



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Escuela de Bioquímica

Profesor patrocinante: Dr. Federico Leighton P.  
Depto. Biología Celular y Molecular, Facultad de  
Ciencias Biológicas, P. Univ. Católica de Chile.

Profesor copatrocinante: Dra. Gloria León R.  
Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias,  
Universidad Austral de Chile.

**EFECTO DE LIPOPROTEÍNAS OXIDADAS EN CÉLULAS  
ENDOTELIALES HUMANAS. PROTECCIÓN POR ÁCIDO  
PROTOCATÉQUICO**

Tesis de Grado presentada como  
parte de los requisitos para optar  
al grado de *Licenciado en  
Bioquímica* y al Título profesional  
de *Bioquímico*

**CRISTIAN ALVARO ZAMBRANO VALERIO**

Valdivia – Chile  
NOVIEMBRE de 2005

## **DEDICATORIA**

**“Con mucha satisfacción, dedico esta tesis a mis padres, por todos sus esfuerzos que permiten ahora mi realización personal y profesional.”**

**“A mis compañeros y amigos, parte viva de mi formación y crecimiento personal lejos de mi hogar, en la hermosa ciudad de Valdivia”**

**“Con mucho cariño a Carolina Alarcón. Espero cumplir con lo que ella hubiese querido de cada uno de nosotros”**

**“Al esfuerzo y entrega de mis profesores”**

**“A mi hijo Sebastián, quién quizás sea mi futuro colega”**

**“A mi mujer. Gracias por darme tanta felicidad”**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Dr. Federico Leighton por brindarme su apoyo como Orientador científico, así como también al proyecto “Ciencia, Vino y Salud” de la Pontificia Universidad Católica de Chile (PUC-PBMEC-98) por el financiamiento del trabajo.

A la Dra. Gloria León por la corrección del manuscrito, lo cual fue un valioso aporte para la obtención del grado académico.

A la Dra. Ana María Zárraga por su incondicional guía en el proceso de titulación. Le agradezco además que me haya acogido en su laboratorio en mis años de estudiante.

También agradezco a Soledad, Rocío, Alejandra, Álvaro y muchos otros que me acompañaron en los experimentos y discusión de los resultados de esta tesis.

## ÍNDICE

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| Índice  | i             |
| Índice de figuras y tablas  | iii           |
| Listado de abreviaturas   | v             |
| <b>1. Resumen</b>   | <b>1</b>      |
| Summary   | 2             |
| <b>2. Introducción</b>  | <b>3</b>      |
| 2.1 Hipótesis   | 7             |
| 2.2 Objetivos   | 7             |
| <b>3.0 Materiales y métodos</b>   | <b>9</b>      |
| 3.1 Materiales  | 9             |
| 3.2 Métodos   | 11            |
| <b>4. Resultados</b>  | <b>20</b>     |
| 4.1. Aislamiento, cultivo y caracterización de células endoteliales HUVEC     | 21            |
| 4.2 Purificación de lipoproteínas   | 22            |
| 4.3 Caracterización de las lipoproteínas purificadas                          | 24            |
| 4.3.1 Electroforesis de lipoproteínas en geles de agarosa                     | 24            |
| 4.3.2 Electroforesis de lipoproteínas en geles de poliacrilamida en gradiente | 26            |
| 4.4 Oxidación <i>in vitro</i> de lipoproteínas                                | 28            |
| 4.4.1 Formación de dienos conjugados  | 32            |
| 4.4.2 Migración electroforética de lipoproteínas en geles de agarosa          | 31            |
| 4.4.3 Fragmentación de apoproteínas en lipoproteínas oxidadas                 | 33            |
| 4.4.4 Determinación de grupos amino libres                                    | 35            |
| 4.5 Evaluación del estrés oxidativo en células HUVEC tratadas con             |               |

|   |    |
|---|----|
| lipoproteínas oxidadas. Efecto del antioxidante APC                                       | 37 |
| 4.5.1 Cuantificación de EROs por detección de fluorescencia de<br>2,7-diclorofluoresceína | 37 |
| 4.5.2 Detección de 2,7-DCF en células HUVEC por microscopía de<br>fluorescencia directa   | 41 |
| 4.5.3 Análisis de los niveles de la proteína hemoxigenasa-1 en<br>células HUVEC           | 42 |
| 4.5.4 RT-PCR de HO-1  | 46 |
| 4.5.6 Formación de residuos de nitrotirosinas en células HUVEC                            | 49 |
| 5. <b>Discusión</b>   | 51 |
| 6. <b>Bibliografía</b>  | 58 |

| <b>Índice de Figuras y Tablas</b>  | <b>página</b> |
|--|---------------|
| Figura 1: Caracterización morfológica de células HUVEC   | 21            |
| Figura 2: Purificación preparativa de lipoproteínas por ultracentrifugación zonal                                  | 23            |
| Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa de plasma y lipoproteínas purificadas.                                  | 25            |
| Figura 4: Electroforesis en gel de poliacrilamida para LDL y HDL purificadas                                       | 27            |
| Figura 5: Formación de dienos conjugados en oxidación de LDL y HDL   | 29            |
| Figura 6: Formación de dienos conjugados en un medio con APC   | 30            |
| Figura 7: Electroforésis para lipoproteínas oxidadas en geles de agarosa   | 32            |
| Figura 8: Electroforésis en gel de poliacrilamida en gradiente   | 34            |
| Figura 9: Determinación de grupos NH <sub>2</sub> en LDL y HDL oxidadas  | 36            |
| Figura 10: Detección de fluorescencia de 2,7-DCF en células HUVEC estimuladas con lipoproteínas nativas y oxidadas | 38            |
| Figura 11: Efecto de la concentración de APC sobre el aumento de EROs por LDL oxidada                              | 39            |
| Figura 12: Efecto de APC en células HUVEC estimuladas con LDL y HDL oxidadas                                       | 40            |
| Figura 13: Detección de EROs por microscopía de fluorescencia directa en células HUVEC                             | 41            |
| Figura 14: Evaluación de la dependencia del tiempo de estímulo con LDLox en la expresión de HO-1                   | 43            |
| Figura 15: Western-blot de HO-1 en células HUVEC tratadas con  |               |

|            |   |    |
|------------|---|----|
|            | LDLox y APC   | 44 |
| Figura 16: | Western-blot de HO-1 en células HUVEC tratadas con HDLox y APC                                | 45 |
| Figura 17: | RT-PCR del transcrito de HO-1 en células HUVEC incubadas a distintos tiempos con LDL oxidada  | 47 |
| Figura 18: | Evaluación del transcrito para HO-1 en células HUVEC tratadas con LDL oxidada y antioxidantes | 48 |
| Figura 19: | Western-blot para residuos de nitrotirosina en proteínas totales extraídas de células HUVEC   | 50 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                   |  |
|-------------------|--|
| AA                | : antimicina A   |
| APC               | : ácido protocatéquico   |
| bFGF              | : factor básico de crecimiento de fibroblastos                 |
| BHT               | : hidroxitolueno butilato                                      |
| BSA               | : albúmina de suero de bovino                                  |
| DTT               | : ditioneitol  |
| DiO               | : 3,3'-doctadeciloxacarbocianina perclorato                    |
| 2,7-DCF-DA        | : 2,7-diclorofluoresceína-diacetato                            |
| EDTA              | : ácido etilendiaminotetracético                               |
| EGF               | : factor de crecimiento epidermal                              |
| eNOS              | : óxido nítrico sintetasa endotelial                           |
| EROs              | : especies reactivas del oxígeno                               |
| HDL               | : "high density lipoproteins" (lipoproteínas de alta densidad) |
| HDLox             | : lipoproteínas de alta densidad oxidadas                      |
| HEPES             | : ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico          |
| HO-1              | : hemoxigenasa 1   |
| HUVEC             | : células de endotelio de vena de cordón umbilical humanas     |
| kDa               | : kilo daltons   |
| LDL               | : "low density lipoproteins" (lipoproteínas de baja densidad)  |
| LDLox             | : lipoproteínas de baja densidad oxidadas                      |
| LOX-1             | : receptor de LDL oxidada 1                                    |
| MDA               | : malondialdehído  |
| OONO <sup>-</sup> | : peroxinitrito  |

|      |  |
|------|--|
| PBS  | : tampón fosfato salino  |
| PBST | : tampón fosfato salino más polioxietilensorbitan monolaurato 0.05 %   |
| PCR  | : reacción de polimerasa en cadena                                     |
| PMSF | : fenilmetilsulfonilfluoruro   |
| SRB1 | : receptor de aseo tipo B clase 1                                      |
| SFB  | : suero fetal de bovino  |
| SDS  | : dodecil sulfato de sodio   |
| TNBS | : ácido trinitrobenzensulfónico  |
| VLDL | : “very low density lipoproteins” (lipoproteínas de muy baja densidad) |

## 1. RESUMEN

La aterosclerosis es una enfermedad vascular que está vinculada al aumento de los niveles plasmáticos de lipoproteínas de baja densidad, LDL. Existe una hipótesis que relaciona la oxidación de esta partícula como efecto gatillante de la cadena de eventos que terminan en la inflamación de la pared arterial y posterior disminución del diámetro del lumen del vaso. Las lipoproteínas de alta densidad, HDL, cumplen un rol protector de la enfermedad, debido a que retiran lípidos desde la periferia para su metabolización en el hígado. Sin embargo, HDL también se puede oxidar y recientemente se ha encontrado HDL oxidada en ateromas. La terapia antioxidante se vislumbra como una posible solución al problema, donde alimentos ricos en antioxidantes como frutas, verduras o vino tinto cobran interés de estudio como suplemento dietario en humanos.

De acuerdo a lo anterior, estudiamos el efecto de LDL y HDL oxidadas en un cultivo de células endoteliales humanas. En primera instancia, se caracterizó la oxidación *in vitro* de ambas partículas con cobre y luego se evaluó la presencia de marcadores de estrés oxidativo en las células tratadas con estas lipoproteínas. En el mismo modelo, se estudió el efecto de un antioxidante polifenólico, ácido protocatéquico (APC). Se seleccionó este compuesto por haber sido detectado en el plasma de individuos luego de una ingesta aguda de vino tinto, bebida rica en antioxidantes polifenólicos.

Los estudios de oxidación de lipoproteínas mostraron que ambas se oxidan de manera similar, modificando tanto sus componentes lipídicos como proteicos. Los marcadores de estrés estudiados, niveles de especies reactivas de oxígeno e inducción de hemoxigenasa-1, aumentaron significativamente con LDL oxidada; aunque menor, el efecto de HDL oxidada también fue significativo. Las lipoproteínas en su forma nativa no produjeron cambios. La adición de APC logró disminuir a niveles basales ambos marcadores en células tratadas con una u otra lipoproteína oxidada.

Estos resultados nos entregan datos acerca de la protección otorgada por un antioxidante exógeno de consumo habitual en el vino tinto como lo es el ácido protocatéquico y dan indicios de la participación de HDL oxidada en alguna de las etapas de la enfermedad.

## SUMMARY

Atherosclerosis is a vascular disease related to the increment of plasmatic levels of low density lipoprotein, LDL. The oxidative modifications of LDL trigger the initial events of arterial wall inflammatory response in a so called “oxidative hypothesis of atherosclerosis”. High density lipoprotein, HDL, levels have a protective role to vascular diseases because they promote the retrograde transport of cholesterol from peripheral tissues to liver for metabolization. However, HDL can undergo oxidation; moreover oxidized HDL has been found in atheromatous plaques. The antioxidant therapy is a possible solution to this problem through dietary supplementation with antioxidant rich food.

In this study, we analyzed the effects of both, oxidized LDL and oxidized HDL, on a human endothelial cell culture. In order to know the antioxidant properties of a bioavailable phenolic compound, prothocatechuic acid (APC), we evaluate the protection against oxidative injury by oxidized lipoproteins stimuli.

The lipoprotein oxidation studies have shown a similar oxidation of both LDL and HDL in their lipid and protein components. Two oxidative stress markers, reactive oxygen species production and heme oxygenase-1 expression, were significantly increased in oxidized LDL treatment. Although to a lesser extent, oxidized HDL increased too the oxidative markers respect to the control cells. Additionally, APC added to oxidized lipoproteins treatments did maintained the basal levels of the oxidative stress markers like a control.

These results supports the role of endothelial cells as a target of oxidized lipoprotein in the indication for the participation of oxidized HDL in some of the steps in disease and show information about the protection conferred by an exogenous antioxidant present in a habitual consume drink like red wine.

## 2. INTRODUCCIÓN

Los lípidos son transportados en el torrente sanguíneo por medio de las lipoproteínas. Las lipoproteínas se han agrupado en sub-poblaciones; éstas son las de alta densidad (HDL), densidad intermedia (IDL), baja densidad (LDL) y muy baja densidad (VLDL). Las (LDL) poseen un alto contenido graso y participan en el transporte de lípidos desde el torrente sanguíneo hacia los tejidos periféricos. Las HDL poseen una mayor proporción de proteínas respecto a lípidos y cumple un rol esencial en el transporte reverso de colesterol, es decir desde los tejidos periféricos hacia el hígado para su modificación y posterior excreción.

Por otra parte, la aterosclerosis se define como una enfermedad que afecta el sistema vascular el cual trae como consecuencias el desarrollo de infartos cerebrales y del miocardio, gangrena y pérdida de la función en las extremidades, siendo responsable del 50 % de la mortalidad en países desarrollados, tales como Estados Unidos, Japón y Europa (Ross, 1993). La relación directa entre niveles plasmáticos de lipoproteínas de baja densidad, LDL, y la ocurrencia de la enfermedad guió los estudios que llevaron a formular una hipótesis llamada “hipótesis oxidativa de la aterosclerosis” planteada por Daniel Steinberg en 1992. En ésta, la causa de la enfermedad sería la acumulación de LDL en el espacio subendotelial en sujetos con altos índices plasmáticos de LDL. Así, en ausencia de la gran capacidad antioxidante del plasma, las lipoproteínas se oxidarían para crear una nueva partícula llamada LDL oxidada (LDLox) con propiedades fisicoquímicas diferentes (Henriksen y cols., 1981, 1983) al igual que funciones biológicas distintas como la unión a receptores para LDLox (LOX-1) o receptores de aseo (SR-BI), activación de genes de respuesta inflamatoria y en general, un aumento del estrés oxidativo en el entorno de la placa aterosclerótica, produciéndose así un efecto autocatalítico para la modificación oxidativa de componentes extracelulares e intracelulares. La detección de LDL oxidativamente modificada (LDLox) en lesiones arteroscleróticas (Palinski y cols., 1989), entrega aún más evidencia para formular la hipótesis oxidativa de la aterosclerosis.

El mecanismo de oxidación *in vivo* de LDL aún no ha sido completamente dilucidado, sin embargo se postulan diversas vías que conducirían a la oxidación de la

lipoproteína (Heinecke y cols., 1998). Entre estos se encuentran la oxidación a través de metales como hierro y cobre (Heinecke y cols., 1984), actividad de la enzima lipoxigenasa, capaz de peroxidar lípidos presentes en alta concentración en lipoproteínas (Yamamoto y cols., 1992) y la participación directa de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno como moléculas capaces de modificar lípidos y residuos de proteína de las apoproteínas (Halliwell, 1993; Steinbrecher, 1987). Estas vías de modificación de lipoproteínas actuarían lejos del plasma (Stocker y cols., 1988).

Las lipoproteínas se pueden oxidar *in vitro* con  $\text{CuSO}_4$ , obteniendo las mismas modificaciones de la incubación en células (Steinbrecher y cols. 1987, 1996). Diversos autores han publicado trabajos acerca de LDL oxidada y los cambios que produce a células en cultivo. En esta clase de modelos *ex vivo*, se ha evaluado el papel de metales como cobre y hierro en el proceso de oxidación de LDL, encontrando que son necesarios para lograr oxidar la partícula lipoproteica (Steinbrecher y cols., 1984).

Una de las dificultades del estudio de los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de la enfermedad y su vinculación a lipoproteínas oxidadas, es el amplio grado de oxidación que se puede obtener para cada partícula purificada. Esto debido a la heterogeneidad, tanto en el contenido de moléculas liposolubles antioxidantes que contienen, como la Vitamina E o la proporción de lípidos con distinta estructura y saturación (ácidos grasos monoinsaturados, poliinsaturados o insaturados, colesterol, etc.) (Steinberg, 1997).

La evaluación del grado de oxidación de las lipoproteínas por ensayos que determinan la formación de malondialdehído (MDA) (Lee, 1980), cambios en la movilidad electroforética (Noble, y cols., 1968), la formación de dienos conjugados (Dieber-Rotheneder y cols., 1991) o la determinación de grupos amino en las apoproteínas (Habeeb y cols., 1966), entregan información acerca de la magnitud de la modificación sufrida por las lipoproteínas purificadas a partir de plasma humano y de animales de estudio o en ensayos de oxidación *in vitro*, ya sea por incubación con células endoteliales o macrófagos, o suspendidas en un tampón conteniendo cobre o hierro.

El término estrés oxidativo indica un desbalance de especies pro-oxidantes y anti-oxidantes, predominando las primeras. LDLox es inductora de estrés oxidativo y se

han establecido algunos marcadores de esta condición. Uno de ellos y probablemente el más directo es la determinación de especies reactivas del oxígeno, EROs, las que aumentan en células tratadas con la lipoproteína oxidada (Cominacini, 2000). Una manera indirecta de detectar el incremento de estrés oxidativo es evaluando la inducción de una proteína de estrés térmico HSP-32 o hemoxigenasa-1 (HO-1). El gen que codifica para esta proteína posee un sitio de unión para un factor nuclear que está involucrado en procesos de aumento de estrés oxidativo (Siow y cols., 1995)

En numerosos estudios epidemiológicos se ha documentado una relación inversa entre los niveles plasmáticos de HDL y la incidencia de enfermedad arterial coronaria aterosclerótica (Gordon y cols., 1989). Esta protección podría ser mediada a través de una inhibición en la oxidación de LDL por HDL (Parthasarathy y cols., 1990) o por el denominado transporte reverso de colesterol, el cual traslada lípidos desde la periferia hacia el hígado para su metabolización. Este mecanismo también podría incluir el traspaso de lípidos oxidados desde la LDLox, ayudando a la detoxificación de estas moléculas. Sin embargo, se ha descrito que HDL obtenida de individuos luego de un infarto al miocardio, no sólo pierden la capacidad de proteger a LDL de la oxidación, sino que aumentaron la oxidación de LDL (Hama y cols., 1992).

Recientemente se ha reportado la presencia de HDL oxidada (HDLox) en lesiones ateroscleróticas (Nakajima y cols., 2000). Además existe evidencia previa que señala que HDL es susceptible a la oxidación *in vitro* al igual que la LDL (Gordon, 2000). El conocimiento sobre sus efectos sobre el endotelio, se limita a verificar la pérdida de su capacidad ateroprotectora al disminuir la salida de colesterol de células espumosas luego de ser tratadas con HDLox respecto al tratamiento con HDL nativa (Nagano y cols., 1991). La relación acerca de la posible participación de HDLox en el desarrollo de la aterosclerosis aún no se conoce, tampoco se sabe si estas lipoproteínas oxidadas inducen estrés oxidativo en células relacionadas a la vasculatura así como lo hacen las LDLox.

En los sistemas biológicos existen una serie de enzimas encargadas de transformar moléculas prooxidantes en otras con menor reactividad. Por otra parte actúan de igual manera moléculas antioxidantes, ya sea de origen endógeno como exógeno, las cuales ayudan a mantener este equilibrio oxidativo.

Los polifenoles son moléculas antioxidantes que se encuentran en una gran variedad de vegetales. Se dividen en dos grandes grupos: 1. Flavonoides (catequina, quercetina, malvidina, genisteína, entre otros) 2. Ácidos fenólicos (ac. gálico, ac. ferúlico, ac. protocatéquico, entre otros).

Una fuente importante de abundantes y diversos polifenoles lo constituye el vino tinto. Estudios realizados en sujetos sometidos a una dieta con alto contenido lipídico, demuestran una pérdida de la función endotelial. El mismo estudio muestra que la función endotelial se reestablece al suplementar esta dieta con vino o al administrar una dieta rica en frutas y verduras, todas ellas fuentes de antioxidantes polifenólicos (Cuevas y cols., 1998).

Es por este tipo de hallazgos que se considera la administración de antioxidantes se vislumbra como una herramienta de protección frente a enfermedades cardiovasculares y otras, que involucran aumento de estrés oxidativo, como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, es necesario dilucidar los eventos moleculares que conducen a la pérdida del equilibrio oxidativo en distintos sistemas celulares para comprender así el proceso de envejecimiento y las enfermedades asociadas a éste.

Resulta de gran interés descubrir la relación existente entre el grado de modificación oxidativa de la LDL y la secuencia de eventos en el proceso de aterogénesis para así comenzar a realizar ensayos clínicos con antioxidantes, lo cual correspondería a una de las últimas fases de la puesta en el mercado de fármacos que ayuden a evitar la aparición de la enfermedad. Por otra parte, aún no se establece el papel fisiológico o fisiopatológico de las HDL oxidadas en este proceso, ni tampoco si sus nuevas propiedades estructurales le entregan o no características proaterogénicas típicas de la LDLox.

## **2.1 HIPÓTESIS**

De acuerdo a antecedentes previos, en esta tesis se propone la siguiente hipótesis:

**“Las Lipoproteínas humanas (LDL y HDL) oxidadas incrementan el estrés oxidativo en células endoteliales humanas en cultivo. El ácido protocatéquico revierte tal efecto”.**

### **2.3.1 OBJETIVO GENERAL**

2.3.1.1 Evaluar marcadores de estrés oxidativo en un modelo de cultivo de células endoteliales humanas tratadas con HDL y LDL en sus formas oxidadas.

2.3.1.2 Comprobar el efecto antioxidante del ácido protocatéquico en células tratadas con lipoproteínas oxidadas.

### **2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

2.3.2.1 Purificar, oxidar y caracterizar lipoproteínas humanas de baja y alta densidad, estableciendo parámetros claros de identificación tanto de LDL y HDL así como de sus formas oxidadas a nivel de componentes lipídicos y proteicos.

2.3.2.2 Cuantificar las especies reactivas del oxígeno y determinar el incremento de la masa de hemoxigenasa-1 en cultivos de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC), tratadas con lipoproteínas nativas y oxidadas y antioxidante.

2.3.2.3 Evaluar y correlacionar la formación de residuos de nitrotirosina como modificación oxidativa directa en proteínas totales del cultivo de células HUVEC, tratadas con lipoproteínas oxidadas.

2.3.2.4 Establecer el efecto de un antioxidante polifenólico en los procesos de estrés oxidativo estudiados. Nuestro laboratorio ya ha detectado ácido protocatéquico en vino y plasma de voluntarios con ingesta moderada de esta bebida. Por esto se decidió evaluar este antioxidante frente a estímulos oxidativos directos en células del endotelio.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales

##### 3.1.1 Reactivos químicos

###### De SIGMA-Chemical

Medio de cultivo M199, medio M199 sin rojo fenol, colagenasa tipo I, sal de Hanks, penicilina-estreptomocina, heparina, medio DMEM, HEPES, EDTA, gelatina, albúmina sérica bovina (BSA), aprotinina, PMSF, SDS, Tritón X-100, Trizma base, acrilamida, bisacrilamida, TEMED, nitrocelulosa, quercetina, ácido protocatéquico, DCF-DA.

###### De GIBCO-BRL

Medio de cultivo de células endoteliales humanas libres de suero (human endothelial-SFM System), suero fetal de bovino (FBS), suero de ternera (CS), fungizona, reactivo TRIZOL, SuperScript II, *randoms primers*, L-glutamina.

###### De Perkin –Elmer

Material PCR para HO-1 (Deoxinucleótidos, MgCl<sub>2</sub>, Tampón 5X PCR, *Taq* polimerasa).

###### De PROMEGA

Material PCR para  $\beta$ -actina (Deoxinucleotidos, MgCl<sub>2</sub>, Tampón 5X PCR, *Taq* polimerasa).

###### De Santa Cruz Biotechnology

Anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (HRP)

Anti-eNOS policlonal desarrollado en conejo

###### De Stressgen

Anticuerpo policlonal anti-heme oxigenasa-1 desarrollado en conejo (HO-1) (spa-896).

### De Upstate Biotechnology

Anti-nitrotirosina, anticuerpo monoclonal desarrollado en conejo.

### De Chiron

Factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y factor de crecimiento endotelial (EGF) (Donados gentilmente por el Dr. Carlos George-Nascimento).

#### 3.1.2 Material biológico

Cordón umbilical humano para la obtención de células endoteliales de vena (HUVEC) obtenidos de la maternidad de la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Plasma humano de hombres jóvenes normolipidémicos obtenido por donación voluntaria y procesado por el Banco de Sangre del Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

#### 3.1.3 Oligonucleótidos partidores

Para las reacciones de amplificación por PCR, se utilizó los siguientes juegos de partidores, mandados a sintetizar a KEYSTONE LABS. (USA) y distribuidos por BioSonda S.A. (Chile):

|                 |   |    |           |                                   |
|-----------------|---|----|-----------|-----------------------------------|
|                 |   | Δ  |           |                                   |
| HO-1 humana     | : | 20 | f 80-100  | 5'- AGG CAG AAG AAT GCG AGT TT-3' |
|                 |   | 18 | r 332-350 | 5'- GCT TCA CAT AGC GCT GCA-3'    |
| β-Actina Humana | : | 19 | f 281-300 | 5'- CGA CAT GGA GAA AAT CTG GC-3' |
|                 |   | 19 | r 561-580 | 5'- AGG TCC AGA CGC AGG ATG G-3'  |

Estos partidores fueron diseñados a partir de la secuencia del cDNA de la proteína de estrés térmico HSP-32 ya descrita en la base de datos *Gene Bank* en Internet.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Purificación de LDL y HDL

Las lipoproteínas se prepararon a partir de plasma humano por ultracentrifugación secuencial de acuerdo al método descrito por Havel y cols. (1995), con modificaciones.

La muestra se obtuvo a partir de aproximadamente 800 ml de sangre de distintos donantes voluntarios normolipidémicos con ayuno de 12 horas, por punción de la vena antecubital, separando el componente celular por centrifugación a 2500 rpm por 15 minutos.

La densidad final del plasma se ajustó agregando 0.4946 g/ml de KBr seco, luego se agregó hidroxitolueno butilato (BHT) como antioxidante a una concentración final de 20  $\mu$ M. A continuación se cargó lentamente sobre una solución isotónica de NaCl en un rotor zonal TZ-28, en una proporción de 1,531 : 1 de NaCl : plasma, y se centrifugó a 28000 rpm por 20 h a 4°C en ultracentrífuga Beckman L8-70.

Se colectaron fracciones de 20 ml desde el rotor zonal y de cada fracción se midió la absorbancia a 494 nm para determinar la presencia de las lipoproteínas. De esta manera se realizó una selección de las fracciones enriquecidas en HDL y LDL para su posterior purificación por ultracentrifugación en un rotor vertical.

Para purificar las lipoproteínas por flotación, se mezcló separadamente las fracciones seleccionadas para las HDL y las LDL, y se ajusta la densidad de cada una adicionando KBr seco de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{g KBr} = \text{Volumen (ml)} \times \frac{d_{\text{lipoproteína}} - d_{\text{muestra}}}{1 - (0,312 \times d_{\text{lipoproteína}})}$$

donde  $d_{\text{lipoproteína}}$  corresponde a la densidad promedio de cada lipoproteína (HDL=1.215 g/ml ; LDL=1.063 g/ml).

Cada mezcla se cargó en tubos de polipropileno (Beckman Quick Seal) y se centrifugó a 48000 rpm por 20 horas a 4°C en un rotor vertical Vti-50.

Al término de la corrida se obtuvo, en la parte superior de cada tubo, las lipoproteínas purificadas (LDL de color anaranjado y HDL de color amarillo), las que se colectaron cuidadosamente con pipeta Pasteur.

Las lipoproteínas obtenidas fueron desalinizadas posteriormente por cromatografía de exclusión molecular en columnas Bio-Rad Econo-Pac 10 DG (gel de poliacrilamida con límite de exclusión de 6000 daltons ), se eluyeron con solución tampón PBS con EDTA 0,25 mg/ml (pH 7,4).

Finalmente, las distintas fracciones fueron guardadas bajo ambiente de nitrógeno, a 4°C y en oscuridad.

La concentración de las lipoproteínas se determinó por el método de Lowry modificado (Markwell, 1978).

### **3.2.2. Estudio de oxidación de lipoproteínas *in vitro***

Para la reacción de oxidación se eliminó el EDTA presente en la solución de lipoproteínas, mediante cromatografía de exclusión molecular en columnas BIO-RAD Econo-Pac 10 DG, usando PBS (pH 7,4) como tampón de elución. Luego, las lipoproteínas, a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , se incubaron con  $\text{CuSO}_4$  (20  $\mu\text{M}$ ) a 37°C por 20 horas. La reacción se detuvo con la adición de EDTA 200  $\mu\text{M}$  y se almacenó en atmósfera de  $\text{N}_2$  a 4°C (Parthasarathy y cols., 1989).

### **3.2.3. Formación de dienos conjugados**

Se analizó la susceptibilidad a la oxidación inducida por cobre de las lipoproteínas a través de la cinética de formación de dienos conjugados, midiendo el cambio de absorbancia a 234 nm mediante registro continuo en un espectrofotómetro

Shimadzu UV-1691 (Dieber-Rotheneder y cols., 1991). El ensayo se realizó con 1 mg/ml de lipoproteínas en PBS con  $\text{CuSO}_4$  20  $\mu\text{M}$  a 37°C, por 20 horas.

#### **3.2.4. Determinación de grupos amino libres**

El análisis de los grupos amino de los residuos aminoacídicos de las lipoproteínas se realizó mediante un método espectrofotométrico que involucra la formación de un compuesto derivado de la reacción entre un grupo  $\text{NH}_2$  presente mayormente en residuos de lisina y el ácido trinitrobenzensulfónico (TNBS), con un máximo de absorción a 340 nm (Habeeb, 1966).

Brevemente, se incubaron lipoproteínas 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  con  $\text{NaHCO}_3$  pH 8,5 y TNBS 0.1% a 37 °C por 1 hora. Se agregó 200  $\mu\text{l}$  de HCl 1M y 100  $\mu\text{l}$  de SDS 10%, se agitó suavemente y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se midió la absorbancia a 340 nm. Los valores se interpolaron en una curva de calibración realizada con un estándar de L-valina.

#### **3.2.5. Electroforesis en geles de agarosa**

Las lipoproteínas (30  $\mu\text{g}$ ) se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0,7 % (p/v) en tampón barbital 0.05 M a pH 8,6. Luego, el gel se fijó por 30 minutos en una solución de ac. acético 5% y etanol 75%. Posteriormente, el gel se secó, se tiñó con Sudan-black B solubilizado en 30% etanol y se lavó 5 veces con etanol 30% (Noble, 1968).

### **3.2.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente**

El contenido de apoproteínas presentes en las distintas preparaciones de lipoproteínas, se evaluó en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes en un gradiente de concentración del 4 al 25% (Fong y cols., 1987).

Brevemente, 30 µg de lipoproteínas denaturadas por calor se separan por electroforesis y las bandas de proteínas se identificaron por tinción con azul de Coomassie.

### **3.2.7. Cultivo de células endoteliales humanas**

#### **3.2.7.1. Obtención y mantención del cultivo primario:**

A partir de cordones umbilicales humanos, proporcionados por el servicio de maternidad del Hospital Clínico de la Universidad Católica de Chile, las células HUVEC fueron aisladas por digestión controlada de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente (Jaffe y cols., 1973) con algunas modificaciones.

Brevemente, el cordón umbilical, de aproximadamente 20 cm de largo, se recibió en tampón Hank's y se limpió exhaustivamente para remover los restos de sangre (bajo condiciones estériles). Posteriormente, la vena se llenó con colagenasa tipo I (1 mg/ml) en tampón Hank's y se incubó por 20 minutos a 37 °C en baño termoregulado con agitación suave. El contenido se colectó y se centrifugó a 200 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. El sedimento de células se resuspendió en medio 199 pH 7,4, que contenía SFB 10%, penicilina-G 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml, bFGF 10 ng/ml, EGF 5 ng/ml, heparina 50 µg/ml, anfotericina B 0,250 µg/ml, deoxicolato de sodio 0,205 µg/ml, y se sembraron en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> pre-cubiertas con gelatina de porcino (2% p/v). Después de 24 h de cultivo a 37°C en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> 5% y aire 95 %, las células se lavaron con el medio 199, donde se reemplazó el SFB 10 % por una mezcla de SFB 5 % y suero de ternera 15 %.

Luego de 48-72 horas de cultivo en medio de mantención, antes de alcanzar confluencia, las células fueron subcultivadas desprendiéndolas mediante incubación con Tripsina-EDTA 0.05% por 1-2 min. A 37 °C. Para llevar a cabo este procedimiento, primero las células se lavaron con PBS, luego se cubrieron con tripsina (20  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) y una vez despegadas se resuspendieron en medio 199 que contiene suero fetal bovino 10 % para inactivar la tripsina. Los subcultivos se realizaron en diluciones 1:2 y 1:4, con cambios de medio de mantención cada 48 horas. Para los diferentes experimentos realizados en esta tesis, las células endoteliales se utilizaron entre el 2º y 8º pasaje, en placas de cultivo cubiertas con gelatina (2% p/v), reemplazándose el medio de mantención por medio de depleción (M199 sin rojo fenol que contenía SFB 1%; BSA 0,1%; de penicilina G 100 U/ml y de estreptomycinina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 12 horas antes del tratamiento.

#### 3.2.7.2. Caracterización de los cultivos primarios de células endoteliales:

Para caracterizar y determinar la proporción de células endoteliales presentes en la preparación celular, se evaluó la morfología típica similar a “adoquines” que exhiben estas células. Por inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo policlonal desarrollado en conejo (dilución 1:100), se identificó la presencia de un marcador específico endotelial, el factor de von Willebrand. Para esto las células se fijaron con paraformaldehído al 4% por 10 minutos, se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron 1 hora con el anticuerpo anti-factor von Willenbrand diluido en PBS-tritón X-100 0,3%. Por último, se incubó con un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con FITC (dilución 1:200) y se observó al microscopio de fluorescencia.

Adicionalmente, se evaluó la incorporación de LDL a las células endoteliales. El medio de mantención se reemplazó por “medio de cultivo de células endoteliales humanas libre de lipoproteínas” por 18 horas y se incubaron durante 5 horas con LDL-DiO 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (lipoproteína marcada con molécula fluorescente), a 37 °C. Luego, se observó directamente la incorporación en microscopio de fluorescencia. Para

comprobar la especificidad, se incubaron células con LDL-DiO 10  $\mu\text{g/ml}$  más LDL 400  $\mu\text{g/ml}$  sin marcar.

### **3.2.8. Determinación de especies reactivas de oxígeno utilizando 2,7 diclorofluoresceína diacetato (2,7-DCF-DA)**

#### 3.2.8.1. Cuantificación indirecta en detector de fluorescencia:

Las células HUVEC cultivadas en placas de 60 mm de diámetro, se depletaron del suplemento de suero fetal bovino por 12 horas y se pre-incubaron con 2,7-DCF-DA a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ . Las células luego se trataron por 4 horas con las diferentes lipoproteínas. Luego se lisaron por sonicación con 1 ml de PBS frío, se separó el sobrenadante por centrifugación y se midió la concentración de proteínas por el método de Bradford. El sobrenadante se filtró por filtros millipore de 0,2  $\mu\text{m}$  y la fluorescencia se cuantificó con un detector de fluorescencia F100 Merck-Hitachi, utilizando una longitud de onda de excitación de 503 nm y de emisión de 529 nm.

#### 3.2.8.2. Detección de fluorescencia directa:

También se determinó *in situ* la producción de EROs. Después de pre-incubar las células con 2,7-DCF-DA, estas fueron tratadas por 4 horas con lipoproteínas sin modificar y oxidadas y luego lavadas tres veces con PBS frío. Se colocó un cubreobjeto sobre la superficie del cultivo y se procedió a observar y fotografiar en un microscopio de fluorescencia.

### **3.2.9. Inmunodetección de hemoxigenasa-1**

Luego de los diferentes estímulos con lipoproteínas nativas y oxidadas a una concentración final 50  $\mu\text{g/ml}$ , las células endoteliales se lavaron tres veces con PBS frío y se lisaron con 200  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis (HEPES 10 mM pH 7,4; Tritón X-100 1%;

PMSF 0,5 mM; leupeptina 10 µg/µL en PBS). El contenido de proteínas totales se determinó mediante el método de Bradford. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% con SDS (PAGE-SDS). Luego las bandas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, y los sitios inespecíficos se bloquearon con leche descremada 5% en PBS, Tween 0.05 % (PBST) por 18 horas a 4°C. Las membranas se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-HO-1 (dilución 1:1000 en BSA 1% disuelto en PBST) durante toda la noche a 4°C. Luego de tres lavados con PBST las membranas se incubaron con un anticuerpo desarrollado en cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (1:4000 en 1% BSA-PBST) por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente la proteína HO-1 se detectó usando el sistema de quimioluminiscencia (NEN), empleando films Kodak BioMax Light. La intensidad de las bandas se analizó con un programa para densitometría USI-SCAN.

### **3.2.10. Inmunodetección de residuos de nitrotirosina**

La obtención de los extractos proteicos se realizó de forma similar a lo descrito anteriormente para hemoxigenasa-1, con las siguientes modificaciones: el bloqueo de sitios inespecíficos se hizo con albúmina de suero de bovino tipo V 1% en PBST; la dilución del anticuerpo anti-nitrotirosina desarrollado en conejo es de 1:2000 en BSA 1%-PBST.

### **3.2.11. Amplificación de un fragmento de cDNA del gen que codifica para hemoxigenasa de células HUVEC**

#### **3.2.11.1. Extracción de RNA total de células en cultivo:**

El RNA se obtuvo por el método de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski y cols., 1987) con algunas modificaciones. Las placas se lavaron tres veces con PBS frío, se rasparon las células con TRIZOL de GIBCO-BRL pasando el volumen 10 veces a través de la micropipeta. En un tubo, libre de ribonucleasas (RNAsa), se incubó el extracto por

5 minutos en hielo. Se agregó 200 µl de cloroformo/alcohol isoamilico (49:1) y se agitó vigorosamente por 15 segundos. Se incubó 15 minutos en hielo. Para separar las fases, se centrifugó a 12000 g por 15 minutos a 4 °C. La fase superior acuosa se transfiere a un tubo libre de RNAsa y se agregó 500 µl de isopropanol para precipitar el RNA, por 1 hora a -20 °C. El tubo se centrifugó a 12000 g por 10 minutos a 4 °C, descartando luego el sobrenadante. El sedimento se lavó con 1 ml de etanol 75%. Se eliminó el etanol y se secó la muestra al aire por 10 min. El RNA se resuspendió en H<sub>2</sub>O-DEPC para luego determinar su concentración por lectura de absorbancia a 260 nm.

#### 3.2.11.2 Síntesis de cDNA:

Para la reacción de transcripción reversa se utilizó el sistema de pre-amplificación SuperScript II (GIBCO BRL). Se mezcló 0.75 µg de partidores aleatorios con 5 µg de RNA total y se incubó 10 minutos a 72°C, se enfrió a 4°C. Posteriormente se agregó 4 µL de tampón primera hebra, 20µL DTT 0.1M, 1 µL dNTPs (10 mM cada uno) y 100 U de Super Script II. Se incubó durante 1 hora a 42°C y luego 15 minutos a 72°C.

#### 3.2.11.3. Amplificación de cDNA por PCR

La reacción de PCR fue llevado a cabo en un termociclador GeneAmp PCR 2400 Perkin Elmer, usando reactivos de la misma fuente. Se utilizó una mezcla de reacción (25 µL) conteniendo 1 µl de la preparación de cDNA, partidores 0,3 µM (diseño según secuencia cDNA hHO-1 en Yoshida, 1988), dNTPs (40 µM), 1.5 µM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 U Taq DNA Polimerasa. Se realizaron ciclos con tiempos y temperaturas de 30 segundos de denaturación a 94 °C, 1 minuto de hibridación de los partidores a 53 °C y 1 minuto de polimerización a 72 °C. Terminados los ciclos se mantiene la temperatura a 72 °C por 7 minutos. El producto de amplificación, de un tamaño esperado de 321 pares de bases (bp), se visualizó en un gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE, teñido con bromuro de etidio 50 µg/µl.

Para normalizar los resultados obtenidos con la amplificación del segmento del gen de hemoxigenasa-1, se utilizó la amplificación de un segmento del gen de  $\beta$ -actina humana. Las condiciones de extracción del RNA así como la transcripción reversa fue similar a las utilizadas para hemoxigenasa. En la reacción de PCR, realizamos ciclos de 1 minuto de denaturación a 94 °C, 1 minuto de hibridación a 58 °C y 1 minuto de polimerización a 72 °C.

## 4. RESULTADOS

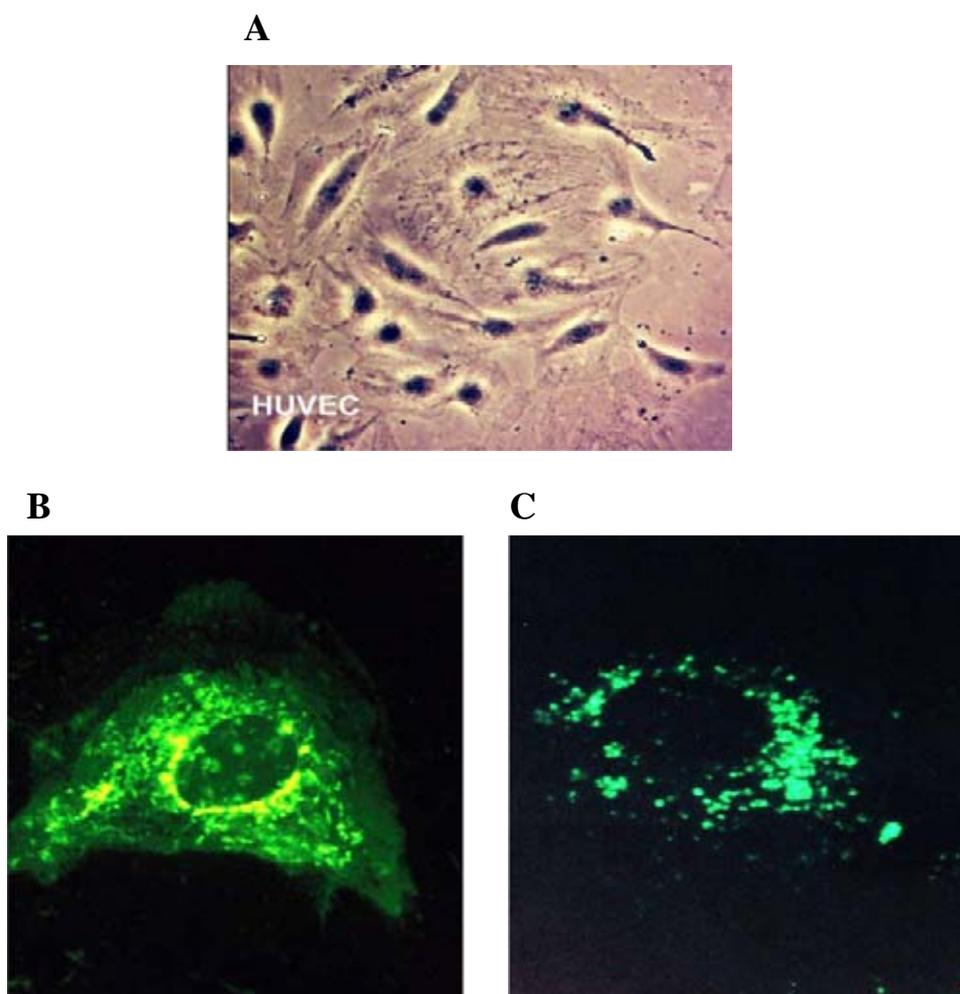
### 4.1. Aislamiento, cultivo y caracterización de células endoteliales HUVEC

Para cumplir con los objetivos de esta tesis se estandarizaron y caracterizaron los cultivos de células HUVEC, los que se utilizaron para los experimentos entre el segundo y sexto pasaje.

El procedimiento de aislamiento y cultivo celular se realizó de acuerdo a lo descrito en métodos, obteniéndose células con una viabilidad cercana al 90%, determinada mediante la exclusión de azul tripán y con una morfología característica de células endoteliales que se puede apreciar en la fotografía de contraste de fase (aumento 40x) que se muestra en la figura 1 A.

La determinación de la eficiencia del proceso de aislamiento celular se realizó previamente en nuestro laboratorio por la detección del factor von Willebrand, proteína que se expresa específicamente en células del endotelio por lo que es utilizada como marcador de células endoteliales. Los resultados revelaron que más del 95% de las células aisladas correspondían a células endoteliales, pues presentaron reacción positiva para este anticuerpo que reacciona específicamente con estructuras del citoplasma de estas células (figura 1-B). De esta forma también se descartó la presencia de células de la musculatura lisa vascular o fibroblastos que no presentan factor von Willebrand.

Adicionalmente, las células endoteliales se caracterizaron por la incorporación de LDL la cual ha sido descrita previamente para este tipo celular (Alexander, y cols. 1991). Para visualizar esta incorporación se utilizó la lipoproteína marcada con una sonda fluorescente (DiO) la que se incubó por 5 h a 37°C con las células en cultivo. Las células mostraron una intensa captación de LDL-DiO, confirmando así la pureza de los cultivos de HUVEC (figura 1-C).



**Figura 1: Caracterización morfológica de células HUVEC**

Panel A: Microfotografía de contraste de fase de cultivo aislado de células de endotelio de vena de cordón umbilical humano bajo aumento 40x.

Panel B: Inmunofluorescencia para anticuerpo anti-factor de von Willebrand revelado con anticuerpo secundario acoplado a FITC.

Panel C: Microfotografía de emisión de fluorescencia directa de LDL acoplada al fluorocromo DiO, el cual es incorporado en células HUVEC.

## 4.2. Purificación de lipoproteínas

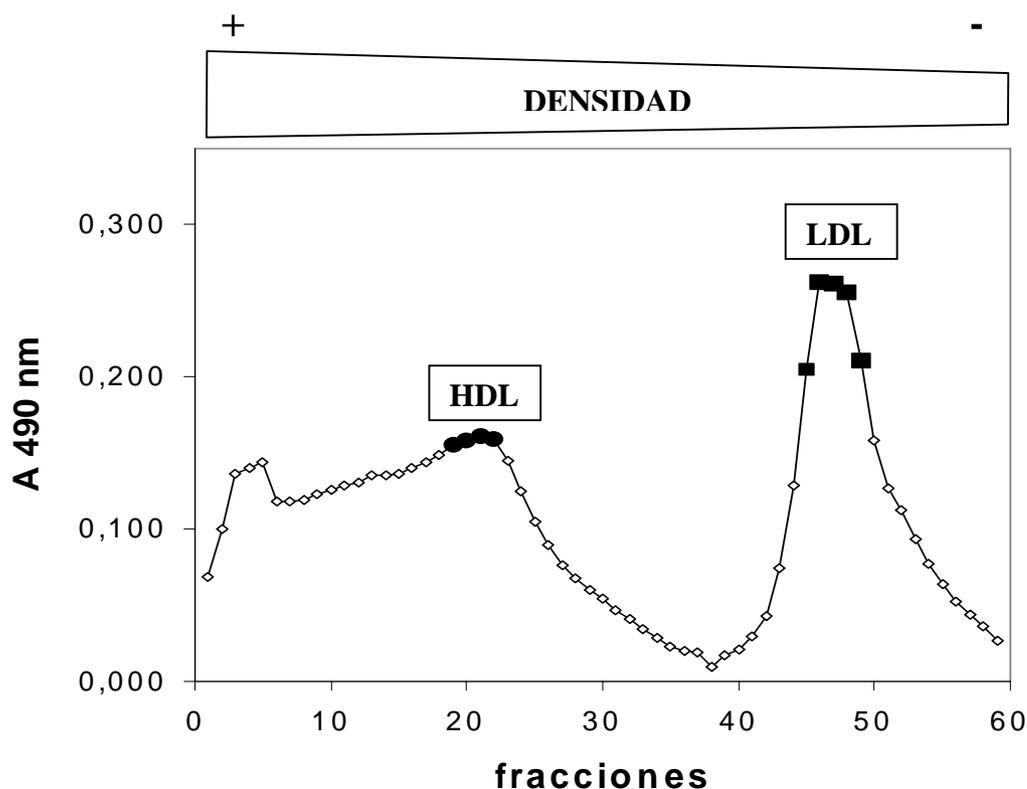
Las lipoproteínas de plasma humano se purificaron a escala preparativa por ultracentrifugación zonal.

En estas condiciones, se crea un gradiente dentro del rotor que ubica los componentes más densos del plasma hacia la parte inferior. Entonces, si se colecta la muestra en fracciones individuales, desde el fondo del rotor, se obtiene en primer lugar HDL, luego de LDL y finalmente de VLDL.

Debido a la condición de ayuno de los donantes, no se obtienen quilomicrones los cuales se ubicarían junto a los componentes de menor densidad del plasma, es decir, en las últimas fracciones. La identificación de las porciones enriquecidas con lipoproteínas, se hizo midiendo absorbancia a 490 nm, máximo de absorción del  $\beta$ -caroteno, un antioxidante liposoluble que se encuentra en alta concentración en las lipoproteínas. De esta forma se observan fracciones con mayor absorbancia correspondientes a LDL y HDL, las lipoproteínas más abundantes del plasma humano (figura 2).

Una segunda ultracentrifugación de las fracciones enriquecidas de cada lipoproteína en un rotor vertical de ángulo fijo, permitió obtener muestras más purificadas y a la vez más concentradas.

Para lograr cada paso de purificación, es necesario ajustar la densidad de la muestra adicionando grandes cantidades de KBr. Debido a esto, las lipoproteínas obtenidas deben ser desalinizadas posteriormente en columnas de exclusión contra un tampón salino que contiene EDTA como preservante.



**Figura 2: Purificación preparativa de lipoproteínas por ultracentrifugación zonal**

Medición de la absorbancia a 490 nm para cada una de las fracciones colectadas del rotor zonal. Los recuadros en el gráfico muestran la región donde se encuentran en mayor concentración HDL y LDL. Los círculos llenos corresponden a las fracciones seleccionadas para purificar HDL y los cuadrados llenos a las fracciones seleccionadas para la purificación de LDL, en un segundo paso de purificación por ultracentrifugación en un rotor de ángulo fijo.

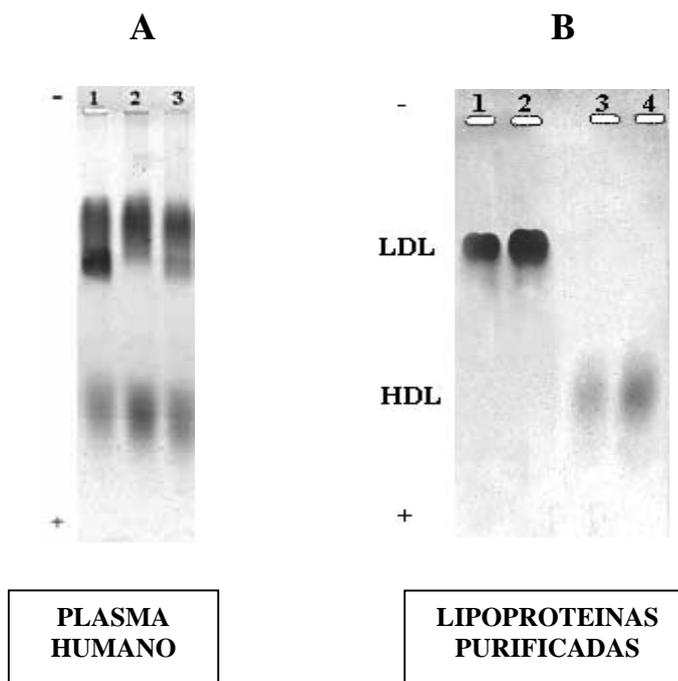
### **4.3. Caracterización de las lipoproteínas purificadas**

#### **4.3.1. Electroforesis de lipoproteínas en geles de agarosa:**

Con el propósito de caracterizar y determinar la eficiencia del proceso de purificación de lipoproteínas, éstas se fraccionaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.7% en tampón barbital y se comparó con muestras de plasma de tres individuos distintos. Esta técnica permite separar los componentes lipídicos tanto del plasma como de la preparación de lipoproteínas de acuerdo al tamaño de cada componente como de su carga, debido a que la separación se realiza en condiciones nativas o no denaturantes. El gel se preparó sobre una membrana flexible impermeable la cual le otorga firmeza al gel a pesar del bajo porcentaje de agarosa. Se cargó 30  $\mu\text{g}$  de proteína para cada muestra. En las muestras de plasma completo se cargó un total de 30  $\mu\text{l}$ . Luego de la electroforesis, el gel se secó con papel absorbente, se fijó y se tiñó con Sudan Blak B, un colorante específico para lípidos. Debido a lo anterior y a las condiciones nativas de la electroforesis, la muestra migra de acuerdo al tamaño y carga negativa neta de cada componente.

Previo a la purificación, el plasma de individuos normolipidémicos presenta distintas bandas de mayor o menor intensidad correspondientes a las diferentes lipoproteínas que contiene (figura 3 A).

Debido a la heterogeneidad de tamaño de las lipoproteínas, se obtienen bandas de amplia longitud, lo que se acentúa para el caso de la HDL respecto a LDL debido a las subpoblaciones de HDL que varían significativamente en su masa total (figura 3 B).



**Figura 3: Electroforesis en geles de agarosa de plasma y lipoproteínas purificadas.**

**Panel A:** Gel de agarosa al 0,7% en tampón barbital, teñido con Sudán Black-B. Los carriles 1, 2 y 3 corresponden a 30  $\mu$ l de plasma de tres voluntarios en ayuno de 12 horas. La muestra se separó en un campo eléctrico a 50 V por 8 horas.

**Panel B:** Gel de agarosa al 0,7% en tampón barbital, teñido con Sudán Black-B. Carriles 1 y 2 corresponden a 20 y 30  $\mu$ g totales de proteína-LDL. Carriles 3 y 4 corresponden a 20 y 30  $\mu$ g de proteína-HDL. La muestra se separó en un campo eléctrico a 50 V por 8 horas.

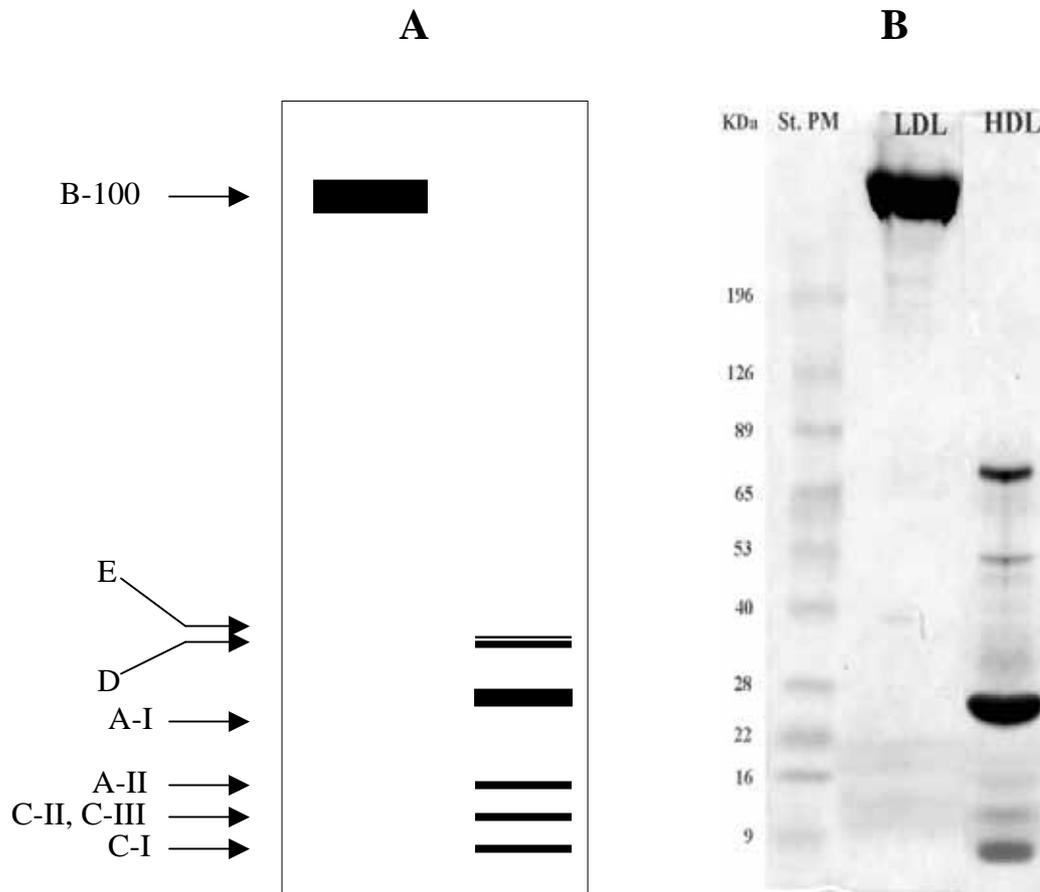
#### 4.3.2. Electroforesis de lipoproteínas en geles de poliacrilamida en gradiente:

Con el objetivo de evaluar la eficiencia del proceso de purificación de LDL y HDL, se realizó una electroforesis en condiciones denaturantes en geles de poliacrilamida en gradiente del 4 al 25 %. Este nos permite visualizar, en un mismo gel, proteínas de alto peso molecular, como la apo B-100 y proteínas de bajo peso como es el caso de la apo A-I. De esta manera se logró comprobar la presencia o ausencia de apoproteínas tanto de LDL como HDL.

Las muestras fueron denaturadas y se cargaron 30  $\mu$ g de proteína total. La tinción corresponde a azul brillante de Coomassie. La decoloración se hizo con una solución de ácido acético, metanol y agua.

En el caso de LDL se observa una banda de aproximadamente 550 kDa que corresponde al tamaño de la apo B-100 (figura 4 B). Se ha descrito la presencia de bandas de menor tamaño molecular correspondientes a la fragmentación de la apo B-100 luego que LDL es oxidada (Fong y cols., 1987). Este antecedente será utilizado en este trabajo para la caracterización de la oxidación *in vitro* de LDL.

La muestra purificada de HDL presenta bandas que se relacionan en tamaño a las apoproteínas que contiene la HDL (figura 4 B). Para facilitar este análisis, se muestra un esquema de las apoproteínas de LDL y HDL ubicadas de acuerdo a su tamaño tomando como referencia las bandas del estandar de peso molecular separado en el gel junto a las lipoproteínas (figura 4 A).



**Figura 4: Electroforesis en geles de poliacrilamida para LDL y HDL purificadas**

**Panel A:** Esquema de las distintas apoproteínas ubicadas de acuerdo a su tamaño tomando como referencia el estándar de peso molecular del panel B.

**Panel B:** Gel de poliacrilamida en gradiente del 4 al 25% en condiciones denaturantes. Se cargó 30  $\mu\text{g}$  de cada lipoproteína purificada. Se aplicó un campo electrico de 100 V por 6 horas. El gel tiñó con azul de Coomassie para revelar las bandas de proteína. La figura es representativa de 5 preparaciones distintas de lipoproteínas.

#### 4.4. Oxidación *in vitro* de lipoproteínas

##### 4.4.1. Formación de dienos conjugados:

Con el propósito de evaluar la oxidación de lípidos presentes en las lipoproteínas se midió la formación de dobles enlaces conjugados en LDL y HDL durante el transcurso de la reacción de oxidación. Estos presentan un máximo de absorción a 234 nm.

La cinética de formación de estos compuestos presenta tres etapas características:

1. Una primera fase llamada de latencia, en la cual no existe cambio en la absorbancia.
2. Incremento exponencial de la absorbancia.
3. Etapa final donde se alcanza un nivel elevado constante de la absorbancia y que señala el máximo de formación de enlaces de este tipo.

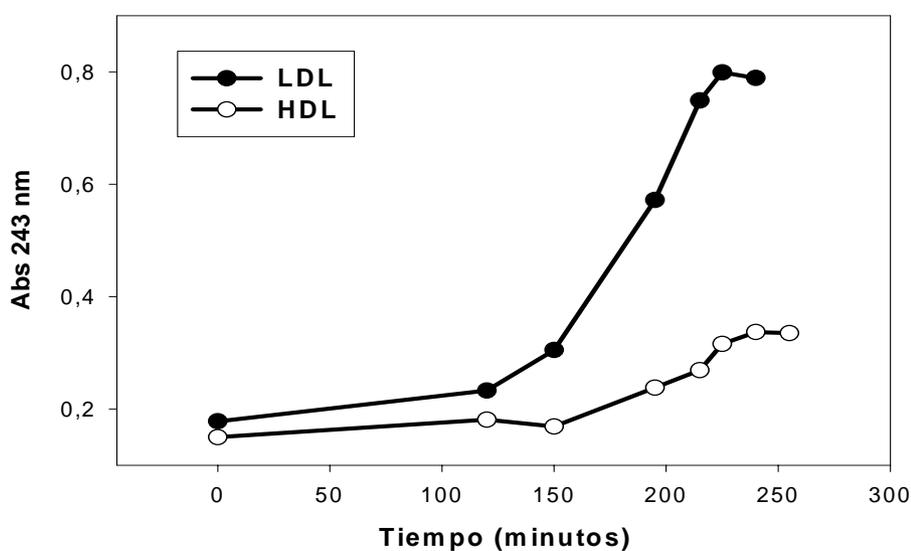
La extensión del tiempo de latencia depende, entonces, de la composición de ácidos grasos de cada lipoproteína y fundamentalmente, de la cantidad de antioxidantes endógenos y exógenos en el caso de adición al medio de reacción.

Se midió absorbancia a 234 nm de la mezcla de reacción incubada a 37 °C que contiene lipoproteínas 1 µg/µl y CuSO<sub>4</sub> 20 µM. Los valores graficados muestran una cinética típica para ambas lipoproteínas, siendo menor la intensidad de la absorción para HDL debido a su menor relación lípidos/proteína (figura 5).

Además esta técnica nos permitió evaluar las propiedades antioxidantes del ácido protocatéquico con el fin de respaldar los ensayos posteriores de este compuesto en cultivo de células HUVEC. La reacción de oxidación se hizo en cubeta de cuarzo y midiendo cada 2 minutos la absorción a 234 nm.

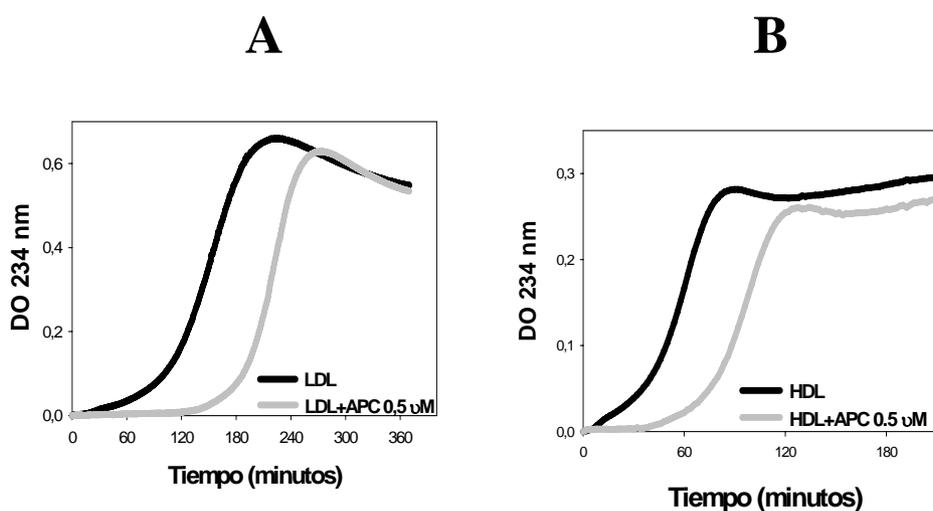
Aplicando procedimientos ya establecidos en nuestro laboratorio, se utilizó una concentración de LDL de 50 µg/ml (figura 6 A) o HDL (figura 6 B) y CuSO<sub>4</sub> 5 µM en

ambas. Una concentración de APC 0,5  $\mu\text{M}$  en la reacción fue suficiente para producir un retardo en la segunda fase de aumento exponencial de la absorbancia (figura 6 A, B).



**Figura 5: Formación de dienos conjugados en oxidación de LDL y HDL**

Detección de la formación de dienos conjugados en LDL y HDL 1 mg/ml oxidadas *in vitro* con  $\text{CuSO}_4$  20  $\mu\text{M}$  a 37°C. De cada tubo de reacción se tomó una alícuota de 50  $\mu\text{l}$  en 950  $\mu\text{l}$  de PBS-EDTA 2,5 mg/ml y se midió la absorbancia a 234 nm. Los valores graficados son representativos de al menos tres ensayos similares con preparaciones distintas de lipoproteínas.



**Figura 6: Formación de dienos conjugados en un medio con APC**

**Panel A:** Cinética de formación de dienos conjugados en LDL 50 µg/ml incubada con CuSO<sub>4</sub> 5 µM con o sin APC. La reacción se realizó en cubeta de cuarzo registrando cada 2 minutos la absorbancia a 234 nm.

**Panel B:** Cinética de formación de dienos conjugados en HDL 50 µg/ml incubada con CuSO<sub>4</sub> 5 µM con o sin APC. La reacción se realizó en cubeta de cuarzo haciendo un registro continuo cada 2 minutos de la absorbancia a 234 nm.

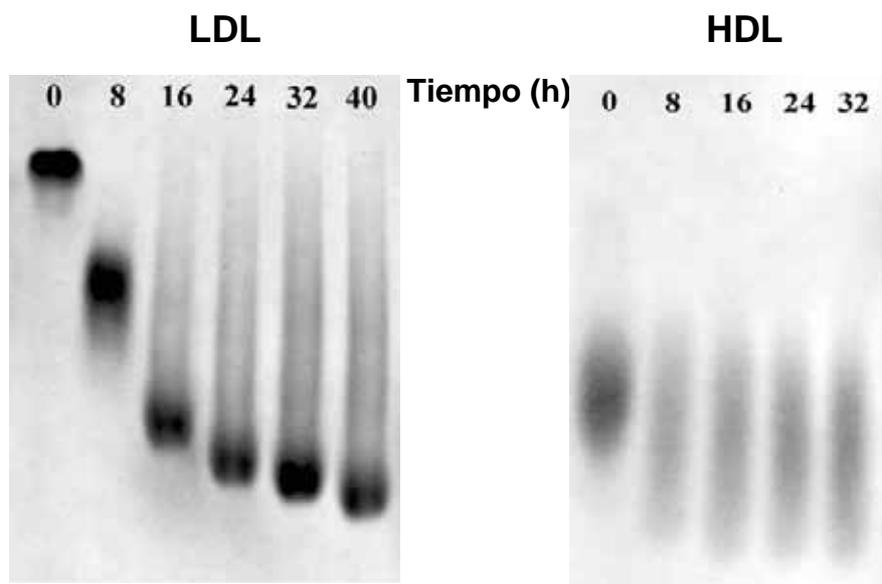
#### **4.4.2. Migración electroforética de lipoproteínas en geles de agarosa:**

Con el objetivo de comprobar cambios estructurales en las lipoproteínas oxidadas respecto a las nativas, se realizó una electroforésis en geles de agarosa en condiciones no denaturantes.

Se obtuvieron muestras después de 8 horas de oxidación y la reacción se detuvo por la adición de EDTA a una concentración final de 200  $\mu$ M. La oxidación de lipoproteínas produce un aumento de su carga neta negativa además de producir fragmentación de la partícula (Fong y cols., 1987). Así observamos para LDL un marcado aumento de la migración luego de 8 y 16 horas de oxidación respecto a la lipoproteína nativa. Para tiempos de oxidación superiores a las 16 horas de oxidación, el incremento en la migración se hace cada vez menor (figura 7 A).

HDL oxidada luego de 8 horas aumenta discretamente su migración electroforética, lo que se mantiene por hasta 32 horas de reacción (figura 7 B).

La marca de las lipoproteínas oxidadas es más amplia y difusa, lo que se correlaciona con el aumento de formas fragmentadas y agregadas de la partícula.



**Figura 7: Electroforesis de lipoproteínas oxidadas en geles de agarosa**

**Panel A:** Migración electroforética en geles de agarosa de LDL 1 mg/ml oxidada *in vitro* con  $\text{CuSO}_4$  20  $\mu\text{M}$ . Se tomaron muestras cada 8 horas de oxidación y luego se cargaron 30  $\mu\text{g}$  de cada una. Se aplicó un campo de 50 V por 8 horas. El gel se tiñó con Sudan Black-B.

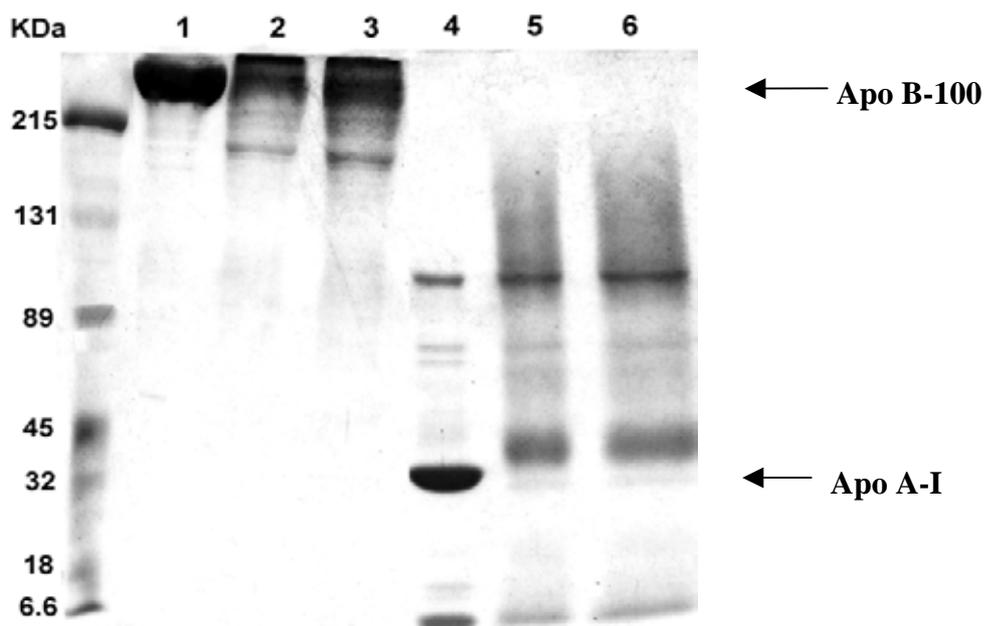
**Panel B:** Migración electroforética en geles de agarosa de HDL 1 mg/ml oxidada *in vitro* con  $\text{CuSO}_4$  20  $\mu\text{M}$ . Se tomaron muestras cada 8 horas de oxidación y luego se cargaron 30  $\mu\text{g}$  de cada una. Se aplicó un campo de 50 V por 8 horas. El gel se tiñó con Sudan Black-B.

#### 4.4.3. Fragmentación de apoproteínas en lipoproteínas oxidadas:

Con el objetivo de evaluar el componente proteico de ambas lipoproteínas luego de la reacción de oxidación, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente del 4 al 25 % en condiciones denaturantes. En cada carril se cargó 30 µg de proteína total medido por el método de Lowry-deoxicolato (Lowry y cols., 1951).

Como una de las modificaciones causadas por la oxidación en LDL se ha descrito la fragmentación del componente proteico (Fong y cols., 1987). En muestras de LDL oxidada comprobamos la aparición de una banda de aproximadamente 180 kDa después de 4 horas de oxidación que aumentó luego de 20 horas (figura 8, carril 2 y 3). También se tiene evidencia de conjugación entre aldehído/proteína en LDL oxidada, más específicamente entre residuos de histidina y 4-hidroxi-2-nonenal, un aldehído derivado de la oxidación de ácido araquidónico, lo cual estaría involucrado en el proceso de reconocimiento de proteínas oxidadas por receptores (Bolgar y cols., 1996).

La apo A-I (28,3 kDa) es la principal apoproteína de HDL (figura 8, carril 4). Luego de oxidar HDL por 4 y 20 horas (figura 8, carriles 5 y 6), se observa la aparición de una banda de aproximadamente 40 kDa y se produce la pérdida de la banda correspondiente a apo A-I. Se ha descrito para HDL oxidada, en un modelo de oxidación que ocupa la enzima mieloperoxidasa como responsable de la oxidación de la lipoproteína, la asociación entre apo-AI y apo A-II, lo que explicaría lo ocurrido en nuestro ensayo para la oxidación de HDL (Gordon y cols., 1993).



**Figura 8: Electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente**

Gel de poliacrilamida en gradiente del 4 al 25 % en condiciones denaturantes. Se cargaron 30  $\mu\text{g}$  de proteína de cada lipoproteína, ya sea en su forma nativa u oxidada con  $\text{CuSO}_4$  20  $\mu\text{M}$ . Las proteínas se separaron en un campo eléctrico de 100 V por 6 horas y luego el gel se tiñó con azul de Coomassie. Carril (1) LDL nativa, carril (2) LDL oxidada 4 horas, carril (3) LDL oxidada 20 horas, carril (4) HDL nativa, carril (5) HDL oxidada 4 horas y carril (6) HDL oxidada 20 horas.

#### 4.4.4. Determinación de grupos aminos libres:

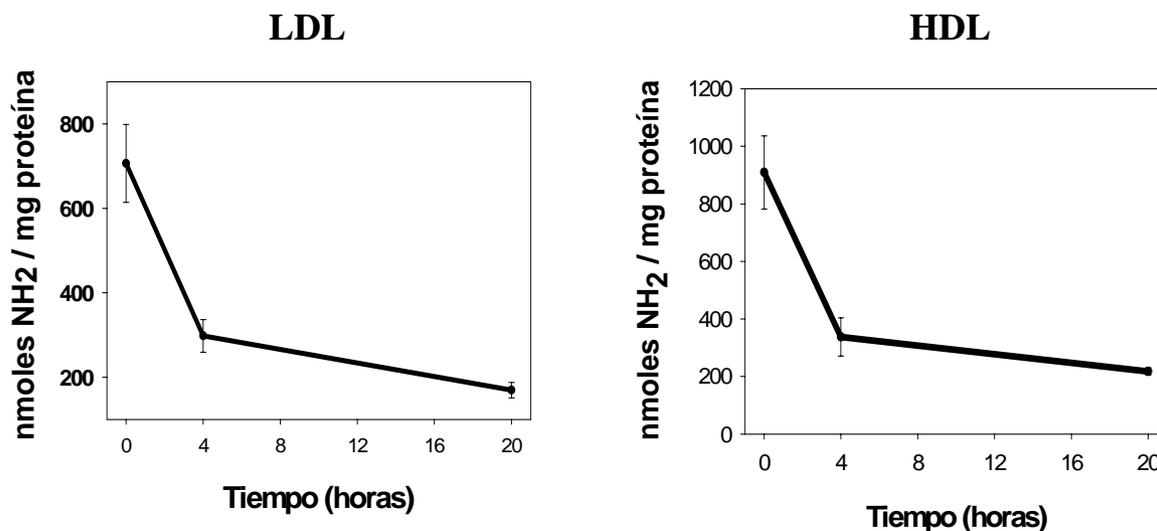
Existe evidencia previa que indica que las modificaciones que conducen al reconocimiento de la LDL por el receptor de aseo de los macrófagos, están relacionadas con la disminución de los grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina de la apoproteína B-100 (Brown y cols., 1993).

Para evaluar este tipo de cambios estructurales a nivel de apoproteínas producidos por la oxidación *in vitro*, realizamos la detección de grupos amino por TNBS (Habeeb y cols., 1966).

LDL en su forma nativa tiene cerca de 700 nmoles de grupos  $\text{NH}_2$  libres por mg de proteína, lo cual concuerda con la literatura (Jurgens y cols., 1986). Sin embargo luego de 4 horas de oxidación, se observa una disminución cercana al 60 % de estos grupos, siendo ésta cercana al 70 %, después de 20 horas de reacción (figura 9).

HDL posee un número mayor de estos residuos de aproximadamente 900 nmoles/mg de proteína. Sin embargo, luego de 4 horas de oxidación encontramos 60 % menos en grupos amino y 75 % menos luego de 20 horas de oxidación (figura 9).

Luego de una modificación del 30 % de los grupos amino en la LDL, ésta comienza a ser reconocida por el receptor de aseo de macrófagos (Weisgraber y cols., 1978). No hay evidencia de este tipo para la modificación oxidativa de HDL.



**Figura 9: Determinación de grupos NH<sub>2</sub> en LDL y HDL oxidadas**

Determinación espectrofotométrica de residuos  $\epsilon$ -amino en lipoproteínas nativas y modificadas utilizando la técnica de TNBS. A partir de muestras de LDL y HDL ya oxidadas *in vitro*, se realizó la determinación descrita en métodos. Cada punto representa un promedio de al menos 6 mediciones.

#### **4.5. Evaluación del estrés oxidativo en células HUVEC tratadas con lipoproteínas oxidadas. Efecto del antioxidante APC.**

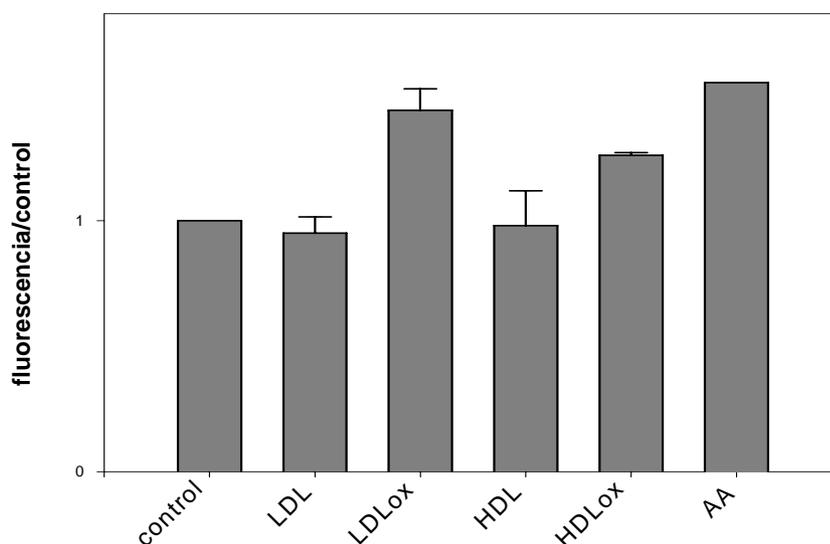
##### **4.5.1 Cuantificación de EROs por detección de fluorescencia de 2,7-diclorofluoresceína**

La detección de especies reactivas del oxígeno se realizó en células HUVEC tratadas con lipoproteínas oxidadas. Para esto se utilizó la técnica de detección de fluorescencia de 2,7 diclorofluoresceína diacetato. Este fluoróforo permite cuantificar especies reactivas del oxígeno dentro de la célula, de esta forma evaluamos cambios del estrés oxidativo en cultivo de células endoteliales incubadas con lipoproteínas nativas y oxidadas y en presencia de APC.

Los tratamientos de células HUVEC con LDL y HDL nativas (50 µg/ml) no produjeron variaciones significativas en la producción de EROs. Estímulos con LDL oxidada (50 µg/ml) causaron un aumento cercano al 35% ( $p < 0,05$ ,  $n=5$ ). La incubación con HDL oxidada (50 µg/ml) registraron un aumento de EROs cercano al 20% siendo un aumento significativo al igual que el observado con LDL oxidada a igual concentración ( $p < 0,05$ ,  $n=3$ ). Como control positivo se utilizó antimicina A (AA) 5 µM, la cual produce un bloqueo de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, lo que trae consigo un incremento en la producción de EROs (figura 10).

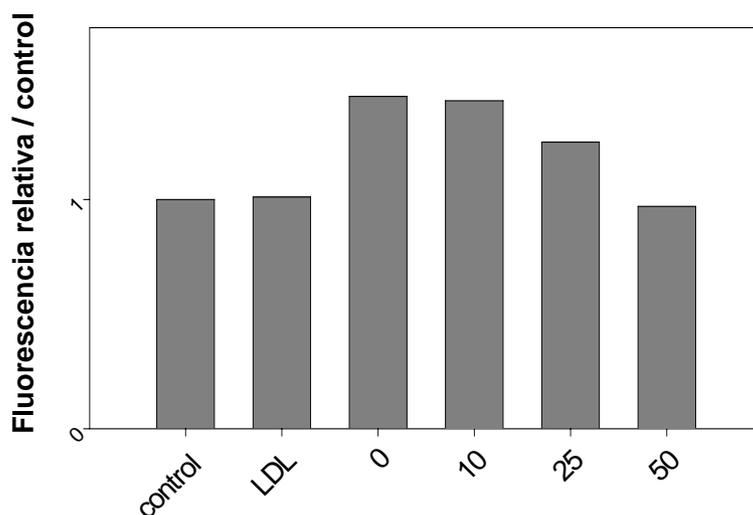
Para evaluar el efecto antioxidante de APC, incubamos células con LDL oxidada con distintas concentraciones del compuesto. APC 50 µM logró disminuir a niveles basales la producción de EROs. Los resultados se expresan en relación al control (figura 11).

Para comprobar la efectividad de APC para disminuir la producción de EROs en células estimuladas con lipoproteínas oxidadas, se adicionó el antioxidante 30 minutos previo al estímulo oxidativo. En la figura 12 se resumen los resultados de 5 experimentos para el caso de LDL oxidada y 3 para HDL oxidada. En ambas situaciones el antioxidante logra mantener los niveles del control en la producción de EROs ( $p < 0.05$ )



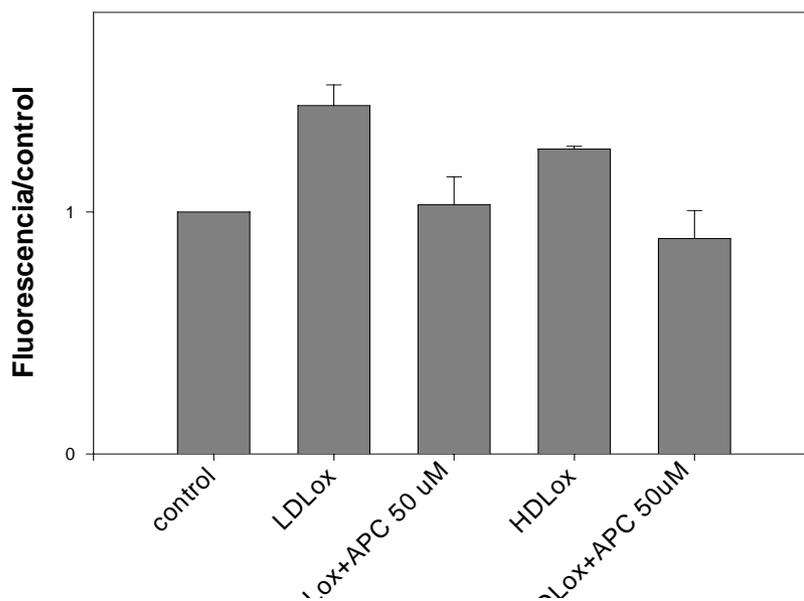
**Figura 10: Detección de fluorescencia de 2,7-DCF en HUVEC estimuladas con lipoproteínas nativas y oxidadas.**

Medición de la fluorescencia de 2,7-DCF en un extracto celular completo de células HUVEC depletadas por 12 horas de suero fetal bovino y luego tratadas con 50  $\mu\text{g/ml}$  de cada lipoproteína. Las células fueron incubadas, previo al estímulo con 10  $\mu\text{M}$  de 2,7-DCF-DA por 30 minutos. El extracto celular fue filtrado a través de una membrana de 22  $\mu\text{m}$  y luego se midió la intensidad de fluorescencia a 503 nm. Los valores fueron normalizados por cantidad de proteína medida por el método de Bradford.



**Figura 11: Efecto de la concentración de APC sobre el aumento de EROs por LDL oxidada.**

Extracto celular completo de células HUVEC depletadas por 12 horas de suero fetal bovino y luego incubadas con lipoproteína 50  $\mu\text{g/ml}$  y concentraciones crecientes del antioxidante. Las células fueron pre-tratadas por 30 minutos con antioxidante, luego se incubaron con 2,7-DCF-DA 10  $\mu\text{M}$  por 30 minutos y finalmente fueron tratadas con la lipoproteína correspondiente. El extracto fue filtrado por una membrana de 22  $\mu\text{m}$  y luego se midió la intensidad de la fluorescencia a 503 nm. Los valores fueron normalizados por cantidad de proteína medida por el método de Bradford.

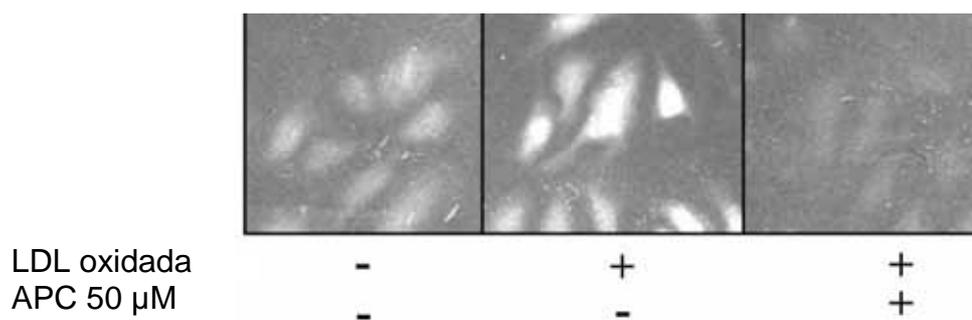


**Figura 12: Efecto de APC en células HUVEC estimuladas con LDL y HDL oxidadas**

Extracto celular completo de células HUVEC depletadas por 12 horas de suero fetal bovino y luego tratadas con cada lipoproteína 50 µg/ml y concentraciones crecientes del antioxidante. Las células fueron pre-tratadas por 30 minutos con antioxidante, luego se les agregó 2,7-DCF-DA 10 µM por 30 minutos y finalmente estimuladas con lipoproteínas. El extracto se filtró con una membrana de 22 µm y luego se midió intensidad de fluorescencia a 503 nm. Los valores fueron normalizados por cantidad de proteína medida por el método de Bradford.

#### 4.5.2. Detección de 2,7-DCF en células HUVEC por microscopía de fluorescencia directa:

Con el objetivo de visualizar la producción de EROs en HUVEC se detectó la emisión de fluorescencia en células tratadas con 2,7 DCF-DA y estimuladas con LDL oxidada 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y con APC 50  $\mu\text{M}$ . Luego de 4 horas de incubación con LDL oxidada, las células presentan una alta intensidad de fluorescencia respecto al control. La adición de antioxidante y LDLox, mantuvo la intensidad de fluorescencia observada respecto a las células control (figura 13).



**Figura 13: Detección de EROs por microscopía de fluorescencia directa en HUVEC**

Las células HUVEC fueron tratadas con 2,7-DCF (10  $\mu\text{M}$ ) por 30 minutos previo al tratamiento con LDLox (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Para el caso de adición de antioxidante, las células fueron pre-tratadas 30 minutos antes de agregar el fluoróforo. Luego de los tratamientos, las células se protegieron de la luz y fueron observadas inmediatamente en el microscopio de fluorescencia.

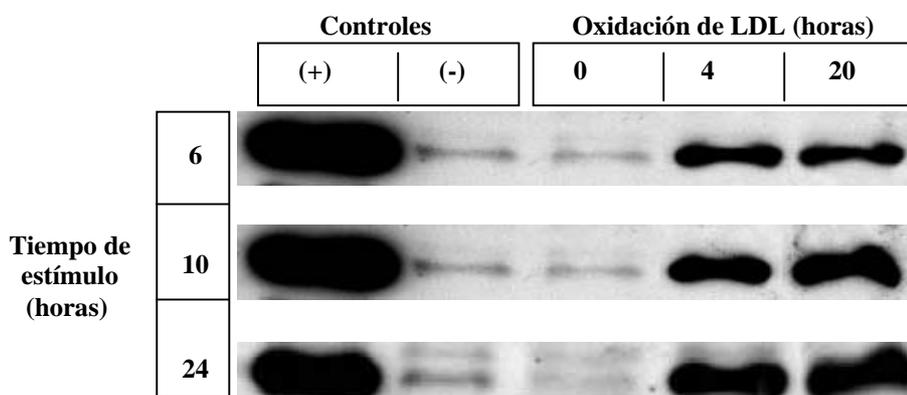
### 4.5.3. Análisis de los niveles de la proteína hemoxigenasa-1 en células HUVEC

Con el propósito de evaluar los cambios de estrés oxidativo en células HUVEC estimuladas con lipoproteínas nativas, oxidadas y en presencia de APC, realizamos ensayos de western blot para detectar hemoxigenasa-1. HO-1 es una proteína de estrés térmico que aumenta su expresión en condiciones de estrés oxidativo. La inducción de esta proteína de estrés térmico (HSP-32) por efecto de LDL oxidada ya ha sido reportada en cultivo de células de la musculatura lisa vascular (Siow y cols., 1995).

En primer lugar se realizó un experimento con el objetivo de establecer el tiempo óptimo de aumento en la expresión de HO-1 estímulo con lipoproteínas oxidadas. Para esto estimulamos células por 6, 10 y 24 horas con LDL nativa y LDL oxidada 50  $\mu\text{g/ml}$  por 4 y 20 horas. Logramos un significativo aumento en la masa de la proteína luego de 24 horas de estímulo. No se observó diferencias entre los tratamientos con LDL oxidada por 4 y 20 horas. Utilizamos como control positivo  $\text{NaAsO}_4$ , descrito como un potente inductor de HO-1 (figura 14).

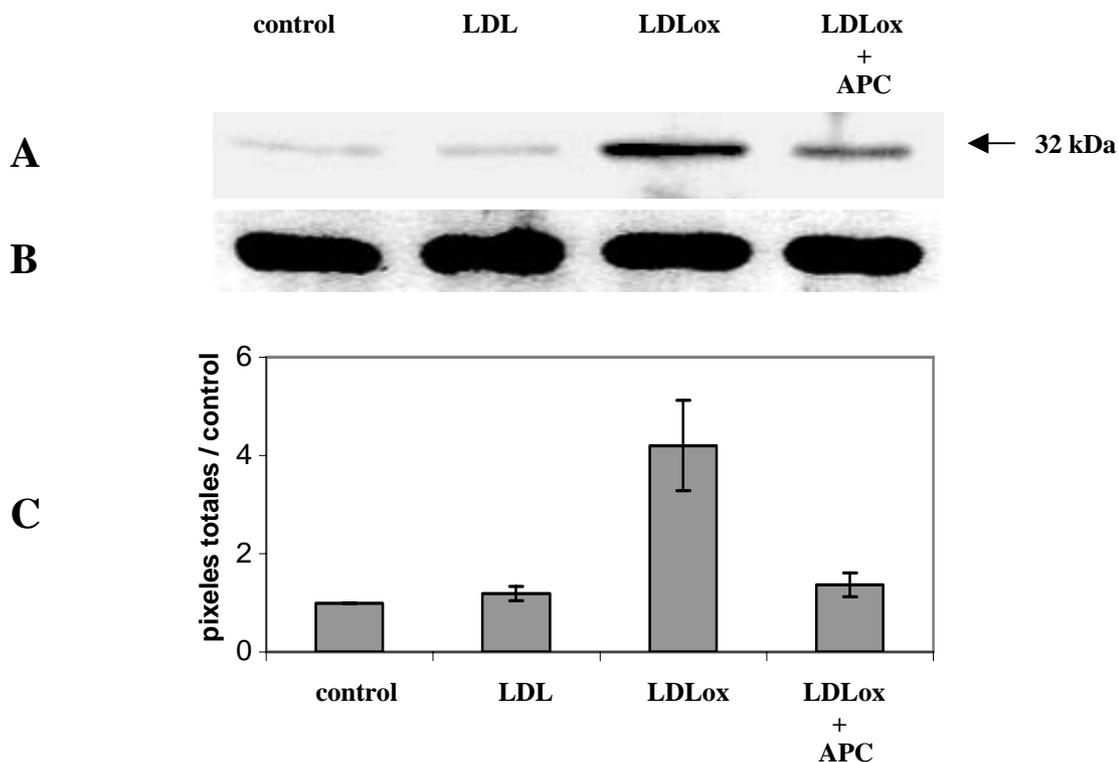
Luego, evaluamos la inducción de la proteína en células tratadas con LDL y HDL oxidadas y con APC. Las células tratadas con LDL nativa no cambian la expresión de HO-1 respecto al control. LDL oxidada 50  $\mu\text{g/ml}$  aumenta la masa de la proteína cerca de 4 veces respecto al control. APC 50  $\mu\text{M}$  logra mantener los niveles de expresión del control. Para normalizar estos resultados se observó la expresión de una proteína constitutiva del citoesqueleto,  $\alpha$ -vimentina, la cual indicó similar intensidad en la marca para todos los tratamientos (figura 15).

HDL no produce cambios significativos en la expresión de HO-1. HDL oxidada 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  aumentó la marca cerca de un 40 % respecto al control. Al adicionar APC 50  $\mu\text{M}$  junto a HDL oxidada, se mantiene la expresión del control. Estos resultados también fueron normalizados con ensayos de western blot para  $\alpha$ -vimentina. (figura 16).



**Figura 14: Evaluación de la dependencia del tiempo de estímulo con LDLox en la expresión de HO-1**

Western-blot para HO-1 de extractos proteicos completos de células HUVEC. Las células fueron depletadas de suero fetal bovino por 12 horas previas al tratamiento con LDL nativa y oxidada *in vitro* durante 4 y 20 horas. Se mantuvo el estímulo por 6, 10 y 24 horas. Las células fueron lisadas con tampón de lisis y el extracto completo fue separado en un gel de poliacrilamida al 12 %. Se transfirió a membrana de nitrocelulosa y ésta se incubó luego con un anticuerpo anti-HO-1, desarrollado en conejo. El control positivo (+) corresponde a  $\text{NaAsO}_4$  5  $\mu\text{M}$  y el control negativo (-) corresponde a la adición de igual volumen de PBS.

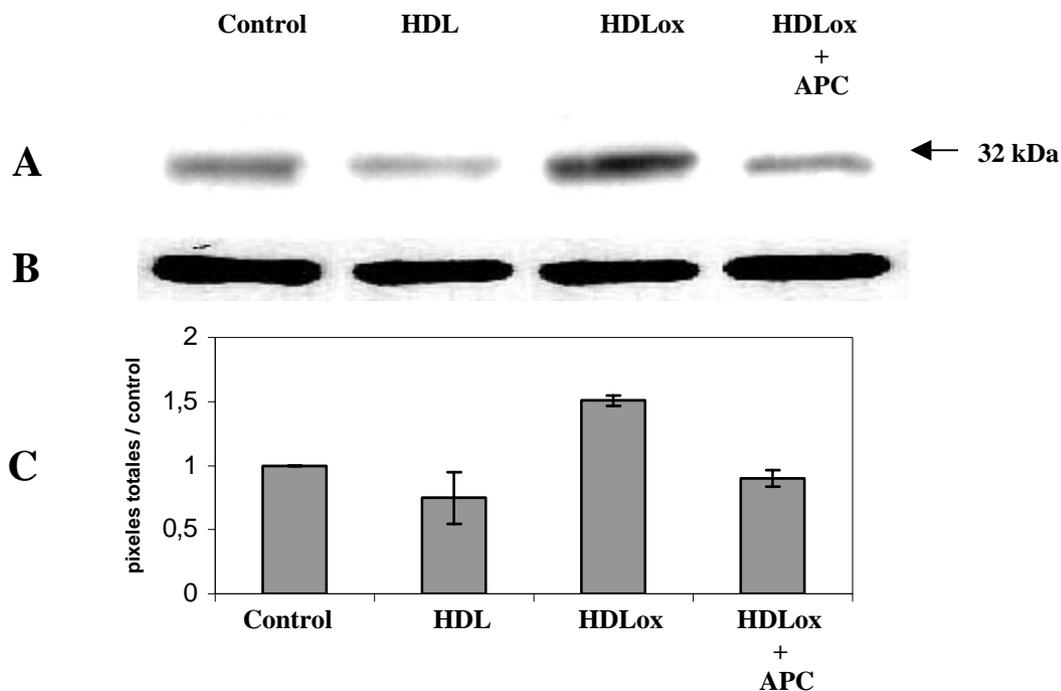


**Figura 15: Western-blot de HO-1 en células HUVEC tratadas con LDLox y APC.**

**Panel A:** Extracto celular completo de células HUVEC tratadas con LDL nativa y oxidada (50  $\mu\text{g/ml}$ ) separado en gel de poliacrilamida al 12 %, transferido a membrana de nitrocelulosa e incubado con anticuerpo policlonal para HO-1. Las células tratadas con antioxidante fueron pre-incubadas por 30 minutos con el compuesto antes de agregar las lipoproteínas. La figura corresponde a un experimento representativo de 3.

**Panel B:** Control de normalización de carga correspondiente a la misma membrana tratada para eliminar anticuerpos y reincubada con anticuerpo anti-vimentina policlonal,

**Panel C:** Gráfico que resume resultados de a lo menos tres experimentos independientes ( $p < 0.05$ ,  $n = 5$ )



**Figura 16: Western-blot de HO-1 en células HUVEC tratadas con HDLox y APC.**

**Panel A :** Transferencia de Western-blot de extractos de células HUVEC tratadas con HDL nativa y oxidada (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Se utilizó un anticuerpo policlonal para la detección de HO-1. Las células tratadas con antioxidante fueron pre-incubadas por 30 minutos con el compuesto antes de agregar las lipoproteínas. La figura corresponde a un experimento representativo de 3.

**Panel B :** Western-blot con anticuerpo anti-vimentina policlonal.

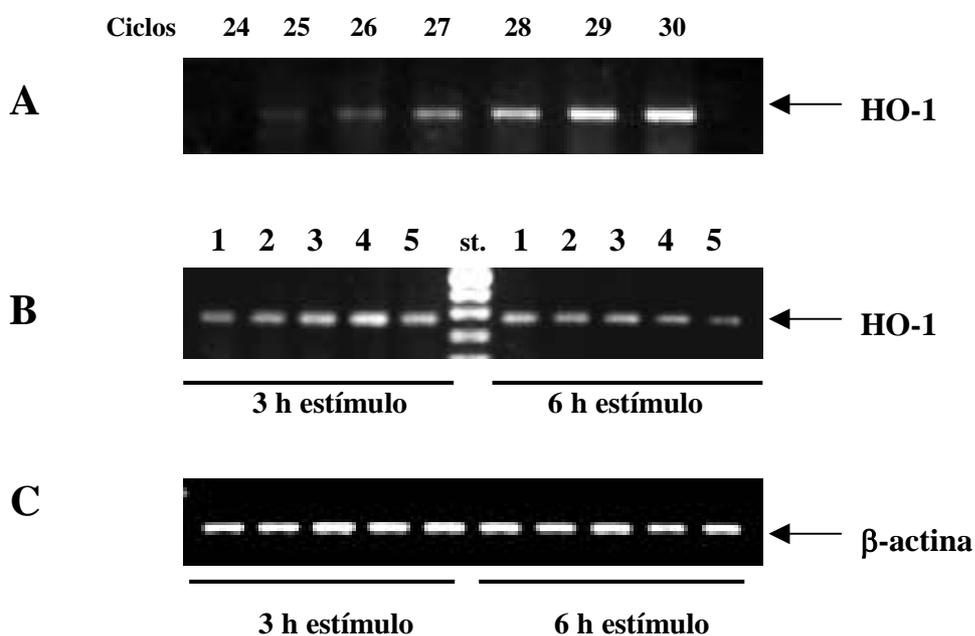
**Panel C :** Gráfico que resume resultados de a lo menos tres experimentos independientes ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ )

#### 4.5.4. RT-PCR de HO-1

Con el objetivo de evaluar la inducción de HO-1 a nivel del aumento del mRNA, se realizó un PCR reverso a partir de mRNA purificado de células tratadas con lipoproteínas nativas y oxidadas. Para esto se utilizaron partidores adyacentes a una región de 269 bp en la secuencia del RNA mensajero.

Los tiempos de tratamiento previo a la extracción del material fueron de 3 y 6 horas, evaluando así el efecto de LDL oxidada *in vitro* por 2, 4 y 20 horas (figura 17, B) . Los resultados luego de 3 horas de estímulo muestran un importante aumento de la marca en células tratadas con LDL oxidada, en especial con LDL oxidada por 4 horas (figura 17, B). A las seis horas de estímulo no se observó cambios entre los distintos tratamientos luego de normalizar cada banda por la intensidad del amplificado de  $\beta$ -actina realizado a partir del mismo material (figura 17, C).

Luego de comprobar el aumento del transcrito de HO-1 en células estimuladas con LDL oxidada, evaluamos el efecto de la pre-incubación por 30 minutos con vino tinto agregado como un extracto crudo de origen comercial al cual previamente se le determinó la concentración de polifenoles por el método de Folin, APC y BHT junto a LDL oxidada 50  $\mu$ g/ml. El resultado obtenido fue una disminución del transcrito para HO-1 por efecto de los tres compuestos, siendo más marcado para el caso de vino tinto y BHT (figura 18 A). La normalización de los resultados se hizo con el transcrito de  $\beta$ -actina amplificado a partir de las mismas muestras (figura 18 B).

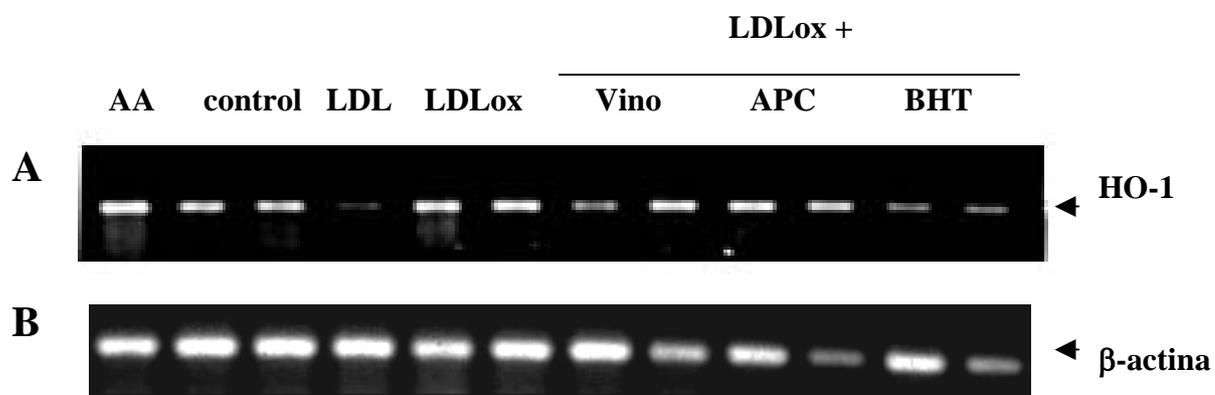


**Figura 17: RT-PCR del transcrito de HO-1 en células HUVEC incubadas a distintos tiempos con LDL oxidada**

**Panel A:** RT-PCR para segmento del transcrito de HO-1 a partir de mRNA extraído de células HUVEC. La reacción se detuvo a partir de los 24 ciclos hasta los 30 ciclos cargando luego 20  $\mu$ l de cada muestra en un gel de agarosa al 1,5 %. El gel se tiñó con bromuro de etidio.

**Panel B:** RT-PCR para segmento del transcrito de HO-1 a partir de mRNA extraído de células HUVEC control (1), tratadas con LDL (2), LDL oxidada por 2 h (3), LDL oxidada por 4 h (4) y LDL oxidada por 20 h (5) estimuladas por 3 y seis horas. Se hizo un número de 27 ciclos de amplificación.

**Panel C:** Utilizando las mismas muestras de cDNA, realizamos un PCR para una región del gen de  $\beta$ -actina humano.



**Figura 18: Evaluación del transcrito para HO-1 en células HUVEC tratadas con LDL oxidada y antioxidantes.**

**Panel A:** RT-PCR para segmento del transcrito de HO-1 a partir de mRNA extraído de células HUVEC. Las células fueron depletadas de suero por 12 horas y luego estimuladas por 3 horas con Antimicina-A como control positivo (AA), LDL 50  $\mu$ g/ml, LDLox y LDLox con vino tinto 50  $\mu$ M ( medidos a partir de concentración de fenoles totales en equivalentes de ác. gálico por método de Folin), APC 50  $\mu$ M y BHT 50  $\mu$ M.

**Panel B:** RT-PCR para segmento del gen de  $\beta$ -actina humana a partir del mismo cDNA amplificado para HO-1(panel A)

#### 4.5.6. Formación de residuos de nitrotirosinas en células HUVEC

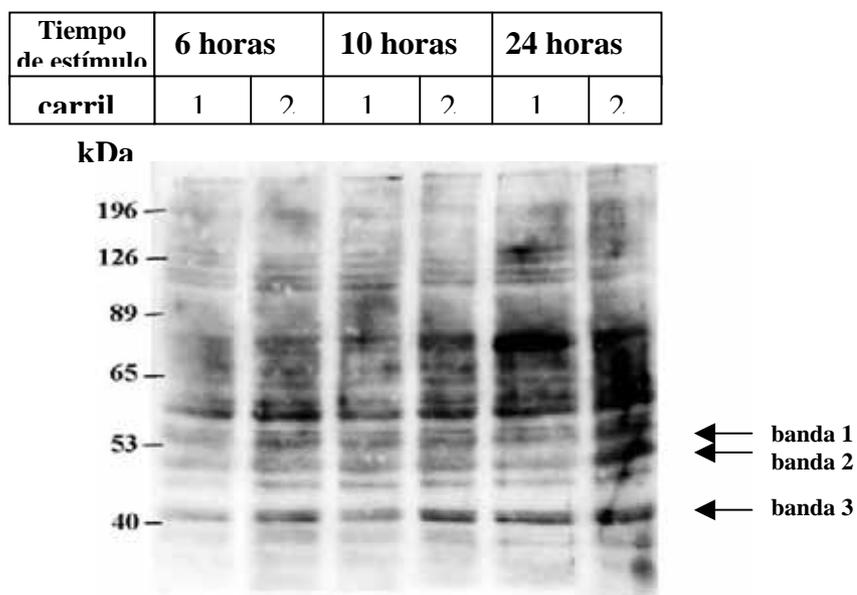
Con el objetivo de evaluar modificaciones oxidativas en proteínas determinamos la formación de residuos de nitrotirosina en células HUVEC estimuladas con LDL oxidada luego de tres diferentes tiempos de estímulo. Peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) es un potente agente oxidante que se forma por la reacción de anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) y óxido nítrico. Un aumento en la producción en la célula de  $\text{O}_2^{\cdot -}$  por tratamientos con agentes prooxidantes como las lipoproteínas oxidadas, supone un desplazamiento del equilibrio en la formación de  $\text{ONOO}^-$ .



La producción de peroxinitrito produce la nitración de otras macromoléculas, específicamente en proteínas la modificación ocurre en residuos de tirosina para formar residuos de nitrotirosina (Radi y cols., 2001) La detección de residuos de nitrotirosinas se realiza con un anticuerpo específico anti-residuos de nitrotirosinas.

Nuestros resultados muestran la aparición de dos bandas con una importante marca luego de tratar HUVEC por 24 horas con LDL oxidada 50  $\mu\text{g/ml}$  (figura 19), así como el aumento en intensidad de una tercera banda a medida que incrementamos el tiempo de incubación con LDL oxidada. Este aumento al parecer indicaría la especificidad de la modificación por peroxinitrito en ciertas proteínas específicas.

La obtención de bandas con un grado importante de resolución requirió mejorar dentro de la técnica utilizada los pasos de bloqueo, el cual se hizo con BSA al 1 %, además de la disminución de la concentración del anticuerpo primario desde 1:1000 hasta 1:2000, al igual que los lavados los cuales se aumentaron de 5 a 10 minutos.



**Figura 19: Western-blot para residuos de nitrotirosina de proteínas totales extraídas de células HUVEC.**

Ensayo de western-blot para extractos proteicos totales de células HUVEC depletadas de suero por 12 horas previo a los estímulos por 6, 10 y 24 horas. El carril 1 corresponde a los controles y el 2 a tratamientos con LDL oxidada 50  $\mu\text{g/ml}$ . El extracto proteico fue separado en un gel de poliacrilamida denaturante al 9% y transferido a membrana de nitrocelulosa. Ésta fue bloqueada con BSA 1% e incubada con un anticuerpo policlonal anti-nitrotirosina.

## 5. DISCUSIÓN

En este estudio hemos podido evaluar el efecto de LDL y HDL oxidadas sobre un cultivo de células endoteliales humanas y a la vez comprobar el efecto del ácido protocatéquico, un compuesto antioxidante perteneciente a la familia de los ácidos hidroxibenzoicos presente en el vino tinto y detectado en plasma de individuos con una ingesta aguda de esta bebida. A continuación se discutirá de manera separada los distintos objetivos de esta tesis.

### **Purificación, oxidación y caracterización de lipoproteínas**

La obtención de ambas lipoproteínas en una gradiente continua de densidad a partir de un volumen de plasma humano cercano a los 500 ml, provenientes de dos individuos, implicó un alto rendimiento en la preparación. Esta técnica de purificación de lipoproteínas es escasamente realizada por otros autores, los cuales realizan purificaciones a partir de pequeños volúmenes de plasma en un sólo paso de centrifugación.

En promedio, la cantidad de proteína-LDL obtenida fue de 100 mg y 20 mg de proteína-HDL totales por preparación. El método también permitió obtener muestras con una alta pureza, evaluada en parte por geles de agarosa en condiciones nativas, donde la tinción específica para lípidos nos entregó un patrón típico de una sola marca para LDL y HDL que no cambió en cinco preparaciones distintas (Figura 2). Las bandas en este ensayo tienen un aspecto difuso, debido a la heterogeneidad de tamaños de cada lipoproteína. Estudios de migración electroforética de la partícula completa han sido ampliamente utilizados en clínica para detectar dislipidemias, así como en trabajos tendientes a evaluar los efectos de lipoproteínas oxidadas sobre cultivos celulares (Parthasarathy y cols., 1990; Nagano y cols., 1991).

Otro método para evaluar la preparación de lipoproteínas a nivel del componente de apoproteínas es la observación del patrón de bandas de cada partícula purificada y separada en un gel de poliacrilamida. Como pudimos comprobar en la figura 3, ambas preparaciones presentaron el patrón esperado de bandas proteicas, con excepción de

una banda de aproximadamente 65 kDa, que asumimos corresponde a albúmina, descrita como el principal contaminante de las preparaciones de HDL (Chung y cols., 1986).

El modelo de oxidación de lipoproteínas también se puede desarrollar bajo condiciones controladas *in vitro* luego de incubarlas con cobre o hierro. Este modelo de oxidación es válido para estudiar eventos aterogénicos de la pared arterial (Halliwell y cols., 1993).

Las condiciones de oxidación que establecimos en nuestros ensayos, nos permitieron obtener LDL y HDL con un alto grado de oxidación, evaluado tanto por técnicas orientadas al estudio estructural de las lipoproteínas, así como ensayos funcionales en cultivo de células endoteliales humanas (Hoff y cols., 1992). Luego de 4 horas de oxidación, tanto LDL como HDL sufren importantes cambios en la migración electroforética en geles de agarosa que evidenció la fragmentación de la partícula, así como el aumento de su carga neta negativa (Fig. 6). Esta última modificación es de vital importancia para la interacción con receptores de aseo o "scavenger receptors" quienes se encuentran principalmente en macrófagos y reconocen ligandos del tipo polianiónicos (Krieger y cols., 1993). Luego de observar las apoproteínas en geles de poliacrilamida en gradiente, pudimos notar que la oxidación produjo cambios tales como fragmentación y asociación en el componente proteico de la lipoproteína (Fig. 7). Se ha descrito la formación de un fragmento de aproximadamente 175 kDa derivado de la apo B-100 que probablemente tenga actividad inmunológica (Montero, 1989) al igual que se ha detectado la formación de di-tirosinas en HDL oxidadas (Gordon, 1993).

La determinación de grupos amino libres, como un ensayo destinado a la evaluación de modificación en el ámbito de proteínas (grupos  $\epsilon$ -amino de lisinas), mostró una correlación respecto a la modificación oxidativa de tales residuos en lipoproteínas nativas y oxidadas, debido a que luego de 4 horas de iniciada la oxidación, se producía una pérdida de más de 60 % de los grupos amino, aumentando a un 70 % luego de 20 horas de incubación (Fig. 8). La modificación de aproximadamente el 30 % de los grupos amino de las lisinas permite a la LDL ser reconocida por receptores de aseo de macrófagos (Steinbrecher y cols., 1989), por lo

tanto en nuestros ensayos con lipoproteínas oxidadas estarían siendo activados receptores tipo “scavenger” además de los reportados para lipoproteínas oxidadas como LOX-1 (Sawamura y cols., 1997). Sin embargo, aún no se establece la relación entre HDL oxidada y este tipo de receptores, pudiendo especular acerca de la posible capacidad de ser ligando para estos receptores con afinidad suficiente como para competir con LDL oxidada. Estudios anteriores demostraron que HDL se oxida en una etapa inicial en residuos de metionina de las apoAI para producir los respectivos residuos metionina sulfóxidos y que este evento estaba acompañado de peroxidación lipídica lo cual se incrementaba en presencia de  $\alpha$ -tocoferol (Garner y cols., 1998)

La formación de dienos conjugados es otra herramienta disponible para el estudio de estados iniciales de oxidación de lípidos. En nuestros ensayos de oxidación pudimos verificar que logramos el máximo de formación de dienos conjugados luego de 4 horas. Este método también fue utilizado para evaluar la capacidad antioxidante del ácido protocatéquico (APC). En incubaciones de LDL con cobre y APC 0.5  $\mu$ M, se observó un significativo retardo en la formación de dienos conjugados lo que confirmó su actividad como molécula antioxidante.

### **Evaluación del efecto de lipoproteínas y ácido protocatéquico en células endoteliales**

Nuestro modelo celular utilizado para el estudio de eventos de estrés fue un cultivo primario de células endoteliales obtenidas a partir de vena de cordón umbilical humano, HUVEC. La hipótesis oxidativa propuesta por Daniel Steinberg señala que la incorporación de lípidos por macrófagos podría ser el inicio de la cadena de eventos moleculares en la aterosclerosis, sin embargo recientes hallazgos indican que la célula endotelial también responde ante una sobrecarga lipídica por lo que es de gran relevancia estudiar en este modelo celular el efecto de lipoproteínas tanto nativas como oxidadas y comprobar el efecto antioxidante de compuestos con biodisponibilidad comprobada como lo es el ácido protocatéquico.

La caracterización de este cultivo fue desarrollada con anterioridad en nuestro laboratorio a través de la morfología así como por la detección del factor de Von

Willebrand y la incorporación de LDL. Los cultivos se utilizaron hasta seis pasajes o generaciones a pesar de que pueden ser mantenidas por más tiempo, sin embargo con esto evitamos un posible aumento de niveles basales de estrés que se podrían originar por el envejecimiento celular. Debido a que el medio de cultivo se suplementó con suero fetal de bovino, el cual contiene factores tróficos de distinta acción, es que previo a cada experimento realizamos una depleción de suero con 12 horas de antelación. Esta práctica está bien descrita en trabajos donde los tratamientos celulares se realizan con lípidos, especialmente en aquellos que se estudia la participación de receptores para lipoproteínas (Acton y cols., 1995).

La determinación de especies reactivas del oxígeno (EROs) es una medida directa del balance oxidativo en un sistema celular en cultivo sometido a estímulos prooxidantes como son las LDL oxidadas y antioxidantes (Keller, 1999). La utilización de 2,7-diclorofluoresceína-diacetato, otorga la ventaja de que la medición será de radicales producidos en el intracelular, debido a que el grupo diacetato le permite el ingreso a la célula y una vez dentro, las esterasas liberan los grupos acetato impidiendo así la salida de la molécula.

La respuesta de la célula ante un estrés del tipo oxidativo es activar una respuesta antioxidante compuesta principalmente por la activación del sistema de producción de glutatión reducido y la expresión de proteínas con actividad antioxidante directa como superóxido dismutasa o catalasa, así como también otras proteínas que tienen como producto un compuesto antioxidante como es el caso de hemoxygenasa-1, la cual está involucrada en la producción de bilirrubina, la cual posee una alta capacidad antioxidante (Stocker y cols., 1987). La expresión de HO-1 es un claro marcador de estrés oxidativo ampliamente estudiado el cual es inducido en su expresión en células musculares expuestas a LDL oxidada (Siow y cols., 1995)

En nuestros ensayos en HUVEC donde el estímulo fue HDL oxidada presentaron un aumento significativo ( $p < 0.05$ , prueba t de student) de EROs de aproximadamente un 20 % por sobre el control, aumentando también la expresión de HO-1 en aproximadamente un 30 % respecto al control, eso indica que además de perder la capacidad protectora, HDL, luego de oxidarse, es inductora de estrés oxidativo en células endoteliales humanas en cultivo.

Si comparamos el aumento de EROs y de HO-1 originado por el tratamiento del cultivo en presencia de LDL oxidada y HDL oxidada, notamos que esta última lipoproteína oxidada produce un menor estrés en las células sometidas a iguales condiciones de tratamiento, es decir a la misma concentración (50  $\mu\text{g/ml}$ ) y los mismos tiempos de incubación.

Desde un punto de vista estructural, ambas lipoproteínas oxidadas sufren dramáticos cambios a nivel lipídico y proteico. Las características proaterogénicas de LDL oxidada ya han sido revisadas, sin embargo aún no está claro el cambio funcional de HDL luego que es oxidada. Cuando incubamos HDL con macrófagos cargados de lípidos, se inicia una salida o exflujo de colesterol desde la célula, si incubamos ahora con HDL oxidada se pierde esa característica (Nagano y cols., 1991). En general las características ateroprotectoras de la HDL se enfocan a la capacidad de inhibir el efecto de la LDL oxidada debido a la hidrólisis de lípidos oxidados por parte de la enzima paraoxonasa, la cual se encuentra asociada a la HDL (Stein cols., 1999).

Una posible explicación al hecho de que HDL oxidada produce menos estrés oxidativo que LDL oxidada es que HDL posee una cantidad menor de lípidos que LDL por unidad de proteína lo que implica que luego de oxidarse, HDLox tendrá una menor cantidad de lípidos oxidados respecto a LDLox. Esto se comprobó luego de observar el valor de absorbancia a 234 nm correspondiente a la formación de dienos conjugados, la cual es el doble mayor para LDLox respecto a HDLox (Figuras 5 y 6).

Comparando los niveles plasmáticos normales de colesterol asociado a LDL, con un límite superior de 200 mg/dl, podemos deducir que si la partícula contiene aproximadamente un 35 % de la masa total que corresponde a proteína, tendríamos una concentración plasmática aproximada de 70 mg/dl de proteína-LDL. La concentración en  $\mu\text{g}$  de proteína utilizada en nuestros ensayos con LDL oxidada fue igual a 50  $\mu\text{g/ml}$  ó 5 mg/dl, por lo tanto estamos trabajando dentro de un rango fisiológico si pensamos que no toda la LDL de un individuo está oxidada. Este breve análisis nos orienta a preguntar por los niveles plasmáticos de LDL oxidada de un individuo normal o uno que padezca de aterosclerosis. En este punto existe consenso de la incapacidad de que por los métodos actuales se logre establecer este parámetro,

ya que LDL oxidada y circulante en el plasma debería ser rápidamente captada y metabolizada en el hígado por su alta afinidad a receptores de aseo.

Lo relevante del estudio de marcadores de estrés oxidativo en células endoteliales, además del efecto prooxidante de HDL oxidada, es que la adición del antioxidante APC protege a las células tratadas con lipoproteínas oxidadas. Esto indicaría que este compuesto con biodisponibilidad demostrada en nuestro laboratorio es realmente efectivo para contrarrestar el efecto prooxidante de las lipoproteínas oxidadas. Estudios que evalúen otras variables farmacológicas como la vida media o capacidad de excreción, podrían ser de gran utilidad para probar su uso farmacológico como tratamiento antioxidante.

Otro marcador de daño oxidativo en proteínas que estudiamos fue la detección de residuos de nitrotirosinas en proteínas totales de HUVEC.

Un ensayo de western-blot reveló que células incubadas con LDL oxidada, aumentaban la formación de residuos de nitrotirosinas en sus proteínas totales, se observó un número de bandas que aumentó de manera importante a medida que se incrementó el tiempo de incubación. Como lo muestra la figura 18, luego de 24 horas de tratamiento con LDL oxidada, se produce un aumento en la marca de un doblete de aproximadamente 53 y 56 kDa, que coincide con lo descrito para la proteína *lyn*, una quinasa perteneciente a la familia *src* que se activa luego de la modificación por peroxinitrito (Mallozzi y cols., 1999). Podemos entonces inferir que el aumento de estrés oxidativo implica el aumento de especies prooxidantes tales como el peroxinitrito, el que se ha involucrado directamente en la formación de residuos de nitrotirosina en proteínas, y que esta modificación de proteínas podría tener un carácter selectivo de acuerdo a la localización de la fuente de radicales, esto debido a que el peroxinitrito tiene una alta reactividad y en teoría una vez formado, modificaría sustratos cercanos. Esta modificación de proteínas incluso podría tener un carácter señalizador de respuestas ante el daño oxidativo causado, pudiendo iniciar señales de transducción similares a las producidas vía fosforilación de residuos de serina treonina o tirosinas.

De esta forma podemos concluir lo siguiente:

1. LDL y HDL purificadas de plasma humano se modifican oxidativamente con cobre, produciéndose cambios tanto al nivel de sus componentes lipídicos como proteicos.
2. LDL y HDL oxidativamente modificadas inducen estrés oxidativo en células endoteliales en cultivo aumentando la producción de EROs, residuos de nitrotirosina e inducción de HO-1.
3. En presencia de ácido protocatéquico las células mantienen los niveles basales de estrés oxidativo luego del tratamiento con lípidos oxidados. Este efecto de protección se observa dentro de la célula lo que indicaría la acción intracelular del compuesto.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Acton, S., Rigotti, A., Landshulz, K., Xu, S., Hobbs, H., Krieger, M. (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*, **271**: 518-520.

Alexander, J.J., Miguel, R., Graham, D. (1991) Low density lipoprotein uptake by an endothelial-smooth muscle cell bilayer. *J. Vasc. Surg.*, **13**: 444-451.

Berliner, A., Haberland, M. (1993) The role of low-density lipoprotein in atherogenesis. *Curr. Op. in Lipid.*, **4**: 373-381.

Berliner, J., Territo, M., Sevanian, A., Ramin, S., Ai Kim, J., Bamshad, B., Esterson, M., Fogelman, A. (1990) Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J. Clin. Invest.*, **85**: 1260-1266.

Berliner, J., Navad, M., Fogelman, A., Frank, J., Demer, L., Edwards, P., Watson, A., Lusis, A. (1995) Atherosclerosis: Basic mechanism, *Circulation*, **91**: 2488-2496.

Bolgar, M., Yang, CY., Gaskell, S. (1996) First direct evidence for lipid/protein conjugation in oxidized human low density lipoprotein, *J. Biol. Chem.* **271**: 27999-28001.

Brown, SA., Hutchinson, R., Morrisett, J., Boerwinkle, E., Davis, CE., Gotto, AM. Jr., Patsch, W. (1993) Plasma lipid, lipoprotein cholesterol, and apoprotein distributions in selected US communities. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, *Arterioscler. Thromb.*, **13**: 1139-1158.

Chisolm, GM., Steinberg, D. (2000) The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med.* **28**: 1815-1826.

Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.

Chung, BH., Segrest, JP., Ray, MJ., Brunzell, JD., Hokanson, JE., Krauss, RM., Beaudrie, K., Cone, JT. (1986) Single vertical spin density gradient ultracentrifugation. *Methods Enzymol.* **986**: 181-209

Cominacini, L., Pasini, AF., Garbin, U., Davoli, A., Tosetti, ML., Campagnola, M., Rigoni, A., Pastorino, AM., Lo Cascio, V., Sawamura, T. (2000) Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* **275**: 12633-12638.

Cuevas, AM., Guasch, V., Castillo, O., Iribarra, V., Mizon, C., San Martin, A., Strobel, P., Perez, D., Germain, AM., Leighton, F. (1998) A high-fat diet induces and red wine counteracts endothelial dysfunction in human volunteers. *Lipids.* **35**:143-148.

Dieber-Rotheneder, M., Puhl, H., Waeg, G. Striegl, G., Esterbauer, H. (1991) Effect of oral supplementation with D-alpha-tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoproteins and resistance to oxidation. *J. Lipid. Res.* **32**: 1325-32.

Finkel, T., Holbrook, NJ. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**: 239-247.

Fong, LG, Parthasarathy, S., Witztum, JL., Steinberg, D. (1987) Nonenzymatic oxidative cleavage of peptide bonds in apoprotein B-100. *J. Lipid Res.* **28**: 1466-1477.

Frei, B., Stocker, R., Ames, BN. (1988) Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**: 9748-9752.

Garner, B., Witting, P., Waldeck, R., Christison, J., Raftery, M., Stocker, R. (1998) Oxidation of high density lipoprotein I. *J. Biol. Chem.* **273**: 6080-6087.

Gordon, F., Mendez, A., Bierman, E., Heinecke, J. (1993) Oxidative tyrosylation of high density lipoprotein by peroxidase enhances cholesterol removal from cultured fibroblasts and macrophage foam cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 6631-6635.

Gordon, F. (2000) High density lipoprotein oxidation: in vitro susceptibility and potential in vivo consequences. *Biochim. Biophys. Acta*, **1483**: 217-235.

Habeeb, AF. (1966) Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal. Biochem.* **14**: 328-336.

Hama, S.Y., Navab, M., de Beer, F.C., Fogelman, A.M. (1992) Acute-phase high density lipoprotein does not prevent but amplifies the modification of low density lipoprotein. *Circulation* **86**: I-423.

Havel, R.J. (1995) Chylomicron remnants: hepatic receptors and metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* **6**: 312-316.

Heinecke, J., Rosen, H., Chait, A. (1984) Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J. Clin. Invest.* **74**: 1890.

Heinecke, J. (1998) Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* **141**: 1-15.

Hoff, H., Whitaker, T., O'neil, J. (1992) Oxidation of low density lipoprotein leads to particle aggregation and altered macrophage recognition. *J. Biol. Chem.* **267**: 602-609.

Jaffe, EA., Nachman, RL., Becker, CG., Minick, CR. (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* **52**: 2745-2756.

Jurgens, G., Lang, J., Esterbauer, H. (1986) Modification of human low-density lipoprotein by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Biochim. Biophys. Acta* **875**: 103-114.

Keller, J.N., Hanni, K.B., Gabbita, S.P., Friebe, V., Mattson, M.P., Kindy, M.S. (1999) Oxidized lipoproteins increase reactive oxygen species formation in microglia and astrocyte cell lines. *Brain Res.* **830**: 10-15.

Krieger, M., Acton, S., Ashkenas, J., Pearson, A., Penman, M., Resnick, D. (1993) Molecular flypaper, host defense, and atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* **268**: 4569-4572.

Lee, DM. (1980) Malondialdehyde formation in stored plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**: 1663-1672.

Mallozzi, C., Michela Di Stasi, A., Minetti, M. (1999) Activation of *src* tyrosine kinases by peroxynitrite. *FEBS Letters* **456**: 201-206.

Markwell, MA., Haas, SM., Bieber, LL., Tolbert, NE. (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem.* **87**: 206-210.

Nakajima, T., Origuchi, N., Matsunaga, T., Kawai, S., Hokari, S., Nakamura Inoue, I., Katayama, S., Nagata, A., Komoda, T. (2000) Localization of oxidized HDL in atheromatous plaques and oxidized HDL binding sites on human aortic endothelial cells. *Ann. Clin. Biochem.* **37**: 179-186.

Nagano, Y., Arai, H., Kita, T. (1991) High density lipoprotein loses its effect to stimulate efflux of cholesterol from foam cells after oxidative modification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 6457-6461.

Noble, RP. (1968) Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarose gel. *J. Lipid. Res.* **9**: 693-700.

Palinski, W., Rosenfeld, M.E., Ylä-Herttuala, S., et al. (1989) Low density lipoprotein undergoes oxidative modifications *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 1372-1376.

Parhami, F., Fang, Z., Fogelman, A., Andalibi, A., Territo, M., Berliner, J. (1993) Minimally modified low density lipoprotein-induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate. *J. Clin. Invest.* **92**: 471-478.

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

Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, MN., Naviliat, M., Cayota, A. (2001) Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* **30**: 463-488.

Ross, R., (1993) Rous-Whipple Award Lecture. Atherosclerosis: a defense mechanism gone awry. *Am J Pathol.* **143**: 987-1002.

Sawamura, T., Kume, N., Aoyama, T., Moriwaki, H., Hoshikawa, H., Aiba, Y., Tanaka, T., Miwa, S., Katsura, Y., Kita, T., Masaki, T. (1997) An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* **386**: 73-77.

Siow, R., Ishii, T., Sato, H., Taketani, S., Leake, D., Sweiry, J., Pearson, J., Bannai, S., Mann, G. (1995) Induction of the antioxidant stress proteins heme oxygenase-1 and MSP23 by stress agents and oxidised LDL in cultured vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters* **368**: 239-242.

Stein, O., Stein, Y. (1999) Atheroprotective mechanism of HDL. *Atherosclerosis* **144**: 285-301.

Steinberg, D. (1997) Oxidative modifications of LDL and atherogenesis. *Circulation* **95** 1062-1071.

Steinberg, D., Witztum, J. (1990) Lipoproteins and atherogenesis. *JAMA* **264**: 3047-3052.

Steinberg, D. (1997) Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* **272**: 20963-20966.

Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T., Khoo, J., Witztum, J. (1989) Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *New Engl. J. Med.* **320**: 915-924.

Steinbrecher, U. (1987) Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products. *J. Biol. Chem.* **262**: 3603-3608.

Steinbrecher, U., Parthasarathy, S., Leake, D., Witztum, J., Steinberg, D. (1984) Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**: 3883-3887.

Steinbrecher, U.P., Lougheed, M., Kwan, W.C., Dirks, M. (1989) Recognition of oxidized low density lipoprotein by the scavenger receptor of macrophages results from derivatization of apolipoprotein B by products of fatty acid peroxidation. *J. Biol. Chem.* **264**: 15216-15223.

Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glazer, A.N., Ames, B.N. (1987) Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* **235**: 1043-1046.

Yamamoto S. (1992) Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1128**: 117-131.