. Su estructura es un mosaico de regiones alfa hélice y dominios ricos en cisteínas. Este receptor tiene la habilidad de unir, además de lipoproteínas de baja densidad modificadas químicamente, un amplio rango de ligandos polianiónicos. Un ligando particular para el RPA es el péptido β -amiloide, el cual se ha involucrado directamente en diferentes procesos amiloidóticos. Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio, así como los llevados a cabo por otros grupos de trabajo, consideran que la unión de este péptido al RPA activa respuestas de tipo inflamatorio con la correspondiente producción de estrés oxidativo.

Palabras clave: Receptor pepenador, proteína precursora del β -amiloide, lipoproteínas, enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis.

Introducción

El transporte intracelular de lípidos, incluyendo al colesterol, los ésteres de colesterol, los triglicéridos así como ciertas vitaminas y drogas requiere de una serie de complejos macromoleculares llamados lipoproteínas. Estas lipoproteínas han sido nombradas con base en sus diferentes densidades, p.ej., HDL (lipoproteínas de alta densidad por sus siglas en inglés *high density lipopro-*

Summary

The scavenger receptor (SRA or RPA) belongs to a wide family of receptor proteins. The classification is based on sequence homologies and structural similarities; nevertheless, it has been useful to group them on the basis of ligand specificity. The SRA was first identified as a receptor for modified low-density lipoproteins, where such modification permits to regulate the uptake of modified LDL by macrophages leading to a massive cholesterol accumulation. Moreover, SRA facilitates the clearance by phagocytic cells of microbial pathogens and senescent cells. SRA is a transmembrane glycoprotein that exists as a trimer comprised of a cysteine-linker dimer and a non-covalently bound monomer. SRA has an α -helical coiled coil domain, which is essential for both trimer formation and acid-dependent ligand dissociation. It also contains a collagenous domain, essential for ligand binding. The majority of these ligands are polyanionic molecules, such as the A β -peptide, important in the development of Alzheimer's disease. Present findings including our own consider that binding of these peptides to SRA activates an inflammatory response with the production of oxidative stress.

Key words: Scavenger receptor, β -amyloid precursor protein, lipoproteins, Alzheimer's disease, atherosclerosis.

tein), LDL (lipoproteínas de baja densidad o *low density lipoprotein*), VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad o *very low density lipoprotein*), y los quilomicrones (QM).^{1,2} Cada una de estas lipoproteínas difiere en su contenido de proteínas y lípidos, así como en sus actividades fisiológicas (Cuadro I). Un ejemplo de ello es la correlación directa que existe entre el riesgo de enfermedad coronaria e infarto al miocardio con la concentración plasmática de LDL y HDL. Las LDL son el principal

* Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Jaime Mas Oliva, Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F. Apartado Postal 70-243, 04510. México, D.F. Tel. 5622-5584. Fax.: 55622-5611 e-mail: jmas@ifisiol.unam.mx

Cuadro I. Comparación de las lipoproteínas plasmáticas y del sistema nervioso central

Lipoproteínas	Apolipoproteína	Tamaño de partícula (nm)	Densidad (g/mL)	Peso molecular (KDa)	Porcentaje lipídico	Lípido
HDL-FCE	A-I, A-II, A-IV C-II, D, E, J AAS	11.0-20.2	~1.09-1.25	200	62%	Ésteres de colesterol (28%) Colesterol libre (11%) Fosfolípidos (47%) Triglicéridos (14%)
HDL _{total}	AI, A-II, A-IV C-I, C-II, C-III D, E, F, G, H, J, AAS	7.6-16	1.063-1.210	150.300	45-55%	Ésteres de colesterol (33%) Colesterol libre (5%) Fosfolípidos (53%) Triglicéridos (9%)
LDL	B-100	16.0-20.0	1.019-1.063	3,000	75-85%	Ésteres de colesterol (49%) Colesterol libre (11%) Fosfolípidos (27%) Triglicéridos (13%)
IDL	B-100 E	30	1.006-1.019			Ésteres de colesterol (29%) Colesterol libre (9%) Fosfolípidos (19%) Triglicéridos (23%)
VLDL	B-100 C-I, C-II, C-III E	30.0-90	1.006-0.93	10,000- 80,000	90-95%	Ésteres de colesterol (14%) Colesterol libre (8%) Fosfolípidos (21%) Triglicéridos (57%)
Quilomicrones	A-I, A,II, A-IV B-48 C-I, C-II, C-III E	>100	0.93		95-98%	Ésteres de colesterol (3%) Colesterol libre (2%) Fosfolípidos (7%) Triglicéridos (86%)

HDL, Lipoproteínas de alta densidad; FCE fluido cerebral espinal, LDL, lipoproteínas de baja densidad; IDL, lipoproteínas de densidad intermedia; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad; AAS apolipoproteína A amiloidogénica sérica.

transportador de colesterol en el plasma^{3,4} y se han descrito dos vías de internalización celular para estas partículas: una vía es a través del receptor a LDL^{5,6} y la otra es a través del receptor pepenador o RPA⁷ (Figura 1). Ambos receptores llevan a cabo su trabajo mediante el mecanismo celular conocido como endocitosis mediada por receptor, proceso descubierto y caracterizado por Goldstein y Brown en 1979.⁸ La endocitosis mediada por el receptor a LDL se conoce con bastante detalle, sin embargo, el significado fisiológico del receptor pepenador aún no está definido con exactitud. Algunos estudios sugieren que la vía de internalización a través del RPA puede jugar un papel importante en el depósito de colesterol proveniente de las LDLs en la pared arterial durante la formación de la placa aterosclerótica.^{9,10}

El receptor pepenador se describió inicialmente en los macrófagos como un receptor alternativo para las LDLs, las cuales conllevan al desarrollo de células espumosas. El nombre de pepenador o "scavenger" en inglés, se determinó por su amplia unión de ligandos. Hace poco

tiempo se describió toda una familia de receptores pepenador los cuales se han clonado con base en su habilidad para internalizar LDL modificadas químicamente.¹¹ De acuerdo con Krieger y cols., la clasificación del receptor pepenador es la siguiente (Figura 2): 1) RP clase A formado por RPA-I, RPA-II, RPA-III y el receptor de macrófagos con estructura parecida a colágena o MARCO (de sus siglas en inglés *macrophage receptor with collagenous structure*). 2) RP clase B que comprende al RP-BI y CD36, ambos receptores se encuentran concentrados en regiones de la célula llamadas caveolas, se ha visto que CD36 también participa en la adhesión celular; 3) la clase C contiene al receptor dRP-CI de *Drosophila*; 4) en la clase D se encuentra el receptor CD68/macrosialina (con regiones parecidas a mucina); 5) en la clase E se encuentra el receptor LOX-1; y 6) en la clase F el RPCE (receptor pepenador con región parecida al factor de crecimiento epidermal). Aunque cada receptor pepenador muestra una amplia especificidad de ligandos muchas veces se superponen con los de los otros receptores (Cuadro II). El

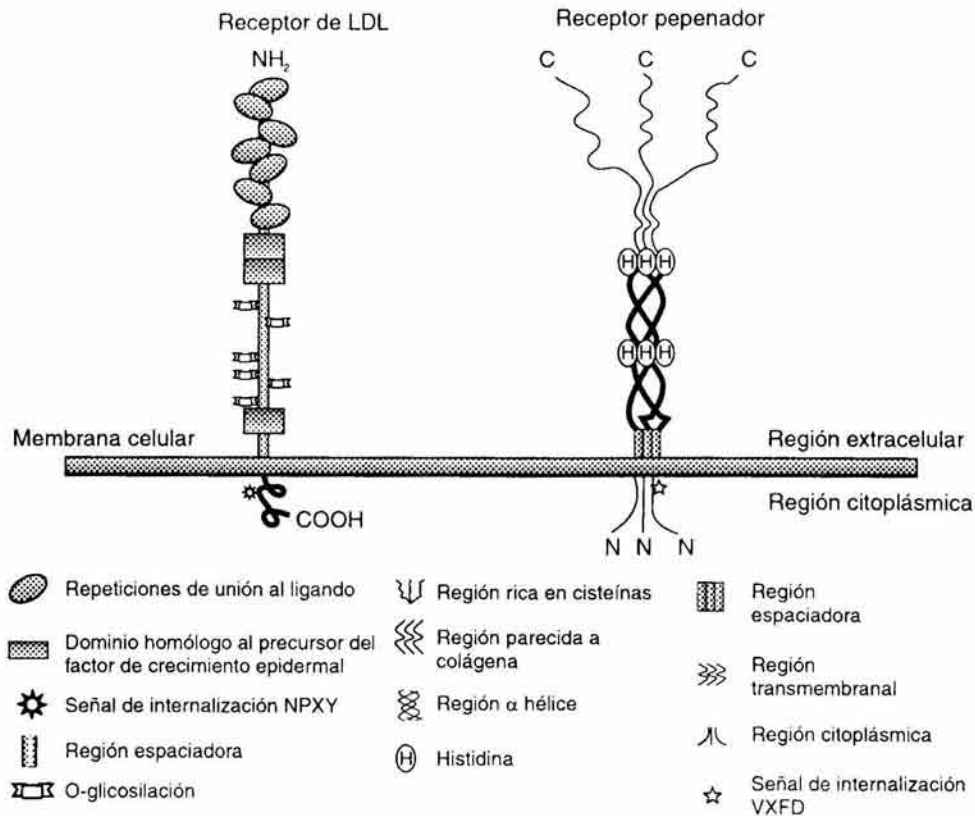


Figura 1. Estructuras del receptor LDL y el receptor pepenador clase A-I. El receptor LDL es una glucoproteína de membrana de 839 aminoácidos en su forma madura. Una principalmente LDLs a través del reconocimiento de sus apolipoproteínas B y E. La secuencia señal citoplásmica NPXY (asparagina-prolina-X-Y) es característica de los receptores que se internalizan en la célula por el proceso conocido como endocitosis mediada por receptor. El receptor pepenador A-I es una glucoproteína homotrimérica de 453 aminoácidos y está conformado por seis dominios. Posee una gran región extracelular con su extremo carboxilo (al contrario del receptor LDL) y un pequeño dominio amino-terminal citoplásmico el cual tiene la secuencia de internalización por endocitosis, VXF (valina-cualquier aminoácido-fenilalanina-aspartico).

RPA une una variedad de componentes, por ejemplo, proteínas modificadas químicamente (acetiladas, oxidadas y maleinadas), polirribonucleótidos (poli-G y poli-I, pero no poli-A o poli-T ó C), polisacáridos como el dextrán sulfato y la fucoidina, lipopolisacáridos (LPS) y ácido lipoteicoico (LTA), siendo estos últimos componentes de bacterias. También une fosfolípidos aniónicos como la fosfatidilserina y productos secretados por plaquetas. Entre otros ligandos no naturales se incluyen el polivinilsulfato, y algunos asbestos.¹² La importancia particular del RPA no sólo reside en su participación y génesis de la enfermedad coronaria, sino también en la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer.

Expresión del receptor pepenador clase A

La expresión celular del RPA se ha descrito en varios tipos celulares. Entre éstos se incluyen las células de Kupffer, los macrófagos alveolares, los macrófagos tímicos y los macrófagos del bazo.^{13,14} Las células endoteliales de hígado y

sinusoides adrenales, al igual que las células endoteliales de vénulas postcapilares y los nódulos linfáticos también expresan el RPA.^{15,18} La expresión de *novo* del RPA se ha demostrado en células del músculo liso que forman parte de las lesiones ateroscleróticas en estado avanzado.¹⁷

La expresión de RPA en macrófagos está bajo la influencia de varias citocinas, factores de crecimiento y dominios de unión a factores de transcripción. Entre los dos primeros grupos, que regulan de forma positiva, se encuentran el M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*), el M-CSF granulocítico^{18,19} y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*platelet derived growth factor*).¹⁸ Entre los factores que tienen efectos negativos sobre la actividad del RPA, se encuentran el factor β -transformante del crecimiento (TGF- β),²⁰ el factor de necrosis tumoral- β (TNF- β), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)²¹ y el interferón- γ .²² Estos dos últimos se producen localmente en las lesiones ateroscleróticas e inhiben la actividad del RPA a nivel tanto transcripcional como postranscripcional. Entre los dominios de unión a factores de transcripción que

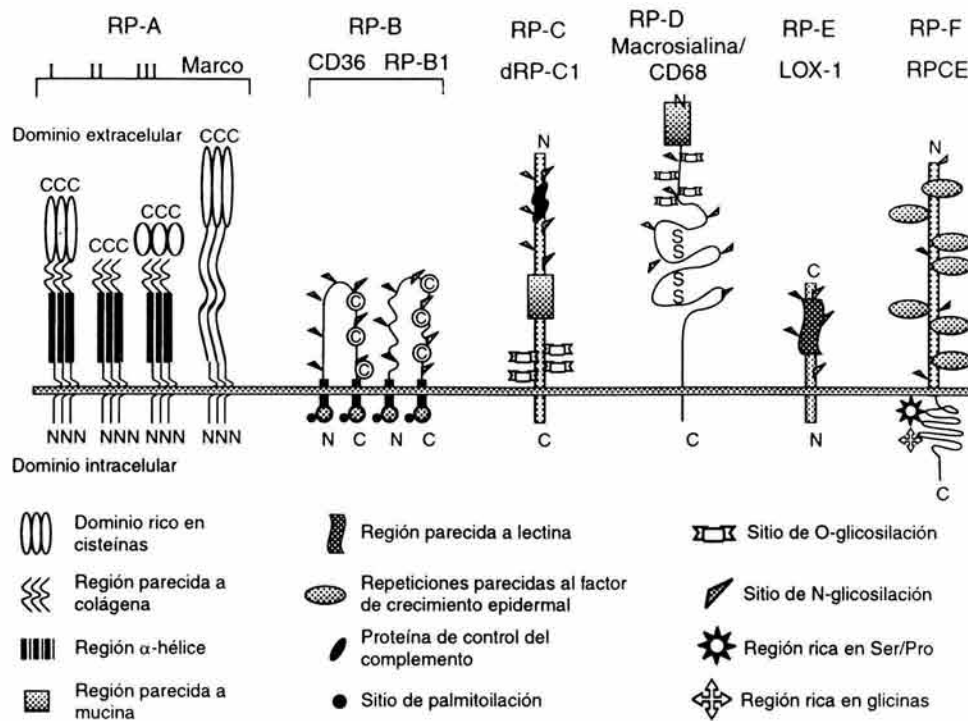


Figura 2. Estructura de los distintos miembros que conforman la familia de receptores pepenador. Esta familia está conformada por seis miembros y todos ellos se agrupan con base en su habilidad de unir e internalizar LDLs modificadas químicamente. La clase A se caracteriza por ser glucoproteínas homotriméricas con dominios de estructura parecida a colágena (sitio de unión del ligando) y/o dominios ricos en cisteína (C). La clase B posee un solo dominio extracitoplásmico conservado con una región en sitios de N-glicosilación. El dominio carboxilo-terminal es rico en residuos de cisteína (C), prolina (Pro) y glicina (Gly). La clase C formada por un solo representante dRP-C1, fue descrita en hemocitos embrionarios de *Drosophila*. Este receptor está formado por varios dominios, entre los que se incluyen en la región extracelular dos dominios de la proteína de control del complemento, un dominio B de somatomedina y un dominio tipo mucina rico en residuos de serina (Ser) y treonina (Thr) que contribuyen a la O-glicosilación. La clase D está formada por macrosialina o su homólogo humano CD68. Macrosialina es una glucoproteína integral de membrana que se expresa solamente en macrófagos y células dendríticas, y se caracteriza por su dominio parecido a mucina. La clase E la conforma LOX-1 o el receptor de LDL oxidadas con una región parecida a lectina. En la clase F se encuentra el receptor pepenador de células endoteliales (RPCE) el cual posee varias repeticiones semejantes al factor de crecimiento epidérmico. Además posee dominios de N- y O- glicosilación y regiones ricas en residuos de serina (Ser), prolina (Pro) y glicina (Gly).

se han descrito dentro de la región promotora del gene del RPA y que regulan de forma positiva, se encuentran la región PU 1/Spi-1 (factor de transcripción específico de células B y macrófagos)²³ y el dominio de unión a la proteína activadora 1 (AP-1).²⁴ Recientemente se ha demostrado que el receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma ó PPAR- γ (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ*) también participa en la regulación negativa del RPA, inhibiendo su expresión.²⁵

Estructura del receptor pepenador clase A

El DNA complementario para el RPA ha sido clonado en varias especies.²⁶⁻²⁸ En los sistemas murino y humano el gene del RPA está conformado por 11 exones, con una

longitud en el humano de aproximadamente 80 Kb, localizado en el cromosoma 8.²⁹ Dos variantes del RPA se generan por edición y empalme alternativo del mismo gene. El RPA tipo 1 está codificado por los exones 1 al 8 y 10 al 11, y contiene el dominio carboxilo terminal de 110 aminoácidos, rico en cisteínas. El RPA tipo II está codificado por los exones 1 al 9 y carece del dominio rico en cisteínas. Recientemente un tercer transcrito fue reportado, el cual actúa de una forma negativa dominante (Figura 2).³⁰ No se conoce la función del dominio rico en cisteínas, pero se sabe que hay una regulación específica para cada una de las isoformas. Es importante mencionar que ambas isoformas se han encontrado en las lesiones ateroscleróticas.³¹

El RPA es una glucoproteína homotrimérica transmembranal, formada por seis dominios (Figura 3). Se ha

Cuadro II. Receptores pepenadores y sus ligandos propuestos

Clase		Ligandos
RP A	RP-I	Ac-LDL, Ox-LDL, proteínas modificadas- AGE, MASB, LPS, ALT, bacterias, ácido poliinosítido, ácido poliguanosínido.
	RP-II RP-III MARCO	? Ac-LDL, LPS, bacterias.
RP B	RP-BI/CLA-1	HDL, LDL, VLDL, lipoproteínas modificadas, fosfolípidos aniónicos, células apoptóticas.
	RP-BII CD36	HDL, LDL, VLDL, lipoproteínas modificadas fosfolípidos aniónicos, ácidos grasos, colágena, trombospondina, eritrocitos infectados con <i>P. flaciparum</i> , células apoptóticas.
RP C	<i>Drosophila</i>	Ac-LDL
RPD	CD68/macrosialina	Ox-LDL, liposomas de fosfatidilserina, malondialdehído, ASB.
RP E	LOX-1	Ox-LDL, ácido poliinosítido, células apoptóticas.
RP F	RPCE	Ac-LDL, Ox-LDL

Ac-LDL, lipoproteínas de baja densidad acetiladas; Ox-LDL, lipoproteínas de baja densidad oxidadas; AGE, productos finales de glicosilación avanzados; m-ASB, albúmina sérica bovina maleinada; LPS, lipopolisacárido; ALT, ácido lipoteicoico, HDL, lipoproteínas de alta densidad; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad; RPCE, receptor pepenador con región parecida al factor de crecimiento epidermal; MARCO, receptor pepenador clase A con región parecida a colágena.

demostrado que el dominio parecido a colágena es la región de unión al ligando, este dominio tiene un racimo de cisteínas, las cuales forman una región rica en cargas positivas que interactúa específicamente con los ligandos de carga negativa. El RPA tiene un peso molecular aproximado de 240 KDa. La estructura primaria del receptor tipo 1 de bovino se predice como una proteína integral de membrana de 453 aminoácidos, formada por seis dominios.³² Los pesos moleculares aparentes de las formas precursoras y maduras del tipo 1 bovino son 64 y 79 KDa para los monómeros, 129 y 162 KDa para los dímeros, y 198 y 237 KDa para los trímeros. Para las formas precursoras y maduras del tipo II se ha descrito de 55 y 69 KDa para los monómeros, 119 y 147 KDa para los dímeros y 176 y 219 para los trímeros.^{32,33} Estos receptores fueron las primeras proteínas de membrana descritas que contienen un dominio parecido a colágena. Como se muestra en la figura 3, en el modelo del RPA tipo I, el dominio extracelular mide aproximadamente 430 Å de largo, y se encuentra super-enrollado formando un tallo. Este tallo comprende el 52% y el 62% de su dominio extracelular.^{32,34} El dominio I es la región amino-terminal citoplásmica (residuos 1-50), la cual contiene la secuencia señal de internalización para llevar a cabo la endocitosis mediada por receptor.³⁵ El dominio II es un solo dominio transmembranal por cadena (aminoácidos 51-76), los dominios restantes son extracelulares y el dominio III es una región espaciadora que va del residuo 77 al 108. El dominio IV (residuos 109-271) está compuesto de una serie de al

menos 16 repeticiones de siete aminoácidos, llamadas héptadas. Las cadenas laterales de las héptadas en la primera y cuarta posición son frecuentemente aminoácidos alifáticos (leucina, isoleucina, valina). Estos dominios que contienen las héptadas se doblan hacia la izquierda formando α -hélices con 3.5 residuos por vuelta.³⁶ Estos se ensamblan en racimos paralelos de tres cadenas tipos α -hélice super-enrolladas.³⁶ El segundo dominio super-enrollado es el dominio V parecido a colágena (residuos 272-343), el cual contiene 23 ó 24 repeticiones del triplete Gly-X-Y, con prolina o lisinas frecuentemente presentes en la posición Y, característica que le da la propiedad de presentar carga positiva. Esta estructura de repeticiones de tripletes se parece a la estructura de triple hélice con giro a la derecha de la colágena, con una longitud aproximada de 200 Å.³⁷ El dominio VI carboxilo terminal (residuos 344-453) comprende una "bisagra" de 8 residuos (subdominio VIa), la cual une al dominio parecido a colágena con el dominio de 102 aminoácidos rico en cisteínas (subdominio VIb). La función relevante para el dominio rico en cisteínas no se conoce; sin embargo, parece ser que las cisteínas dentro de cada dominio forman tres puentes disulfuro intramoleculares y probablemente se pliegan en estructuras globulares.³⁸

A pesar de la forma truncada del RPA tipo II, la endocitosis de las LDLs por el receptor se lleva a cabo con una alta afinidad y amplia especificidad similar a la del tipo I. Todos los ligandos conocidos hasta el momento se unen a ambos receptores. La unión de ligandos a este

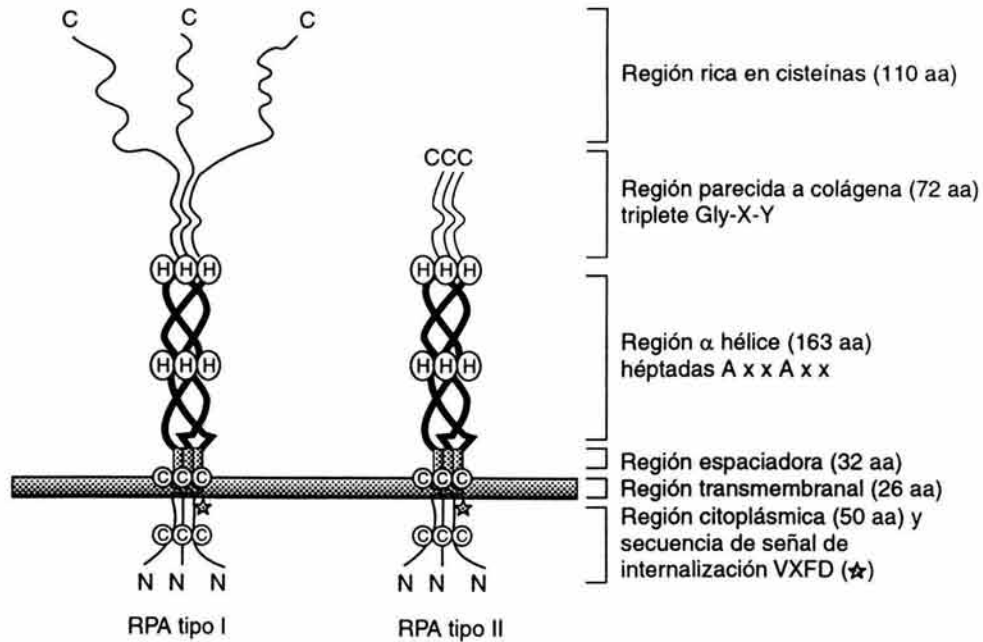


Figura 3. Estructuras del receptor pepenador clase A tipos I y II. El RPA tipo I es una molécula homotrimérica formada por seis dominios. La región amino-terminal citoplásmica (dominio I) la cual contiene la secuencia que controla la internalización a través de endocitosis mediada por receptor. El dominio II es la región transmembranal. El dominio III es una pequeña región espaciadora. El dominio IV presenta una estructura α hélice super-enrollada conformada por repeticiones de siete aminoácidos llamadas héptadas con aminoácidos alifáticos (A, alanina) en la primera y cuarta posición. El dominio V es la región parecida a colágena la cual comprende 24 repeticiones del triplete Gly-X-Y, donde X y Y pueden ser cualquier aminoácido. El dominio VI es la región rica en cisteínas. El RPA tipo II posee los primeros cinco dominios del tipo 1 y carece del dominio VI rico en cisteínas. Las cisteínas (Cys) en la posición de la región espaciadora participan en la formación de puentes disulfuro para la unión covalente de cada dos de tres cadenas que conforman la estructura del receptor. Las cisteínas en el dominio citoplásmico parecen no participar en la formación de puentes disulfuro.

receptor es poco usual no sólo por su amplia especificidad sino porque no muestran competencia recíproca, es decir, si un ligando compite eficientemente por la unión de un segundo ligando, el segundo ligando compite parcialmente por la unión del primero. Cabe mencionar que el RPA-II, a pesar de su extremo carboxilo-terminal truncado, puede ser inhibido por el mismo grupo de moléculas polianiónicas que afectan al RPA-I.^{12,39-42}

Biosíntesis y reciclamiento del receptor pepenador clase A

La vía de biosíntesis y reciclamiento de los receptores bovino y murino expresados en células de ovario de hámster chino o células CHO (de sus siglas en inglés *chinese hamster ovary*),^{40,43} se muestra en la figura 4. Las subunidades del RPA recién sintetizadas son insertadas en la membrana del retículo endoplásmico rugoso (RER). En el lumen del RER, se genera una forma precursora del receptor en donde el dominio extracelular sufre una serie de cuatro modificaciones conformacionales covalentes.

Éstas incluyen *N*-glicosilación (unión covalente de carbohidratos de la cadena lateral de las glucoproteínas a residuos de asparagina, N), hidroxilación de prolina y lisinas en la región espaciadora y en la región hélice, formación de puentes disulfuro a través de los residuos de cisteína en la posición 83 en el dominio espaciador (dominio II), y la oligomerización de monómeros en trímeros. Después de su procesamiento por el RE, los trímeros precursores son transportados al y a través del aparato de Golgi (a la región de *trans-Golgi*) con ruta hacia la superficie celular. Durante este transporte se convierten en formas maduras por el procesamiento de sus *N*-oligosacáridos en cadenas complejas resistentes a *H*-endoglicosidasas. Desde la superficie, los receptores participan en la endocitosis de ligandos por la vía de pozos cubiertos de clatrina y vesículas endocíticas. Una vez endocitado, el complejo ligando-receptor se libera en el endosoma y el receptor puede ser reciclado para la captura e internalización de un nuevo ligando. La eficiencia en el procesamiento y transporte del receptor pepenador puede ser dependiente del tipo celular. La vía de endocitosis mediada por

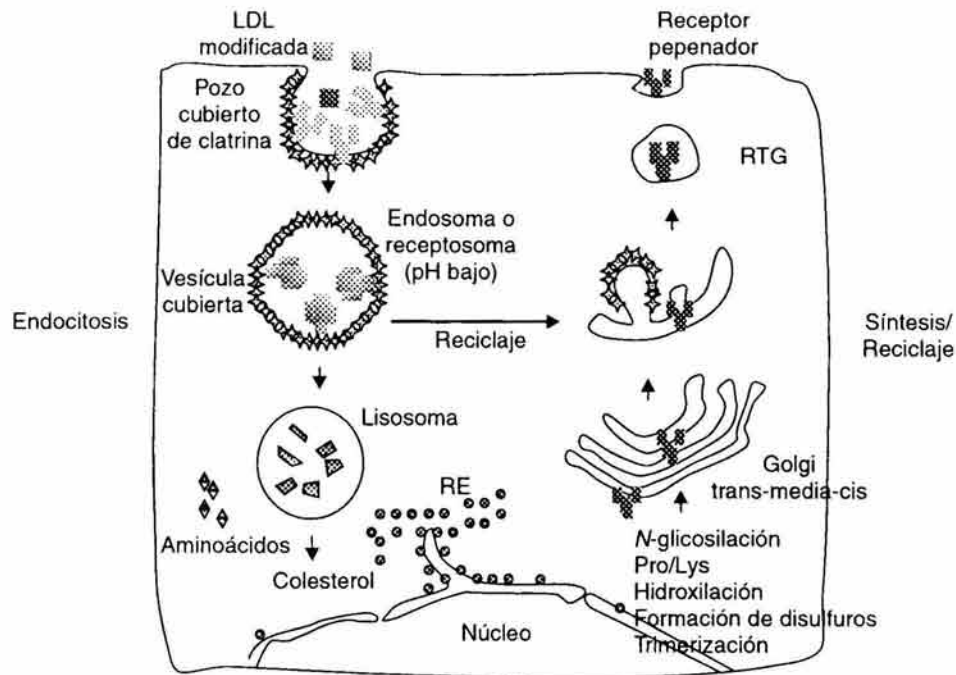


Figura 4. Biosíntesis y reciclamiento del receptor pepenador. El receptor pepenador es sintetizado como una proteína integral de membrana en el retículo endoplásmico (RE) en donde se modifica covalentemente por N-glicosilaciones e hidroxilaciones de residuos de prolina (Pro) y/o lisina (Lys). Asimismo, se asocian los trómeros a partir de la formación de puentes disulfuro entre los residuos de cisteína en la posición 83. Estos trómeros son transportados al aparato de Golgi (región trans-Golgi o RTG) para su procesamiento adicional y salida hacia la superficie membranal. La endocitosis mediada por receptor de ligandos como las LDLs modificadas químicamente ocurre vía formación de pozos cubiertos de clatrina.

receptor consiste en la unión de ligandos con una alta afinidad al receptor, la invaginación del complejo ligando-receptor a través de pozos cubiertos de una proteína llamada clatrina desde la superficie celular, y la formación de vesículas endocíticas cubiertas. Estas vesículas se convierten en endosomas y el pH bajo que existe en el lumen endosomal induce la disociación del complejo ligando-receptor con el consecuente reciclamiento del receptor a la superficie celular y digestión del ligando. Si el ligando es una LDL modificada, este proceso de endocitosis puede llevar a la acumulación masiva de colesterol y a la subsecuente conversión a células espumosas.^{7,40,43}

Participación del receptor pepenador clase A en la formación de la placa aterosclerótica

La característica principal en la enfermedad aterosclerótica es la acumulación de colesterol plasmático en las paredes de las arterias, formando las llamadas placas ateroscleróticas. Este proceso es inducido por niveles elevados de lipoproteínas aterogénicas como las LDL y VLDL en sangre.⁴⁴ La placa aterosclerótica es el resultado del depósito de macrófagos, detritos celulares, matriz extracelular, colesterol y ésteres de colesterol, por debajo de las células endoteliales arteriales. Los macrófagos y

células del músculo liso en estas placas se encuentran sobrecargadas de ésteres de colesterol, lo que les da aspecto de espuma al procesarse para verse al microscopio (las células espumosas son componentes celulares clave de estas placas). En forma general la formación de la placa aterosclerótica comienza con la adhesión de monocitos a la superficie luminal del endotelio y su subsecuente migración en el espacio subendotelial, donde los monocitos se diferencian en macrófagos.⁴⁵ Si los niveles plasmáticos de las LDL son altos, éstas pueden modificarse químicamente y ser reconocidas por el RPA de los macrófagos.^{46,27} Éstos pueden acumular grandes cantidades de colesterol de las lipoproteínas debido a un proceso de internalización no regulada a través del RPA y convertirse así en células espumosas.^{45,47,48} Procesos como la adhesión, y la interacción de estos macrófagos con otras células en la placa, tales como las células endoteliales, células del músculo liso u otros macrófagos, pueden ser mediados por el RPA. De igual forma el RPA participa en la eliminación de células apoptóticas en la lesión aterosclerótica.^{9,49,50} Es importante mencionar que no se ha definido aún si esta función de adhesión del RPA es proaterogénica o antiaterogénica. La importancia del RPA en las lesiones ateroscleróticas se ha entendido mejor en el laboratorio al momento de obtener ratones que carecen del gene para

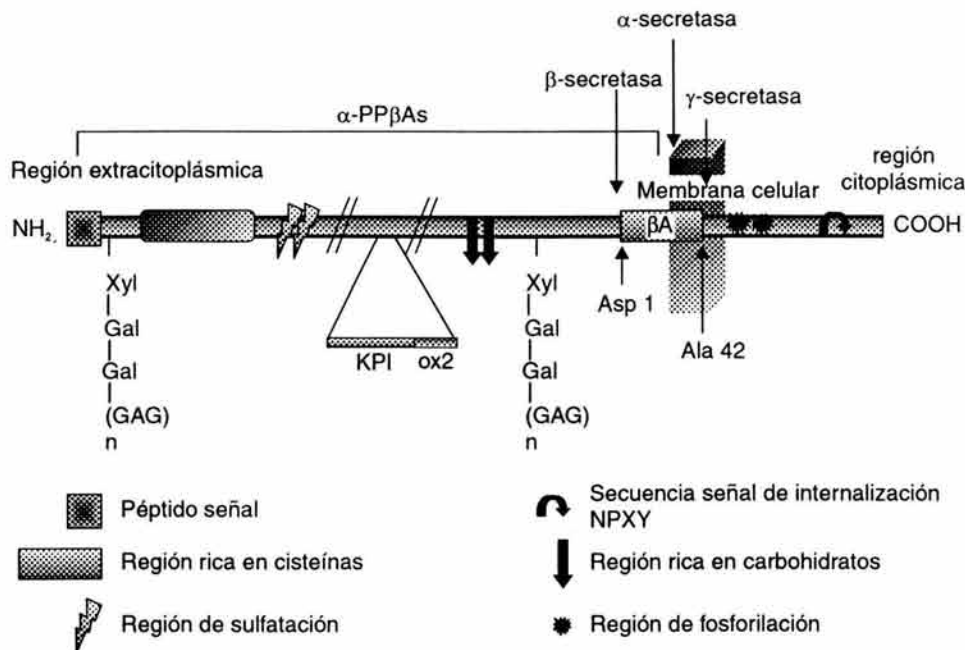


Figura 5. Estructura de la proteína precursora del β -amiloide. Se representa una de las isoformas largas de 770 aminoácidos, que se caracteriza por poseer la región parecida al inhibidor de proteasas tipo Kunitz (KPI). Los residuos 1 al 17 pertenecen a la secuencia del péptido señal en el extremo amino-terminal. Dos exones que codifican para dos regiones de 56 y 19 aminoácidos pueden ser alternativamente procesados e insertados en los residuos 289, el primero contiene el dominio KPI y el segundo contiene el dominio ox-2. Dos sitios de N-glicosilación (CHO) se encuentran en los residuos 542 y 571 respectivamente. Un solo dominio transmembranal (aminoácidos 700 al 723) cruza la membrana plasmática. El fragmento β A incluye 28 residuos del dominio extracelular y los primeros 12 a 14 aminoácidos del dominio transmembranal. El corte proteolítico hecho por una proteasa no conocida y designada como α -secretasa permite la salida de un gran ectodominio soluble de la proteína precursora (α -PPBAs) después del residuo 687, con la retención en la membrana celular, del fragmento carboxilo-terminal de 83 aminoácidos (~10 KDa). Dos cortes proteolíticos alternativos en los residuos 671 y 713 por enzimas no conocidas y denominadas como β -secretasa (Asp 1) y γ -secretasa (Ala 42) liberan el fragmento β A de 4 KDa. Esta última secretasa puede cortar en diversos residuos originando diversas formas del péptido β A que varían en tamaño desde 39 hasta 43 residuos de largo. Posee una secuencia de internalización mediada por receptor NPXY (asparagina-prolina-X-Y), también regiones ricas en residuos de cisteínas, una región de sulfatación (en el ectodominio) y una región de fosforilación en extremo carboxilo-terminal citoplásmico.

este receptor (knockout). Macrófagos residentes de Esta línea de ratones mostraron de un 80% a un 30% de reducción en la degradación de Ac-LDL y Ox-LDL, respectivamente.⁵¹

Regulación de la expresión génica del receptor pepenador clase A por Ox-LDL

Se ha reportado que las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (Ox-LDL)^{52,53} y la lisofosfatidilcolina,^{54,55} son capaces de inducir el crecimiento de macrófagos. Partículas Ox-LDL junto con M-CSF pueden modular positivamente la expresión del receptor PPAPR γ (miembro de la familia de receptores hormonales nucleares) e inhibir la activación del factor nuclear NF-KB disminuyendo la respuesta inflamatoria.^{55,56} Esta respuesta afecta la internalización de partículas Ox-LDL a través del RPA.⁵⁷ El PPAPR γ fue

identificado originalmente como un receptor nuclear relacionado en la diferenciación adipocítica y el control de la internalización lipídica celular.⁵⁸ Este receptor PPAPR γ también es capaz de unirse al receptor 9-cis del ácido retinoico (RXR) para formar el heterodímero PPAPR γ -RXR. En presencia de Ox-LDL y de LG268 (ligando específico para el RXR); este complejo también puede regular la expresión de los RNA mensajeros de los receptores RPA-I y CD36 en la línea celular THP-1 monocítica.⁵⁹ El hecho de que las partículas Ox-LDL puedan actuar como ligandos para el receptor PPAPR γ y que además puedan incrementar la síntesis del mismo receptor PPAPR γ así como del RP CD36, tiene importantes implicaciones para el desarrollo de las células espumosas en la aterosclerosis.⁶⁰ Por otro lado, las LDL oxidadas han sido identificadas como un agente que promueve la apoptosis en varios tipos celulares, entre los que se incluyen células

del músculo liso vascular, células endoteliales y macrófagos.^{10,61,62} El tratamiento *in vitro* de cultivos celulares que expresan el RPA con Ox-LDL mostró la activación de la proteasa de cisteínas caspasa-3, la cual actúa como un efector en la cascada río abajo de caspasas involucradas en la muerte celular. Sin embargo, no es claro si el RPA es quien modula directamente el efecto apoptótico de las Ox-LDLs. Otras LDLs modificadas, como las LDLs degradadas enzimáticamente también pueden inducir selectivamente la expresión de la proteína quimotáctica de monocitos tipo 1 y ejercer efectos citotóxicos en macrófagos humanos.

Amiloidosis

El término amiloide se usa para describir depósitos extracelulares de proteínas fibrilares asociados con alguna enfermedad. Estos depósitos hialinos se acumulan en distintos tipos de tejidos y se definen por sus propiedades morfológicas al ser teñidos con el colorante rojo "Congo".⁶³ Al microscopio se observa una birrefringencia positiva color rojo-verde bajo luz polarizada y muestran una estructura fibrilar cuando se observan bajo microscopio electrónico.⁶⁴ Se han descrito otros constituyentes comunes no fibrilares asociados a estos amiloides como los proteoglicanos: heparán sulfato, glicosaminoglicanos, componente P y apolipoproteína E (apoE).^{65,66} En las amiloidosis localizadas, la amiloidosis ocurre cerca o en el sitio de síntesis, mientras que en las amiloidosis sistémicas, los precursores se secretan, circulan y se depositan a distancia de su sitio de síntesis. Estas enfermedades amiloidóticas se caracterizan por el tipo de amiloide depositado y por ser de lenta aparición y del tipo degenerativo.⁶⁷ Aunque las proteínas amiloidogénicas son distintas en su secuencia de aminoácidos y estructura nativa, las fibrillas que forman son estructuralmente similares. Todas ellas tienen un diámetro de entre 5 y 13 nm son rígidas y no ramificadas.⁶⁸ Por estudios de difracción de rayos X, la estructura general es del tipo beta-plegada.⁶⁸ Las propiedades estructurales comunes implican mecanismos similares de fibrilización y características comunes en la patogénesis de las amiloidosis.⁶⁹ Varias de las proteínas amiloidogénicas se liberan de precursores por proteólisis. Se ha descrito que en dichos precursores ocurren mutaciones que propician el incremento de esta proteólisis, y esto tiene como consecuencia un incremento en los niveles del fragmento amiloidótico.⁶⁹

La formación fibrilar del amiloide ocurre por un mecanismo llamado de oligomerización, el cual depende de un proceso de nucleación,⁷⁰ donde un núcleo ordenado se forma únicamente dentro de una solución "supersaturada" que excede la concentración crítica de la proteína amiloidogénica. Después de la nucleación, el crecimiento de la fibra ocurre rápidamente. La adición de un núcleo preformado (o semilla) a una solución proteica supersaturada acelera la fibrilación comparada con el ensamble mismo de fibrillas en forma espontánea.⁷¹

Un total de 18 proteínas han sido identificadas claramente como precursoras de amiloides y se han asociado a alguna enfermedad humana.⁷² Mutaciones en los genes que codifican para estas proteínas precursoras producen enfermedades autosómicas dominantes.⁷² Las amiloidosis representan una clase de enfermedades caracterizadas por anomalías en la estructura secundaria de fragmentos de las proteínas precursoras, lo que da como resultado una disminución en su solubilidad bajo condiciones fisiológicas y que por lo tanto, se depositen en forma local.^{65,72,73} Entre algunas de las proteínas amiloides humanas se encuentran el péptido beta amiloide (β A) que se origina de la proteína precursora del β A y que se acumula en la enfermedad de Alzheimer (EA),⁷⁴ la proteína AprPsc que se origina de la proteína priónica y se acumula en las encefalopatías espongiiformes,⁷⁵ la prolactina amiloide que se origina de la prolactina y se acumula en prolactinomas y en padecimientos en el envejecimiento de la glándula pituitaria, la proteína transtiretina amiloide (ATTR) que se origina de la transtiretina y se acumula en la polineuropatía amiloidótica familiar,⁷⁶ la proteína amiloide A sérica (SAA), proteína de fase aguda y que se acumula en distintos tejidos, dándole el nombre general de amiloidosis de la proteína amiloide A sérica.⁷²

Implicaciones del receptor pepenador clase A en la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden cerebral que se presenta en personas de edad avanzada y que causa pérdida de la memoria y daño de las funciones cognitivas (habla y habilidades motoras). Una de las características patológicas principales es la presencia de las placas amiloides ó seniles que se forman extracelularmente en la materia gris.⁷⁷ Los componentes moleculares de las placas fueron identificados con precisión a mediados de los 80, a través de la purificación y secuenciación del péptido beta-amiloide (β A).⁷⁸ Este péptido β A de 4 KDa, se origina de una gran molécula precursora llamada proteína precursora del beta amiloide o PP- β A.⁷⁹ Esta PP- β A es miembro de una familia de proteínas muy parecidas entre sí que contienen en su secuencia al péptido de 4 KDa y se han denominado presenilinas 1 y 2.⁸⁰ La PP- β A es codificada por un solo gene en el cromosoma 21 y parece tener la forma de un receptor de membrana con un solo dominio transmembranal, un gran dominio extracelular (ectodominio) y un dominio corto citoplásmico⁸¹ (Figura 5). La familia de la PP- β A muestra una considerable heterogeneidad debido al procesamiento por edición y empalme alternativo de tres exones, y a modificaciones postraduccionales.⁸²⁻⁸⁴ La función de la PP- β A no se ha definido con exactitud, pero se sabe que es capaz de participar en la homeostasis sanguínea y la viabilidad celular.⁸⁵

El péptido β A está formado por los 28 residuos del ectodominio del precursor y los primeros 11-15 aminoáci-

dos de su dominio transmembranal.⁸⁶ La longitud del péptido β A tiene influencia sobre sus propiedades físicas.⁸³ Los péptidos con 42 y 43 aminoácidos son los más amiloidogénicos y frecuentemente se encuentran formando las placas seniles en la enfermedad de Alzheimer.⁸⁷ Se han propuesto 3 proteasas que procesan la proteína precursora. Éstas se han designado como α , β y γ -secretasas, y al parecer se encuentran en casi todos los tipos celulares, aunque aún no se conoce su identidad con precisión⁸⁸ (Figura 5). La α -secretasa corta a la mitad la secuencia del β A para generar un ectodominio soluble y un fragmento carboxilo-terminal asociado a la membrana, previniendo así la síntesis del péptido β A. La vía amiloidogénica involucra la actividad de la β -secretasa que precede a la γ -secretasa para generar el fragmento β A. Este proceso puede ocurrir en el retículo endoplásmico, aparato de Golgi o en la membrana celular. La actividad de γ -secretasa puede ocurrir en el RE, hasta en el Golgi o incluso en los endosomas. Se ha descrito que esta actividad depende de la función de la proteína presenilina 1. La regulación de esta γ -secretasa y su mecanismo de corte dentro de la membrana celular aún son de gran interés bioquímico.

La estructura del péptido β A es controlada por el ambiente de la membrana, el cual lo estabiliza con una estructura α hélice. Al ser liberado de la membrana el péptido β A, tiende a agregarse y a adquirir una estructura fibrilar β plegada (7.5-10 nm), altamente neurotóxica, que es capaz de producir respuestas inflamatorias en células de microglia, inhibir el crecimiento neurítico y activar la fosforilación de diversas proteínas.⁸⁹

Las células de microglia en el cerebro presentan características muy semejantes a las de los macrófagos. La microglia se activa en respuesta a daño, infección e inflamación del sistema nervioso central.⁹⁰⁻⁹² Esta microglia activa muestra actividad fagocítica y secreta varios factores, como lo son proteasas y agentes citotóxicos (como especies reactivas de oxígeno) que inducen la muerte neuronal.⁹²⁻⁹⁵ Varios trabajos han mostrado la presencia de microglia activa alrededor de las placas seniles en pacientes con la EA.^{92,96,97} Se sugiere que estas células pueden estar contribuyendo de forma directa al proceso de la amiloidosis. Se conoce que la microglia expresa al RPA y que estas células son capaces de unir, internalizar y degradar fibrillas β A a través de este receptor.^{98,99} Ligandos para el RPA compiten eficientemente con las partículas β A en ensayos celulares de unión.⁹⁶ El papel que juega el RPA en células de microglia no se conoce con exactitud, pero se propone que participa en la eliminación de las fibrillas más que en la formación de las placas seniles.¹⁰⁰⁻¹⁰³ En estudios *post mortem* se ha demostrado una alta expresión del RPA en microglia activa alrededor de las placas seniles, en pacientes con la EA.¹⁰⁴ Dado que esta microglia activa es la primera respuesta inflamatoria del cerebro y que se ha observado alrededor de las placas

amiloidóticas, se propone que las placas son sitios de inflamación crónica. Se conoce también que las fibrillas β A pueden activar a la microglia y propiciar la producción de mediadores proinflamatorios.^{105,106} El β A junto con el interferón, son capaces de activar la producción de especies reactivas de nitrógeno en cultivos de microglia y producir daño neuronal *in vitro*.

En los últimos años, un buen número de trabajos se han enfocado al estudio del papel que juega el exceso de la producción del péptido β A en la formación de las placas seniles en cerebros de pacientes con la EA.¹⁰⁷⁻¹¹⁰ El depósito y acumulación amiloidótica no dependen solamente de la síntesis del β A, sino también de su eliminación. Quizás el exceso en la producción del péptido va más allá de la capacidad de la microglia para eliminarlo. Es probable que este proceso dependa de varios factores que estén regulando la actividad del receptor bajo condiciones específicas no adecuadas para que el RPA pueda internalizar el péptido.⁹⁶

Se ha observado que en cultivos celulares el RPA media la adhesión de la microglia a superficies cubiertas con fibrillas β A así como su internalización, dando la posibilidad de que el RPA esté involucrado en la eliminación de β A en el cerebro.^{96,111,112} El papel potencial del RPA en la neurodegeneración se ha propuesto a partir de estudios que muestran que la exposición de β A lleva a la activación de células de microglia en cultivo y a la salida de neurotoxinas, como especies reactivas de oxígeno y aminos neurotóxicas.¹¹³ Estos efectos pueden ser mediados en parte por interacciones entre el β A y el RPA.¹¹⁴ Se conoce que el β A daña las neuronas directamente más que indirectamente por su efecto en la activación de la microglia. Este efecto se debe a que las fibrillas β A son tóxicas por sí mismas, aunque no se descarta que el β A induzca neurotoxicidad vía otros mecanismos. Si bien el péptido β A, componente principal de las placas amiloidóticas juega un papel importante en la patogénesis de la EA, aún no se ha dilucidado si existe una relación causal entre la acumulación de β A con la degeneración neuronal que acompaña a la enfermedad de Alzheimer. Dos teorías no mutuamente excluyentes se han desarrollado para tratar de entender los efectos neurotóxicos de β A: una se relaciona con el efecto directo y la otra con el efecto indirecto de la acción del β A. De acuerdo a la primera, el β A causa un daño neuronal directo, posiblemente por la inducción de estrés oxidativo y/o cambios en la homeostasis del calcio intracelular.¹¹⁵ La segunda considera que β A activa vías de respuestas inflamatorias en el cerebro, las cuales tienen un efecto negativo sobre la sobrevivencia neuronal.¹¹⁶⁻¹¹⁸ Estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que β A puede participar en la producción de especies potencialmente dañinas como intermediarios de oxígeno o nitrógeno y citocinas proinflamatorias, en monocitos periféricos, células monocitoides y microglia, todas ellas per-

tenecientes al linaje de fagocitos mononucleares.¹¹⁷⁻¹¹⁹ Más aún, la exposición al β A activa fagocitos mononucleares, un efecto que puede ser bloqueado por sustancias anti-inflamatorias. Mientras que la activación de los fagocitos por β A puede iniciar un proceso citotóxico en el cerebro de pacientes con la EA, tanto la naturaleza de la interacción fagocitos- β A, como el mecanismo que los relaciona con la destrucción del tejido neural, también quedan por ser dilucidados. Sin embargo, existe una relación cercana entre los fagocitos y el péptido β A en las placas seniles, acoplada con la habilidad de estas células para unir e internalizar β A, lo que sugiere que receptores específicos puedan estar relacionados con la interacción fagocito- β A.

Apolipoproteína E

La apolipoproteína E (apoE) es la apolipoproteína asociada con partículas lipoproteicas como las VLDLs, los quilomicrones y las HDLs.^{120,121} La apoE participa en el transporte de lípidos entre diferentes células y tejidos a través del reconocimiento y unión de las lipoproteínas a receptores celulares, como el receptor a LDL (o receptor apo-B, E) y la proteína relacionada al receptor de LDL (LRP). La apoE es una proteína de 299 aminoácidos con un peso molecular de 34 KDa que contiene múltiples hélices anfipáticas.^{122,123} El dominio carboxilo-terminal se ha descrito como el sitio de unión a lípidos, debido a su hidrofobicidad.¹²⁴ Este fragmento carboxilo-terminal recombinante tiende a agregarse en fibrillas tipo amiloide.¹²⁵ El dominio amino-terminal (residuos 136-160) es rico en aminoácidos básicos, y se ha descrito como el sitio de unión al receptor.¹²⁶ El gene de la apoE se localiza en el cromosoma 19 y tiene tres alelos en el humano (E2, E3 y E4).¹²⁷ Cada alelo da como resultado tres isoformas que difieren en residuos de aminoácidos. La apoE2 tiene cisteínas en los residuos 112 y 158, la apoE3 presenta una cisteína en la posición 112 y una arginina en la 158, y la apoE4 tiene arginina en ambas posiciones.^{128,129} Las diferencias en la unión al receptor de cada una de las distintas isoformas afectan el metabolismo y eliminación de las lipoproteínas.² La apoE3 es el alelo más común que se encuentra en la población en general, la apoE2 se ha asociado con la hiperlipoproteinemia tipo III, la cual se caracteriza por un defecto en la unión al receptor.¹³⁰ La herencia del alelo E4 muestra una unión al receptor normal pero se asocia a niveles elevados de colesterol y LDL,^{130,131} y aumenta la susceptibilidad a desarrollar la forma esporádica y familiar tardía de la enfermedad de Alzheimer.¹³² La apoE es sintetizada en muchos órganos, pero la mayor cantidad se produce en el hígado y cerebro.¹³³ La producción de apoE es modulada por el estado de activación de los macrófagos, así también, su síntesis y secreción puede ser inducida a niveles altos por macrófagos peritoneales de ratón incubados con colesterol.¹³⁴ En cerebro, los astrocitos y los

oligodendrocitos son los encargados de su síntesis.¹³⁵ Las HDL son las únicas lipoproteínas presentes en fluido cerebro espinal que contienen a la apoE además de la apoA-I.¹³³

Entre las funciones que se le han atribuido a la apoE está la del transporte de colesterol y lípidos para la reparación celular en sitios donde existe daño neuronal.¹³⁵ La apoE también juega un papel neurotrófico a través de promover el crecimiento neurítico,¹³⁷ el cual puede modular la respuesta inflamatoria inducida por daño cerebral, suprimiendo la activación glial y la secreción de citocinas inflamatorias y de óxido nítrico.¹³⁸ Todas estas funciones se han asociado con el tipo de la isoforma presente. La apoE oxidada interacciona con el péptido β A, modulando la formación fibrilar y la agregación del péptido β A en forma dependiente del tipo de la isoforma presente (E4>E3>E2).¹³⁹

Otras funciones en las que participa el RPA

Defensa del hospedero

Como parte del sistema inmune, los macrófagos reconocen y eliminan moléculas desnaturalizadas, microorganismos patógenos, tejido dañado y células apoptóticas a través de su sistema "pepenador" o "scavenger". El RPA puede unir y degradar diversos microorganismos circulantes, en defensa del organismo. El RPA es capaz de unir bacterias gram negativas a través del lípido A, y su precursor el lípido IV_A. Este precursor es constituyente del lipopolisacárido (LPS) presente en la superficie de estas bacterias, lo que estimula a los macrófagos y puede provocar choque endotóxico. El RPA también es capaz de unir bacterias gram positivas a través del ácido lipoteicoico (LTA). Entre estas bacterias se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Lysteria monocytogenes*.^{11,140,141}

Funciones en inmunidad innata

El RPA participa en el proceso de eliminación microbiana, así como en la activación del sistema inmune adaptativo a través de la internalización de antígenos y/o en el procesamiento (maleinización) y presentación de células B ó T. El RPA también participa en el transporte de monocitos de sangre periférica hacia tejidos infectados, un proceso que requiere de la extravasación de estas células a través de las células endoteliales vasculares. El mismo factor estimulante de macrófagos (M-CSF) que induce la diferenciación de monocitos a macrófagos y se libera bajo condiciones de inflamación, puede regular positivamente la expresión y adhesión celular a través del RPA-I y II.¹⁴²⁻¹⁴⁴

Adhesión celular

La participación del RPA en la adhesión celular *in vitro* ha sido ampliamente estudiada en macrófagos muri-

nos.^{142,145,146} Se conoce que RPA permite la adhesión de macrófagos incluso en secciones de tejido congelado de diferentes órganos, linfoides y no linfoides. También se ha mostrado que los linfocitos B activados son capaces de adherirse a células CHO transfectadas con el RPA. Este mismo papel de adhesión a placas de cultivo se ha demostrado en células Kupffer activadas con ésteres de forbol.^{147,148} La adhesión de macrófagos a membranas basales de colágena IV modificadas por glucosa ha adquirido relevancia, debido a que el RPA también es capaz de adherir células de microglia a superficies cubiertas con fibrillas del péptido beta amiloide (β A), con la producción de especies reactivas de oxígeno e inmovilización celular.^{98,99} Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la interacción entre el RPA y las fibrillas β A depende solamente de la forma fibrilar del β A (β A25-35) y no así con respecto a la forma no fibrilar (β A35-25). Se demostró que la adhesión de estas células gliales y macrófagos peritoneales de ratón es dependiente de la concentración del péptido β A. Estudios de competencia mostraron que ligandos para el RPA compiten por la unión de las fibrillas β A al RPA, además de que bloquean la adhesión de células gliales y macrófagos a las superficies cubiertas con las fibrillas. De forma interesante, estos mismos efectos se observaron cuando se llevaron a cabo estudios de adhesión utilizando células de hámster chino (CHO) transfectadas con el gene para el RPA. Entre los ligandos que se han descrito para el RPA se encuentra la región del ectodominio de la PP- β A. Esta PP- β A α (originada del corte proteolítico con la α -secretasa) es prácticamente un proteoglicano condroitín sulfato, el cual, al ser digerido con condroitinasa, pierde la capacidad de ser reconocido por el RPA.¹⁵⁰ Esta PP- β A también compite por la unión al RPA e inhibe la adhesión celular a las superficies cubiertas con las fibrillas β A, no siendo así cuando esta PP- β A es digerida con condroitinasa A, indicando que las cargas negativas son importantes para su reconocimiento por el RPA.¹⁴⁹⁻¹⁵¹ La presencia de la PP- β A en los medios de cultivo, inhibió de forma importante la adhesión, y la producción de radicales libres.

Conclusiones

En los últimos años se ha acumulado una buena cantidad de evidencia, en donde procesos fisiopatológicos aparentemente distantes como la aterosclerosis, la enfermedad de Alzheimer y la cirrosis hepática tienen puntos de encuentro. Por ejemplo, cada una de estas enfermedades se ha relacionado con la amiloidosis en el amplio sentido de la palabra. En el año de 1994 nuestro grupo de trabajo describió un proteoglicano secretado por plaquetas humanas (PDMBP de sus siglas en inglés *platelet-derived macrophage binding proteoglycan*) que presenta la capacidad de bloquear al receptor pepenador de macrófagos y

células endoteliales con implicaciones directas en la génesis de la placa aterosclerótica. En forma por demás interesante, este año hemos descrito que el proteoglicano PDMBP, comprende en un 100% a la proteína Nexina-II. Esta proteína se forma como resultado de un corte proteolítico del tipo no amiloidótico de la molécula completa. Esta proteína Nexina-II corresponde al precursor del β -amiloide, molécula directamente relacionada con la destrucción de células gliales y neuronales, y por lo tanto, con la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Con este fundamento, consideramos que el conocer en detalle cómo interacciona este proteoglicano o los péptidos producidos a partir de éste con el receptor pepenador será de enorme utilidad en la modulación del RPA. Tomando en cuenta que en general los procesos amiloidóticos cursan con un grado avanzado de estrés oxidativo, el conocer cómo PDMBP/Nexina-II y péptidos diseñados a partir de su estructura básica regulan la internalización del β -amiloide, causante directo de este estrés, será de enorme valía en la búsqueda de mecanismos que contrarresten el efecto negativo directo del estrés oxidativo sobre el metabolismo celular.

Referencias

1. **Alaupovic P, Lee DM, McConathy J.** Studies on the composition and structure of plasma lipoproteins. Distribution of lipoprotein families in major density classes of normal human plasma lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1972;260:689-707.
2. **Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH.** Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* 1984;25:1277-94.
3. **Havel RJ.** The formation of LDL: mechanisms and regulation. *J Lipid Res*, 1984; 25:1570-1576.
4. **Scanu AM, Lagocki P, Chung J.** Effect of apolipoprotein A-II on the structure of high-density lipoproteins: relationship to the activity of lecithin: cholesterol acyl transferase *in vitro*. *Ann NY Acad Sci* 1980;348:160-73.
5. **Goldstein JL, Brown MS.** Atherosclerosis and its complications: contributions from the Association of American Physicians, 1886-1986. *Trans Assoc Am Physicians* 1986;99:CCXXXI-CCXLVII.
6. **Goldstein JL, Brown MS.** The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1977;46:897-930.
7. **Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS.** Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:333-7.
8. **Goldstein JL, Anderson RG, Brown MS.** Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature* 1979;279:679-85.
9. **Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL.** Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320:915-24.
10. **Steinberg D.** Low density lipoprotein oxidation and its pathological significance. *J Biol Chem* 1997;272:20963-6.
11. **Krieger M.** The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr Opin Lipidol* 1997;8:275-80.

12. Hampton RY, Golenbock DT, Penman M, Krieger M, Raetz CR. Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature* 1991;352:342-4.
13. Naito M, Kodama T, Matsumoto A, Doi T, Takahashi K. Tissue distribution, intracellular localization, and *in vitro* expression of bovine macrophage scavenger receptors. *Am J Pathol* 1991;39:1411-23.
14. Naito M, Suzuki H, Mori T, Matsumoto A, Kodama T, Takahashi K. Coexpression of type I and type II human macrophage scavenger receptors in macrophages of various organs and foam cells in atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1992;141:591-9.
15. Hughes DA, Fraser IP, Gordon S. Murine macrophage scavenger receptor: *in vivo* expression and non-function as receptor for macrophage adhesion in lymphoid and lymphoid organs. *Eur J Immunol* 1995;25:466-73.
16. Geng YJ, Hansson GK. High endothelial cells of postcapillary venules express the scavenger receptor in human peripheral lymph nodes. *Scand J Immunol* 1995;42:289-96.
17. Gough PJ, Greaves DR, Suzuki H, Hakkinen T, Hiltunen MO, Turunen M, Herttuala SY, Kodama T, Gordon S. Analysis of macrophage scavenger receptor (SR-A) expression in human aortic atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:461-71.
18. de Villiers WJ, Fraser IP, Gordon S. Cytokine and growth factor regulation of macrophage scavenger receptor expression and function. *Immunol Lett* 1994;43:73-9.
19. de Villiers WJ, Fraser IP, Hughes DA, Doyle AG, Gordon S. Macrophage-colony-stimulating factor selectively enhances macrophage scavenger receptor expression and function. *J Exp Med* 1994;180:705-9.
20. Bottalico LA, Wager RE, Agellon LB, Assoian RK, Tabas I. Transforming growth factor-beta 1 inhibits scavenger receptor activity in THP-1 human macrophages. *J Biol Chem* 1991;266:22866-71.
21. Hsu HY, Nicholson AC, Hajjar DP. Inhibition of macrophage scavenger receptor activity by tumor necrosis factor-alpha transcriptionally and post-transcriptionally regulated. *J Biol Chem* 1996;271:7767-73.
22. Geng YJ, Hansson GK. Interferon-gamma inhibits scavenger receptor expression and foam cell formation in human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest* 1992;89:1322-30.
23. Moulton KS, Semple K, Wu H, Glass CK. Cell-specific expression of the macrophage scavenger receptor gene is dependent on PU.1 and a composite AP-1/ETS motif. *Mol Cell Biol* 1994;14:4408-18.
24. Mietus-Snyder M, Glass CK, Pitas RE. Transcriptional activation of scavenger receptor expression in human smooth muscle cells requires AP-1/c-Jun and C/EBP beta: both AP-1 binding and JNK activation are induced by phorbol esters and oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1440-9.
25. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998;391:79-82.
26. Ashkenas J, Penman M, Vasile E, Acton S, Freeman M, Krieger M. Structures and high and low affinity ligand binding properties of murine type I and type II macrophage scavenger receptors. *J Lipid Res* 1993;34:983-1000.
27. Matsumoto A, Naito M, Itakura H, Ikemoto S, Asaoka H, Hayakawa L, Kanamori H, Aburatani H, Takaku F, Suzuki H, et al. Human macrophage scavenger receptors: primary structure, expression, and localization in atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9133-7.
28. Bickel PE, Freeman MW. Rabbit aortic smooth muscle cells express inducible macrophage scavenger receptor messenger RNA that is absent from endothelial cells. *J Clin Invest* 1992;90:1450-7.
29. Emi M, Asaoka H, Matsumoto A, Itakura H, Kurihara Y, Wada Y, Kanamori H, Yazaki Y, Takahashi E, Lepert M, et al. Structure, organization, and chromosomal mapping of the human macrophage scavenger receptor gene. *J Biol Chem* 1993;268:2120-5.
30. Gough PJ, Greaves DR, Gordon S. A naturally occurring isoform of the human macrophage scavenger receptor (SR-A) gene generated by alternative splicing blocks modified LDL uptake. *J Lipid Res* 1998;39:531-43.
31. Geng YJ, Holm J, Nygren S, Bruzelius M, Stemme S, Hansson GK. Expression of the macrophage scavenger receptor in atheroma. Relationship to immune activation and the T-cell cytokine interferon-gamma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1995-2002.
32. Kodama T, Freeman M, Rohrer L, Zabrecky J, Matsudaira P, Krieger M. Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature* 1990;343:531-5.
33. Krieger M, Herz J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* 1994;63:601-37.
34. Krieger M, Acton S, Ashkenas J, Pearson A, Penman M, Resnick D. Molecular flypaper, host defense, and atherosclerosis. Structure, binding properties, and functions of macrophage scavenger receptors. *J Biol Chem* 1993;268:4569-72.
35. Morimoto K, Wada Y, Hinagata J, Imanishi T, Kodama T, Doi T. Cytoplasmic domain of macrophage scavenger receptors mediates internalization and cell-surface expression. *Biol Pharm Bull* 1999;22:1022-6.
36. Cohen C, Parry DA. Alpha-helical coiled coils and bundles: how to design an alpha-helical protein. *Proteins* 1990;7:1-15.
37. Miller EJ, Gay S. The collagens: an overview and update. *Methods Enzymol* 1987;144:3-41.
38. Freeman M, Ashkenas J, Rees DJ, Kingsley DM, Copeland NG, Jenkins NA, Krieger M. An ancient, highly conserved family of cysteine-rich protein domains revealed by cloning type I and type II murine macrophage scavenger receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:8810-4.
39. Dejager S, Mietus-Snyder M, Frier A, Pitas RE. Dominant negative mutations of the scavenger receptor. Native receptor inactivation by expression of truncated variants. *J Clin Invest* 1993;92:894-902.
40. Rohrer L, Freeman M, Kodama T, Penman M, Krieger M. Coiled-coil fibrous domains mediate ligand binding by macrophage scavenger receptor type II. *Nature* 1990;343:570-2.
41. Freeman M, Ekkel Y, Rohrer L, Penman M, Freedman NJ, Chisolm GM, Krieger M. Expression of type I and type II bovine scavenger receptors in Chinese hamster ovary cells: lipid droplet accumulation and nonreciprocal cross competition by acetylated and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4931-5.
42. Ottnad E, Via DP, Frubis J, Sinn H, Friedrich E, Ziegler R, Dresel HA. Differentiation of binding sites on reconstituted hepatic scavenger receptors using oxidized low-density lipoprotein. *Biochem J* 1992;281(Pt 3):745-51.
43. Penman M, Lux A, Freedman NJ, Rohrer L, Ekkel Y, McKinstry H, Resnick D, Krieger M. The type I and type II bovine scavenger receptors expressed in Chinese VXFDF in their efficient hamster ovary cells are trimeric proteins with collagenous triple helical domains comprising noncovalently associated monomers and Cys83-disulfide-linked dimers. *J Biol Chem* 1991;266:23985-93.

44. **Tamminen M, Mottino G, Qiao JH, Breslow JL, Frank JS.** Ultrastructure of early lipid accumulation in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:847-53.
45. **Ross R.** The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s *Nature* 1993;362:801-9.
46. **Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D.** Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 1989;84:1086-95.
47. **Goldstein JL, Ho YK, Brown MS, Innerarity TL, Mahley RW.** Cholesteryl ester accumulation in macrophages resulting from receptor-mediated uptake and degradation of hypercholesterolemic canine beta- very low density lipoproteins *J Biol Chem* 1980;255:1839-48.
48. **Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Cynshi O, Wada Y, Honda M, Kurihara H, Aburatani H, Doi T, Matsumoto A, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Kodama T, et al.** A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 1997;386:292-6.
49. **Freeman MW.** Scavenger receptors in atherosclerosis. *Curr Opin Hematol* 1997;4:41-7.
50. **Steinbrecher UP.** Receptors for oxidized low density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1999;1436: 279-98.
51. **Van Berkel TJ, Van Velzen A, Kruijt JK, Suzuki H, Kodama T.** Uptake and catabolism of modified LDL in scavenger-receptor class A type I/II knock-out mice. *Biochem J* 1998;331(Pt 1):29-35.
52. **Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D.** Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:6499-503.
53. **Hakamata H, Miyazaki A, Sakai M, Sakamoto YI, Horiuchi S.** Cytotoxic effect of oxidized low density lipoprotein on macrophages. *J Atheroscler Thromb* 1998;5:66-75.
54. **Parthasarathy S, Fong LG, Otero D, Steinberg D.** Recognition of solubilized apoproteins from delipidated, oxidized low density lipoprotein (LDL) by the acetyl-LDL receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:537-40.
55. **Bird DA, Gillotte KL, Horkko S, Friedman P, Dennis EA, Witztum JL, Steinberg D.** Receptors for oxidized low-density lipoprotein on elicited mouse peritoneal macrophages can recognize both the modified lipid moieties and the modified protein moieties: implications with respect to macrophage recognition of apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6347-52.
56. **Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM.** Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 1998;93:229-40.
57. **Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM.** PPARgamma promotes monocyte-macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 1998;93:241-52.
58. **Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK.** Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:7614-9.
59. **De Kimpe SJ, Anggard EE, Carrier EJ.** Reactive oxygen species regulate macrophage scavenger receptor type II but not type I, in the human monocytic cell line THP-1. *Mol Pharmacol* 1998;53:107-82.
60. **Han CY, Park SY, Pak YK.** Role of endocytosis in the transactivation of nuclear factor-kappaB by oxidized low-density lipoprotein. *Biochem J* 2000;350 Pt 3:829-37.
61. **Yang X.** Oxidized low density lipoproteins alter macrophage lipid uptake, apoptosis, viability and nitric oxide synthesis. *J Nutr* 1996;126(4 Suppl):1072S-5S.
62. **Hodis HN, Kramsch DM, Avogaro P, Bittolo-Bon G, Cazzolato G, Hwang J, Peterson H, Sevanian A.** Biochemical and cytotoxic characteristics of an *in vivo* circulating oxidized low density lipoprotein (LDL-). *J Lipid Res* 1994;35:669-77.
63. **Chiti F, Webster P, Taddei N, Clark A, Stefani M, Ramponi G, Dobson CM, et al.** Designing conditions for *in vitro* formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3590-4.
64. **Eanes ED, Glenner GG.** X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J Histochem Cytochem* 1968;16:673-7.
65. **Glenner GG.** Amyloid deposits and amyloidosis. The beta-fibrilloses (first of two parts). *N Engl J Med* 1980;302:1283-92.
66. **Glenner GG.** Amyloid deposits and amyloidosis: the beta-fibrilloses (second of two parts). *N Engl J Med* 1980;302:1333-43.
67. **Lansbury PT.** Evolution of amyloid: what normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3342-4.
68. **Sunde M, Blake C.** The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Adv Protein Chem* 1997;50:123-59.
69. **Kelly JW.** Alternative conformations of amyloidogenic proteins govern their behavior. *Curr Opin Struct Biol* 1996;6:11-7.
70. **Teplow DB.** Structural and kinetic features of amyloid beta-protein fibrillogenesis. *Amyloid* 1998;5:121-42.
71. **Rochet JC, Lansbury PT.** Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Curr Opin Struct Biol* 2000;10:60-8.
72. **Buxbaum JN, Tagoe CE.** The genetics of the amyloidoses. *Annu Rev Med* 2000;51:543-69.
73. **Westermarck P, Araki S, Benson MD, Cohen AS, Frangione B, Masters CL, Saraiva MJ, Sipe JD, Husby G, Kyle RA, Selkoe D.** Nomenclature of amyloid fibril proteins. Report from the meeting of the International Nomenclature Committee on Amyloidosis, August 8-9, 1998. Part 1. *Amyloid* 1999;6:63-6.
74. **Levy-Lahad E, Wasco W, Roorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, et al.** Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 1995;269:973-7.
75. **Goldfarb LG, Brown P.** The transmissible spongiform encephalopathies. *Annu Rev Med* 1995;46:57-65.
76. **Saraiva MJ, Birken S, Costa PP, Goodman DS.** Family studies of the genetic abnormality in transthyretin (prealbumin) in Portuguese patients with familial amyloidotic polyneuropathy. *Ann NY Acad Sci* 1984;435:86-100.
77. **Selkoe DJ.** The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 1991;6:487-98.
78. **Glenner GG, Wong CW.** Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;120:885-90.
79. **Gandy S, Greengard P.** Processing of Alzheimer A beta-amyloid precursor protein: cell biology, regulation, and role in Alzheimer's disease. *Int Rev Neurobiol* 1994;36:29-50.
80. **Selkoe DJ.** The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 1998;8:447-53.
81. **Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B.** The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 1987;325:733-6.

82. **Rockenstein EM, McConlogue L, Tan H, Power M, Masliah E, Mucke L.** Levels and alternative splicing of amyloid beta protein precursor (APP) transcripts in brains of APP transgenic mice and humans with Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 1995;270:28257-67.
83. **Haass C, Selkoe DJ.** Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell* 1993;75:1039-42.
84. **Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, et al.** Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 1992;359:322-5.
85. **Mattson MP.** Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* 1997;77:1081-132.
86. **Busciglio J, Gabuzda DH, Matsudaira P, Yankner BA.** Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:2092-6.
87. **Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Oltersdorf T, Teplow DB, Selkoe DJ.** Normal cellular processing of the beta-amyloid precursor protein results in the secretion of the amyloid beta peptide and related molecules. *Ann NY Acad Sci* 1993;695:109-16.
88. **Milis J, Reiner PB.** Regulation of amyloid precursor protein cleavage. *J Neurochem* 1999;72:443-60.
89. **McLaurin J, Yang D, Yip CM, Fraser PE.** Review: modulating factors in amyloid-beta fibril formation. *J Struct Biol* 2000;130:259-70.
90. **Graeber MB, Streit WJ.** Microglia: immune network in the CNS. *Brain Pathol* 1990;1:2-5.
91. **Perry VH, Gordon S.** Macrophages and the nervous system. *Int Rev Cytol* 1991;125:203-44.
92. **Giulian D.** Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system. *J Neurosci Res* 1987;18:155-71.
93. **Boje KM, Arora PK.** Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen species mediate neuronal cell death. *Brain Res* 1992;587:250-8.
94. **Colton CA, Gilbert DL.** Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett* 1987;223:284-8.
95. **Streit WJ.** The role of microglia in brain injury. *Neurotoxicology* 1996;17:671-8.
96. **Araujo DM, Cotman CW.** Beta-amyloid stimulates glial cells *in vitro* to produce growth factors that accumulate in senile plaques in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1992;569:141-5.
97. **Christie RH, M. Freeman, Hyman BT.** Expression of the macrophage scavenger receptor, a multifunctional lipoprotein receptor, in microglia associated with senile plaques in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1996;148:399-403.
98. **Paresce DM, Ghosh RN, Maxfield FR.** Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron* 1996;17:553-65.
99. **El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Cao L, Silverstein SC, Loike JD.** Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature* 1996;382:716-9.
100. **Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C, et al.** Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 1992;359:325-7.
101. **Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B, et al.** Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* 1992;258:126-9.
102. **Haass C, Hung AY, Selkoe DJ.** Processing of beta-amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localization over constitutive secretion. *J Neurosci* 1991;11: 3783-93.
103. **McGeer PL, Akiyama H, Kawamata T, Yamada T, Walker DG, Ishii T.** Immunohistochemical localization of beta-amyloid precursor protein sequences in Alzheimer and normal brain tissue by light and electron microscopy. *J Neurosci Res* 1992;31:428-42.
104. **Iwatsubo T, Saldo TC, Mann DM, Lee VM, Trojanowski JQ.** Full-length amyloid-beta (1-42(43)) and amino-terminally modified and truncated amyloid-beta 42(43) deposit in diffuse plaques. *Am J Pathol* 1996;149:1823-30.
105. **Bianca VD, Dusi S, Bianchini E, Dal Pra I, Rossi F.** Beta-Amyloid activates the O-2 forming NADPH oxidase in microglia, monocytes, and neutrophils. A possible inflammatory mechanism of neuronal damage in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 1999;274:15493-9.
106. **Janciauskiene S, Wright HT, Lindgren S.** Fibrillar Alzheimer's amyloid peptide Abeta(1-42) stimulates low density lipoprotein binding and cell association, free radical production and cell cytotoxicity in PC12 cells. *Neuropeptides* 1999;33:510-6.
107. **Yankner BA, Mesulam MM.** Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. beta-Amyloid and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 1991;325:1849-57.
108. **Selkoe DJ.** Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein. *Annu Rev Neurosci* 1994;17:489-517.
109. **Iversen LL, Mortishire-Smith RJ, Pollack SJ, Shearman MS.** The toxicity *in vitro* of beta-amyloid protein. *Biochem J* 1995;311(Pt 1): 1-16.
110. **Hardy J.** Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 1997;20:154-9.
111. **Chung H, Brazil MI, Irizarry MC, Hyman BT, Maxfield FR.** Uptake of fibrillar beta-amyloid by microglia isolated from MSR-A (type 1 and type II) knockout mice. *Neuroreport* 2001;12:1151-4.
112. **Ard MD, Cole GM, Wei J, Mehrle AP, Fratkin JD.** Scavenging of Alzheimer's amyloid beta-protein by microglia in culture. *J Neurosci Res* 1996;43:190-202.
113. **Yankner BA.** The pathogenesis of Alzheimer's disease. Is amyloid beta-protein the beginning or the end? *Ann NY Acad Sci* 2000;924:26-8.
114. **Huang F, Buttini M, Wyss-Coray I, McConlogue L, Kodama T, Pitas RE, Mucke L.** Elimination of the class A scavenger receptor does not affect amyloid plaque formation or neurodegeneration in transgenic mice expressing human amyloid protein precursors. *Am J Pathol* 1999;155:1741-7.
115. **Hensley K, Carney JM, Mattson MP, Aksenova M, Harris M, Wu JF, Floyd RA, Butterfield DA.** A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3270-4.
116. **Mattson MP, Barger SW, Cheng B, Lieberburg I, Smith-Swintosky VL, Rydel RE.** beta-Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 1993;16:409-14.
117. **Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L Jr, Baron P, Villalba M, Ferrari D, Rossi F.** Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* 1995;374:647-50.
118. **Klegeris A, Walker DG, McGeer DL.** Activation of macrophages by Alzheimer beta amyloid peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;199:984-91.

119. **McDonald DR, Brunden KR, Landreth GE.** Amyloid fibrils activate tyrosine kinase-dependent signaling and superoxide production in microglia. *J Neurosci* 1997;17:2284-94.
120. **Mahley RW.** Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988;240:622-30.
121. **Mahley RW, Ji ZS.** Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res* 1999;40:1-16.
122. **Segrest JP, Garber DW, Brouillette CG, Harvey SC, Anantharamaiah GM.** The amphipathic alpha helix: a multifunctional structural motif in plasma apolipoproteins. *Adv Protein Chem* 1994;45:303-69.
123. **Weisgraber KH.** Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv Protein Chem* 1994;45:249-302.
124. **Wisniewski T, Lalowski M, Golabek A, Vogel T, Frangione B.** Is Alzheimer's disease an apolipoprotein E amyloidosis? *Lancet* 1995;345:956-8.
125. **Wetterau JR, Aggerbeck LP, Raúl SC Jr, Weisgraber KH.** Human apolipoprotein E: in aqueous solution. I. Evidence for two structural domains. *J Biol Chem* 1988;263:6240-8.
126. **Aggerbeck LP, Wetterau JR, Weisgraber KH, Wu CS, Lindgren FT.** Human apolipoprotein E: in aqueous solution. II. Properties of the amino- and carboxyl-terminal domains. *J Biol Chem* 1988;263:6249-58.
127. **Olaisen B, Teisberg P, Gedde-Dahl T Jr.** The locus for apolipoprotein E (apoE) is linked to the complement component C3 (C3) locus on chromosome 19 in man. *Hum Genet* 1982;62:233-6.
128. **Rall SC Jr, Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW.** Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:4696-700.
129. **Rall SC Jr, Weisgraber KH, Mahley RW.** Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 1982;257:4171-8.
130. **Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW.** Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J Biol Chem* 1982;257:2518-21.
131. **Dong LM, Weisgraber KH.** Human apolipoprotein E4 domain interaction. Arginine 61 and glutamic acid 255 interact to direct the preference for very low density lipoproteins. *J Biol Chem* 1996;271:19053-7.
132. **Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT.** Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 1993;11:575-80.
133. **Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Hul D, Weisgraber KH.** Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. *J Biol Chem* 1987;262:14352-60.
134. **Basu SK, Brown MS, Ho YK, Havel RJ, Goldstein JL.** Mouse macrophages synthesize and secrete a protein resembling apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:7545-9.
135. **Boyles JK, Pitas RE, Wilson E, Mahley RW, Taylor JM.** Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J Clin Invest* 1985;76:1501-13.
136. **Ignatius MJ, Gebicke-Harter PJ, Skene JH, Schilling JW, Weisgraber KH, Mahley RW, Shooter EM.** Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:1125-9.
137. **Snipes GJ, McGuire CB, Norden JJ, Freeman JA.** Nerve injury stimulates the secretion of apolipoprotein E by non-neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:1130-4.
138. **Laskowitz DT, Goel S, Bennett ER, Matthew WD.** Apolipoprotein E suppresses glial cell secretion of TNF alpha. *J Neuroimmunol* 1997;76:70-4.
139. **Miyata M, Smith JD.** Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat Genet* 1996;14:55-61.
140. **Dunne DW, Resnick D, Greenberg J, Krieger M, Joiner KA.** The type I macrophage scavenger receptor binds to Gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1863-7.
141. **Greenberg JW, Fischer W, Joiner KA.** Influence of lipoteichoic acid structure on recognition by the macrophage scavenger receptor. *Infect Immun* 1996;64:3318-25.
142. **Platt N, Suzuki H, Kurihara Y, Kodama T, Gordon S.** Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12456-60.
143. **Haworth R, Platt N, Keshav S, Hughes D, Darley E, Suzuki H, Kurihara Y, Kodama T, Gordon S.** The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock. *J Exp Med* 1997;186:1431-9.
144. **Pearson AM.** Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1996;8:20-8.
145. **Sambrano GR, Parthasarathy S, Steinberg D.** Recognition of oxidatively damaged erythrocytes by a macrophage receptor with specificity for oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3265-9.
146. **Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA, Henson PM.** Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 1992;149:4029-35.
147. **Fraser I, Hughes D, Gordon S.** Divalent cation-independent macrophage adhesion inhibited by monoclonal antibody to murine scavenger receptor. *Nature* 1993;364:343-6.
148. **Hughes DA, Fraser IP, Gordon S.** Murine Mphi scavenger receptor: adhesion function and expression. *Immunol Lett* 1994;43:7-14.
149. **Phillips RD, Arnold K, Innerarity T.** Platelet secretory products inhibit lipoprotein metabolism in macrophages. *Nature* 1985;316:746-748.
150. **Mas-Oliva J, Arnold K, Wagner W, Phillips D, Pitas R, Innerarity T.** Isolation and characterization of a platelet-derived macrophage-binding proteoglycan. *J Biol Chem* 1994;269:10177-10183.
151. **Santiago-Garcia J, Mas-Oliva J, Innerarity T, Pitas R.** Secreted forms of amyloid- b-precursor protein are ligands for the class A scavenger receptor. *J Biol Chem* 2001;276:30665-61.

Aguilar-Gaytan, R., and Mas-Oliva, J. Oxidative Stress Impairs Endocytosis of the "scavenger" Receptor Class A. *BBRC* (2003) 305:510-517.

Oxidative stress impairs endocytosis of the scavenger receptor class A

Rocio Aguilar-Gaytan and Jaime Mas-Oliva*

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-243, 04510 México, D.F., Mexico

Received 15 April 2003

Abstract

We report the characterization of a cell system employing Chinese hamster ovary (CHO) cells and CHO cells transfected with the scavenger receptor class A (CHO-SRA) using extracellularly produced reactive oxygen species (ROS) in order to study the endocytic function of the scavenger receptor. The oxidative environment was produced using *tert*-butyl hydroperoxide (TBH) and characterized by flow cytometry and cell viability. Once an adequate oxidative environment was established, binding and internalization studies of radiolabeled acetylated LDL particles (¹²⁵I-labeled Ac-LDL) with CHO-SRA cells were carried out. RT-PCR analysis using total RNAs from CHO-SRA cells revealed that oxidative stress does not alter the expression of the scavenger receptor. However, internalization of ¹²⁵I-labeled Ac-LDL through this receptor carried out by these cells was completely abolished under extracellularly oxidative conditions. Together, these results support the idea that an oxidative stress produced extracellularly, inhibiting the endocytosis of the scavenger receptor, could help to understand and explain the mechanisms by which several physiologically important ligands are accumulated in the extracellular space with its consequent cell damage.

© 2003 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Keywords: Scavenger receptor class A; Free radicals; Oxidative stress; Lipoprotein internalization; Endocytosis; Acetylated low-density lipoproteins

Atherosclerosis is a progressive disease characterized by the accumulation of lipids and fibrous elements in the large arteries [1]. Early lesions of atherosclerosis consist of subendothelial accumulations of cholesterol-engorged macrophages called foamy cells [2,3]. It has been suggested that accumulation of oxidatively modified low-density lipoproteins (LDL) in the arterial intima contributes significantly to the recruitment of monocytes toward the arterial wall and the formation of foamy cells [4]. Reactive oxygen species (ROS) produced by vascular cells, monocyte-derived macrophages, and enzymes, such as myeloperoxidase, sphingomyelinase, and secretory phospholipase have been proposed to mediate the oxidation of these lipoproteins [5–9]. These oxidatively modified LDLs are recognized and internalized by scavenger receptors present in macrophages [10]. These scavenger receptors belong to a large family of receptors composed of six classes, all related through their capacity to internalize chemically modified LDLs

[11]. Scavenger receptor class A (SR-A) types I and II identified in macrophages [12,13] have been considered to play an important role in the genesis of atherosclerosis [14]. SR-A receptor types I and II are membrane-integral trimeric glycoproteins produced by editing and alternative splicing of a single gene [13,15]. SR-A type I additionally presents a C-terminal cysteine domain with no known function to date [16]. Both receptors are formed by six domains, including an α helical coiled-coil domain [13,17] and a collagenous-like domain that contains a lysine-rich cluster forming a region with positive charges essential for modified LDL binding [15,18]. Both receptors show very similar ligand-binding properties and have been reported to bind acetylated LDL (Ac-LDL), oxidized LDL (Ox-LDL), maleinated serum albumin, polysaccharides, such as dextran sulfate and fucoidin, polyribonucleotides (poly(I) and poly(G)), and phospholipids [13,15,17–19].

The expression of SR-A is largely restricted to macrophages, including alveolar, thymic, and splenic macrophages as well as Kupffer cells, but also is expressed in endothelial cells and smooth muscle cells present in atherosclerotic lesions [20–24]. Additionally, SR-A

* Corresponding author. Fax: +525-5655-5611.

E-mail address: jmas@ifisiol.unam.mx (J. Mas-Oliva).

expression has been reported on microglial cells in the central nervous system (CNS) and, therefore related to the development of several neuronal diseases [25], such as neurodegeneration in Alzheimer's disease [26]. The expression of the SR-A has been localized in active microglia surrounding amyloid plaques [27], and its function has been associated to the endocytosis of the β -amyloid (β A) peptide [27], as well as the adhesion of microglia to amyloid fibrils with the consequent production of neurotoxins, such as ROS and reactive nitrogen species (RNS) [28].

Originally, ROS were recognized for their role in mammalian host defense during the respiratory burst of phagocytic cells [29,30]. At present, they are recognized as signaling molecules important in many biological systems under physiologic as well as pathologic conditions. There is important evidence related to the participation of ROS in the progress of various degenerative conditions, such as cardiovascular [31] and neurological [32,33] diseases. ROS can be generated intracellularly through enzymatic systems, such as NADPH oxidases, nitric oxide synthase (NOS), and lipoxygenase as a response to growth factor stimulation or by means of normal mitochondrial metabolism [34]. On the other hand, extracellular ROS production can be catalyzed by ionizing radiation, ultraviolet light (UV), environmental toxins, and cytokines produced during the inflammatory response [34]. During the activation of macrophages and microglial cells, the release of growth factors, cytokines, and cytotoxic mediators such as ROS, intracellularly as well as extracellularly, has been observed and associated with the modification of LDL particles [35]. It has also been demonstrated that interaction of these oxidized lipoproteins with the SR-A expressed on the surface of these cell type promotes activation of transcription factors that promote a further intracellular production of ROS [36,37]. Nonetheless, to date little is known concerning the role that these extracellularly produced ROS play on SR-A activity. Therefore, in this study, we investigated the effect of ROS produced exogenously on the endocytic function of the SR-A. The data presented support the notion that extracellularly produced ROS are able to inhibit the internalization of ligands through the SR-A without altering their expression.

Materials and methods

Materials. Benzamidine, *tert*-butyl hydroperoxide (TBH), collagen IV, poly-D-lysine, fucoidin, and trypan blue dye were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO). Rat anti-mouse SR-A was obtained from Serotec (Kidlington, England). Rabbit anti-human collagen CIV was purchased from Chemicon International (Temecula, CA). The ECL Kit was purchased from Pharmacia (Uppsala, Sweden). All reagents for cell culture were purchased from Life Technologies (Gaithersburg, MD), while tissue culture dishes and other plasticware were obtained from Nalgen Nunc (Rochester, NY). 2',7'-Dichlorodihydro-

fluorescein diacetate (DCFH-DA) was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). 125 I-labeled sodium iodide was purchased from Amersham (Piscataway, NJ), and the protein assay and Iodogen Kits were obtained from Pierce (Rockford, IL).

Lipoproteins. Human LDL ($d = 1.019$ – 1.063 g/ml) were isolated from plasma of normal fasted donors by sequential density ultracentrifugation at 4°C in a Beckman Ti-60 rotor [38]. All lipoproteins were dialyzed against 0.15 M NaCl and 0.01% EDTA at pH 7.2 as previously reported [38]. The LDL concentration is given in terms of its protein content determined by the BCA method following instructions issued by the manufacturer, using bovine serum albumin as a standard. Ac-LDL was prepared by LDL treatment with acetic anhydride [39,40]. The Iodogen method was used to iodinate Ac-LDL and LDL to reach a specific activity of 50–150 counts/min/ng protein.

Flow cytometry assays. The different cell lines employed were cultured in serum-free medium for 5 h, washed, and resuspended in a phosphate-buffered saline solution (PBS), pH 7.4. One milliliter cell aliquots were treated without or with DCFH-DA, dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a final concentration of 400 μ M, stored in the dark at -20°C , and used in a 1:100 dilution with PBS. Cells were preincubated for 15 min with 4 μ M DCFH-DA in the absence or presence of different concentrations of TBH prior to the cytometric analysis. Fluorescence was measured on a FACScalibur instrument (Becton–Dickinson). The FL1 fluorescence distribution was displayed as a single histogram [41]. Cell viability was determined using the trypan blue dye exclusion method.

RT-PCR. Control Chinese hamster ovary (CHO) cells lacking the presence of the SR-A were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 (50/50, v/v) containing penicillin (50 U/ml)/streptomycin (50 μ g/ml) and supplemented with 10% fetal bovine serum at 37°C in 5% CO₂. Transfected CHO cells expressing the SR-A (CHO-SRA) (kindly provided by Dr. Robert E. Pitas, Gladstone Institute of Cardiovascular Disease, University of California, San Francisco) were grown in the same medium, but containing Geneticin (400 μ g/ml) [42]. RNA was isolated from CHO and CHO-SRA cells that were cultured under control (absence of TBH) and oxidative stress (presence of TBH) conditions for 5 h, as mentioned above. Cells were washed and resuspended in 1 ml Trizol (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Scavenger receptor from CHO and CHO-SRA cells was determined by PCR after reverse transcription of 2–3 μ g of total RT-RNA using the GeneAmp RNA Kit (Applied Biosystems). cDNAs were derived using 2.5 μ M random hexanucleotides and oligo(dT)₁₆, and 2.5 U of MuLV of reverse transcriptase at 42°C for 45 min followed by denaturalization at 99°C for 5 min. cDNAs were amplified by PCR using specific primer pairs (0.2 μ M) and 2.5 U of AmpliTaq DNA polymerase in 100 μ l during 25 cycles: denaturalization at 99°C for 2 min, annealing at 56°C for 30 s, and extension at 72°C for 30 s. The primers for SR-A were selected from the cytoplasmic region (50 amino acids). The sense primer was 5'-ATGGCAC AGTGGGATGACTTT-3' and the antisense primer 5'-TTTATAAGA CTTCATCCTCTC-3' (PCR product, 150 bp). For the β -actin gene, the sense primer was 5'-GGGTCAGAAAGGATTCC-TATG-3' and the antisense primer 5'-GGTCTCAAACATGATCTGGG-3' (PCR product, 233 bp).

Internalization assays and cell toxicity. Lipoprotein internalization assays were performed for 5 h at 37°C and 5% CO₂ in serum-free medium [42]. Lipoprotein binding assays were performed at 4°C following the same procedure employed for internalization assays. Nonlabeled Ac-LDL, fucoidin, or LDL were used to determine non-specific internalization. Cells were grown for 2–3 days prior to the experiment, controlling density up to 10,000 cells/cm² for CHO and CHO-SRA cells. Oxidative stress assays were performed by adding 30 μ M TBH each hour into the incubation medium during the internalization and binding assays. For competition experiments, cells were washed with serum-free medium and incubated for 5 h at 37°C in serum-free medium containing either 125 I-labeled Ac-LDL, 125 I-labeled LDL, or the indicated concentrations of competitors.

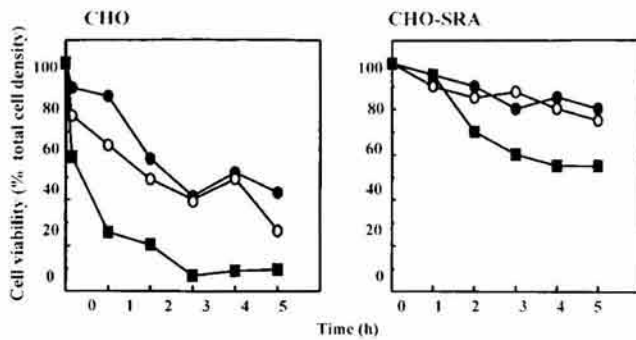


Fig. 2. Time course of cell viability after treatment with different concentrations of TBH. CHO and CHO-SRA cells were incubated at 37°C with 30 μ M (●), 50 μ M (○), and 70 μ M (■) TBH added each hour for 5 h. After this time, cells were recovered and viability was measured by the trypan blue dye exclusion method. Cell viability is expressed as a percentage of the total number of cells found at zero time.

throughout the time employed for the internalization assays. A set of experiments with the cell lines employed in the form of cell monolayers was performed in order to monitor the process of cell viability by trypan blue dye exclusion during the experiments when TBH was added every hour to the culture medium. As shown in Fig. 2, cell viability was maintained up to 50% in the CHO cell line throughout the 5-h internalization assay, depending on the amount of TBH added to the incubation medium. In contrast, when the CHO-SRA cell line was tested, cell viability improved up to 80% using the same amounts of TBH in the incubation medium. These results indicated the higher susceptibility to an oxidative stress as shown by the control CHO cells in comparison

to the results obtained with the CHO-SRA cell line. Transfection of the SR-A seems to have given this cell line the ability to better manage oxidative stress.

The mRNA levels for the CHO-SRA cell line studied after the treatment with TBH (30 μ M) were similar to those of control cells without treatment (Fig. 3). Moreover, in order to test whether synthesis of other proteins might be affected with the same TBH treatment, we tested β -actin, showing no differences when either CHO or CHO-SRA cells were cultured with or without TBH (Fig. 3). These results indicate that experimental conditions employed in these series of experiments maintained an oxidative environment without altering gene expression of SR-A and β -actin as an example of other protein type. From these sets of experiments, we decided to carry out our internalization and binding experiments using the lowest concentration of TBH tested (30 μ M) in order to maintain an adequate ratio between oxidative stress and cell viability.

Exogenous free radicals affect the internalization process of Ac-LDL

In order to investigate the contribution of free radicals upon scavenger receptor function, we evaluated the internalization of 125 I-labeled Ac-LDL in CHO-SRA cells and CHO cells under control and oxidative conditions. This last condition was maintained by adding TBH (30 μ M) every hour for 5 h in order to maintain a constant oxidative stress throughout the internalization assay. As shown in Fig. 4, internalization of 125 I-labeled Ac-LDL by CHO-SRA cells was completely abolished in the presence of TBH, whereas CHO control cells, which do not express the SR-A, did not internalize acetylated LDL particles. These results demonstrate that internalization of modified LDL through the SR-A present in CHO-SRA cells is importantly affected by the presence of an oxidative environment. In contrast, control experiments carried out by studying the internalization of 125 I-labeled LDL through the LDL receptor in both cell lines showed that this lipoprotein receptor was not as dramatically affected by oxidative stress as the effect observed upon the scavenger receptor (Fig. 4).

Effect of oxidative stress upon 125 I-labeled Ac-LDL binding

Binding assays under control conditions as well as under oxidative stress conditions showed no significant changes in 125 I-labeled Ac-LDL binding, indicating that stress produced under our experimental conditions did not significantly affect the ligand binding capacity of the scavenger receptor (Fig. 5).

In order to study the possibility that oxidative stress might have affected the radioactively labeled acetylated

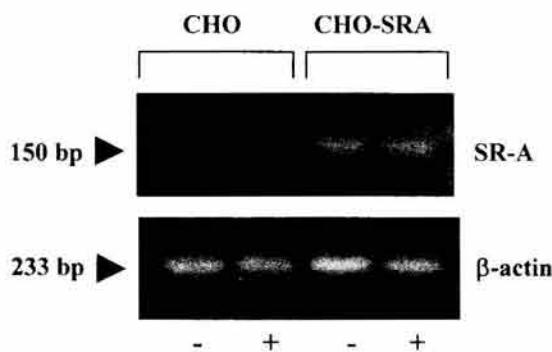


Fig. 3. Effect of oxidative stress upon the expression of RNA-SRA and RNA- β -actin. RNA was isolated from CHO and CHO-SRA cells under control (-) and oxidative conditions (+) employing 30 μ M TBH added each hour for 5 h of assay. After reverse transcription of total RNA (2.3 μ M) with random primers, equal amounts of cDNA template were amplified by PCR using specific oligonucleotides as shown under Materials and methods. The upper panel shows a 150-bp band corresponding to the cytoplasmic region of the scavenger receptor class A under both control and oxidative conditions in CHO-SRA cells. The lower panel shows a 230-bp band corresponding to the β -actin gene used as a control protein as well as a loading control in CHO and CHO-SRA cells under both control (-) and oxidative conditions (+).

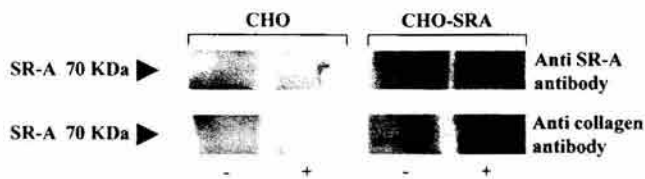


Fig. 6. Effect of TBH upon the expression of the scavenger receptor in CHO-SRA cells. Cellular extracts were obtained after incubation of CHO and CHO-SRA cells in the absence (–) or the presence (+) of TBH (30 μ M) added every hour during an internalization assay carried out at 37 °C. The homogenates were fractionated according to Mietus-Snyder et al. [51]. Cytosolic extracts were isolated and 30 μ g of protein was used for SDS–PAGE (10%) and transferred to nylon membranes overnight. The upper panel shows the signal detected using an anti-scavenger receptor class A antibody and the lower panel shows the signal detected using an anti-collagen antibody.

A present a collagenous-like domain recognized as the binding site for several polyanionic ligands and the support for its distinctive broad specificity [15], we compared receptor protein levels using an anti-SR-A antibody in parallel with an anti-collagen antibody using both control and oxidative stress conditions. As shown in Fig. 6, SR-A expression in the CHO-SRA cell line was shown to be similar under both control and oxidative conditions, suggesting that exogenously produced free radicals apparently only modify the internalization function of the SR-A, leaving untouched the mechanisms involved in receptor synthesis and receptor inclusion into the membrane. Several studies have shown that different cytokines and growth factors inhibit or enhance the activity and expression of SR-A in macrophages where changes in receptor activity have been associated with the establishment of an intracellular oxidative stress condition [44–50]. Previous studies have demonstrated that an intracellular oxidative stress caused by phorbol esters with the combination of H₂O₂ and vanadate up-regulates SR-A in SMC [51]. This same effect occurred when SMC were incubated in the presence of oxidized LDL, suggesting that Ox-LDL might be a source of intracellular oxidative stress [51]. In contrast, our study demonstrates that extracellularly produced reactive oxygen species exclusively alter the endocytic capacity of the scavenger receptor class A.

Interestingly, ROS did not damage the ligand binding capacity, nor did they alter the ligands directly exposed to the oxidant effect of TBH. Since we did not observe important changes in LDL internalization through the LDL receptor when normal as well as oxidative stress conditions were studied, therefore, we can infer that the structural differences present in the LDL receptor in comparison to the SR-A most probably play an important role in the susceptibility to oxidative stress showed by the two receptors.

In comparison to previous reports showing that intracellular stress contributes to an increase in mRNA expression and protein levels in different cell systems

[44,51], we did not find changes in receptor levels under the extracellular oxidative stress conditions used in this study. It seems that ROS produced by exogenous agents do not have the same effect upon the receptor as intracellularly produced ROS, therefore, supporting the notion that different microdomains might present a different susceptibility to oxidative stress. Mazhul et al. [52] reported that oxidative stress induced by TBH increases the intramolecular dynamics of membrane proteins, a phenomenon that has been associated to cell death.

Changes in Ac-LDL internalization by the SR-A under extracellularly created oxidative stress conditions could help to explain how it is that several ligands, such as the β -amyloid peptide cannot be internalized and eliminated through internalization of the scavenger receptor when an oxidative environment is well established, therefore stimulating their extracellular accumulation [53]. Since the changes caused upon the scavenger receptor seem not to be related to ligand binding, it is possible to propose that changes in the organization of the receptor embed the membrane [54], which in turn might alter its association to the cytoskeleton, could be related to the alteration of the normal mechanisms for receptor internalization. These changes caused by ROS might affect the way the extracellular signal is coupled to the cytoplasm through protein–protein recognition events carried out between the intracellular segment of the receptor and the cytoskeleton. Currently in our laboratory, we are studying these mechanisms as a feasible explanation for this phenomenon.

Acknowledgments

We thank Alejandro Zentella and Rolando Hernández for their help and suggestions. We are also grateful to Paul Gaytán, Instituto de Biotecnología, UNAM, for synthesis of oligonucleotides. This work was supported by grants from CONACyT (38551N) and DGAPA-UNAM (IN212301).

References

- [1] R. Ross. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362 (1993) 801–809.
- [2] A.H. Lichtman, S.K. Clinton, K. Iiyama, P.W. Connelly, P. Libby, M.I. Cybulsky. Hyperlipidemia and atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice fed defined semipurified diets with and without cholate. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19 (1999) 1938–1944.
- [3] M. Tamminen, G. Mottino, J.H. Qiao, J.L. Breslow, J.S. Frank. Ultrastructure of early lipid accumulation in ApoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19 (1999) 847–853.
- [4] J.L. Goldstein, Y.K. Ho, S.K. Basu, M.S. Brown. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 333–337.

- [44] S.J. De Kimpe, E.E. Anggard, M.J. Carrier, Reactive oxygen species regulate macrophage scavenger receptor type I, but not type II, in the human monocytic cell line THP-1, *Mol. Pharmacol.* 53 (1998) 1076–1082.
- [45] L.A. Bottalico, R.E. Wager, L.B. Agellon, R.K. Assoian, I. Tabas, Transforming growth factor- β 1 inhibits scavenger receptor activity in THP-1 human macrophages, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 22866–22871.
- [46] W.J. de Villiers, I.P. Fraser, D.A. Hughes, A.G. Doyle, S. Gordon, Macrophage-colony-stimulating factor selectively enhances macrophage scavenger receptor expression and function, *J. Exp. Med.* 180 (1994) 705–709.
- [47] M.P. de Winther, K.W. van Dijk, L.M. Havekes, M.H. Hofker, Macrophage scavenger receptor class A: a multifunctional receptor in atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 (2000) 290–297.
- [48] H.Y. Hsu, A.C. Nicholson, D.P. Hajjar, Inhibition of macrophage scavenger receptor activity by tumor necrosis factor- α is transcriptionally and post-transcriptionally regulated, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 7767–7773.
- [49] H.Y. Hsu, Y.C. Twu, Tumor necrosis factor α -mediated protein kinases in regulation of scavenger receptor and foam cell formation on macrophage, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 41035–41048.
- [50] K.S. Moulton, K. Semple, H. Wu, C.K. Glass, Cell-specific expression of the macrophage scavenger receptor gene is dependent on PU.1 and a composite AP-1/ets motif, *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 4408–4418.
- [51] M. Mietus-Snyder, M.S. Gowri, R.E. Pitas, Class A scavenger receptor up-regulation in smooth muscle cells by oxidized low density lipoprotein. Enhancement by calcium flux and concurrent cyclooxygenase-2 up-regulation, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 17661–17670.
- [52] V. Mazhul, D. Shcherbin, I. Zavodnik, K. Rekawiecka, M. Bryszewska, The effect of oxidative stress induced by *t*-butyl hydroperoxide on the structural dynamics of membrane proteins of Chinese hamster fibroblasts, *Cell Biol. Int.* 23 (1999) 345–350.
- [53] D.M. Paresce, H. Chung, F.R. Maxfield, Slow degradation of aggregates of the Alzheimer's disease amyloid β protein by microglial cells, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 29390–29397.
- [54] J. Mas-Oliva, G. Velasco-Loyden, T.H. Haines, Receptor pattern formation as a signal for the capture of lipoproteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224 (1996) 212–218.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tabas, I. 2002. Cholesterol in health and disease. *Journal of Clinical Investigation* 110:583-590.
2. Maxfield, F.R., and Wustner, D. 2002. Intracellular cholesterol transport. *Journal of Clinical Investigation* 110:891-898.
3. Kang, S., and Davis, R.A. 2000. Cholesterol and hepatic lipoprotein assembly and secretion. *Biochimica et Biophysica Acta* 1529:223-230.
4. Dietschy, J.M., Turley, S.D., and Spady, D.K. 1993. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *Journal of Lipid Research* 34:1637-1659.
5. Chang, T.Y., Chang, C.C., Lin, S., Yu, C., Li, B.L., and Miyazaki, A. 2001. Roles of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 and -2. *Current Opinion in Lipidology* 12:289-296.
6. Bjorkhem, I. 2002. Do oxysterols control cholesterol homeostasis? *Journal of Clinical Investigation* 110:725-730.
7. Tabas, I. 2002. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *Journal of Clinical Investigation* 110:905-911.
8. Brown, A.J., and Jessup, W. 1999. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 142:1-28.
9. Kellner-Weibel, G., Yancey, P.G., Jerome, W.G., Walser, T., Mason, R.P., Phillips, M.C., and Rothblat, G.H. 1999. Crystallization of free cholesterol in model macrophage foam cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology* 19:1891-1898.
10. Yeagle, P.L. 1991. Modulation of membrane function by cholesterol. *Biochimie* 73:1303-1310.
11. Glass, C.K., and Witztum, J.L. 2001. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104:503-516.
12. Tall, A.R., Costet, P., and Wang, N. 2002. Regulation and mechanisms of macrophage cholesterol efflux. *Journal of Clinical Investigation* 110:899-904.
13. Ross, R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-809.
14. Gimbrone, M.A., Jr. 1999. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis.[comment]. *American Journal of Pathology* 155:1-5.
15. Lusis, A.J. 2000. Atherosclerosis. *Nature* 407:233-241.
16. Brown, M.S., and Goldstein, J.L. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34-47.
17. Goldstein, J.L., Kita, T., and Brown, M.S. 1983. Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis. Lessons from an animal counterpart of familial hypercholesterolemia. *New England Journal of Medicine* 309:288-296.
18. Goldstein, J.L., Anderson, R.G., and Brown, M.S. 1979. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature* 279:679-685.
19. Brown, M.S., Kovanen, P.T., and Goldstein, J.L. 1981. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* 212:628-635.
20. Brown, M.S., and Goldstein, J.L. 1979. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:3330-3337.

21. Brown, M.S., and Goldstein, J.L. 1983. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annual Review of Biochemistry* 52:223-261.
22. Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K., and Brown, M.S. 1979. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:333-337.
23. Kellner-Weibel, G., Jerome, W.G., Small, D.M., Warner, G.J., Stoltenberg, J.K., Kearney, M.A., Corjay, M.H., Phillips, M.C., and Rothblat, G.H. 1998. Effects of intracellular free cholesterol accumulation on macrophage viability: a model for foam cell death. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology* 18:423-431.
24. Steinbrecher, U.P., Parthasarathy, S., Leake, D.S., Witztum, J.L., and Steinberg, D. 1984. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81:3883-3887.
25. Morel, D.W., DiCorleto, P.E., and Chisolm, G.M. 1984. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* 4:357-364.
26. Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C., and Witztum, J.L. 1989. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity.[comment]. *New England Journal of Medicine* 320:915-924.
27. Steinberg, D. 1997. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *Journal of Biological Chemistry* 272:20963-20966.
28. Iuliano, L. 2001. The oxidant stress hypothesis of atherogenesis. *Lipids* 36 Suppl:S41-44.
29. Alaupovic, P., Lee, D.M., and McConathy, W.J. 1972. Studies on the composition and structure of plasma lipoproteins. Distribution of lipoprotein families in major density classes of normal human plasma lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 260:689-707.
30. Mahley, R.W., Innerarity, T.L., Rall, S.C., Jr., and Weisgraber, K.H. 1984. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *Journal of Lipid Research* 25:1277-1294.
31. Borgstrom, B. 1974. Fat digestion and absorption. *Biomembranes* 4B:555-620.
32. Westergaard, H., and Dietschy, J.M. 1976. The mechanism whereby bile acid micelles increase the rate of fatty acid and cholesterol uptake into the intestinal mucosal cell. *Journal of Clinical Investigation* 58:97-108.
33. Gallo, L.L., Myers, S., and Vahouny, G.V. 1984. Rat intestinal acyl coenzyme A: cholesterol acyl transferase properties and location. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine* 177:188-196.
34. Imaizumi, K., Havel, R.J., Fainaru, M., and Vigne, J.L. 1978. Origin and transport of the A-I and arginine-rich apolipoproteins in mesenteric lymph of rats. *Journal of Lipid Research* 19:1038-1046.
35. Shimada, K., Gill, P.J., Silbert, J.E., Douglas, W.H., and Fanburg, B.L. 1981. Involvement of cell surface heparin sulfate in the binding of lipoprotein lipase to cultured bovine endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation* 68:995-1002.
36. Mjos, O.D., Faergeman, O., Hamilton, R.L., and Havel, R.J. 1975. Characterization of remnants produced during the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins of blood plasma and intestinal lymph in the rat. *Journal of Clinical Investigation* 56:603-615.
37. Eisenberg, S., and Schurr, D. 1976. Phospholipid removal during degradation of rat plasma very low density lipoprotein in vitro. *Journal of Lipid Research* 17:578-587.

38. Havel, R.J. 1995. Chylomicron remnants: hepatic receptors and metabolism. *Current Opinion in Lipidology* 6:312-316.
39. Windler, E., Chao, Y., and Havel, R.J. 1980. Regulation of the hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins in the rat. Opposing effects of homologous apolipoprotein E and individual C apoproteins. *Journal of Biological Chemistry* 255:8303-8307.
40. Windler, E., Chao, Y., and Havel, R.J. 1980. Determinants of hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants in the rat. *Journal of Biological Chemistry* 255:5475-5480.
41. Kwiterovich, P.O., Jr. 2000. The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review. *American Journal of Cardiology* 86:5L-10L.
42. Packard, C.J., Munro, A., Lorimer, A.R., Gotto, A.M., and Shepherd, J. 1984. Metabolism of apolipoprotein B in large triglyceride-rich very low density lipoproteins of normal and hypertriglyceridemic subjects. *Journal of Clinical Investigation* 74:2178-2192.
43. Beltz, W.F., Kesaniemi, Y.A., Howard, B.V., and Grundy, S.M. 1985. Development of an integrated model for analysis of the kinetics of apolipoprotein B in plasma very low density lipoproteins, intermediate density lipoproteins, and low density lipoproteins. *Journal of Clinical Investigation* 76:575-585.
44. Yamashita, S., Sakai, N., Hirano, K., Ishigami, M., Maruyama, T., Nakajima, N., and Matsuzawa, Y. 2001. Roles of plasma lipid transfer proteins in reverse cholesterol transport. *Frontiers in Bioscience* 6:D366-387.
45. Rubinstein, A., Gibson, J.C., Paterniti, J.R., Jr., Kakis, G., Little, A., Ginsberg, H.N., and Brown, W.V. 1985. Effect of heparin-induced lipolysis on the distribution of apolipoprotein e among lipoprotein subclasses. Studies with patients deficient in hepatic triglyceride lipase and lipoprotein lipase. *Journal of Clinical Investigation* 75:710-721.
46. Rye, K.A., Clay, M.A., and Barter, P.J. 1999. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis* 145:227-238.
47. Barter, P.J., and Rye, K.A. 1996. Molecular mechanisms of reverse cholesterol transport. *Current Opinion in Lipidology* 7:82-87.
48. Rader, D.J. 2002. High-density lipoproteins and atherosclerosis. *American Journal of Cardiology* 90:62i-70i.
49. Krieger, M. 2001. Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *Journal of Clinical Investigation* 108:793-797.
50. Remaley, A.T., Rust, S., Rosier, M., Knapper, C., Naudin, L., Broccardo, C., Peterson, K.M., Koch, C., Arnould, I., Prades, C., et al. 1999. Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1): genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:12685-12690.
51. Feng, B., and Tabas, I. 2002. ABCA1-mediated cholesterol efflux is defective in free cholesterol-loaded macrophages. Mechanism involves enhanced ABCA1 degradation in a process requiring full NPC1 activity. *Journal of Biological Chemistry* 277:43271-43280.
52. Hevonoja, T., Pentikainen, M.O., Hyvonen, M.T., Kovanen, P.T., and Ala-Korpela, M. 2000. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta* 1488:189-210.
53. Segrest, J.P., Jones, M.K., De Loof, H., and Dashti, N. 2001. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res* 42:1346-1367.

54. Witztum, J.L., and Steinberg, D. 1991. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 88:1785-1792.
55. Palinski, W., Rosenfeld, M.E., Yla-Herttuala, S., Gurtner, G.C., Socher, S.S., Butler, S.W., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Steinberg, D., and Witztum, J.L. 1989. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:1372-1376.
56. Mori, M., Itabe, H., Higashi, Y., Fujimoto, Y., Shiomi, M., Yoshizumi, M., Ouchi, Y., and Takano, T. 2001. Foam cell formation containing lipid droplets enriched with free cholesterol by hyperlipidemic serum. *Journal of Lipid Research* 42:1771-1781.
57. Libby, P. 2002. Atherosclerosis: the new view. *Scientific American* 286:46-55.
58. Schneider, W.J., Beisiegel, U., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. 1982. Purification of the low density lipoprotein receptor, an acidic glycoprotein of 164,000 molecular weight. *Journal of Biological Chemistry* 257:2664-2673.
59. Goldstein, J.L., and Brown, M.S. 1977. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annual Review of Biochemistry* 46:897-930.
60. Mahley, R.W., and Innerarity, T.L. 1983. Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta* 737:197-222.
61. Aguilar-Gaytan, R., and Mas-Oliva, J. 2002. El receptor "pepenador" y su importancia en procesos amiloidoticos. *Gaceta Medica de Mexico* 138:445-460.
62. Krieger, M., and Herz, J. 1994. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annual Review of Biochemistry* 63:601-637.
63. Pearson, A.M. 1996. Scavenger receptors in innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 8:20-28.
64. Linton, M.F., and Fazio, S. 2001. Class A scavenger receptors, macrophages, and atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology* 12:489-495.
65. Paresce, D.M., Ghosh, R.N., and Maxfield, F.R. 1996. Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron* 17:553-565.
66. Ashkenas, J., Penman, M., Vasile, E., Acton, S., Freeman, M., and Krieger, M. 1993. Structures and high and low affinity ligand binding properties of murine type I and type II macrophage scavenger receptors. *Journal of Lipid Research* 34:983-1000.
67. Kodama, T., Freeman, M., Rohrer, L., Zabrecky, J., Matsudaira, P., and Krieger, M. 1990. Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature* 343:531-535.
68. Naito, M., Kodama, T., Matsumoto, A., Doi, T., and Takahashi, K. 1991. Tissue distribution, intracellular localization, and in vitro expression of bovine macrophage scavenger receptors. *American Journal of Pathology* 139:1411-1423.
69. Naito, M., Suzuki, H., Mori, T., Matsumoto, A., Kodama, T., and Takahashi, K. 1992. Coexpression of type I and type II human macrophage scavenger receptors in macrophages of various organs and foam cells in atherosclerotic lesions. *American Journal of Pathology* 141:591-599.
70. Hughes, D.A., Fraser, I.P., and Gordon, S. 1995. Murine macrophage scavenger receptor: in vivo expression and function as receptor for macrophage adhesion in lymphoid and non-lymphoid organs. *European Journal of Immunology* 25:466-473.

71. Geng, Y.J., and Hansson, G.K. 1995. High endothelial cells of postcapillary venules express the scavenger receptor in human peripheral lymph nodes. *Scandinavian Journal of Immunology* 42:289-296.
72. Gough, P.J., Greaves, D.R., Suzuki, H., Hakkinen, T., Hiltunen, M.O., Turunen, M., Hertzuala, S.Y., Kodama, T., and Gordon, S. 1999. Analysis of macrophage scavenger receptor (SR-A) expression in human aortic atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology* 19:461-471.
73. de Villiers, W.J., Fraser, I.P., and Gordon, S. 1994. Cytokine and growth factor regulation of macrophage scavenger receptor expression and function. *Immunology Letters* 43:73-79.
74. de Villiers, W.J., Fraser, I.P., Hughes, D.A., Doyle, A.G., and Gordon, S. 1994. Macrophage-colony-stimulating factor selectively enhances macrophage scavenger receptor expression and function. *Journal of Experimental Medicine* 180:705-709.
75. Bottalico, L.A., Wager, R.E., Agellon, L.B., Assoian, R.K., and Tabas, I. 1991. Transforming growth factor-beta 1 inhibits scavenger receptor activity in THP-1 human macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 266:22866-22871.
76. Hsu, H.Y., Nicholson, A.C., and Hajjar, D.P. 1996. Inhibition of macrophage scavenger receptor activity by tumor necrosis factor-alpha is transcriptionally and post-transcriptionally regulated. *Journal of Biological Chemistry* 271:7767-7773.
77. Geng, Y.J., and Hansson, G.K. 1992. Interferon-gamma inhibits scavenger receptor expression and foam cell formation in human monocyte-derived macrophages. *Journal of Clinical Investigation* 89:1322-1330.
78. Mietus-Snyder, M., Frieria, A., Glass, C.K., and Pitas, R.E. 1997. Regulation of scavenger receptor expression in smooth muscle cells by protein kinase C: a role for oxidative stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology* 17:969-978.
79. Freeman, M., Ekkel, Y., Rohrer, L., Penman, M., Freedman, N.J., Chisolm, G.M., and Krieger, M. 1991. Expression of type I and type II bovine scavenger receptors in Chinese hamster ovary cells: lipid droplet accumulation and nonreciprocal cross competition by acetylated and oxidized low density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:4931-4935.
80. Morimoto, K., Wada, Y., Hinagata, J., Imanishi, T., Kodama, T., and Doi, T. 1999. VXFDF in the cytoplasmic domain of macrophage scavenger receptors mediates their efficient internalization and cell-surface expression. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 22:1022-1026.
81. Platt, N., Haworth, R., Darley, L., and Gordon, S. 2002. The many roles of the class A macrophage scavenger receptor. *International Review of Cytology* 212:1-40.
82. Acton, S.L., Scherer, P.E., Lodish, H.F., and Krieger, M. 1994. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *Journal of Biological Chemistry* 269:21003-21009.
83. Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H., and Krieger, M. 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271:518-520.
84. Calvo, D., and Vega, M.A. 1993. Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. *Journal of Biological Chemistry* 268:18929-18935.
85. Babitt, J., Trigatti, B., Rigotti, A., Smart, E.J., Anderson, R.G., Xu, S., and Krieger, M. 1997. Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-

- glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *Journal Biological Chemistry* 272:13242-13249.
86. Krieger, M. 1999. Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annual Review of Biochemistry* 68:523-558.
 87. Vinals, M., Xu, S., Vasile, E., and Krieger, M. 2003. Identification of the N-linked glycosylation sites on the high density lipoprotein (HDL) receptor SR-BI and assessment of their effects on HDL binding and selective lipid uptake. *Journal of Biological Chemistry* 278:5325-5332.
 88. Johnson, M.S., Svensson, P.A., Helou, K., Billig, H., Levan, G., Carlsson, L.M., and Carlsson, B. 1998. Characterization and chromosomal localization of rat scavenger receptor class B type I, a high density lipoprotein receptor with a putative leucine zipper domain and peroxisomal targeting sequence. *Endocrinology* 139:72-80.
 89. Cao, G., Garcia, C.K., Wyne, K.L., Schultz, R.A., Parker, K.L., and Hobbs, H.H. 1997. Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1. *Journal Biological Chemistry* 272:33068-33076.
 90. Webb, N.R., Connell, P.M., Graf, G.A., Smart, E.J., de Villiers, W.J., de Beer, F.C., and van der Westhuyzen, D.R. 1998. SR-BII, an isoform of the scavenger receptor BI containing an alternate cytoplasmic tail, mediates lipid transfer between high density lipoprotein and cells. *Journal of Biological Chemistry* 273:15241-15248.
 91. Lisanti, M.P., Scherer, P.E., Vidugiriene, J., Tang, Z., Hermanowski-Vosatka, A., Tu, Y.H., Cook, R.F., and Sargiacomo, M. 1994. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *Journal of Cell Biology* 126:111-126.
 92. Gu, X., Lawrence, R., and 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. *Journal of Biological Chemistry* 275:9120-9130.
 93. Trigatti, B., Rigotti, A., and Krieger, M. 2000. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism. *Current Opinion of Lipidology* 11:123-131.
 94. Landschulz, K.T., Pathak, R.K., Rigotti, A., Krieger, M., and Hobbs, H.H. 1996. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *Journal of Clinical Investigation* 98:984-995.
 95. Rigotti, A., Edelman, E.R., Seifert, P., Iqbal, S.N., DeMattos, R.B., Temel, R.E., Krieger, M., and Williams, D.L. 1996. Regulation by adrenocorticotrophic hormone of the in vivo expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI), a high density lipoprotein receptor, in steroidogenic cells of the murine adrenal gland. *Journal of Biological Chemistry* 271:33545-33549.
 96. Parker, K.L., and Schimmer, B.P. 1997. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocrinology Review* 18:361-377.
 97. Trigatti, B., Covey, S., and Rizvi, A. 2004. Scavenger receptor class B type I in high-density lipoprotein metabolism, atherosclerosis and heart disease: lessons from gene-targeted mice. *Biochemical Society Transactions* 32:116-120.

98. Johnson, A.C., Yabu, J.M., Hanson, S., Shah, V.O., and Zager, R.A. 2003. Experimental glomerulopathy alters renal cortical cholesterol, SR-B1, ABCA1, and HMG CoA reductase expression. *American Journal of Pathology* 162:283-291.
99. Husemann, J., Loike, J.D., Kodama, T., and Silverstein, S.C. 2001. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) mediates adhesion of neonatal murine microglia to fibrillar beta-amyloid. *Journal of Neuroimmunology* 114:142-150.
100. Husemann, J., and Silverstein, S.C. 2001. Expression of scavenger receptor class B, type I, by astrocytes and vascular smooth muscle cells in normal adult mouse and human brain and in Alzheimer's disease brain. *American Journal of Pathology* 158:825-832.
101. Husemann, J., Loike, J.D., Anankov, R., Febbraio, M., and Silverstein, S.C. 2002. Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia* 40:195-205.
102. Chinetti, G., Gbaguidi, F.G., Griglio, S., Mallat, Z., Antonucci, M., Poulain, P., Chapman, J., Fruchart, J.C., Tedgui, A., Najib-Fruchart, J., et al. 2000. CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation* 101:2411-2417.
103. Hirano, K., Yamashita, S., Nakagawa, Y., Ohya, T., Matsuura, F., Tsukamoto, K., Okamoto, Y., Matsuyama, A., Matsumoto, K., Miyagawa, J., et al. 1999. Expression of human scavenger receptor class B type I in cultured human monocyte-derived macrophages and atherosclerotic lesions. *Circulation Research* 85:108-116.
104. Buechler, C., Ritter, M., Quoc, C.D., Agildere, A., and Schmitz, G. 1999. Lipopolysaccharide inhibits the expression of the scavenger receptor Cla-1 in human monocytes and macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 262:251-254.
105. Rigotti, A., Trigatti, B.L., Penman, M., Rayburn, H., Herz, J., and Krieger, M. 1997. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:12610-12615.
106. Rodriguez, W.V., Thuahnai, S.T., Temel, R.E., Lund-Katz, S., Phillips, M.C., and Williams, D.L. 1999. Mechanism of scavenger receptor class B type I-mediated selective uptake of cholesteryl esters from high density lipoprotein to adrenal cells. *Journal of Biological Chemistry* 274:20344-20350.
107. Connelly, M.A., and Williams, D.L. 2003. SR-BI and cholesterol uptake into steroidogenic cells. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 14:467-472.
108. Williams, D.L., Temel, R.E., and Connelly, M.A. 2000. Roles of scavenger receptor BI and APO A-I in selective uptake of HDL cholesterol by adrenal cells. *Endocrinology Research* 26:639-651.
109. Thuahnai, S.T., Lund-Katz, S., Williams, D.L., and Phillips, M.C. 2001. Scavenger receptor class B, type I-mediated uptake of various lipids into cells. Influence of the nature of the donor particle interaction with the receptor. *Journal of Biological Chemistry* 276:43801-43808.
110. Webb, N.R., Cai, L., Ziemba, K.S., Yu, J., Kindy, M.S., van der Westhuyzen, D.R., and de Beer, F.C. 2002. The fate of HDL particles in vivo after SR-BI-mediated selective lipid uptake. *Journal of Lipid Research* 43:1890-1898.
111. Silver, D.L., and Tall, A.R. 2001. The cellular biology of scavenger receptor class B type I. *Current Opinion of Lipidology* 12:497-504.

112. Rhainds, D., and Brissette, L. 2004. The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. defining the rules for lipid traders. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 36:39-77.
- 112a. Hansber,W. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico* 26:19-54.
- 112b. Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. 2000. Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press, U.S.A.*. Second Edition.
113. Droge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82:47-95.
114. Chisolm, G.M., and Steinberg, D. 2000. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radical Biology & Medicine* 28:1815-1826.
115. Napoli, C., de Nigris, F., and Palinski, W. 2001. Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall. *Journal of Cellular Biochemistry* 82:674-682.
116. Chisolm, G.M., 3rd, Hazen, S.L., Fox, P.L., and Cathcart, M.K. 1999. The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages. Biochemical and biological mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 274:25959-25962.
117. Souza, H.P., Cardounel, A.J., and Zweier, J.L. 2003. Mechanisms of free radical production in the vascular wall. *Coronary Artery Disease* 14:101-107.
118. Taniyama, Y., and Griendling, K.K. 2003. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 42:1075-1081.
119. Young, I.S., and McEneaney, J. 2001. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions* 29:358-362.
120. Salvayre, R., Auge, N., Benoist, H., and Negre-Salvayre, A. 2002. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1585:213-221.
121. Pitas, R.E., Innerarity, T.L., and Mahley, R.W. 1980. Cell surface receptor binding of phospholipid . protein complexes containing different ratios of receptor-active and -inactive E apoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 255:5454-5460.
122. Weisgraber, K.H., Innerarity, T.L., and Mahley, R.W. 1978. Role of lysine residues of plasma lipoproteins in high affinity binding to cell surface receptors on human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 253:9053-9062.
123. Basu, S.K., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. 1983. Independent pathways for secretion of cholesterol and apolipoprotein E by macrophages. *Science* 219:871-873.
124. Han, J., and Nicholson, A.C. 1998. Lipoproteins modulate expression of the macrophage scavenger receptor. *American Journal of Pathology* 152:1647-1654.
125. Rosenkranz, A.R., Schmaldienst, S., Stuhlmeier, K.M., Chen, W., Knapp, W., and Zlabinger, G.J. 1992. A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate. *Journal of Immunological Methods* 156:39-45.
126. Possel, H., Noack, H., Augustin, W., Keilhoff, G., and Wolf, G. 1997. 2,7-Dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation. *FEBS Letters* 416:175-178.
127. Innerarity, T.L., Pitas, R.E., and Mahley, R.W. 1986. Lipoprotein-receptor interactions. *Methods in Enzymology* 129:542-565.
128. Mietus-Snyder, M., Glass, C.K., and Pitas, R.E. 1998. Transcriptional activation of scavenger receptor expression in human smooth muscle cells requires AP-1/c-Jun and C/EBPbeta: both AP-1 binding and JNK activation are induced by phorbol esters and oxidative stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology* 18:1440-1449.

- 128a. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. Editor Chris Ferguson, U.S.A. Second edition.
129. Dhaliwal, B.S., and Steinbrecher, U.P. 1999. Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins. *Clinical Chimica Acta* 286:191-205.
130. Steinbrecher, U.P. 1999. Receptors for oxidized low density lipoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1436:279-298.
131. Azhar, S., and Reaven, E. 2002. Scavenger receptor class BI and selective cholesteryl ester uptake: partners in the regulation of steroidogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 195:1-26.
132. Rigotti, A., Acton, S.L., and Krieger, M. 1995. The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *Journal of Biological Chemistry* 270:16221-16224.
133. Videla, L.A., and Fernandez, V. 1988. Biochemical aspects of cellular oxidative stress. *Archives of Biological Medicine Experimental (Santiago)* 21:85-92.
134. Makino, N., Bannai, S., and Sugita, Y. 1995. Kinetic studies on the removal of extracellular tert-butyl hydroperoxide by cultured fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 1243:503-508.
135. Dringen, R., Kussmaul, L., and Hamprecht, B. 1998. Rapid clearance of tertiary butyl hydroperoxide by cultured astroglial cells via oxidation of glutathione. *Glia* 23:139-145.
136. Lupo, G., Anfuso, C.D., Ragusa, N., Strosznajder, R.P., Walski, M., and Alberghina, M. 2001. t-Butyl hydroperoxide and oxidized low density lipoprotein enhance phospholipid hydrolysis in lipopolysaccharide-stimulated retinal pericytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1531:143-155.
137. Palomba, L., Sestili, P., and Cantoni, O. 2001. tert-Butylhydroperoxide induces peroxynitrite-dependent mitochondrial permeability transition leading PC12 cells to necrosis. *Journal of Neuroscience Research* 65:387-395.
138. Martin, C., Martinez, R., Navarro, R., Ruiz-Sanz, J.I., Lacort, M., and Ruiz-Larrea, M.B. 2001. tert-Butyl hydroperoxide-induced lipid signaling in hepatocytes: involvement of glutathione and free radicals. *Biochemical Pharmacology* 62:705-712.
139. Mietus-Snyder, M., Gowri, M.S., and Pitas, R.E. 2000. Class A scavenger receptor up-regulation in smooth muscle cells by oxidized low density lipoprotein. Enhancement by calcium flux and concurrent cyclooxygenase-2 up-regulation. *Journal of Biological Chemistry* 275:17661-17670.
140. Farber, J.L., Kyle, M.E., and Coleman, J.B. 1990. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Laboratory Investigation* 62:670-679.
141. Hunt, J.V., Simpson, J.A., and Dean, R.T. 1988. Hydroperoxide-mediated fragmentation of proteins. *Biochemical Journal* 250:87-93.
142. Mazhul, V., Shcherbin, D., Zavodnik, I., Rekawiecka, K., and Bryszewska, M. 1999. The effect of oxidative stress induced by t-butyl hydroperoxide on the structural dynamics of membrane proteins of Chinese hamster fibroblasts. *Cell Biology International* 23:345-350.
143. Sullivan, S.G., and Stern, A. 1984. Membrane protein changes induced by tert-butyl hydroperoxide in red blood cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 774:215-220.
144. Forman, H.J., Skelton, D.C., Loeb, G.A., and Dorio, R.J. 1988. Membrane permeability and oxidant induced injury. *Basic Life Sci* 49:523-530.

145. Kamps, J.A., Kruijt, J.K., Kuiper, J., and van Berkel, T.J. 1992. Characterization of the interaction of acetylated LDL and oxidatively modified LDL with human liver parenchymal and Kupffer cells in culture. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 12:1079-1087.
146. Rhains, D., Falstrault, L., Tremblay, C., and Brissette, L. 1999. Uptake and fate of class B scavenger receptor ligands in HepG2 cells. *European Journal of Biochemistry* 261:227-235.
147. Pittman, R.C., Knecht, T.P., Rosenbaum, M.S., and Taylor, C.A., Jr. 1987. A nonendocytotic mechanism for the selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesterol esters. *Journal of Biological Chemistry* 262:2443-2450.
148. Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., and Sweet, W. 1968. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161:370-371.
149. Bottenstein, J.E., and Sato, G.H. 1979. Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:514-517.
150. Yamada, Y., Doi, T., Hamakubo, T., and Kodama, T. 1998. Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cellula and Molecular Life Sci* 54:628-640.
151. Ladu, M.J., Reardon, C., Van Eldik, L., Fagan, A.M., Bu, G., Holtzman, D., and Getz, G.S. 2000. Lipoproteins in the central nervous system. *Annals of the New York Academy of Sciences* 903:167-175.
152. Ohgami, N., Nagai, R., Miyazaki, A., Ikemoto, M., Arai, H., Horiuchi, S., and Nakayama, H. 2001. Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products. *Journal of Biological Chemistry* 276:13348-13355.
153. Gillotte-Taylor, K., Boullier, A., Witztum, J.L., Steinberg, D., and Quehenberger, O. 2001. Scavenger receptor class B type I as a receptor for oxidized low density lipoprotein. *Journal of Lipid Research* 42:1474-1482.
154. de la Llera-Moya, M., Rothblat, G.H., Connelly, M.A., Kellner-Weibel, G., Sakr, S.W., Phillips, M.C., and Williams, D.L. 1999. Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface. *Journal of Lipid Research* 40:575-580.
155. Gu, X., Kozarsky, K., and Krieger, M. 2000. Scavenger receptor class B, type I-mediated [³H]cholesterol efflux to high and low density lipoproteins is dependent on lipoprotein binding to the receptor. *Journal of Biological Chemistry* 275:29993-30001.
156. Kellner-Weibel, G., de La Llera-Moya, M., Connelly, M.A., Stoudt, G., Christian, A.E., Haynes, M.P., Williams, D.L., and Rothblat, G.H. 2000. Expression of scavenger receptor BI in COS-7 cells alters cholesterol content and distribution. *Biochemistry* 39:221-229.
157. Rothblat, G.H., de la Llera-Moya, M., Atger, V., Kellner-Weibel, G., Williams, D.L., and Phillips, M.C. 1999. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *Journal of Lipid Resarch* 40:781-796.
158. Johnson, W.J., Mahlberg, F.H., Rothblat, G.H., and Phillips, M.C. 1991. Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1085:273-298.
159. Jacobs, N.L., Andemariam, B., Underwood, K.W., Panchalingam, K., Sternberg, D., Kielian, M., and Liscum, L. 1997. Analysis of a Chinese hamster ovary cell mutant with defective mobilization of cholesterol from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum. *Journal of Lipid Research* 38:1973-1987.

160. Yoshida, Y., Ito, N., Shimakawa, S., and Niki, E. 2003. Susceptibility of plasma lipids to peroxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305:747-753.
161. Greene, L.A., and Tischler, A.S. 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73:2424-2428.
162. Greene, L.A. 1977. Quantitative in vitro studies on the nerve growth factor (NGF) requirement of neurons. II. Sensory neurons. *Developmental Biology* 58:106-113.
163. Cherradi, N., Bideau, M., Arnaudeau, S., Demaurex, N., James, R.W., Azhar, S., and Capponi, A.M. 2001. Angiotensin II promotes selective uptake of high density lipoprotein cholesterol esters in bovine adrenal glomerulosa and human adrenocortical carcinoma cells through induction of scavenger receptor class B type I. *Endocrinology* 142:4540-4549.
164. Calvo, D., Gomez-Coronado, D., Lasuncion, M.A., and Vega, M.A. 1997. CLA-1 is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 17:2341-2349.
165. Imachi, H., Murao, K., Sayo, Y., Hosokawa, H., Sato, M., Niimi, M., Kobayashi, S., Miyauchi, A., Ishida, T., and Takahara, J. 1999. Evidence for a potential role for HDL as an important source of cholesterol in human adrenocortical tumors via the CLA-1 pathway. *Endocrinology Journal* 46:27-34.
166. Posse De Chaves, E.I., Vance, D.E., Campenot, R.B., Kiss, R.S., and Vance, J.E. 2000. Uptake of lipoproteins for axonal growth of sympathetic neurons. *Journal of Biological Chemistry* 275:19883-19890.
167. Srivastava, R.A., and Jain, J.C. 2002. Scavenger receptor class B type I expression and elemental analysis in cerebellum and parietal cortex regions of the Alzheimer's disease brain. *Journal of Neurological Science* 196:45-52.
168. Pitas, R.E., Boyles, J.K., Lee, S.H., Hui, D., and Weisgraber, K.H. 1987. Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. *Journal of Biological Chemistry* 262:14352-14360.
169. Christie, R.H., Chung, H., Rebeck, G.W., Strickland, D., and Hyman, B.T. 1996. Expression of the very low-density lipoprotein receptor (VLDL-r), an apolipoprotein-E receptor, in the central nervous system and in Alzheimer's disease. *Journal of Neuropathology Experimental Neurology* 55:491-498.
170. Rebeck, G.W., Reiter, J.S., Strickland, D.K., and Hyman, B.T. 1993. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 11:575-580.
171. Baranova, I., Vishnyakova, T., Bocharov, A., Chen, Z., Remaley, A.T., Stonik, J., Eggerman, T.L., and Patterson, A.P. 2002. Lipopolysaccharide down regulates both scavenger receptor B1 and ATP binding cassette transporter A1 in RAW cells. *Infection and Immunity* 70:2995-3003.