

Estudio del potencial anti-aterogénico del AANO2 in vivo

María Lamas Bervejillo
Orientadora: Ana M. Ferreira
Laboratorio de Inmunología, IQB



**Tesina de grado de la Licenciatura en
Bioquímica**
Facultad de Ciencias, UdelaR
Febrero 2012

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecerla a Ana, por abrirme las puertas de su grupo de trabajo, por recibirme y siempre hacerme sentir muy cómoda. Por todo lo que me enseña cada día, con mucha dedicación, paciencia y claridad. Gracias por incentivar me siempre a la superación, por mostrarme que las cosas pueden mejorarse aún más de lo que pensaba, sé que eso va a traerme buenos frutos en el futuro.

Quiero agradecerles a todos los compañeros de la casita del medio, porque no solo son un grupo de científicos excelentes, sino que por sobre todo, son un grupo de gente muy linda, con la que se hace ameno trabajar. Me siento afortunada de haberlos conocido y formar parte de ustedes.

En especial le agradezco a Luis, por haberme enseñado todo lo necesario para que pudiera realizar este trabajo y mucho más.

También quiero agradecerle a Homero, Andrés, Lucía B. y Lucía G., por su apoyo, sus consejos y sugerencias para poder mejorar los resultados de mi trabajo.

El equipo de la UATE se merece un GRACIAS enorme, en especial a Gabriel, Martina, Geraldine y Sergio, por haberme ayudado durante todas las semanas en el trabajo con los animales.

También quiero agradecerle a Vicky por ayudarme a recuperar el colesterol, no sé qué hubiésemos hecho sin ti.

Flavio, Andrea, Daniel y Gonzalo, gracias por su amabilidad al permitirme hacer uso de su laboratorio.

Finalmente quiero darle las gracias a mi familia, a mi novio y a mis amigos, que me han visto trabajar sin parar, a la espera de que llegue el gran día de terminar con la tesis, siempre dándome ánimo y compartiendo la alegría del futuro recibimiento. Gracias a todos! A ustedes les dedico mi trabajo.

Índice

Agradecimientos	2
Resumen	5
Abreviaturas	7
1. Introducción	9
1.1. La aterosclerosis como centro de estudio de esta propuesta	9
1.1.1. Mecanismos asociados a la pérdida de resolución de la inflamación en la pared arterial.....	14
1.2. Generalidades sobre los nitroalquenos	16
1.3. Propiedades anti-inflamatorias de los nitroalquenos	18
1.3.1. Formación de aductos con proteínas involucradas en vías de señalización	19
1.3.2. Activación de los receptores PPAR	22
1.3.3. Liberación de •NO	23
1.3.4. Efecto de la administración de nitroalquenos en modelos de inflamación <i>in vivo</i>	24
1.3.5. Elección del AANO ₂ para el estudio de su potencial anti-aterogénico	26
2. Objetivo.....	31
3. Diseño Experimental	32
3.1. Descripción general del modelo de aterosclerosis en ratón	32
3.1.1. Elección de los animales.....	33
3.1.2. Dieta hipercolesterolémica (DHC).....	34
3.2. Diseño general de los experimentos	34
3.2.1. Experimento piloto	35
3.2.2. Experimento final	36
3.3. Métodos.....	38
3.3.1. Preparación de la dieta hipercolesterolémica (DHC).....	38
3.3.2. Determinación de CL y TG en sangre.....	38
3.3.3. Cuantificación de la placa de ateroma.....	39
3.3.4. ELISA para la determinación de SAP en plasma.	41
3.3.5. Análisis estadísticos.....	42
4. Resultados	43
4.1. Experimento piloto.....	43
4.1.1. Efecto de la dieta hipercolesterolémica sobre el estado general de los animales: monitoreo del peso corporal y el aspecto físico	43

4.1.2. Efecto de la dieta hipercolesterolémica sobre los niveles de lípidos en sangre	46
4.1.3. Efecto de la dieta hipercolesterolémica sobre los niveles de SAP en plasma	49
4.1.4. Efecto de la dieta hipercolesterolémica sobre el nivel de placa desarrollada en la válvula aórtica.....	50
4.2. Experimento final	53
4.2.1. Efecto de la dieta hipercolesterolémica sobre el estado general de los animales: monitoreo del peso corporal y el aspecto físico	53
4.2.2. Efecto de la dieta hipercolesterolémica sobre los niveles de lípidos en sangre:.....	55
4.2.3. Efecto de la dieta hipercolesterolémica sobre los niveles de SAP en plasma.....	60
4.2.4. Efecto de la dieta hipercolesterolémica sobre el nivel de placa desarrollada en la válvula aórtica.....	61
5. Discusión.....	64
5.1. Puesta a punto: comparación de los resultados obtenidos en ambos experimentos para el lote PBS/DN y Veh/DHC.	64
5.2. Relación Placa-CL, Placa-TG, CL vs TG.....	69
5.3. Evaluación de las propiedades anti-aterogénicas del AANO ₂	74
6. Conclusiones.....	80
7. Perspectivas.....	81
8. Bibliografía.....	83

Resumen

En este trabajo se buscó probar el potencial anti-aterogénico del ácido nitroaraquidónico (AANO₂) en un modelo de aterosclerosis en ratón.

El AANO₂ pertenece a la familia de los nitroalquenos, moléculas derivadas de la nitración de ácidos grasos poli-insaturados (NO₂-FA, por sus siglas en inglés). Dichas moléculas han demostrado ejercer varios efectos anti-inflamatorios sobre diferentes tipos celulares a través de distintos mecanismos. Algunos de estos involucran la inhibición de vías de señalización pro-inflamatorias (por ej.: inhibición de la vía de NF-κB), o la activación de vías con efectos anti-inflamatorios (por ej.: activación de la vía Keap1/Nrf2 o PPAR-γ). Particularmente nos interesamos en el AANO₂, porque presenta una propiedad anti-inflamatoria diferencial en relación con otros NO₂-FA, asociada a su capacidad de interferir en forma específica con la Prostaglandina endoperóxido H sintasa (PGHS), enzima que utiliza el AA como sustrato. Esta interferencia suprimiría la síntesis de mediadores pro-inflamatorios. Además, no existen hasta la fecha estudios del potencial anti-inflamatorio del AANO₂ en modelos *in vivo*, por lo que resultó de interés ensayarlo en un modelo de inflamación crónica como la aterosclerosis. Asimismo, el desarrollo de esta enfermedad se vincula con la hipercolesterolemia, razón por la cual la administración de NO₂-FA podría ser beneficiosa a través de su capacidad para modular el metabolismo lipídico vía la activación de PPAR-γ.

Para cumplir con el objetivo propuesto utilizamos ratones deficientes en el receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDLr^{-/-}), los cuales al ser alimentados con dietas hipercolesterolémicas (DHC), ricas en colesterol (CL) y grasas totales, desarrollan aterosclerosis en tiempos relativamente cortos. Se trabajó en el ajuste del modelo de modo de generar en los ratones una respuesta aterogénica de intensidad suficiente, como para evaluar posteriormente el efecto inhibitorio de un compuesto, en este caso el AANO₂. Este ajuste implicó variar el tiempo de ingesta de la DHC y la intensidad de la respuesta aterogénica se determinó a través de la medida de la lesión generada conocida como placa de ateroma, a nivel de la válvula aórtica. Por otro lado, para examinar el potencial anti-aterogénico del AANO₂ se realizaron ensayos en donde en forma paralela a la inducción de la aterosclerosis, los ratones fueron inyectados semanalmente con AANO₂ (1 μmol/dosis/kg) o el vehículo o el ácido araquidónico, como controles de la actividad del compuesto. Al final del ensayo, se midieron parámetros indicativos del avance de la aterosclerosis, incluyendo los niveles de triglicéridos (TG) y CL en sangre, y el área de placa de ateroma desarrollada en la válvula aórtica. Los resultados mostraron que son necesarias 7 semanas de ingesta de la DHC para obtener una respuesta aterogénica de intensidad adecuada como para estudiar su posible

inhibición. Por otro lado, se observó que el AANO₂ logró modular los aumentos en los niveles de TG y CL inducidos por la ingesta de la DHC, mostrando diferencias significativas con respecto al vehículo utilizado, pero no redujo el desarrollo de la placa de ateroma en la válvula aórtica. Como se comprobó la existencia de una correlación entre el nivel de placa desarrollada y los niveles de lípidos en sangre, la modulación por el AANO₂ de los niveles de CL y TG durante el desarrollo de la placa, sugiere que este NO₂-FA podría prevenir la aterosclerosis si se optimiza su efecto, utilizando mayores concentraciones y/o diferentes formas y/o vías de administración.

Abreviaturas

6-AAMetNO₂ , 6-metilnitroaraquidonato	LNO₂ , ácido nitrolinoleico
AA , ácido araquidónico	LPS , lipopolisacárido bacteriano
ACF , adyuvante completo de Freund	MCP-1 , proteína quimiotáctica de monocitos-1
ARE , elemento de respuesta a antioxidantes	NF-κB , factor nuclear-kappa B
BHT butil hidroxitolueno	NO₂-FA , nitroalquenos derivados de ácidos grasos insaturados
BSA, albúmina de suero bovino	NO₂⁻ , nitrito
CD36 , receptor barrendero de la LDLox	•NO , radical óxido nítrico
CD , células dendríticas	•NO₂ , radical dióxido de nitrógeno
CL , colesterol	NOS₂ , óxido nítrico sintasa 2
CLN , colesterol-linoleato	Nrf2 , del inglés <i>Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2</i>
CLNO₂ , colesterol-nitrolinoleato	O₂⁻ , superóxido
COX , actividad ciclooxigenasa	OA , ácido oleico
CRP , proteína C reactiva	OANO₂ , ácido nitrooleico
DHC , dieta hipercolesterolémica	ONOO⁻ , peroxinitrito
DHCcom , dieta hipercolesterolémica comercial	PBS , tampón fosfato salino
DHCp , dieta hipercolesterolémica preparada	PBS-T , PBS conteniendo 0.05% de Tween
DN , dieta normal	PEG₄₀₀ , polietilen glicol 400
EDTA , ácido etilendiaminotetraacético	PGG₂ , prostaglandina G ₂
eNOS , óxido nítrico sintasa endotelial	PGH₂ , prostaglandina H ₂
GSH , glutatión	PGHS , prostaglandina endoperóxido H sintasa
HDL , lipoproteína de alta densidad	POX , actividad peroxidasa
HO-1 , hemoxigenasa-1	PPAR-γ , <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptors-γ</i>
ICAM-1 , molécula de adhesión intercelular-1	PPRE , elemento de respuesta a PPAR
IκB , inhibidor de NF-κB	RXR , receptor retinoico X
IL-1β , interleuquina-1β	SAP , componente amiloide P del suero
IL-6 , interleuquina-6	s.c. , subcutánea
IL-8 , interleuquina-8	sGC , guanilato ciclasa soluble
IM , indometacina	SOD , superóxido dismutasa
Keap-1 , del inglés <i>Kelch-like ECH-associating protein 1</i>	TG , triglicéridos
LDL , lipoproteína de baja densidad	TNF-α , factor de necrosis tumoral-α
LDLox , forma oxidada de la LDL	
LDLr , receptor de la LDL	
LDLr^{-/-} , deficiente en el receptor de la LDL	

VCAM-1, molécula de adhesión de células
vasculares-1

Veh, vehículo

1. Introducción

Este trabajo se centró en la evaluación de los posibles efectos anti-aterogénicos del ácido nitroaraquidónico (AANO₂), utilizando un modelo experimental de aterosclerosis en ratón. De lo anterior se deduce porqué en esta sección se introducen aspectos básicos de la biología de la aterosclerosis y de los nitroalquenos derivados de la nitración de los ácidos grasos insaturados (NO₂-FA, por sus siglas en inglés), particularmente del ácido AANO₂.

1.1. La aterosclerosis como centro de estudio de esta propuesta

En primer lugar revisaremos algunos aspectos generales sobre el origen de la aterosclerosis y los fenómenos que están involucrados en su desarrollo.

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica y constituye la principal causa de muerte en el mundo desarrollado, al punto de que cobra más víctimas que las generadas por la suma de todos los tipos de cánceres [1]. Se cree que este impacto en la salud humana es consecuencia del cambio en las costumbres alimenticias hacia hábitos más occidentales. En el Uruguay se repite este mismo escenario: las enfermedades cardiovasculares, dentro de las cuales la aterosclerosis es la principal patología subyacente, constituyen la principal causa de muerte (aproximadamente 33% del total, VIII Convención Médica, Plenario Sector Público, Documento 2, Mayo 2004).

Se ha comprobado que existen varios factores de riesgo que favorecen el desarrollo de esta enfermedad, entre los cuales encontramos la edad avanzada, el género masculino, la obesidad, los hábitos de fumar, el padecimiento de hipertensión y diabetes mellitus, y los altos niveles de colesterol (CL) en sangre (revisado por [1]). Debido al gran impacto que tiene la aterosclerosis en la población mundial, existe un gran interés por comprender con mayor profundidad las bases moleculares de su origen y los factores de riesgo que pueden colaborar en su surgimiento; de hecho, la investigación en este tema ha crecido explosivamente en las últimas décadas.

Si bien la etiología de dicha enfermedad sigue en discusión, la información actual sugiere que existen al menos tres eventos importantes en el desarrollo de la enfermedad: i) la generación espontánea de una inflamación basal en el endotelio vascular, principalmente en sitios donde el flujo sanguíneo es turbulento, como ser las ramificaciones de la red vascular o las válvulas del corazón; ii) la oxidación de la lipoproteína plasmática de baja densidad (LDL, del inglés *low density lipoprotein*) y su posterior incorporación por los macrófagos residentes en la pared del endotelio vascular, con generación de una célula diferenciada llamada célula

espumosa, que es clave en el desarrollo de la enfermedad. Estos eventos se ven favorecidos por niveles altos de CL en sangre (hipercolesterolemia); y iii) la pérdida de los mecanismos de resolución de la inflamación en la pared arterial. A continuación se describen cada uno de éstos:

El desarrollo de una inflamación basal en la pared arterial es un fenómeno espontáneo, que ocurre con mayor intensidad en sitios de ramificación de la red vascular o en las válvulas del corazón. Esto es porque el flujo sanguíneo en estos puntos deja de ser laminar para pasar a ser turbulento y el impacto mecánico de la sangre contra las paredes del endotelio genera una respuesta inflamatoria crónica en la íntima. Globalmente esta respuesta se refleja a nivel del endotelio, haciéndolo más permeable y adherente para los leucocitos que circulan por la sangre, con la consiguiente extravasación de estas células a la íntima. Además, esta inflamación conduce a la activación de células inflamatorias, por ejemplo macrófagos, con generación de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno; fenómeno que se ha asociado a un estado de estrés oxidativo que participa y promueve el inicio de la enfermedad [2]. Además, se podrían activar células dendríticas (CD), ya que recientemente se ha postulado que en estos sitios de la pared del endotelio, comienza a alojarse tempranamente una población particular de CD, no derivadas de monocitos, que comparten marcadores con las CD del bazo sin ser equivalentes a las mismas. Como consecuencia de esta inflamación basal, los componentes solubles del plasma ingresan a la pared arterial donde pueden resultar modificados por las especies reactivas. Este fenómeno cobra especial relevancia sobre los componentes lipoproteicos, lo cual nos lleva al segundo evento importante en el desarrollo de la enfermedad: la oxidación de la LDL y su impacto sobre la diferenciación de los monocitos/macrófagos.

La LDL es una de las lipoproteínas plasmáticas que participa en el transporte de los lípidos en la sangre y tiene un rol fundamental en los mecanismos que promueven el desarrollo de la aterosclerosis. Esta lipoproteína en su estado nativo circula por la sangre a una concentración dependiente de la cantidad de CL ingerido en la dieta, de modo que altas concentraciones de LDL en sangre se asocian con dietas ricas en CL. Mientras la lipoproteína se encuentre circulando bajo condiciones de homeostasis, presentará una pequeña fracción en forma oxidada (LDLox), debido a la baja concentración de especies reactivas en la sangre y a la presencia de antioxidantes que la protegen [3]. Pero al ingresar al espacio subendotelial, encuentra un ambiente con una concentración de antioxidantes menor que aumenta la probabilidad de oxidación. Si además esta extravasación ocurre en las zonas donde existe una inflamación basal, que presentan altas concentraciones de especies reactivas, el nivel de oxidación será aún más importante. Tanto la LDL nativa como la LDLox interactúan con los

macrófagos residentes y con los monocitos inflamatorios que ingresen a la íntima arterial, sin embargo, el resultado de estas interacciones es diferente. Mientras la incorporación de la forma nativa es regulada por los niveles intracelulares de CL, que frenan la expresión del receptor para dicha lipoproteína (LDLr), la LDLox es incorporada a través de receptores barrenderos (conocidos como *scavenger* en inglés, por ejemplo CD36) que no presentan tal regulación (revisado por [1]). La ingesta descontrolada de LDLox lleva a la diferenciación de los macrófagos a células espumosas. Estas células pueden estallar por el consumo excesivo de LDLox, liberando en el espacio subendotelial lípidos oxidados y restos celulares que exponen señales de peligro tipo DAMPs (del inglés, *Damage Associated Molecular Pattern*), las cuales activarán células de la inmunidad innata como CD y monocitos/macrófagos encargadas de amplificar la inflamación.

Resulta interesante que las CD fueron co-localizadas con depósitos tempranos de lípidos en la íntima y su eliminación redujo dichos depósitos en un 55% [4], sugiriendo una relación directa de las mismas en la formación de los depósitos lipídicos. Sin embargo la localización de estas CD en la pared se da independientemente de los niveles de CL en sangre. No se conoce con exactitud como ocurre la interacción entre dichas células y los lípidos, pero basándose en micrográficas electrónicas que demuestran ciertas proyecciones de las CD hacia la luz del vaso, algunos proponen que estas células son capaces de retener los lípidos circulantes en la sangre mediante dichas prolongaciones, para luego ingresarlos en la pared del vaso formando los depósitos que promueven el inicio de la enfermedad (revisado por [5]). Este comportamiento es muy similar al que presentan las CD en las mucosas, en donde por ejemplo en las vías aéreas, emiten proyecciones hacia el lumen del conducto con el fin de captar posibles antígenos para presentar [6].

De acuerdo con lo anterior, la posible secreción de citoquinas pro-inflamatorias como consecuencia de la activación de macrófagos residentes, monocitos inflamatorios, CD que entran en el tejido y las células espumosas [7], favorece y amplifica el reclutamiento de células inflamatorias iniciado por la inflamación basal. Además la presencia de LDLox activa la proliferación de células musculares de la pared de la arteria que se sumarán a dicho reclutamiento [8]. Sin embargo, la característica clave que hace que el proceso se sostenga en el tiempo es que el foco inflamatorio resultante no logra resolverse por los mecanismos normales que actúan durante una respuesta inflamatoria. En una respuesta inflamatoria normal, existe una fase inicial durante la cual se da el reclutamiento de leucocitos de la sangre, siendo los neutrófilos las primeras células en ingresar al sitio inflamatorio seguido de los monocitos que originarán CD y/o macrófagos. Una vez que los neutrófilos ejercen su función fagocítica, mueren, y los macrófagos allí presentes además de fagocitar elementos nocivos,

fagocitarán los cuerpos apoptóticos generados por los neutrófilos, colaborando de este modo con la “limpieza” de la zona de inflamación. Este evento cumple un rol fundamental durante la evolución de la inflamación porque lleva a la inducción de la liberación de IL-10 por parte de los macrófagos, citoquina que colabora con el apagado de la respuesta inflamatoria local. Por otro lado, la migración de células y antígenos desde el sitio inflamatorio, vía linfa, hacia el ganglio contribuye al drenaje del sitio a la vez que transporta componentes claves para la activación de la respuesta inmune adaptativa. Este drenaje es sin duda fundamental para resolver la inflamación. Este proceso inflamatorio parece sufrir alteraciones importantes cuando ocurre en la pared arterial durante la aterosclerosis. En primer lugar los macrófagos, que son las células encargadas de fagocitar los desechos celulares que se generan en la íntima e inducir el apagado de la inflamación, son las células afectadas en esta enfermedad y en consecuencia no logran cumplir correctamente con la función de remoción de los desechos celulares. Además, la migración de las células derivadas de monocitos hacia los ganglios linfáticos está disminuida, lo que prolonga la resolución de la inflamación [9]. Debido a estas fallas, la inflamación no se resuelve y el proceso conduce a la acumulación de lípidos, restos celulares, células espumosas, dendríticas, macrófagos y musculares, provocando una amplificación de la respuesta y el engrosamiento de la pared que crece progresivamente hacia la luz del vaso. La lesión característica de la enfermedad que se origina se conoce como **placa de ateroma**. Esta placa genera rigidez en la pared del vaso y distorsiona la circulación sanguínea. Además, cuando la enfermedad avanza, existe la posibilidad de ruptura de dichas placas, generando trombos que viajan por la vasculatura, y pueden provocar la obstrucción total de vasos de menor calibre, comprometiendo la oxigenación de otros órganos (infarto). Así, esta serie de eventos puede culminar en accidentes cardiovasculares, que son causa de muerte. En la Figura 1 se resumen los eventos más relevantes descritos hasta ahora, que llevan a la formación de la placa de ateroma.

La descripción anterior corresponde a los efectos inflamatorios que se dan a nivel de la pared arterial. Por otro lado, durante una enfermedad inflamatoria se produce una respuesta inflamatoria sistémica como consecuencia de la acción de interleuquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6) que actúan sobre el hígado: esta respuesta se conoce como respuesta de fase aguda, cuando ocurre al inicio de una inflamación e incluye la síntesis de proteínas con capacidad de favorecer o contrarrestar la inflamación. En una enfermedad inflamatoria sistémica como la aterosclerosis, sería esperable que se sintetizaran proteínas de fase aguda que además podrían eventualmente funcionar como marcadores durante el desarrollo y progreso de la enfermedad. Dentro de las proteínas de fase aguda se encuentra una familia de proteínas de la inmunidad innata altamente conservadas llamadas Pentraxinas. Dos integrantes de esta

familia, la proteína SAP (del inglés *serum amyloid P-component*) y la proteína C reactiva (CRP, del inglés *C Reactive Protein*), han sido relacionadas con la aterosclerosis ya que se detectaron en las placas de ateroma [10] y mostraron un reconocimiento específico por la LDLox [11-12]. Mientras que CRP ha sido establecida como un buen marcador del riesgo de padecer futuros eventos cardiovasculares [13], el rol de SAP como biomarcador se encuentra menos caracterizado. De todos modos existen evidencias actuales que relacionan los altos niveles de SAP con biomarcadores inflamatorios, factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares, casos subclínicos de las mismas e incidentes como angina o infarto del miocardio [14], por lo que la posibilidad de que funcione como biomarcador continúa estando vigente.

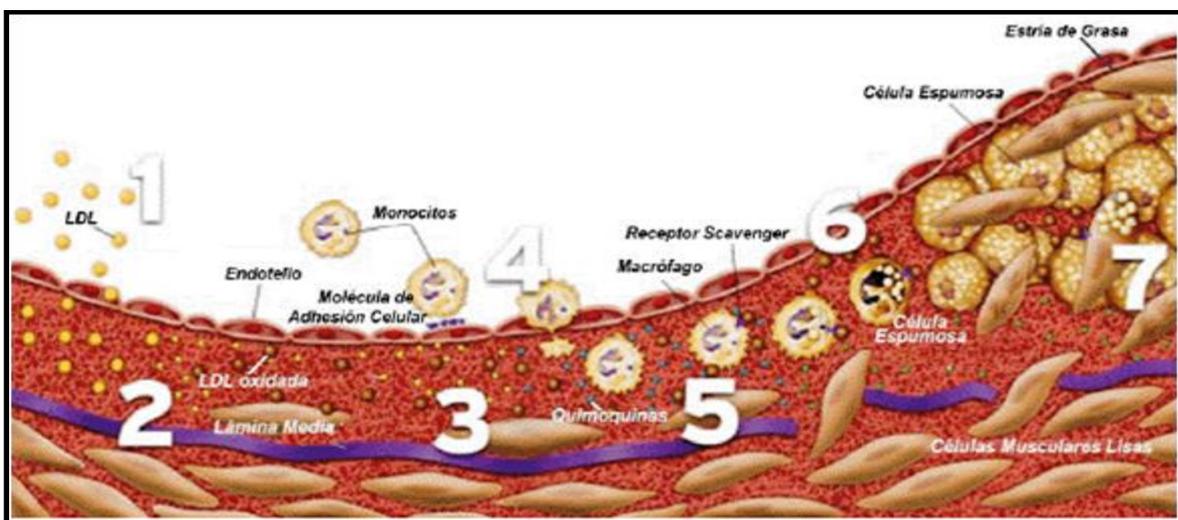


Figura 1: Esquema representativo de los fenómenos más importantes que desencadenan la formación de la placa de ateroma.

En los sitios de la vasculatura donde existen ramificaciones el flujo de sangre deja de ser laminar para pasar a ser turbulento. El impacto mecánico de la sangre en las paredes del endotelio genera zonas que presentan una inflamación basal crónica. Si a su vez existe un exceso de LDL circulante en la sangre (1), debido a un consumo elevado de CL, cuando dicha lipoproteína ingrese al endotelio en las zonas de inflamación basal (2) se verá expuesta a especies reactivas que la oxidarán (3). Esta LDLox es la molécula que gatilla el inicio de la aterosclerosis. En primer lugar logra que las células musculares y endoteliales liberen quimioquinas que atraen monocitos al espacio subendotelial (4). En segundo lugar los macrófagos presentes en las zonas de inflamación crónica y aquellos derivados de los monocitos reclutados incorporan la LDLox a través de un receptor barrendero que no es regulado por los niveles de CL de la célula (5), de modo que el macrófago incorporará grandes cantidades de LDLox hasta transformarse en la llamada célula espumosa (6). La acumulación de CL provoca el estallido de las células espumosas, y los componentes liberados al medio extracelular activan nuevamente mecanismos inflamatorios que reclutan otras células fagocíticas, y generan quimioquinas que atraen a células musculares. De modo que en el endotelio se origina un acúmulo de células, restos celulares, LDLox y lípidos, que se conoce como placa de ateroma (7). Ésta no solo genera rigidez en la pared del endotelio, sino que también comienza a avanzar sobre la luz del vaso reduciéndola y pudiendo provocar la obstrucción total de la circulación y por tanto infarto en el tejido. Fuente: El

papel de la inflamación en la aterogénesis. Revisión. *Glacelids Rodríguez, Neil Mago y Francisco Rosa*. Invest Clin 50(1): 109 - 129, 2009.

1.1.1. Mecanismos asociados a la pérdida de resolución de la inflamación en la pared arterial.

Uno de los mecanismos propuestos para explicar la pérdida de la resolución de la inflamación es la retención de monocitos en la placa de ateroma. Esta acumulación tiene efectos pro-aterogénicos porque favorece la formación de células espumosas e impide la migración de células derivadas de monocitos hacia la linfa, fenómeno necesario para culminar con la resolución de la inflamación. Pero ¿qué causa esta retención? Varios mecanismos fueron propuestos para responder a esta pregunta. En primer lugar la retención de los monocitos podría deberse a la inducción, por motivos lipídicos, de un fenotipo que queda anclado en la íntima. En un modelo *in vitro* que reproduce estas interacciones en la pared de los vasos, se estudió el efecto sobre la migración de los monocitos, de productos derivados de la oxidación de la fosfatidilcolina o LPA (mediador derivado de fosfolípidos y ligando endógeno de PPAR- γ , ver más adelante). Los resultados mostraron que ambos lípidos fueron capaces de evitar la diferenciación de los monocitos a CD capaces de emigrar de la pared del vaso, y en cambio promovieron la diferenciación a macrófagos que serán residentes de la placa, y que en condiciones de hipercolesterolemia son potenciales generadores de células espumosas [9]. Por otro lado, es cuestionable porqué estas células no logran emigrar del sitio inflamatorio. Se ha propuesto que esto podría deberse a un impedimento anatómico, por el cual las células presentes en la íntima del endotelio no puedan alcanzar los vasos linfáticos aferentes que se ubican cercanos a la capa adventicia del vaso (la más externa), por la existencia de una capa media de células musculares que actúa como una barrera. Existen algunas evidencias que apuntarían a esto ya que se observó que cuando se infectan ratones con un virus que causa inflamación en la pared de las grandes arterias el patógeno logra sobrevivir únicamente en la capa media del vaso, porque los linfocitos T (tanto CD4 como CD8 positivos) y los macrófagos no logran ingresar para combatirlo por la presencia de las células musculares [15]. Sin embargo, también se ha descrito que el flujo de monocitos hacia la linfa se ve disminuido en condiciones favorables para la aterosclerosis como la hipercolesterolemia, pero no al regular los niveles de colesterol en sangre [9]. Así, el impedimento anatómico que ocasionarían las células musculares parece ser inducido por la enfermedad. Por otro lado el papel de las células musculares podría ser no sólo el de una barrera, sino que además podrían estar anclando a los monocitos a través de interacciones de tipo ligando-receptor. En este contexto, un grupo de investigadores realizaron experimentos con macrófagos derivados de monocitos de sangre

humana y cultivos primarios de células musculares de las arterias coronarias (CASMC por sus siglas en inglés). En estos ensayos evidenciaron una fuerte adhesión entre los macrófagos y las CASMC luego de la activación de los primeros con lípidos derivados de la oxidación del ácido linoleico (9-HODE y 13-HODE, los más abundantes en la placa de ateroma), mientras que observaron una pobre adhesión con macrófagos no activados. Se comprobó que la interacción celular se dio de manera dependiente de CX₃CR1-CX₃CL1, ya que la pre-incubación de los monocitos con anticuerpos anti CX₃CR1 logró impedirla. CX₃CR1 es un receptor de citoquinas que presenta una doble función porque puede guiar a los leucocitos hacia su ligando el CX₃CL1 y/o unirlos a células que lo estén expresando (revisado por [16]). Además se encontró que éste receptor presenta cierta relación con la aterosclerosis, porque ratones con algún tipo de deficiencia en dicho receptor mostraron una menor susceptibilidad a la enfermedad, si bien no se conocen en profundidad los mecanismos subyacentes. Estos resultados sugieren que los monocitos una vez ingresados en la pared de los vasos sanguíneos, donde pueden interactuar con señales de oxidación de los lípidos, comienzan a expresar CX₃CR1 que los ancla a las células musculares allí presentes. Además tanto CX₃CR1 como CX₃CL1 se expresan en los macrófagos lo que favorecería una interacción cruzada macrófago-macrófago, tal como se observa en la placa de ateroma [17].

Se han realizado estudios para evaluar si revertiendo la retención de monocitos en la pared arterial se logra revertir también la placa. Utilizando ensayos quirúrgicos, en los que se transplantó un segmento de aorta de ratón conteniendo placas de ateroma a un animal con bajos niveles de CL en sangre, se observó la regresión de lesiones ateroscleróticas concomitante con un aumento de la migración de monocitos a los ganglios [9]. Además mediante una sonda no biodegradable para cuantificar la densidad de población de monocitos en la placa se verificó su reducción cuando la migración fue restaurada [18]. En contrapartida a estos resultados, otros investigadores postulan que es más importante en la regresión de la lesión, la disminución en el reclutamiento de monocitos hacia la placa que el aumento de la salida de los mismos hacia la linfa [19]. Esta hipótesis se desprende de un trabajo que utiliza un modelo de regresión de la aterosclerosis en donde ratones deficientes en la apolipoproteína E (apoE^{-/-}) son infectados con un vector viral conteniendo el gen de la apoE, para restaurar la deficiencia, y con ello inducir la regresión de la aterosclerosis [19]. En este modelo se logró revertir la placa desarrollada y determinar que la reducción fue acompañada por una disminución del 72% en la carga de macrófagos de la lesión, independiente del flujo mediado por CCR7 de monocitos desde la placa.

Estas hipótesis sobre la migración de los monocitos durante la reversión de la placa no son necesariamente opuestas. La primera hipótesis plantea que al disminuir los niveles de CL en

sangre se restaura la migración de los monocitos hacia los ganglios. Sin embargo no se evaluó si además la reducción de lípidos en sangre influyó en el reclutamiento de monocitos a la placa, lo que puede haber colaborado en parte con la reversión de esta última. En relación a la segunda hipótesis, es difícil creer que un fenómeno tan importante como la migración de los monocitos hacia los ganglios, sea regulado únicamente por el CCR7; es posible que otros receptores pueden estar involucrados y sean responsables de dirigir el eflujo de monocitos.

1.2. Generalidades sobre los nitroalquenos

Los nitroalquenos derivados de los ácidos grasos insaturados (NO₂-FA, por sus siglas en inglés) son una familia de moléculas originadas a partir de la nitración de estos lípidos por parte de especies reactivas derivadas del óxido nítrico (\cdot NO). Esta modificación puede generarse por distintas vías (revisado por [20]) siendo la más relevante la adición homolítica del dióxido de nitrógeno (\cdot NO₂) al doble enlace [21][20][19]. En este caso el paso limitante para la formación de NO₂-FA es la disponibilidad de \cdot NO₂, el cual puede generarse a partir de las siguientes reacciones:

- i) La oxidación del \cdot NO en un medio hidrofóbico, como aquellos generados en el interior de las lipoproteínas y membranas biológicas, donde el \cdot NO se concentra.
- ii) La protonación de NO₂⁻ (principal derivado fisiológico del \cdot NO) a ácido nitroso (HNO₂) y su posterior decaimiento en medio acuoso.
- iii) La descomposición de productos derivados del peroxinitrito (ONOO⁻): el ácido ONOOH o el ONOOCO₂⁻, éste último generado a partir de su reacción con el CO₂.
- iv) La oxidación del nitrito (NO₂⁻) mediada por peroxidasas, microperoxidasas, hemo-proteínas y metales de transición [Fe (II)] (revisado por [22])

Las condiciones necesarias para la formación de esta familia de nitroalquenos, tales como la baja tensión de oxígeno, la formación de radicales y el pH ácido, son características de contextos inflamatorios o de estrés metabólico y pueden encontrarse en sitios como el espacio intermembrana de la mitocondria, ambientes ácidos como el tracto digestivo o el entorno de macrófagos o neutrófilos activados [23]. De todos modos el primer registro de la presencia de estos compuestos fue en un homogeneizado de lípidos proveniente de los músculos papilares bovinos en condiciones normales, en el que se halló al nitrohidroxiaquidónico. Hoy en día se han detectado nitroalquenos provenientes de la mayoría de los ácidos grasos y sus correspondientes derivados nitrohidroxilados en plasma y orina de pacientes normales [21, 24]. Sin embargo la detección y cuantificación de dichas

moléculas en condiciones fisiológicas continúa siendo tema de debate. Baker y colaboradores detectaron en sangre y orina de pacientes normales la presencia de varios nitroalquenos, pero cuantificaron únicamente al ácido nitrolinoleico (LNO₂) y nitrooleico (OANO₂) por disponer de estándares sintetizados *in vitro* solo para dichas especies. La concentración del LNO₂ no esterificado en plasma rondó los 79nM y en la membrana de los eritrocitos fue de 50 nM, mientras que el OANO₂ mostró valores de 619 y 59 nM respectivamente [21, 25]. Sin embargo, más recientemente, el mismo grupo de investigación constató que no era posible detectar tales niveles de NO₂-FA libres en muestras de plasma normal. En efecto, en contraposición a lo descrito inicialmente, varios experimentos mostraron que una vez ingresados al torrente sanguíneo, los nitroalquenos reaccionan rápidamente formando aductos reversibles con tioles presentes en proteínas [26-27]. Además, los NO₂-FA pueden ser rápidamente metabolizados por β -oxidación o saturación del doble enlace, y por lo cual es muy probable que los datos obtenidos por Baker y colaboradores hayan sido producto de artefactos en la metodología de medición [23]. De todos modos existen evidencias de la generación de NO₂-FA en condiciones de inflamación o estrés oxidativo. Otros investigadores detectaron al LNO₂ en el plasma de pacientes hiperlipidémicos [24], y en extractos lipídicos de mitocondria provenientes de corazones de rata sometidos a acondicionamiento isquémico. Es este último estudio la concentración de LNO₂, basada en un estándar interno, rondó los 619 fmol/mg de proteína mitocondrial [23, 28]. Por su parte el OANO₂ fue detectado a una concentración de 9.5nM en el miocardio como consecuencia del daño producido por isquemia-reperusión en un modelo en ratón [29]. A su vez otros estudios que utilizaron el cultivo de una línea celular tipo macrófago (J774.1) demostraron un aumento de la nitración del colesterol-linoleato (CLN) después de la activación de estos macrófagos por 24 horas con LPS e Interferón- γ [30]. En conjunto, existe un cuerpo de evidencias que indicaría que los NO₂-FA pueden formarse fisiológicamente durante procesos inflamatorios, pero la concentración que alcanzan no está claramente establecida, y su determinación requiere del ajuste de métodos analíticos de mayor sensibilidad, así como también del cuidado en la preparación de las muestras para evitar artefactos y permitir recuperar la totalidad de los NO₂-FA presentes (libres y aductados).

Puede considerarse que a través de la formación de los NO₂-FA se transforman moléculas, en principio destinadas a la estructura celular y al almacenamiento de energía, en nuevas moléculas que podrían haber perdido estas funciones. De hecho resulta improbable que los NO₂-FA tengan el mismo destino en la célula que los ácidos grasos que los originaron, ya que como veremos a continuación estas moléculas son altamente electrófilas y forman rápidamente aductos con blancos proteicos, como ser factores de transcripción, pudiendo

alterar la señalización celular [25-26]. Así la formación de NO₂-FA, podría constituir una ruta diferente derivada del ·NO para modular las funciones celulares. Esta hipótesis es razonable pero su comprobación requiere establecer con exactitud cuáles son los niveles fisiológicos alcanzados por los NO₂-FA en condiciones inflamatorias y no inflamatorias.

1.3. Propiedades anti-inflamatorias de los nitroalquenos

Existen muchas evidencias que demuestran que los NO₂-FA participan en procesos tanto fisiológicos como patofisiológicos, a través de la activación de vías de señalización intracelular en varios tipos de células, incluyendo células endoteliales, plaquetas y células del sistema inmune innato (neutrófilos, monocitos y macrófagos) [26, 30-32]. A grandes rasgos los efectos anti-inflamatorios provocados por los NO₂-FA sobre estos tipos celulares consisten en:

i) modulación de la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales y leucocitos, involucradas en mediar la extravasación de leucocitos de la sangre en un sitio inflamatorio. Se observó que el LNO₂ como el OANO₂ fueron capaces de inhibir el rodamiento y la adhesión de monocitos; en este caso el efecto se asoció a la supresión de la expresión de VCAM-1 en estas células y en el endotelio [26].

ii) cambios en los perfiles de citoquinas y quimioquinas de forma de limitar también la permeabilidad del endotelio y la migración celular. Varios NO₂-FA han mostrado capacidad para modular el perfil de citoquinas y quimioquinas secretado por distintas células. Por ejemplo, el LNO₂ y el OANO₂, inhibieron de manera dependiente de la dosis la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (como ser IL-6, TNF- α y MCP-1) en macrófagos activados con LPS [26], mientras que el colesterol-nitrolinoleato (CLNO₂) provocó la disminución de la secreción de IL-1 β y TNF- α en macrófagos THP-1 estimulados con ésteres de forbol [30]. De acuerdo con los resultados obtenidos por estos investigadores, estos efectos se relacionarían con una interferencia en la activación del factor de transcripción NF- κ B, involucrado en el disparo de la expresión de numerosos genes inflamatorios incluyendo las citoquinas mencionadas arriba.

iii) inhibición de la producción de especies reactivas del O y N involucradas en el potencial redox de las células inflamatorias. Esto se ha visto en particular con el LNO₂, que fue capaz de bloquear la función de los neutrófilos mediante la inhibición de la degranulación y la producción de O₂⁻, por un mecanismo independiente de la formación de cGMP [31]. Además, estudios muy recientes sugieren que los NO₂-FA tienen capacidad para modular la expresión de la NADPH oxidasa en macrófagos murinos (Lucía González, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, datos no publicados). Por otro lado, la generación de ·NO en macrófagos J774.1 activados con LPS (con o sin IFN- γ) fue regulada por el CLNO₂ o LNO₂, a

través del control de la expresión de la NOS2 (óxido nítrico sintasa inducible). Este efecto también sería mediado por la inhibición del factor de transcripción NFκB que controla la expresión de la enzima [30, 33], y no mostró relación con otras propiedades de los NO₂-FA como su capacidad para liberar ·NO o activar el receptor nuclear PPAR-γ (del inglés *Peroxisome Proliferator Activated Receptor*). Finalmente,.

iv) la inducción de la expresión de proteínas que controlan procesos redox e inflamatorios como ser la totalidad de las proteínas de fase II. Se observó que tanto el CLNO₂ como el LNO₂ provocaron un aumento en la expresión de la proteína de fase II, Hemoxigenasa-1 (HO-1). Esta familia de proteínas se encuentran bajo el control de un elemento de respuesta a antioxidantes, conocido como ARE (del inglés, *antioxidant response element*), el cual puede ser activado a través de la activación de la vía de Keap1/Nrf2 (ver más adelante) [34-36]. Es posible que el mecanismo subyacente a dicha activación por parte del CLNO₂ y el LNO₂, implique modificaciones electrofílicas por los NO₂-FA en el factor Keap1. Se ha planteado que la inducción de HO-1 por los NO₂-FA está vinculada a la inhibición de la vía de NF-κB en macrófagos activados, posiblemente mediante la producción por parte de esta enzima de CO, el cual es capaz de interferir con esta vía [37].

v) capacidad para contrarrestar la activación de las plaquetas. En particular esto se ha visto a través de su potencial para inhibir la agregación plaquetaria inducida por trombina *in vitro*. Esta propiedad descrita para el LNO₂ le da un potencial regulador interesante ya que la agregación plaquetaria es el evento más frecuente que se desencadena en etapas terminales de la aterosclerosis.

Además de los efectos anti-inflamatorios descritos anteriormente, algunos NO₂-FA han mostrado otro tipo de propiedades biológicas que pueden ser relevantes en situaciones inflamatorias, si bien no son directamente anti-inflamatorias. Se demostró que el LNO₂ es capaz de inducir la relajación de anillos de aorta de rata precontraídos, mediante la activación de la guanilatociclasa soluble (sGC); esta activación genera cGMP que actúa como segundo mensajero, el cual termina activando a protein kinasas que inducen la relajación de la pared vascular [38]. Este efecto se asoció a una vía independiente de la formación de cGMP pero dependiente de cAMP [32].

1.3.1. Formación de aductos con proteínas involucradas en vías de señalización

La presencia del grupo nitro en los NO₂-FA, induce una gran electrofilicidad en el carbono beta adyacente, que lo lleva a reaccionar con moléculas nucleófilas mediante una reacción del

tipo de adición de Michael [27]. Se conoce una gran variedad de moléculas que pueden auspiciar como nucleófilos en una reacción de este tipo. Los primeros registros de aductos de NO₂-FA fueron con moléculas de agua, originando así nitrohidroxialquenos [21]. Otros blancos de ataque de estos compuestos pueden ser los residuos proteicos de His y Cys en proteínas; en estos casos posiblemente se modifiquen las características estructurales de la proteína en cuestión y en última instancia su función. La nitroalquilación de proteínas mediada por los NO₂-FA fue registrada con NF-κB en experimentos *in vitro* [26], así como también con glutatión (GSH) y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) en ensayos *in vitro* y en glóbulos rojos de humanos sanos [27].

Existen evidencias de la reversibilidad de los aductos nitroalqueno-proteína cuando son incubados con agentes reductores como ditioneitol o GSH. Este carácter reversible es una característica muy interesante si consideramos a los NO₂-FA como señalizadores celulares [27], ya que sería posible que los niveles de GSH celular regularan la nitroalquilación de proteínas y de esa forma el encendido o apagado de vías de señalización intracelular.

En conjunto, la modificación covalente, pero potencialmente reversible, de proteínas claves en las rutas de activación intracelular a través de la nitroalquilación, hace posible que los NO₂-FA puedan modular la expresión génica y en consecuencia las propiedades biológicas de las células. Cómo esta modulación se liga con las funciones anti-inflamatorias se explica al menos por la inhibición de la vía de NF-κB y la activación de la vía de Keap1/Nrf2 que se detallan a continuación.

1.3.1.a. Inhibición del factor de transcripción NF-κB

NF-κB es un factor de transcripción de la familia de proteínas Rel, que puede actuar como un hetero u homodímero de cinco subunidades (p50, p52, p65, p100 y p105). El dímero formado por p50 y p65 es la forma mayoritaria y presenta actividades relacionadas con la inflamación, ya que activa la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (como ser IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α y MCP-1) y de moléculas de adhesión tales como ICAM-1 y VCAM-1. En condiciones normales NF-κB se encuentra en el citoplasma asociado a su inhibidor, la proteína IκB. En respuesta a diferentes estímulos inflamatorios, IκB es fosforilada por la IκB quinasa y posteriormente degradada, permitiendo la traslocación al núcleo de NF-κB y posterior activación de los genes mencionados anteriormente [39].

Así, la interferencia de los NO₂-FA con la activación de NF-κB constituye un mecanismo anti-inflamatorio. Como ya mencionamos se ha comprobado en experimentos *in vitro* y en cultivos celulares que varios NO₂-FA son capaces de inhibir la secreción de citoquinas y quimioquinas

(MCP-1, IL-1, IL-6 y TNF- α), por monocitos y macrófagos activados, y la inducción de la NOS2 por macrófagos activados con LPS [26, 30]. Ambas acciones serían mediadas por mecanismos que involucrarían inhibición de la activación de NF- κ B [30]. Existen evidencias de la formación de aductos NO₂-FA-NF- κ B, y se ha propuesto que modificaciones post-traduccionales derivadas de la nitroalquilación de residuos claves en las subunidades p65 y en menor medida p50, comprometen la activación del factor. Más específicamente se ha propuesto la nitroalquilación de Cys involucradas en la unión al ADN de estas subunidades, que son críticas para la actividad de las mismas [26]. Otra posibilidad podría ser la alquilación de la I κ B quinasa por parte de los NO₂-FA, que evitaría la fosforilación de I κ B, pero no hay ninguna evidencia directa de la formación de aductos I κ B-NO₂FA. Ambos mecanismos podrían evitar la traslocación al núcleo de NF- κ B y por lo tanto inhibir la activación de sus genes blanco.

1.3.1.b. Activación de la vía de señalización mediada por Keap1/Nrf2

El factor de transcripción Nrf2 (del inglés *Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*) reconoce en el ADN un elemento de respuesta a antioxidantes (ARE), que es un potenciador en *cis* de la expresión de una batería de genes de fase II con funciones antioxidantes y citoprotectoras detoxificantes, como ser HO-1, ferritina y glutatión peroxidasa, entre otros. La actividad de Nrf2 está controlada por la proteína Keap1 (del inglés *Kelch-like ECH-associating protein 1*), el mecanismo subyacente no está completamente dilucidado, pero la hipótesis más aceptada es que en condiciones normales la unión de Keap1 a Nrf2 promueve la degradación de éste último por el proteosoma, manteniendo bajo control la expresión de los genes a su cargo, mientras que señales a través de moléculas oxidantes o electrófilas, disocian Nrf2 de Keap1, logrando la traslocación al núcleo y el inicio de la expresión de genes capaces de controlar el estrés oxidativo y prevenir posibles daños celulares [40]. Como se mencionó anteriormente uno de los genes activado por Nrf2 es la HO-1, la cual participa en respuestas protectoras a enfermedades inflamatorias como aterosclerosis, fallas renales agudas, restenosis vascular, rechazo a transplantes y sepsia (revisado por [35]). La HO-1 degrada al grupo hemo en biliverdina, CO y Fe. Si bien todos estos productos colaboran en las respuestas protectoras frente a la oxidación, el CO sería el mediador generado de mayor potencial anti-inflamatorio. En cuanto a los NO₂-FA, resultados en células musculares de la pared vascular y en células endoteliales mostraron que el tratamiento con LNO₂ fue capaz de interferir con la inhibición mediada por Keap1 permitiendo la traslocación al núcleo de Nrf2 [41], y la activación de HO-1 respectivamente [36]. Si bien se sabe que existe una interacción de los NO₂-FA con Keap1 y se propone que el mecanismo subyacente implica la nitroalquilación de dicho factor,

todavía no hay resultados directos que comprueben esta teoría. Por otro lado la activación de esta enzima también se observó en macrófagos J774.1 tratados con CLNO₂, que paralelamente mostraron una disminución de la síntesis NOS₂, probablemente como consecuencia de una disminución en la activación o traslocación de NF-κB mediada por el CO [30]. De modo que la generación endógena de nitroalquenos en un contexto inflamatorio podría intervenir en la vía de Keap1/Nrf2, nitroalquilando a Keap1 y liberando a Nrf2, con posterior activación de la HO-1, para proteger la vasculatura del daño oxidativo y modular el potencial inflamatorio de los macrófagos.

1.3.2. Activación de los receptores PPAR

Los receptores PPAR (del inglés *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*) son factores de transcripción activados por ligandos lipofílicos que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. Una vez activados forman heterodímeros con el receptor retinoico X (RXR por sus siglas en inglés) y se unen a los elementos de respuesta a PPAR (PPRE) en las regiones promotoras de los genes blanco [42]. Estos factores de transcripción regulan genes relacionados con el metabolismo de lípidos y lipoproteínas, la homeostasis de la glucosa y la diferenciación, proliferación y supervivencia celular. A su vez se postula que pueden reprimir la expresión de genes pro-inflamatorios activados por factores de transcripción como NF-κB, AP-1 (del inglés *activation protein-1*) y STAT-1 (del inglés *signal transducer and activator transcription 1*) mediante el bloqueo de sus vías de señalización [43].

Existen tres tipos de PPAR llamados α, δ/β y γ, que presentan una estructura similar, pero distribución y funciones diferentes. En particular nos interesa PPAR-γ porque los NO₂-FA han demostrado tener una gran afinidad por este subtipo en comparación con los otros [21, 44]. Este receptor se expresa en el tejido adiposo, músculo esquelético y cardíaco, intestino, endotelio, macrófagos y monocitos periféricos. Su activación controla funciones tales como la diferenciación a adipocitos, la deposición de las grasas, el control del metabolismo lipídico y de la homeostasis de la glucosa. Además se ha observado que cumple un rol en la modulación de la respuesta inflamatoria de algunos tipos celulares (Revisado por [45] y [46]). Dado el impacto de estos receptores en el control del metabolismo lipídico y la inflamación, se han sintetizado una variedad de ligandos como la familia de las drogas antidiabéticas tiazolidinedionas, con propósitos terapéuticos. Dentro de esta familia de drogas se encuentra la rosiglitazona, que ha demostrado ser uno de los ligandos más potentes de PPAR-γ.

Aunque se conocen muchos ligandos de PPAR-γ, todavía se debate sobre cuál o cuáles son sus ligandos fisiológicos. Por un lado los eicosanoides y sus moléculas derivadas son ligandos

endógenos de estos factores. Por otro lado, los derivados de las prostaglandinas en particular la 15-deoxi-delta 12,14PGJ₂ (15d-PGJ₂), también podría actuar como ligando. Esta última es producida en el organismo en una miríada de situaciones inflamatorias, pero a concentraciones pM que, no alcanzarían para activar a PPAR-γ; de acuerdo con estudios *in vitro*, se requerirían de concentraciones nM para poder inducir dicha activación [47].

En relación con los NO₂-FA, en base a la información disponible sobre los niveles fisiológicos de los NO₂-FA y a experimentos realizados *in vitro* y en cultivos celulares que mostraron su capacidad de unión y activación del receptor, inicialmente se los propuso como ligandos endógenos de PPAR-γ. Sin embargo, los datos más recientes no permiten asegurar la veracidad de esta hipótesis, ya que sus niveles fisiológicos continúan aún en discusión. De todos modos, de los experimentos que mostraron la activación de estos factores por parte de los NO₂-FA en cultivos celulares, vale la pena detallar que mediaron el aumento de la adipogénesis, la incorporación de glucosa y la expresión de CD36 en macrófagos [21, 44]. En cuanto a este último punto CD36 es un receptor barrendero (del inglés *scavenger receptor*) que presenta gran afinidad por la LDLox. Como ya se mencionó, PPAR-γ está involucrado en los mecanismos que conducen a la acumulación de lípidos en el interior de los macrófagos y posterior diferenciación de la célula en células espumosas, fenotipo característico de las lesiones ateroscleróticas. Es importante notar que el aumento de la expresión de CD36 inducido en macrófagos por ligandos de PPAR-γ no tiene necesariamente efectos pro-aterogénicos. Esto es porque PPAR-γ también modula la expresión de proteínas de membrana de la familia ABCA (del inglés *ATP-binding cassette*) encargadas de hacer circular al CL fuera de la célula, de modo de compensar la incorporación de lípidos mediada a través de CD36 (revisado por [48]).

1.3.3. Liberación de •NO

Los NO₂-FA actúan como un reservorio de •NO, ya que bajo ciertas condiciones de pH en medio acuoso sufren reacciones que conducen a la liberación de este radical. Existen dos mecanismos posibles para explicar la generación de •NO por parte de los NO₂-FA. En primer lugar a pH neutro en un medio acuoso los NO₂-FA pueden originar por decaimiento intermediarios nitrosos, que presentan un enlace C-N débil, factible de romperse liberando •NO [44]. Esta reacción es una modificación de la reacción de Nef, la cual fue descripta por primera vez en 1894 [49]. Por otro lado los NO₂-FA podrían formar por isomerización ésteres de nitrito que mediante homólisis del enlace y/o reducción originarían •NO [50]. La liberación del radical por parte de los NO₂-FA se ha seguido por varios métodos que se dividen en dos grandes grupos. Por un lado se han utilizado métodos indirectos de detección y cuantificación del •NO,

que hacen uso de cambios en las propiedades de otras moléculas generadas por la interacción con el radical (como ser modificaciones en el nivel de oxidación o emisión de fluorescencia). La oxidación de hemoglobina o del cPTIO a metamioglobina y cPTI respectivamente, y el aumento en la fluorescencia mediada por la sonda DAF, son ejemplo de métodos indirectos [30, 33, 44]. Por otro lado, se aplicaron métodos electroquímicos para la cuantificación directa de $\cdot\text{NO}$ liberado por los $\text{NO}_2\text{-FA}$ [33]. A modo de ejemplo, la liberación de NO por parte del AANO_2 , fue de $8 \mu\text{mol}$ de $\cdot\text{NO}/\text{minuto}/\text{mmol}$ de AANO_2 cuando se midió con métodos directos [33], mientras que derivados vecinales nitrohidroxilados del AA produjeron un flujo de 183 nmol de $\cdot\text{NO}/15 \text{ min}/\mu\text{mol}$ producto lipídico, el cual se midió a través de métodos quimioluminiscentes [51].

Se ha demostrado que el NO presenta propiedades biológicas interesantes. En primer lugar es capaz de reaccionar en compartimentos lipofílicos con peroxi-radicales lipídicos frenando la lipoperoxidación lipídica, evidenciando así un rol protector de la oxidación. Esta acción antioxidante puede ser determinante en el metabolismo de las lipoproteínas ya que el $\cdot\text{NO}$ tiende a acumularse en las membranas de las mismas pudiendo evitar su oxidación [52]. En segundo lugar actúa como un mediador de la vasorelajación [53]. Esta propiedad involucra la reacción del radical con la guanilatociclasa soluble (sGC), que al activarse genera cGMP como segundo mensajero, el cual terminará activando cascadas de protein kinasas que inducen la relajación de la pared vascular. De todos modos, algunas de las acciones que se le atribuyen al $\cdot\text{NO}$ no son mediadas directamente por él, sino que están involucrados productos derivados del $\cdot\text{NO}$, capaces de modificar moléculas blanco y así transducir señales dependientes o no de cGMP (revisado por [54]).

En el caso de la capacidad vasorelajante inducida por los $\text{NO}_2\text{-FA}$ y su asociación a la generación de NO , los datos experimentales obtenidos a partir de anillos de arterias de rata previamente contraídos, sugieren una vinculación directa entre esta capacidad vasorelajante y la generación de cGMP. Como la vasorelajación demostró ser independiente del endotelio, (no se observó pérdida de la actividad al extraer el endotelio vascular), se puede inferir que no hay participación de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), de expresión constitutiva, y por ende generación de $\cdot\text{NO}$ por esta enzima. Así, las observaciones anteriores sugieren que en la vasorelajación mediada por los $\text{NO}_2\text{-FA}$ el $\cdot\text{NO}$ juega un rol fundamental [50].

1.3.4. Efecto de la administración de nitroalquenos en modelos de inflamación *in vivo*

Para probar las propiedades anti-inflamatorias de los $\text{NO}_2\text{-FA}$ desarrolladas anteriormente, se han realizado varios estudios en modelos de distintas enfermedades inflamatorias, obteniéndose resultados prometedores.

En un modelo de ischemia/reperfusión en el corazón de ratones, la inyección de OANO₂ previo a la inducción de la ischemia, logró reducir el área de infarto del miocardio en comparación con el grupo tratado con vehículo. Además el NO₂-FA indujo una menor activación de NF-κB en las células del miocardio que fue corroborada por los bajos niveles de ARNm correspondientes a proteínas de adhesión celular y quimioquinas controladas por dicho factor (ICAM-1, VCAM-1 y MCP-1); ésta incubación estaría mediada por una modificación post-traducciona l de la subunidad p65 de NF-κB. Por otro lado en las zonas de lesión el OANO₂ logró una menor infiltración de neutrófilos y previno la apoptosis de las células. De modo que en este modelo la administración de OANO₂ mostró ejercer propiedades anti-apoptóticas y anti-inflamatorias, mediante el control de factores pro-inflamatorios [29].

Por otro lado el OANO₂ fue capaz de evitar en un modelo en ratón la hiperplasia de la neoíntima mediante la activación de una vía con efectos anti-inflamatorios. El modelo utilizado reprodujo el daño de la arteria femoral, inducido a través de una intervención quirúrgica y se buscó luego la posterior reparación del tejido mediante el suministro del NO₂-FA. La administración exógena de OANO₂ en concentraciones nM logró activar un mecanismo dependiente de la HO-1, que generó una recuperación normal de la pared de la arteria, a diferencia de los controles que presentaron cierto grado de hiperplasia [55].

El modelo de Colitis en ratón también fue utilizado para probar los efectos anti-inflamatorios de los NO₂-FA. Esta enfermedad es un desorden intestinal inflamatorio y recurrente de etiología no totalmente elucidada. Datos publicados indican que la regulación de la inflamación por PPAR-γ podría llegar a relacionarse con la etiología de la colitis, debido a que la susceptibilidad a padecerla aumentaba en ratones PPAR-γ -/+ [primera generación de la cruce de un animal deficiente para PPAR-γ (PPAR-γ -/-) con uno salvaje para dicho gen (PPAR-γ +/+)]. Por otro lado el epitelio del colon expresa grandes cantidades de PPAR-γ, lo que vuelve a este factor un blanco atractivo para el tratamiento de la inflamación responsable de la enfermedad. Considerando que en condiciones inflamatorias el colon produce grandes cantidades de ·NO, se postuló que el colon podría ser un sitio de alta producción de NO₂-FA y por lo tanto sería interesante evaluar los efectos de la activación de PPAR-γ por los NO₂-FA sobre el desarrollo de colitis [56]. La administración del OANO₂ en un modelo de colitis inducido por Dextran sulfato de sodio, redujo los síntomas característicos de la enfermedad y previno el acortamiento del intestino en comparación con el control (la longitud del intestino se considera un marcador robusto del avance de la enfermedad). Por otro lado, la administración del OANO₂ logró prevenir las respuestas pro-inflamatorias regulando la activación de NF-κB en el epitelio del intestino. Concomitantemente se observó una marcada activación de PPAR-γ por el tratamiento con el OANO₂, sugiriendo que el OANO₂ a través de la

activación de este receptor nuclear podría estar inhibiendo la vía de NF- κ B, y mediando un efecto protector en el desarrollo de la enfermedad [56].

Finalmente los NO₂-FA se probaron en un modelo de aterosclerosis basado en la utilización de ratones deficientes para la apo-proteína E (apoE^{-/-}), que desarrollan la enfermedad rápidamente cuando se los alimenta con una dieta rica en CL. Como ya se mencionó, la aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica, caracterizada por la formación de lesiones en la pared de los vasos sanguíneos conocidas como placas de ateroma, que se originan por una respuesta inflamatoria desmedida favorecida entre otras cosas, por los altos niveles de CL en sangre. En particular el tratamiento con OANO₂ tuvo efectos benéficos frente al control con ácido oleico (OA), su precursor, porque logró reducir el área de placa generada, y aumentar su estabilidad, lo que previene la posible formación de trombos y obstrucción de las arterias. Por otro lado el OANO₂ redujo la respuesta inflamatoria a nivel de la pared de la aorta, ya que logró reducir la expresión de moléculas de adhesión y quimioquinas pro-inflamatorias. Esto llevó a un menor reclutamiento de neutrófilos, monocitos y macrófagos en el sitio de la lesión y a una reducción de la generación de especies reactivas del O y N. En este mismo trabajo pero mediante ensayos *in vitro* los autores demostraron que el OANO₂ previno la diferenciación de macrófagos a células espumosas, inhibiendo la incorporación de LDLox a la célula. Este efecto podría ser uno de los responsables de la reducción de la placa observada en los ratones [57].

1.3.5. Elección del AANO₂ para el estudio de su potencial anti-aterogénico

Dentro de la gran familia de NO₂-FA, elegimos estudiar el potencial anti-aterogénico del AANO₂, debido a varias razones. En primer lugar el AANO₂ es un derivado nitrado del ácido araquidónico (AA); este último constituye uno de los ácidos grasos poli-insaturados más abundantes en las membranas celulares, además de ser el precursor de las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, que integran una familia de potentes moléculas señalizadoras [58]. Como el precursor del AANO₂ media funciones biológicamente relevantes, resultó interesante explorar la posibilidad de que su nitración pudiese modificar e incluso ampliar estas funciones otorgándole al compuesto nitrado nuevas propiedades de señalización.

Por otro lado recientemente se ha demostrado que el AANO₂ comparte con otros NO₂-FA varias de las propiedades biológicas que discutimos en la sección 1.3.5. Es importante mencionar que el AA es un ácido graso de 20 carbonos que presenta cuatro insaturaciones en *cis*, permitiendo la formación de 8 posibles isómeros mono-nitrados. Así, la nitración del AA, por ejemplo en presencia de NaNO₂ en medio acuoso y pH ácido, genera un derivado

nitrohidroxilado y una mezcla de isómeros mononitrados [33, 51]. Mediante ESI MS/MS y NMR, fue posible identificar los isómeros siendo el 9, 12, 14 y 15-nitroaraquidonato los principales componentes (ver Figura 2). Si bien estos cuatro compuestos son factibles de ser separados por HPLC, hasta ahora todos los estudios realizados para caracterizar las propiedades biológicas del AANO₂ utilizaron la mezcla de isómeros. Así, en adelante se utilizará el término AANO₂ para referirse a dicha mezcla.

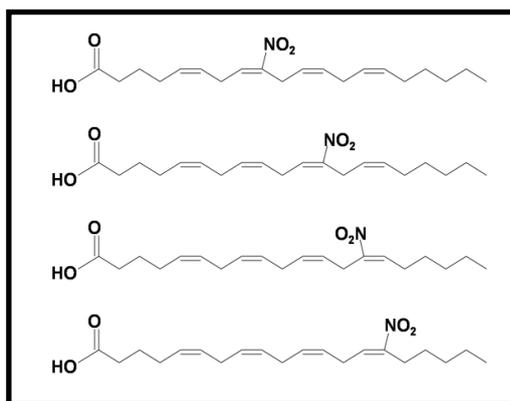


Figura 2: Isómeros mono-nitrados del ácido nitroaraquidónico (AANO₂).

A partir de la síntesis *in vitro* del AANO₂ se obtuvo una mezcla de isómeros mono-nitrados que por ESI MS/MS y NMR, pudieron identificarse como el 9-nitroaraquidonato, 12-nitroaraquidonato, 14-nitroaraquidonato y 15-nitroaraquidonato. No han podido producirse grandes cantidades de estos isómeros por separado, por lo que se usa la mezcla de los mismos como si fueran un único compuesto al que se le denomina AANO₂.

Una de las primeras propiedades del AANO₂ estudiadas fue su capacidad para liberar $\cdot\text{NO}$. Esta propiedad fue demostrada mediante ensayos indirectos basados en la oxidación de la oxihemoglobina y en la medición por EPR de la reducción de cPTIO a cPTI (molécula barrendera de $\cdot\text{NO}$). A su vez se intentó cuantificar directamente dicha liberación en medio acuoso a través de la utilización del electrodo de $\cdot\text{NO}$, pero no fue posible detectar al gas en cuestión en estas condiciones. Sin embargo, en presencia de superóxido dismutasa (SOD) se observó y cuantificó la liberación del $\cdot\text{NO}$, siendo el flujo de 8 μmol de $\cdot\text{NO}$ /minuto/mmol de AANO₂. Los autores sostienen que la presencia de SOD estaría eliminando el $\text{O}_2^{\cdot-}$, (generado por decaimiento del AANO₂), el cual podría estar barriendo al $\cdot\text{NO}$ liberado, impidiendo su detección [33]. Vale la pena mencionar que además del AANO₂ otros derivados del AA mostraron capacidad para liberar $\cdot\text{NO}$. Por un lado derivados vecinales nitrohidroxilados sintetizados *in vitro* produjeron un flujo de 183 nmol de $\cdot\text{NO}$ /15 min/ μmol producto lipídico, el cual se midió a través de métodos quimioluminiscentes [51]. Por otro lado el 6-metilnitroaraquidonato (6-AAMetNO₂) en medio acuoso pero en presencia de células logró liberar $\cdot\text{NO}$, que fue detectado a través de una sonda fluorescente pero no pudo ser

cuantificado [59]. Como la capacidad liberadora de $\cdot\text{NO}$ está íntimamente relacionada a la inducción de la vasorelajación, se buscó si el AANO₂ era capaz de inducir vasorelajación en anillos de aorta de rata previamente contraídos. Los resultados mostraron que el AANO₂ es capaz de inducir vasorelajación por un mecanismo dependiente de la activación de la sGC (fue inhibido por preincubación de los anillos de aorta con un inhibidor conocido de la sGC), e independiente del endotelio[33]. Esto último asegura que los efectos observados no son consecuencia del aumento en la producción de $\cdot\text{NO}$ por la óxido nítrico sintasa endotelial constitutiva (eNOS). Los resultados anteriores fueron exactamente reproducidos por los derivados nitrohidroxilados y por el 6-AAMetNO₂ [51, 59].

Otra propiedad del AANO₂ compartida con otros nitroalquenos (LNO₂ y CLNO₂) fue la capacidad de inhibir la inducción de la NOS₂ en macrófagos inflamatorios. Para demostrar esto, se realizaron experimentos donde los macrófagos fueron activados con LPS/IFN γ y tratados con AANO₂ en presencia o ausencia de cicloheximida, un inhibidor de la traducción. Se observó que el AANO₂ logró inhibir la generación de NO mediante la inhibición de la síntesis de la NOS₂, pero no de la actividad de la enzima, dado que la administración del AANO₂ después de la cicloheximida no provocó inhibición. Para confirmar que dicha inhibición fuera independiente de la liberación de $\cdot\text{NO}$ desde el nitroalqueno, las células fueron tratadas con NOC-18, un dador de $\cdot\text{NO}$, el cual no logró inhibir en absoluto a la enzima.

Además de las propiedades biológicas mencionadas anteriormente, el AANO₂ presenta novedosas propiedades anti-inflamatorias no compartidas con otros NO₂-FA, nos referimos a su capacidad para inhibir la prostaglandina endoperóxido H sintasa (PGHS), enzima clave en el metabolismo del AA. En la literatura están descritas dos isoenzimas PGHS-1 y PGHS-2, siendo la primera de expresión constitutiva en casi todos los tejidos mamíferos, mientras que la segunda es inducible en varios tipos celulares (por ej.: monocitos y células endoteliales de la vena umbilical humana y células NIH 3T3 de ratón) [60]. Ambas enzimas son homodímeros que presentan en cada subunidad una molécula de Fe⁺³-protoporfirina IX (Fe⁺³-PPIX) unida de forma no covalente. PGHS-1 y 2 catalizan las mismas dos reacciones: en primer lugar la dioxigenación del AA para generar prostaglandina G₂ (PGG₂), con una posterior peroxidación que produce PGH₂ como producto final. Para poder catalizar dichas reacciones las dos enzimas presentan dos sitios activos con funciones diferentes, uno tiene actividad peroxidasa (POX), mientras que el otro presenta actividad ciclooxigenasa (COX). Ambas actividades requieren de la presencia de Fe⁺³-PPIX como cofactor, pero este grupo se localiza en el sitio con actividad POX (revisado por [61]). Trostchansky y colaboradores demostraron que el AANO₂ interfiere con el funcionamiento normal de las PGHS en un sistema *in vitro* basado en el uso de proteínas aisladas de las vesículas seminales de carnero [62]. Esta interferencia se asoció a una inhibición

de la actividad POX tanto en la PGHS-1 como en la 2, así como también de la actividad COX en la PGHS-1. Sin embargo no se observó inhibición de la COX en la PGHS-2. Bastó una concentración de 10 μM de AANO₂ para obtener una inhibición del 50% en la actividad POX, pero resultó interesante que a las mismas concentraciones el LNO₂ y el OANO₂ no fueron capaces de afectar dicha actividad [62]. Considerando que el AA se une en primera instancia al sitio COX y que la separación entre los dos sitios activos no permite que los ácidos grasos en general inhiban la actividad POX (especialmente más alejada), es probable que dada la similitud estructural con el AA, el AANO₂ interactúe con el sitio activo de la enzima, de forma tal que el grupo nitro establezca interacciones que permitan inhibir las dos actividades enzimáticas. Por el contrario el esqueleto de 18 carbonos y una y dos insaturaciones del OANO₂ y LNO₂ respectivamente, no permitiría una interacción con el sitio activo de la enzima por lo cual no hay inhibición. Esto puede implicar una falta de reconocimiento de este tipo de arreglo estructural por parte del sitio activo de la enzima, lo que impide cualquier tipo de interacción enzima-nitroalqueno y por lo tanto suprime la posibilidad de que el OANO₂ y el LNO₂ ejerzan una inhibición.

Varios estudios han profundizado en el mecanismo asociado a la inhibición mediada por AANO₂ de la PGHS. En primer lugar Trostchansky y colaboradores estudiaron los efectos del AANO₂ sobre la enzima en presencia o ausencia de indometacina (IM), un inhibidor de la PGHS que se une específicamente al sitio COX sin afectar la actividad POX. El AANO₂ produjo la inhibición de la actividad POX independientemente de la presencia de IM, y como también inhibió en manera dosis dependiente la actividad COX, los resultados sugieren que la supresión de ambas actividades es independiente de la interacción entre el nitroalqueno y el sitio de actividad COX. En segundo lugar evaluaron los efectos del AANO₂ sobre la apoPGHS-1, es decir la enzima carente del grupo Fe⁺³-PPIX, con el fin de analizar si la inhibición necesitaba de la presencia o no de dicho grupo. Para ello trataron a la apoenzima con el AANO₂ o IM y luego de remover el exceso de los inhibidores, reconstituyeron la enzima agregando Fe⁺³-PPIX y midieron la actividad remanente. La preincubación con IM no afectó a la actividad de la enzima, lo cual indica que la unión de este inhibidor, necesaria para ejercer su acción, requiere de la integridad de la enzima. En contraste, el AANO₂ logró inhibir nuevamente ambas actividades de la PGHS, probablemente interfiriendo con la incorporación del cofactor que es esencial para el correcto funcionamiento de la enzima. Estos resultados en conjunto muestran que el AANO₂ puede inhibir ambas actividades mediante la interacción tanto con la holo como con la apoenzima. Luego, conociendo que otros NO₂-FA han mostrado capacidad para interferir con enzimas mediante la interacción con metales presentes en sus cofactores [63], se estudió la posible interacción entre el AANO₂ y el grupo hemo presente en la PGHS. La

adición del AANO₂ a la holoenzima provocó la remoción sin ningún tipo de modificación del grupo hemo, a medida que era inducida la inhibición. Además, se observó que la presencia del AANO₂ enlentece la reincorporación del grupo hemo a la apoenzima y que el agregado exógeno de hemo en exceso no logra la recuperación de la actividad POX. En conjunto, se postula que los efectos inhibitorios del AANO₂ sobre la PGHS estarían mediados por una modificación en la holoenzima, que provoca la remoción del grupo hemo y evita en parte su posterior incorporación, inhibiendo la actividad POX y COX. Teniendo en cuenta la gran electrofilicidad que presenta el AANO₂ por la presencia de su grupo NO₂, es altamente probable que la inhibición de la PGHS tenga como mecanismo subyacente la nitroalquilación de algún residuo clave en la unión del cofactor.

Por último, es importante mencionar que existen evidencias que sugieren que este efecto inhibitorio del AANO₂ sobre la PGHS ocurre durante la activación de plaquetas humanas. Se observó que el AANO₂ disminuyó la síntesis de tromboxano B₂ (TxB₂) en plaquetas activadas con trombina, en una manera dependiente de la dosis. Efectos similares fueron alcanzados al incubar las plaquetas con IM, lo que indicaría que la disminución en la producción de TxB₂ inducida por el nitroalqueno se debe a una reducción en la actividad de la enzima. Por otro lado se observó una inhibición en la agregación plaquetaria también dependiente de la dosis, donde 1.3 μM de nitroalqueno bastó para reducir la agregación al 50%, mientras que la IM no tuvo efecto sobre dicho fenómeno [62]. Efectos similares fueron observados con el 6-AAMetNO₂ [59].

De todos los resultados mencionados anteriormente se deduce que el AANO₂ es capaz de modular la activación plaquetaria en forma diferente a otros inhibidores conocidos (como IM) u otros NO₂-FA, ya que logró inhibir tanto la actividad POX como la COX de la enzima y además como fenómeno independiente fue capaz de inhibir la agregación plaquetaria inducida por trombina.

Por otra parte a diferencia del resto de los nitroalquenos, aún no se han realizado trabajos que demuestren la interacción del AANO₂ con PPAR-γ, por lo que hasta el momento solo podemos suponer que por pertenecer a dicha familia la probabilidad de interacción es grande. Sin embargo sería interesante realizar algún ensayo que permitiera corroborar esta supuesta interacción.

Finalmente, vale la pena hacer notar que no existen a la fecha estudios que hayan analizado el potencial del AANO₂ para regular el desarrollo de la inflamación en un modelo *in vivo*. Así, el trabajo que nos planteamos realizar constituye una contribución importante a la comprensión de las propiedades reguladoras de los NO₂-FA, y su potencial como agentes anti-inflamatorios.

2. Objetivo

De acuerdo con los antecedentes, existe un cuerpo de evidencias que apoyan la idea de que los nitroalquenos son moléculas con propiedades anti-inflamatorias, algunas de ellas testeadas en modelos de inflamación *in vivo*. Por otro lado, dentro de esta familia de moléculas, el AANO₂ parece tener algunas propiedades anti-inflamatorias diferenciales, probablemente producto de su capacidad para interactuar con blancos para los cuales el AA es un ligando natural. En efecto el AANO₂, pero no el OANO₂ o el LNO₂, actúa como un potente inhibidor de las enzimas PGHS-1 y PGHS-2. Estas enzimas participan activamente en cascadas de reacciones involucradas en la síntesis de muchos mediadores inflamatorios, por lo cual la inhibición de las mismas podría aumentar los efectos anti-inflamatorios del AANO₂ en relación con otros nitroalquenos.

En este trabajo se buscó evaluar el potencial anti-aterogénico del AANO₂, utilizando un modelo *in vivo* de aterosclerosis, basado en el uso de ratones deficientes para el receptor de la LDL (LDLr^{-/-}). Como la aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica, asociada a un desorden en el metabolismo lipídico, se consideró que el AANO₂ a través de sus propiedades anti-inflamatorias y de la posible interacción y activación de PPAR- γ , podría ejercer efectos moduladores sobre el desarrollo de la enfermedad. Además, este trabajo resulta importante porque no existen ensayos que hayan examinado el potencial anti-inflamatorio del AANO₂ *in vivo*.

Para llevar adelante este trabajo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1) Poner a punto el modelo de aterosclerosis en ratones LDLr^{-/-} en base a la bibliografía disponible y a la experiencia previa del grupo de trabajo en dicho modelo.
- 2) Analizar en este modelo el efecto anti-aterogénico del tratamiento con AANO₂ evaluando los efectos sobre el perfil lipídico, los niveles de la proteína SAP en plasma y la disminución de la placa de ateroma desarrollada a nivel de la válvula aórtica.

3. Diseño Experimental

3.1. Descripción general del modelo de aterosclerosis en ratón

Los estudios realizados se basaron en un modelo de aterosclerosis ampliamente utilizado, que utiliza ratones de la cepa B6.129S7-Ldlrtm1Her que son deficientes en el receptor de la LDL (LDLr^{-/-}). Estos ratones se compraron al laboratorio Jackson (USA) y se criaron en el Instituto Pasteur de Montevideo. Los ratones LDLr^{-/-} desarrollan aterosclerosis cuando se los alimenta con una dieta enriquecida en grasas y CL (dieta hipercolesterolémica, DHC) en tiempos menores [64] a los requeridos en una cepa con niveles normales de LDLr, como lo es la cepa trasfondo genético C57BL/6 [65]. La evidencia del padecimiento de la enfermedad es el desarrollo de la lesión conocida como placa de ateroma en sitios específicos de la vasculatura, en particular en lugares de flujo sanguíneo turbulento como pueden ser los sitios de bifurcación o las válvulas del corazón. La ventaja de utilizar este modelo para ensayar drogas con potencial anti-aterogénico, es que genera lesiones de gran tamaño en un tiempo corto, permitiendo una ventana de trabajo adecuada para evaluar el efecto de las drogas sobre la placa. Además frente a otras cepas utilizadas para el estudio de la aterosclerosis, los ratones LDLr^{-/-} tienen una ventaja adicional que es una distribución del CL en la sangre más parecida al humano, ya que lo transportan mayormente en la LDL, frente al común de los ratones que lo hacen en la HDL. A esto se le suman las ventajas propias de la utilización de ratones como animal de experimentación, que básicamente son la rápida generación de animales sexualmente maduros, su fácil mantenimiento y el gran conocimiento de su genoma. Sin embargo este modelo también presenta desventajas, porque la inducción rápida de la aterosclerosis estimulada por la DHC, no reproduce totalmente el fenómeno fisiológico que se da en el humano, lo que lleva a que las características de la lesión que genera no sean exactamente iguales a las encontradas en estos últimos. Mientras que la larga vida media del hombre permite que la lesión pueda desarrollarse hasta alcanzar las etapas avanzadas, la corta vida del ratón no es suficiente para abarcar la totalidad de dichas etapas y por ello los modelos en ratones no permiten un estudio íntegro de la enfermedad [revisado por [66] y [67]]. En particular nuestro modelo reproduce fielmente la etapa temprana de la lesión, que está caracterizada por la acumulación en el espacio subendotelial de monocitos con lípidos en su citoplasma, pero muestra una restricción de la misma mayoritariamente a la válvula aórtica y en menor medida al resto de la arteria, cuando en el humano la enfermedad afecta a la totalidad de los grandes vasos.

Para poner a punto este modelo resultó importante definir las características de los animales a utilizar (edad y sexo) y de la DHC, ya que ambas influyen fuertemente en el desarrollo de las lesiones. Variaciones en la edad/sexo de los animales o en la composición de la DHC introducirían dispersiones importantes dentro de un experimento o entre experimentos independientes. A continuación se detallan las características de los animales y dietas empleadas.

3.1.1. Elección de los animales

Como se mencionó arriba, la elección de los animales para los experimentos es de gran importancia, ya que debe tener en cuenta varios aspectos como ser el género, la edad y las diferencias de edad entre los mismos. Por otro lado, el número mínimo de animales a utilizar también constituye un elemento a definir al diseñar los experimentos.

Género: se trabajó con hembras porque desarrollan mayor cantidad de placa que los machos [65]. Además agrupar machos de la cepa LDLr-/- en una misma caja por un tiempo prolongado no es aconsejable, ya que son extremadamente agresivos y esta agresividad estará aumentada por el estrés del experimento, lo cual no solo dificulta el trabajo con ellos sino que además puede repercutir en la salud de los animales (se lastiman entre ellos, por lo cual pueden ocasionarse lesiones e infecciones, que en última instancia pueden afectar los resultados).

Edad: la edad de los animales al inicio del experimento es determinante, porque desarrollan placa de ateroma espontáneamente a medida que envejecen. Así, trabajar con animales adultos (más de 12 semanas de edad) no sería aconsejable porque significa que se estaría evaluando el efecto de una droga sobre un nivel de lesión preformada, lo cual resulte probablemente mucho más exigente como modelo de monitoreo de una actividad anti-aterogénica. Por otro lado, de acuerdo con la experiencia previa de nuestro grupo, los niveles de placa desarrollados en animales con más de 2 semanas de diferencia de edad son notoriamente distintos y si se le suma la dispersión asociada a las diferencias individuales dificulta notoriamente el análisis final, por lo cual es necesario ser muy estricto en este punto. Así, tomando en cuenta los antecedentes y la experiencia previa del grupo, se trabajó con ratones de entre 10 y 12 semanas de edad.

Número de individuos: al diseñar un experimento la cantidad de individuos a utilizar debe determinarse en función del análisis estadístico con el que se proyecta realizar el análisis de los datos. Si se busca aplicar test paramétricos que presentan una mayor robustez que los no paramétricos, se necesita un n mínimo del entorno de los 10 animales por grupo para aspirar a que los datos obtenidos puedan ser analizados por los test que evalúan la distribución normal

de la muestra. Además, en este caso, el procesamiento de las muestras para la cuantificación de las lesiones al final de la experiencia es muy delicado y en ocasiones pueden perderse parte de las muestras, por lo cual siempre se trató de incluir un número de animales por grupo mayor al pensado, previendo que al menos las muestras de 2 animales podrían perderse. Cabe mencionar que la crianza y obtención de ratones de esta cepa y con estas características (sexo/edad) es en sí mismo un trabajo complejo y cuyos resultados tienen un componente azaroso. Por lo tanto, más allá de la planificación que se realizó, el número de animales con que se pudo trabajar en nuestras experiencias, quedó determinado por la disponibilidad de hembras de la misma edad, más que por la cantidad deseada.

3.1.2. Dieta hipercolesterolémica (DHC)

Se utilizaron dos tipos de DHC en dos experimentos independientes. Una de ellas fue una dieta comercial 5TJT (TestDiet, USA), que contiene 1% de CL y 20% de grasas totales; esta dieta fue muy cara para utilizarla en ensayos más prolongados y con un gran número de animales. Para este tipo de ensayos se utilizó una segunda dieta, más económica, que se preparó en nuestro laboratorio (DHC preparada). Para ello a la dieta normal comercial 5k52 LabDiet (DN), que se utiliza para la alimentación de los animales durante la cría, se le adicionó CL y grasa vacuna para alcanzar niveles de 1% y 26% en CL y grasas totales respectivamente. La descripción detallada de la preparación se encuentra en la sección 3.3.1.

3.2. Diseño general de los experimentos

Las hembras de edad adecuada se distribuyeron en los diferentes lotes experimentales de forma tal de que la composición de cada lote fuera equivalente en relación con la edad y peso de los animales. Al día 0 se cambió la dieta con la que se alimenta normalmente a los animales (dieta normal, DN) por la DHC, de manera de acelerar el inicio y la magnitud de la lesión. Concomitante al cambio de dieta se comenzaron a suministrar por vía sub cutánea (s.c.) una vez por semana, el compuesto a testear (AANO₂), y los controles necesarios para validar el experimento (el vehículo utilizado y cuando fue posible el AA, precursor del AANO₂). En paralelo, un grupo de animales fueron alimentados con la DN durante todo el experimento e inyectados con tampón fosfato salino (10 mM fosfato 150 mM NaCl pH 7.2, PBS) para evaluar el nivel basal de lesión que desarrollaron los animales. Después de transcurrido el tiempo deseado los animales se sacrificaron y se recuperaron tejidos y órganos, en particular el corazón. Este último fue procesado para cuantificar el área de la placa de aterosclerosis a nivel de la

válvula aórtica. La comparación de los niveles de placa desarrollados en los diferentes lotes experimentales permitió analizar si los tratamientos modificaron el progreso de las lesiones.

Además se realizó un monitoreo del peso y de los niveles de CL y triglicéridos (TG) en sangre, para lo cual se colectaron muestras de sangre de todos los animales previo al cambio de dieta y el día del sacrificio (día final) y de algunos individuos en puntos intermedios del experimento. Finalmente se analizó en los plasmas del día final el nivel de SAP, por ELISA, para evaluar si esta proteína de fase aguda es inducida en este modelo, y por tanto se pudiera utilizar posteriormente como parámetro para el monitoreo de la inflamación inducida durante el desarrollo de la enfermedad.

Se realizaron dos experimentos (piloto y final) bajo distintas condiciones, obteniéndose del primero resultados preliminares, que permitieron ajustar el protocolo para realizar un segundo ensayo. Básicamente las diferencias se introdujeron para mejorar aspectos prácticos del protocolo y optimizar la ventana de respuesta a la DHC, de forma de obtener más potencia para diferenciar eventuales efectos del AANO₂.

3.2.1. Experimento piloto

Este fue el primer experimento, razón por la cual tuvo un objetivo exploratorio y se le llamó **piloto**. Se utilizó un número pequeño de hembras LDLr^{-/-} (n=19), de entre 10 y 12 semanas de edad y la DHC de origen comercial. Se tomaron 4 semanas como el tiempo total del tratamiento con la DHC en base a la experiencia anterior de nuestro grupo [68-69].

Los animales se dividieron en cuatro lotes siguiendo los criterios ya mencionados y fueron tratados de la siguiente forma:

Lote 1: Control Dieta Normal (PBS/DN n=4). Animales alimentados con la DN durante los 28 días de duración del experimento e inyectados por vía subcutánea (s.c.) con 40 µl de PBS los días 0, 7, 14 y 21 como control del efecto de la manipulación.

Lote 2: Control Dieta Hipercolesterolemica (PBS/DHC, n=5). Animales alimentados con DHC a partir del día 0 e inyectados por vía s.c. con 40 µl de PBS los días 0, 7, 14 y 21.

Lote 3: Control del vehículo (Veh/DHC, n=5). Animales alimentados con DHC a partir del día 0 e inyectados por vía s.c. con 40 µl de PEG₄₀₀:etanol (70:30), correspondiente al solvente del AANO₂, los días 0, 7, 14 y 21.

Lote 4: Compuesto (AANO₂/DHC, n=5). Animales alimentados con DHC a partir del día 0 e inyectados por vía s.c. con 1µmol/dosis/kg de AANO₂, en un volumen de 40 µl PEG₄₀₀:etanol (70:30), los días 0, 7, 14 y 21.

Es importante aclarar que la mayoría de los animales recibieron un volumen de 40µl semanales de compuesto o vehículo, sin embargo aquellos animales cuyo peso fue menor a 15 g recibieron 35 µl para evitar posible intoxicación por el vehículo utilizado.

Tres días antes de comenzar el experimento (día -3) y el día del sacrificio (día 28) todos los animales se sangraron vía el seno submandibular, para medir niveles iniciales y finales de CL y TG, respectivamente (ver Figura 3: Diseño experimental utilizado en el experimento piloto.3.3.2). Una vez realizada la medición de los lípidos la sangre fue centrifugada para separar el plasma, el cual se utilizó posteriormente para la medida de SAP por ELISA (ver 3.3.4). Por otro lado, luego del sacrificio se recuperaron los corazones, que se procesaron para cuantificar la placa de ateroma a la altura de la válvula aórtica tal como se describe en 3.3.3.

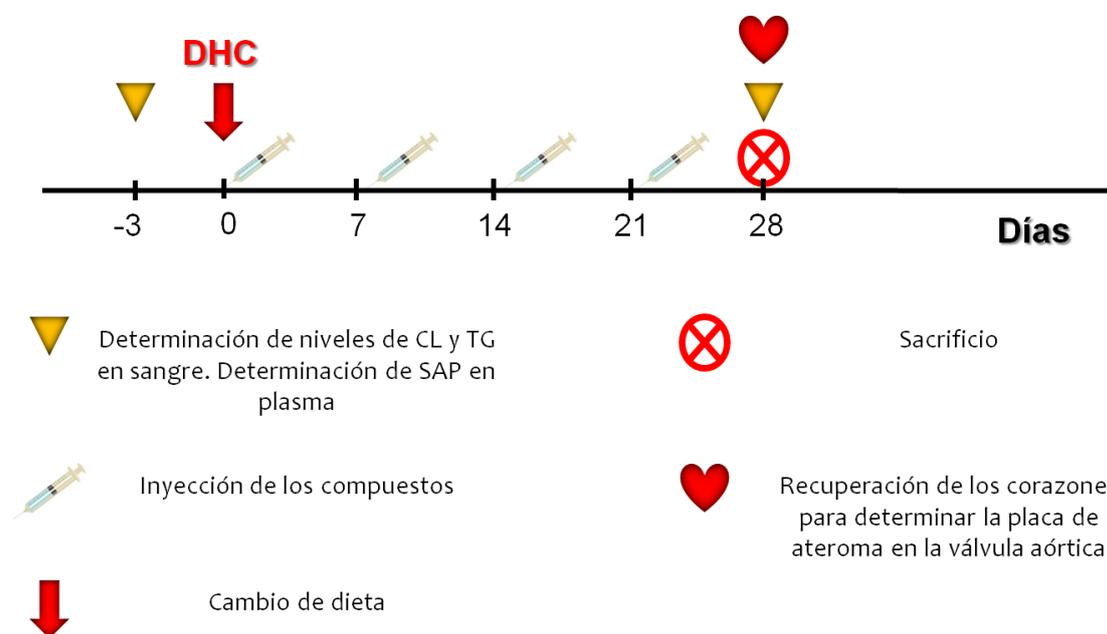


Figura 3: Diseño experimental utilizado en el experimento piloto.

Se muestra una línea del tiempo indicando los 28 días de duración del experimento, con las 4 inyecciones semanales de los compuestos. Además se especifica el momento del cambio de dieta el día 0; los sangrados inicial y final los días 3 y 28 respectivamente, para la medición de CL y TG en sangre y de SAP en plasma; el día del sacrificio y la recuperación de los corazones para la medición de la placa de ateroma el día 28.

3.2.2. Experimento final

En este experimento se introdujeron los siguientes cambios: i) se aumentó el número total de animales utilizados (de 19 a 34), ii) se cambió la DHC comercial por una preparada en nuestro laboratorio, para hacer posibles tratamientos más prolongados que encarecerían mucho el experimento con la DHC comercial, iii) se prolongó la ingesta de la dieta a 7 semanas, ya que la placa generada en el experimento piloto con una ingesta de DHC durante 4 semanas,

no fue adecuada como para evaluar la existencia de efectos inhibitorios por parte del AANO₂, iv) se realizaron dos inyecciones de los compuestos previas a comenzar con el cambio de dieta, para precondicionar a través de los efectos del NO₂-FA el ambiente en que se inicia el desarrollo de la placa, buscando aumentar las posibilidades de detectar efectos anti-aterogénicos, v) se agregó un lote llamado control del compuesto, que se trató con AA (precursor del AANO₂) y vi) se introdujeron variaciones en la técnica para la preparación de las secciones del corazón (cortes histológicos en criostato) que permitieron reducir su grosor de 20 µm a 14 µm.

Los animales se dividieron en cuatro lotes siguiendo los criterios ya mencionados y fueron tratados de la siguiente forma:

Lote 1: Control Dieta Normal (PBS/DN, n=7). Animales alimentados con dieta normal (dieta comercial 5K52, LabDiet, USA) durante los 63 días de duración del experimento e inyectados por vía s.c. con 40 µl de PBS los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56.

Lote 2: Control del vehículo (Veh/DHC, n=9). Animales alimentados con DHC a partir del día 14 e inyectados por vía s.c. con 40 µl de PEG₄₀₀:etanol (70:30) correspondiente al solvente del AANO₂, los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56.

Lote 3: Control del compuesto (AA/DHC, n=9). Animales alimentados con DHC a partir del día 14 e inyectados por vía s.c. con 40µl de AA en una solución de PEG₄₀₀:etanol (70:30), conteniendo 1µmol/dosis/kg, los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56.

Lote 4: Compuesto (AANO₂/DHC, n=9). Animales alimentados con DHC a partir del día 14 e inyectados por vía s.c. con 40 µl* de AANO₂ en una solución de PEG₄₀₀:etanol (70:30), conteniendo 1µmol/dosis/kg, los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56.

Nuevamente, la mayoría de los animales recibieron un volumen de 40 µl semanales de compuesto o vehículo, pero aquellos cuyo peso fue menor a 15 g recibieron 35 µl para evitar posible intoxicación por el vehículo utilizado.

Cinco días antes de comenzar el experimento (día -5) y el día del sacrificio (día 63) todos los animales se sangraron vía el seno submandibular, para medir niveles iniciales y finales de CL y TG en sangre, respectivamente. Además a mitad del experimento (día 28) algunos individuos de cada grupo fueron sangrados para obtener los mismos valores pero a tiempos intermedios (ver Figura 4). Una vez realizada la medición de los lípidos, la sangre fue centrifugada para separar el plasma, el cual se utilizó posteriormente para la medida de SAP por ELISA. Por otro lado luego del sacrificio se recuperaron los corazones, que se procesaron para cuantificar la placa de ateroma a la altura de la válvula aórtica como se hizo en el experimento piloto.

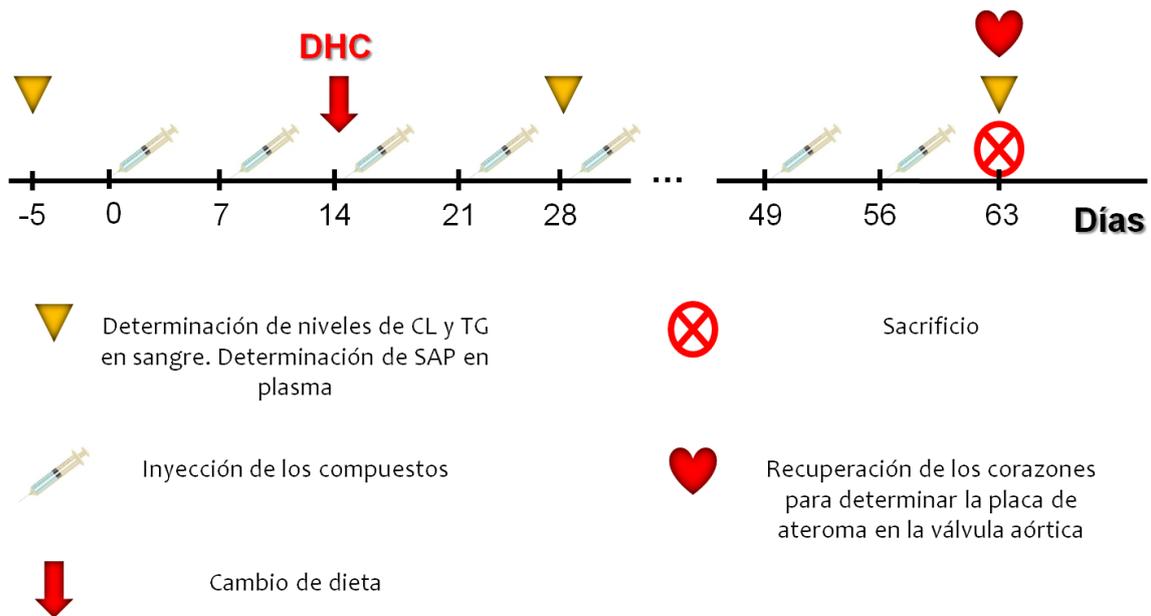


Figura 4: Diseño experimental utilizado en el experimento final.

Se muestra una línea del tiempo indicando los 63 días de duración del experimento. A modo de ejemplo se muestran algunas de las 9 inyecciones semanales de los compuestos. Además se especifica el momento del cambio de dieta el día 14; los sangrados inicial, intermedio y final los días -5, 28 y 63 respectivamente, para la medición de CL y TG en sangre y de SAP en plasma; el día del sacrificio y la recuperación de los corazones para la medición de la placa de ateroma el día 63.

3.3. Métodos

3.3.1. Preparación de la dieta hipercolesterolemica (DHC)

Se utilizó como base de la preparación la DN comercial (ración 5K52, LabDiet, USA), que se suplementó con CL y grasas para alcanzar los niveles de las DHC de origen comercial. Para ello, las pastillas de ración se sumergieron durante una hora en una cantidad suficiente de una mezcla de grasa vacuna (C.O.M.S.A.) y CL (Sigma) en proporción (7.7: 2.3 p/p). De esta forma la ración resultante quedó enriquecida en grasa y CL respecto a la DN, conteniendo aproximadamente 1% CL y 20% grasas totales. Posteriormente la ración fue esterilizada mediante irradiación, a una dosis de 8.1 KGy- 9.1 KGy, con un equipo EMI-9 (Tecnología de Irradiación, LATU). En la alimentación de 27 ratones durante 7 semanas se consumieron 4,5 kg de ración.

3.3.2. Determinación de CL y TG en sangre

A las muestras de sangre obtenidas tanto al inicio como al final del experimento se les agregó ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de modo de alcanzar una concentración final de 10 mM para evitar la coagulación y 20 μ M de butilhidroxitolueno (BHT) para evitar la

oxidación. Los niveles de CL y TG iniciales se obtuvieron mediante el uso de un kit comercial (Accutrend Plus, Roche) sin necesidad de diluir las muestras. Por su parte los valores finales de CL y TG se obtuvieron utilizando el mismo kit pero fue necesario diluir las muestras entre 1/3 y 1/5 con PBS.

3.3.3. Cuantificación de la placa de ateroma

Obtención de los corazones. El día final del experimento se sangraron los ratones y luego se sacrificaron por dislocación cervical. Inmediatamente se perfundió el corazón con 10 mL de NaCl 0.9% y se los lavó con agitación por tres horas en la misma solución, cambiando el medio hasta no observar turbidez. Luego los corazones se fijaron por incubación en formol 10% a 4°C toda la noche.

Obtención de cortes histológicos. Para realizar cortes histológicos del corazón, éstos se lavaron con agua corriente por media hora y se gelatinizaron de la siguiente manera: se colocaron en cajitas de plástico para embeber el tejido (sus lados dejan entrar el líquido en el cual se sumergen) y se sumergieron en gelatina 5% a 40-50°C por tres horas. Finalizado este tiempo se aumentó la concentración de la gelatina al 10% manteniendo la misma temperatura por tres horas más. Por último se llevó la gelatina al 25% y se aumentó la temperatura hasta 60°C manteniendo estas condiciones durante toda una noche. Al otro día se pusieron las cajitas en una bandeja, se cubrieron con gelatina al 25% y se colocaron en la heladera hasta que solidificara la gelatina. Finalmente se cortaron cubos de gelatina conteniendo los corazones y se guardaron en formol al 10%, conservándolos a 4°C hasta su procesamiento. En estas condiciones los corazones pueden mantenerse por varios meses. Para obtener los cortes histológicos los corazones se cortaron transversalmente con bisturí para descartar la parte inferior de los ventrículos, se montaron con medio de montaje para crióstato (Cryoplast, Biopack) y se cortaron a -25°C. Hubo algunas diferencias entre el experimento piloto y el final. En el experimento piloto, los corazones fijados y gelatinizados se despojaron de toda la gelatina que los rodeaba y se cortaron a 20 µm utilizando el criostato "Coldtome", modelo CM-501 (Sakura) a -25°C. En el experimento final los corazones se conservaron en el bloque de gelatina, y se montaron y cortaron en el crióstato, modelo Cryocut E (Reichert-Jung) a -25°C. De esta manera se lograron cortes más finos, de 14 µm. En todos los casos se recogieron todos los cortes a partir de la visualización de la válvula aórtica (con sus tres membranas características) y hasta observar la aorta totalmente circular. Los cortes se colocaron en portaobjetos previamente gelatinizados y se mantuvieron en una atmósfera de formol a temperatura ambiente hasta su tinción con oil red.

Tinción con Oil Red. Se realizó de acuerdo con protocolos convencionales [65]. Los cortes se sumergieron en forma consecutiva en las siguientes soluciones: agua miliQ 1 minuto (min), agua destilada 1 min, isopropanol 60% 0.5 min, solución del colorante Oil Red 0.24% 12 min, isopropanol 60% 0.5 min, agua destilada 1 min dos veces, solución Bluing (MgSO₄ 0.165 M, KHCO₃ o NaHCO₃ 0.02 M en agua miliQ) 1 min, agua destilada 1 min y solución del colorante Fast Green (al 0.025% para el experimento piloto y 0.05% para el final) 1 min. Finalmente se enjuagaron en agua destilada, se dejaron secar al aire y se protegieron colocando un cubreobjetos con cola de gelatina.

Es importante destacar que el proceso de tinción representa un paso en el que pueden perderse parte de las muestras, porque se despegan del portaobjeto en alguna de las inmersiones a las que se someten. De todos modos debido a los cambios en la metodología de corte que se introdujeron en el experimento final, se redujo de forma considerable la pérdida de cortes al momento de teñir en comparación con el experimento piloto.

Cuantificación. Se fotografiaron todos los cortes con una cámara Nikon DS-R11 acoplada a un microscopio Nikon Eclipse 80i (objetivo 10x) utilizando el software Nis-Elements BR 3.0. De cada corazón se seleccionaron determinada cantidad de cortes (6 en el experimento piloto y 10 en el final) a lo largo de la válvula (separados cada uno del siguiente por tres cortes), y se cuantificaron las áreas teñidas en rojo, que corresponden a los lípidos depositados, mediante el software AxioVision Rel 4.8. La suma de estas áreas corresponde al área de placa total desarrollada en el corazón. Éste procedimiento es de tipo integral, por lo que la cuantificación mejora cuando se logra obtener mayor número de cortes a lo largo de la longitud de la válvula, y para ello se requiere de la producción de cortes más finos.

Es importante aclarar que previo a comenzar con la cuantificación de la placa es indispensable definir el criterio a utilizar, sobre todo si se pretenden comparar resultados de experimentos independientes. Es decir que al momento de la cuantificación debe existir una serie de características claras que definan qué estructuras teñidas de las válvulas se van a considerar como placa de ateroma. Si bien hay casos en los que claramente se puede delinear el área de placa, hay otros en los que la interpretación es más compleja y se hace necesario la existencia de dicho criterio. A su vez, es recomendable que la cuantificación de un experimento dado la realice una única persona, logrando de esta forma minimizar al máximo las variaciones intrínsecas al cambio de observador. Por otro lado luego del corte y la tinción hay muestras que quedan en mal estado y al momento de la cuantificación deben descartarse, para evitar la introducción de resultados con alto porcentaje de error. Por esta razón cuatro corazones del experimento final no fueron considerados para la cuantificación.

A continuación se presenta la Figura 5; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** que resume el procesamiento de los corazones desde el sacrificio hasta la cuantificación de la placa.

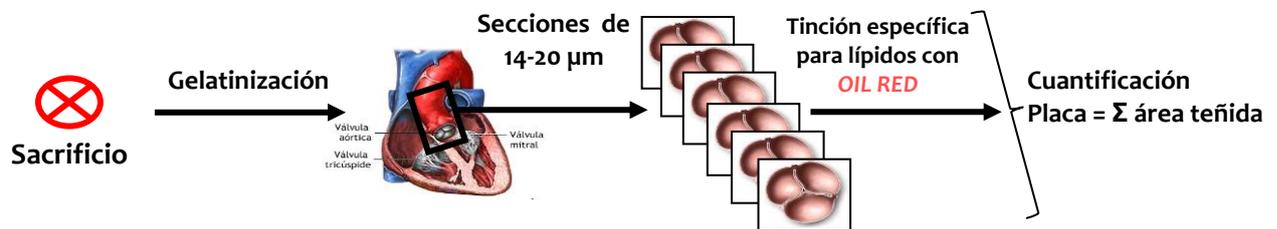


Figura 5: Procesamiento de los corazones luego del sacrificio.

Una vez realizado el sacrificio se recuperaron los corazones y se gelatinizaron, para luego poder cortarlos en crióstato a -25°C en secciones de $14\ \mu\text{m}$ para el experimento piloto o $20\ \mu\text{m}$ para el final. Posteriormente todos los cortes fueron teñidos con un colorante específico de lípidos, el Oil Red, y se seleccionó determinado número de los mismos (6 en el experimento piloto y 10 en el final) para cuantificar por métodos computacionales el área teñida de rojo y obtener así el valor total de placa desarrollada.

3.3.4. ELISA para la determinación de SAP en plasma.

Las muestras de sangre colectadas en los experimentos se centrifugaron durante 10 minutos a 4°C y 2500 rpm para obtener el plasma. Éste se conservó a -80°C hasta su uso. Para la determinación de SAP se sensibilizaron placas de ELISA (NUNC) con $1.5\ \mu\text{g/pozo}$ de anti-SAP murino (fracción IgG de oveja, Calbiochem) en PBS, utilizando un volumen total de $100\ \mu\text{L/pozo}$ y una incubación durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C . Luego se bloqueó con PBS conteniendo Tween 0.1% y albúmina de suero bovino (BSA) 0.1%, utilizando un volumen de $200\ \mu\text{L/pozo}$ y una incubación de 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó tres veces con PBS conteniendo Tween 0.05% (PBS-T) por 5 minutos con agitación. Se incubaron durante 1 hora en cámara húmeda a 37°C , $100\ \mu\text{L/pozo}$ de las muestras problema diluidas 1/200 y 1/400 y un suero de ratón que se preparó como control positivo ya que no se dispuso de un estándar de SAP. Este suero control se obtuvo a partir de un ratón inoculado por vía intraperitoneal con una emulsión de lipopolisacárido (LPS, Sigma) en adyuvante completo de Freund (ACF, Sigma), que fue sangrado a las 36 horas post inyección. A este suero se le asignaron 100 UA/ μL y se usó en diluciones seriadas al medio (1/800 a 1/12800). Tanto el control como las muestras se diluyeron en PBS conteniendo Tween 0.05% y BSA 0.05% (PBS-T-BSA). A continuación se lavó tres veces con PBS-T por 5 minutos con agitación. Luego se pre-incubó durante 20 minutos una dilución 1/2000 del anticuerpo anti-SAP murino (fracción igG de conejo, Calbiochem) biotinilado en PBS-T-BSA y suero ovino normal 5%, la cual se sembró utilizando un volumen total de $100\ \mu\text{L/pozo}$ y una incubación de 1 hora en cámara húmeda a 37°C . Se volvió a lavar tres veces con PBS-T por 5

minutos con agitación. Posteriormente se incubó durante 120 minutos en cámara húmeda a 37°C, una dilución 1/5000 de streptavidina conjugada a peroxidasa (Sigma) en PBS-T-BSA 0.05%, utilizando un volumen total de 100 µL/pozo. Nuevamente se lavó tres veces con PBS-T por 5 minutos con agitación. Finalmente se reveló con tetrametilbenzidina (Fluka) durante 15 minutos o hasta observar coloración celeste, utilizando un volumen total de 100 µL/pozo, y se detuvo la reacción con una solución 1M de H₂SO₄, utilizando un volumen de 50 µL/pozo. Se midió la densidad óptica a 450 nm y se corrigió a 560 nm.

3.3.5. Análisis estadísticos

Los valores del área de placa, peso, niveles iniciales y finales de CL y TG, así como también los aumentos de los tres últimos, fueron sometidos en primera instancia a test de normalidad como ser Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino y Shaphiro, con un intervalo de confianza del 95%, para evaluar la posibilidad de realizar posteriormente test paramétricos.

Aquellos datos que no pasaron el test de normalidad fueron analizados con test no paramétricos como ser el t-test Mann-Whitney de 2 colas, con un intervalo de confianza del 95%, para determinar diferencias entre dos grupos, y/o el test OnewayANOVA Dunn, con un intervalo de confianza del 95% para determinar diferencias significativas entre tres o más grupos. La búsqueda de correlaciones se realizó mediante el test de Spearman (intervalo de confianza del 95%).

Por otro lado los resultados que presentaron una distribución normal en por lo menos uno de los tres test mencionados anteriormente, fueron analizados con test paramétricos como ser el t- test desapareado de 2 colas, con un intervalo de confianza del 95%, para determinar diferencias entre dos grupos, y/o el test OnewayANOVA paramétrico Tukey, con un intervalo de confianza del 95% para determinar diferencias significativas entre tres o más grupos. La búsqueda de correlaciones se realizó mediante el test de Pearson (intervalo de confianza del 95%).

Todos los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.

4. Resultados

4.1. Experimento piloto

En primer lugar se realizó un experimento piloto con un número reducido de animales, con el fin de evaluar principalmente los efectos de la ingesta de la DHC sobre el nivel de placa de ateroma desarrollado a la altura de la válvula aórtica; esto permitiría ajustar el modelo para posteriormente discriminar los posibles efectos anti-aterogénicos por el tratamiento con el AANO₂. Además, este experimento fue útil para detectar eventualmente otros efectos de la administración del AANO₂ sobre los animales, como ser cambios en el comportamiento, peso o aspecto general, así como también la formación de lesiones en el sitio de las inyecciones. Con estos propósitos y tal como se detalló en el Diseño Experimental, se utilizaron 4 lotes de animales: uno de ellos se alimentó con la DN y fue inyectado con PBS, para conocer el nivel basal de placa de ateroma desarrollada bajo el régimen de manipulación que tuvieron todos los lotes (grupo PBS/DN). Los otros tres grupos fueron alimentados con la DHC y recibieron diferentes tratamientos: i) grupo PBS/DHC, inyectado semanalmente con PBS para obtener una medida del nivel de placa alcanzado por la ingesta de la DHC; ii) grupo Veh/DHC, inyectado semanalmente con la mezcla PEG₄₀₀:EtOH, utilizada para solubilizar el AANO₂ de forma de valorar el posible efecto del vehículo sobre el desarrollo de la placa; iii) grupo AANO₂/DHC, inyectado con el compuesto de interés. Este diseño experimental permitió evaluar si la alimentación con la DHC indujo cambios en el perfil lipídico, niveles de SAP en plasma y niveles de placa desarrollada en la válvula aórtica, a través de la comparación de los grupos PBS/DN y PBS/DHC; y si la administración del AANO₂ pudo modular la respuesta aterogénica inducida por la DHC, a través de la comparación de estos mismos parámetros entre los grupos Veh/DHC y AANO₂/DHC.

4.1.1. Efecto de la dieta hipercolesterolémica sobre el estado general de los animales: monitoreo del peso corporal y el aspecto físico

Durante el experimento, los animales fueron pesados semanalmente para tener un control del crecimiento que es una forma rápida de evidenciar si el conjunto de la manipulación (DHC e inyecciones) está afectando significativamente el desarrollo normal de los animales. Además estos fueron observados con atención en busca de cualquier cambio en el aspecto general como ser el comportamiento, pelaje y heridas, que denotara malestar o sufrimiento.

En cuanto al peso corporal, es importante establecer que todos los animales de 10 a 12 semanas de edad al inicio del experimento presentaron valores de peso entre 14.5 y 19.2 gramos, con una media de 17.9 g, lo que representa un valor menor al esperado para animales de esta edad (media= 20 ± 2 g, [70]). Luego de 4 semanas todos los animales aumentaron su peso, llegando a valores entre 16.5 y 22 g, con una media de 19.8 g, que continúa estando por debajo del peso estimado para la edad (media= 22.5 ± 2.5 g, [70]).

Los resultados obtenidos muestran que al comparar el peso inicial y final dentro del mismo lote (ver Figura 6 A), todos los grupos menos el grupo Veh/DHC mostraron un aumento significativo. Por su parte en el lote Veh/DHC la evolución del peso también siguió la misma tendencia y probablemente no alcanzó la significancia estadística debido a una mayor dispersión en los valores en un grupo reducido de animales. Por otro lado, si se compara entre los lotes el incremento de peso en cada grupo (medido como la diferencia entre el peso final y el inicial, Pf-Pi), se observa que no hubo diferencias significativas entre ellos; todos los grupos presentaron un aumento cercano a 2 g (ver Figura 6 B). Esto indicó que el aumento de peso no varió con el tipo de dieta utilizada y que en general los tratamientos no afectaron el crecimiento de los animales.

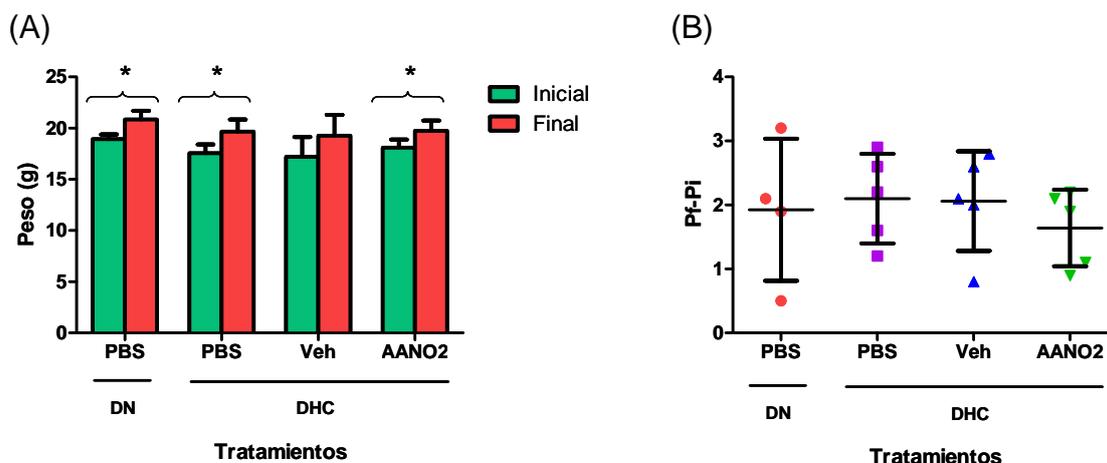


Figura 6: Evolución del peso corporal en los ratones LDLr ^{-/-} durante su alimentación con DN o DHC, y el tratamiento con PBS, Vehículo (PEG₄₀₀:EtOH) o AANO₂.

Todos los ratones se pesaron al inicio y al final del experimento y a partir de estos datos, se calcularon los aumentos para cada lote. En (A) se muestran los promedios de los pesos iniciales (barras rojas) y finales (barras verdes) y el grado de dispersión dentro de cada lote o desvío estándar (líneas verticales). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los valores iniciales y finales de los grupos PBS/DN, PBS/DHC y AANO₂/DHC. El lote PBS/DN no pasó el test de normalidad entonces se aplicó un test no paramétrico, que mostró diferencias significativas (Mann-Whitney, $p < 0.05$). A los lotes PBS/DHC y AANO₂/DHC que pasaron el test de normalidad se les aplicó un test paramétrico, evidenciándose diferencias significativas (t-test desapareado, $p < 0.05$). El lote Veh/DHC no mostró diferencias significativas entre los valores iniciales y finales (t-test desapareado, $p > 0.05$). En (B) se muestran los valores individuales de Pf-Pi (símbolos), los promedios de los valores de Pf-Pi (líneas horizontales) y el

desvío estándar (líneas verticales). La comparación de estos valores entre los distintos lotes no indicó diferencias significativas (test Dunn de comparación múltiple, $p > 0.05$). Tanto en (A) como en (B) $n=4$ para el lote PBS/DN y $n=5$ para los lotes PBS/DHC, Veh/DHC y AANO₂/DHC.

Por otro lado se evaluó el aspecto general de los animales en el correr del experimento. No se registraron cambios en el comportamiento en ningún caso, pero se detectaron cambios notorios en el pelaje (pérdida del brillo y de la densidad de pelo en todo el cuerpo) de algunos de ellos, particularmente aquellos alimentados con la DHC (ver Figura 7). A su vez la piel que quedó expuesta fue más propensa a sufrir daño, que se reflejó en zonas paspadas. Como dichas alteraciones se correspondieron con los animales alimentados con la DHC, es lógico pensar que el alto contenido en grasa de la dieta haya favorecido la caída del pelo y la opacidad del mismo. Además esta sospecha se apoyaba en que los animales alimentados con DN no presentaban el aspecto anteriormente descrito. A pesar de que la información disponible en la base de datos de Jackson Lab correspondiente a la cepa utilizada, indicaba que estos animales eran propensos a la pérdida de pelo, fue llamativo que muchos animales del grupo AANO₂/DHC tuvieran pelaje normal. No se puede asegurar que estas observaciones en las diferencias del pelaje se deban a efectos secundarios del AANO₂, sin embargo resultó un hecho digno de mencionar.



Figura 7: Fotografías representativas del pelaje de los animales luego de cuatro semanas de alimentarse con la DHC.

En el correr del experimento los animales alimentados con DHC presentaron cambios en el pelaje: perdieron el brillo característico, disminuyó la densidad del pelo y se evidenciaron zonas de peladillas. Sin embargo el grupo tratado con AANO₂/DHC mostró un aspecto más similar al control tratado con PBS/DN. En cada ángulo de la figura se presenta a modo de ejemplo la foto de un ratón perteneciente a cada uno de los cuatro tratamientos.

En relación con otro tipo de lesiones, en muy pocas ocasiones se detectaron granulomas inducidos por la inyección de las preparaciones, y cuando se observaron no se correspondieron con una preparación en particular. Por el contrario, se registraron casos de pequeños granulomas en ratones pertenecientes a los cuatro grupos, lo que sugiere que los mismos se debieron a la inyección en sí misma más que a los tratamientos.

En conjunto los resultados muestran que la ingesta de DHC indujo un aumento normal del peso que no se vio afectado por el tratamiento con las preparaciones. No se registraron otros cambios importantes en los ratones como consecuencia de los tratamientos, con la excepción de los cambios en el pelaje que podrían estar vinculados a la dieta.

4.1.2. Efecto de la dieta hipercolesterolémica sobre los niveles de lípidos en sangre

Los ratones utilizados LDLr^{-/-}, desarrollan aterosclerosis espontáneamente, pero para obtener niveles avanzados de la enfermedad en tiempos cortos se necesita de la ingesta de una dieta con niveles de CL elevados (hipercolesterolémica). Esto favorece el aumento de los niveles de lípidos en sangre que como se explicó en la Introducción están vinculados al inicio y desarrollo de la enfermedad. Así, para monitorear si la ingesta de la DHC provocaba los efectos esperados se determinaron los niveles de TG y CL en sangre al inicio y final del experimento, y se analizó si hubo un aumento significativo en relación con las variaciones observadas en el lote PBS/DN.

4.1.2.a. Niveles de triglicéridos en sangre

Se compararon los valores iniciales y finales de TG en cada grupo, y luego se compararon los eventuales aumentos entre los distintos grupos de ratones, utilizando el cociente Triglicéridos finales/Triglicéridos iniciales (TGf/TGi).

La concentración promedio de TG al inicio del experimento fue de ~170 mg/dL. Luego de cuatro semanas de tratamiento los ratones alimentados con DN no mostraron variaciones en los niveles de TG, lo que sugiere que la ausencia del receptor de la LDL no influye en los niveles basales de TG cuando los animales son alimentados con DN en un lapso de 4 semanas. Por otro lado, entre los lotes alimentados con DHC, únicamente el grupo PBS/DHC mostró diferencias

significativas entre los valores finales e iniciales de TG, mientras que no se observaron diferencias de este tipo al comparar los TGf entre dichos grupos (ver Figura 8 A).

Al evaluar los aumentos individuales (TGf/TGi) entre los distintos grupos, nuevamente solo el grupo PBS/DHC mostró una diferencia significativa con el lote PBS/DN, siendo el incremento menor a 2 en la mayoría de los individuos. Además se vuelve a observar que los lotes Veh/DHC y AANO₂/DHC no presentaron diferencias ni con el grupo PBS/DN, ni con el PBS/DHC (ver Figura 8 B).

Las niveles de TG no constituyen una buena referencia para evaluar el efecto inducido por la ingesta de la DHC, ya que en la literatura hay reportados resultados muy distintos dependiendo de las condiciones en las que se realizó el experimento y de las dietas utilizadas (Kowala kim TH). Si a esto le agregamos que se trabajó con un número reducido de animales, en donde las dispersiones individuales influyen en mayor medida sobre el resultado final, es difícil concluir qué efecto provocó el tratamiento con el Veh o con el AANO₂.

Es importante notar que en el lote AANO₂ hubo un individuo que presentó niveles finales de TG mayores al resto de los animales del experimento. Esto provocó un notorio aumento de la dispersión en dicho grupo, en comparación con el resto de los grupos.

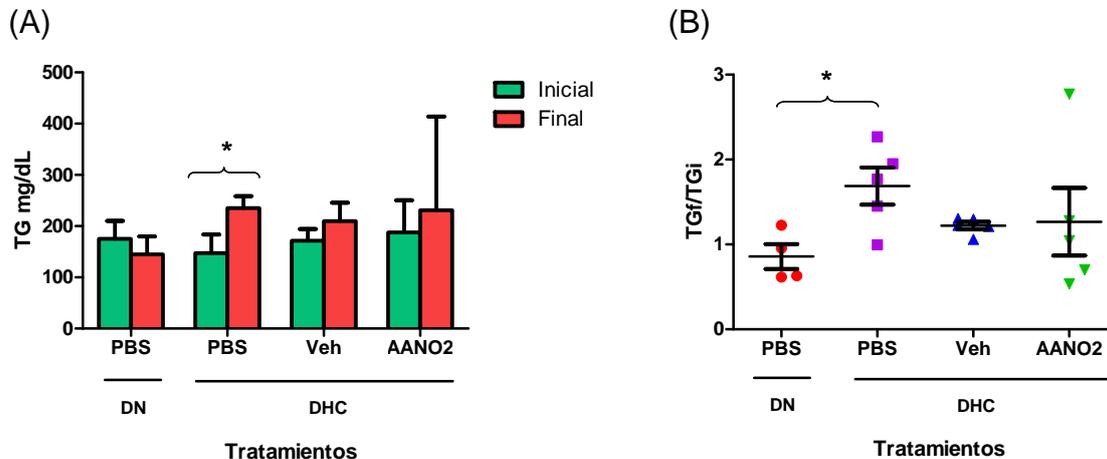


Figura 8: Efecto de la DHC sobre los niveles de TG en sangre al inicio y luego de cuatro semanas de ingesta en los ratones LDLr^{-/-}.

Todos los ratones fueron sangrados al inicio y final del experimento y se determinaron los niveles de TG en sangre utilizando el kit Accutrend Plus de Roche. En (A) se muestran los valores obtenidos como el promedio \pm el desvío estándar de los valores iniciales (barras verdes) y finales (barras rojas). La comparación de los valores iniciales y finales mostró diferencias significativas únicamente en el grupo PBS/DHC, indicado con el asterisco (t-test desapareado, $p < 0.05$) mientras que no se observaron diferencias en el resto de los grupos ($p > 0.05$). En (B) se muestran la variación en los niveles de TG (cociente TGf/TGi) para cada ratón (símbolos), graficada en función del tratamiento correspondiente. También se grafican el promedio (líneas horizontales) y el desvío estándar (líneas verticales). La comparación de los aumentos mostró diferencias significativas solo entre los grupos PBS/DN y

PBS/DHC, indicado con un asterisco (t-test Mann-Whitney $p < 0.05$), cualquier otra comparación no fue significativa (t-test Mann-Whitney, $p > 0.05$). Tanto en (A) como en (B) $n=4$ para el lote PBS/DN y $n=5$ para los lotes PBS/DHC, Veh/DHC y AANO₂/DHC.

4.1.2.b. Niveles de colesterol en sangre

Además de los niveles de TG en sangre, los niveles de CL fueron otro indicador elegido para estudiar los efectos de la ingesta de la DHC sobre el nivel de lípidos en sangre. Nuevamente, primero se evaluaron los promedios iniciales versus los finales dentro de un mismo grupo, y en segunda instancia se compararon los eventuales aumentos (calculados como CL_f/CL_i) entre los distintos lotes.

La cepa de ratones utilizada en este experimento posee niveles basales de CL más altos que los valores normales de los ratones C57BL/6 (trasfondo genético de la cepa LDLr^{-/-}). En este ensayo en particular los animales partieron de valores que rondaban en promedio los 164 mg/dL y al igual que con los TG, se esperaba que estos niveles aumentaran luego de 4 semanas de alimentación con la DHC. Como se observa en el gráfico de la Figura 9 A, el grupo PBS/DN mantuvo constantes los niveles de CL. Nuevamente este resultado sugiere que la ausencia del receptor de la LDL no provoca variaciones en los niveles basales de CL, cuando los animales son alimentados con una dieta normal de bajo contenido graso, por lo menos durante 4 semanas. Por su parte los animales de los lotes alimentados con DHC mostraron un aumento significativo en el nivel de CL en sangre: además de presentar diferencias significativas entre los valores medios de CL al inicio y final del experimento, mostraron diferencias significativas con el nivel de CL del lote PBS/DN al final del experimento. Este aumento fue similar en los tres grupos ya que no se observaron variaciones entre los valores de CL_f cuando fueron comparados entre sí, ver Figura 9A.

Por otro lado, cuando se calcula el cociente CL_f/CL_i a nivel individual se obtiene el gráfico de la Figura 9B, que indica que el grupo PBS/DN no presentó variación en los niveles de CL en el correr de todo el experimento mientras que el lote PBS/DHC fue el que presentó el mayor aumento siendo, del orden de 2.7 veces. Este aumento en los niveles de CL no reproduce los datos reportados frecuentemente en la literatura [71-72], lo que sugiere un efecto pobre por parte de la DHC. Sin embargo los tres grupos alimentados con la DHC presentaron diferencias significativas al compararlos con el grupo PBS/DN.

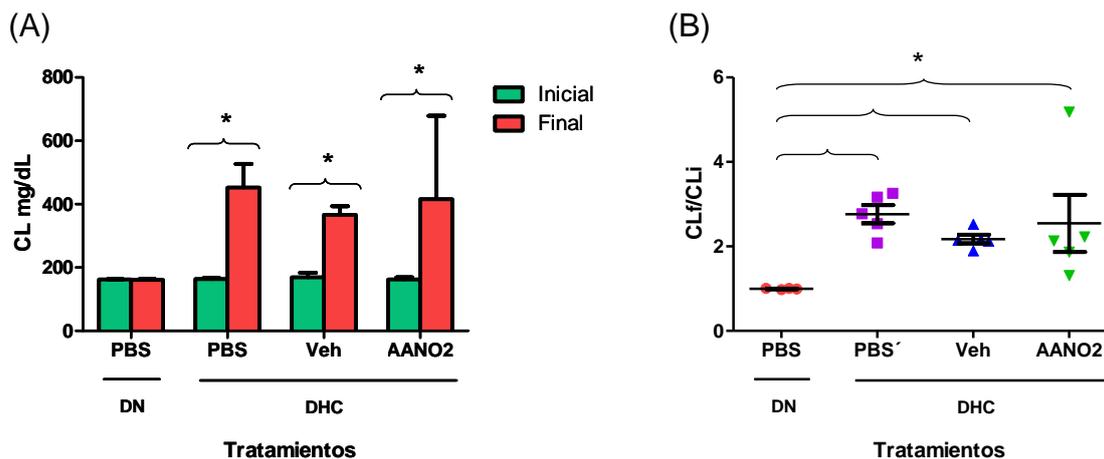


Figura 9: Efecto de la DHC sobre los niveles de CL en sangre al inicio y luego de cuatro semanas de ingesta en los ratones LDLr-/-.

Todos los ratones fueron sangrados al inicio y final del experimento y se determinaron los niveles de CL en sangre utilizando el kit Accutrend Plus de Roche. En (A) se muestran los valores obtenidos como el promedio \pm el desvío estándar de los valores iniciales (barras verdes) y finales (barras rojas). Los asteriscos indican diferencias significativas entre las barras indicadas (para PBS/DHC y Veh/DHC t-test desapareado, $p < 0.05$; para AANO2/DHC t-test Mann-Whitney, $p < 0.05$). En (B) se muestra la variación en los niveles de CL (cociente CLf/CLi) para cada ratón (símbolos), graficada en función del tratamiento correspondiente. También se grafican el promedio (líneas horizontales) y el desvío estándar (líneas verticales). Los asteriscos indican diferencias significativas con el lote PBS/DN (t-test Mann-Whitney, $p < 0.05$). Tanto en (A) como en (B) $n = 4$ para el lote PBS/DN y $n = 5$ para los lotes PBS/DHC, Veh/DHC y AANO2/DHC.

Finalmente queremos hacer notar que al igual que con los TG, la presencia en el grupo AANO2 del mismo individuo que en este caso presentó valores de CL más elevados que el grueso de los animales, aumentó la dispersión en dicho grupo pudiendo afectar la capacidad de diferenciar el comportamiento general de este lote frente al resto de los tratamientos aplicados.

4.1.3. Efecto de la dieta hipercolesterolémica sobre los niveles de SAP en plasma

Debido a que la aterosclerosis es una enfermedad de base inflamatoria, su padecimiento puede aumentar los niveles de expresión de proteínas de fase aguda como SAP [73], inducidas por la acción de la IL-1 e IL-6. Así, se intentó evaluar por ELISA si en nuestro modelo de aterosclerosis la ingesta de DHC producía un aumento en los niveles de SAP en plasma. Si este fuera el caso, la inducción de SAP podría constituir un marcador interesante para monitorear el estado inflamatorio en los ratones, y evaluar si resulta modulado por el tratamiento con el AANO2.

Se puso a punto un ELISA de captura para la detección de SAP, utilizando dos anticuerpos anti-SAP de ratón, generados en oveja y conejo, y un suero de ratón inyectado con ACF y LPS como control positivo.

El análisis por ELISA del nivel de SAP en los plasmas de los ratones alimentados con DN y DHC en el día final del experimento, se muestra en la Figura 10. No se detectó un aumento significativo de los niveles de la proteína en los animales del grupo PBS/DHC al compararlos con los del lote PBS/DN, si bien se observó una tendencia que queda oculta por la dispersión de los valores asociada a diferencias individuales en el comportamiento de los ratones. Dado que no se observaron diferencias significativas y que se contaba con cantidades limitadas de reactivos para el ELISA, no se procesaron las muestras de los grupos Veh/DHC y AANO₂/DHC.

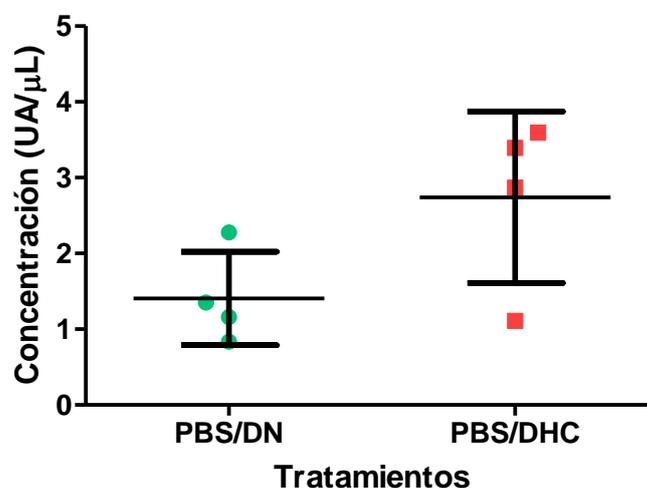


Figura 10: Efecto de la ingesta de la DHC sobre los niveles de SAP en plasma de ratones LDLr -/-.

Los plasmas de los ratones de los lotes PBS/DN y PBS/DHC obtenidos al final de experimento, fueron analizados por ELISA de captura para determinar el nivel de la proteína SAP, inducida por la ingesta de la DHC. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias (UA)/μL en relación con un suero control (suero de ratón inyectado con ACF+LPS) al que se le asignaron 100 UA/μL. Los datos corresponden a los valores individuales (símbolos), y en cada lote se representa el promedio (líneas horizontales) y el desvío estándar (líneas verticales). Los datos no pasaron el test de normalidad Kolmogorov-Smirnov por lo cual se analizaron mediante un test no paramétrico. La comparación de los valores entre el grupo PBS/DN y PBS/DHC no mostró diferencias significativas (t-test Mann-Whitney, $p > 0.05$). $n=4$ para el lote PBS/DN y $n=5$ para el lote PBS/DHC.

4.1.4. Efecto de la dieta hipercolesterolémica sobre el nivel de placa desarrollada en la válvula aórtica

Como describimos anteriormente el desarrollo de la aterosclerosis en este modelo se monitoreó a través de la cuantificación del área de de las lesiones (placa de ateroma) desarrolladas en el corazón a la altura de la válvula aórtica. Como se explicó en el capítulo de

Diseño Experimental, la medición de la placa implica fijar y gelatinizar los corazones para preservar su estructura, despojarlos posteriormente de la gelatina que los rodea para poder fijarlos en la platina del crióstato y cortarlos a nivel de la válvula aórtica. De este último paso se obtiene un conjunto de cortes seriados, que se tiñen con un colorante específico para lípidos - Oil Red-, de modo que la placa desarrollada queda coloreada en rojo, lo que permite su posterior cuantificación utilizando programas de computación para el análisis de imágenes. En el experimento piloto se lograron cortes de 20 μm de grosor, no fue posible obtener cortes más finos en forma secuencial, lo que es determinante de la sensibilidad del método. La obtención de cortes de este grosor fue un problema al momento de la tinción porque el peso y volumen de los cortes disminuyó su adherencia al portaobjeto y se perdieron gran cantidad de los mismos. A su vez la pérdida de muestras fue un factor que limitó la cuantificación, ya que para obtener el valor de placa total deben sumarse los valores del área desarrollada a lo largo de una serie de cortes consecutivos.

En este experimento, debido a la gran pérdida de cortes durante todo el procedimiento y en particular en la tinción, se pudieron cuantificar únicamente 6 cortes por corazón, por lo que el resultado final a partir de la integración del área de 6 cortes es una medida correcta pero que podría carecer de la sensibilidad necesaria para el análisis propuesto. A pesar de estas consideraciones, se logró cuantificar el área de placa en todos los corazones, lo cual es en sí mismo valioso, dada la complejidad de la metodología y el esfuerzo que representó la realización del experimento.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 11, presentados como área de placa desarrollada en μm^2 en función de los distintos tratamientos. Los valores de área de placa son un promedio de dos cuantificaciones independientes, que se realizaron con el fin de conocer el error asociado a la determinación manual de los niveles de placa. El cálculo del porcentaje de error entre las mismas fue de tan solo 3.8%. Los promedios de los lotes alimentados con DHC están todos por encima del promedio del lote alimentado con DN, sin embargo la DHC no indujo un aumento significativo en el área de placa desarrollada. Probablemente esto es debido a que la alimentación con la DHC no logró aumentos notorios en los niveles de CL y TG en sangre. Es importante mencionar que la gran dispersión que presentan los valores del área de placa de la Figura 11, no es particularmente diferente a la observada en otros experimentos realizados en nuestro grupo de investigación y limita notoriamente la posibilidad de detectar diferencias sobre todo al trabajar con un número reducido de animales. De todas maneras, en el grupo tratado con AANO₂ la dispersión fue claramente mayor, dado que el mismo individuo que presentó niveles elevados de CL y TG mostró altos niveles de placa, aumentando notoriamente la dispersión del grupo en general.

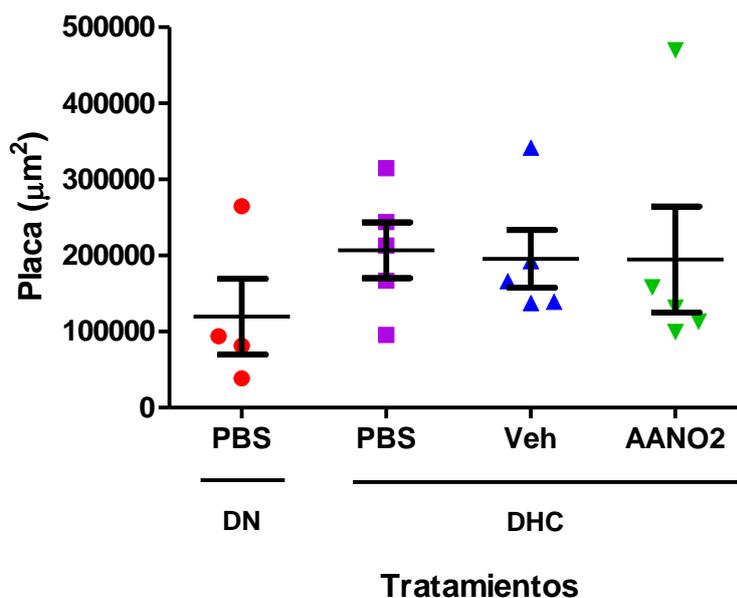


Figura 11: Efecto del tratamiento con AANO2 sobre el área de placa (μm^2) desarrollada por ratones LDLr-/- a lo largo de 4 semanas de alimentación con DHC.

Se cuantificó el área de placa desarrollada a nivel de la válvula aórtica integrando el área teñida con un colorante específico para lípidos en 6 cortes tal como se describió en el capítulo de Diseño Experimental. Para determinar el área de la zona teñida se utilizó el programa AxioVision Rel 4.8. y luego se convirtieron los valores de pix^2 a μm^2 . Los resultados del área total desarrollada en cada ratón se expresan como la media de dos cuantificaciones independientes. Se muestran los valores individuales (símbolos), y en cada lote se representa el promedio (líneas horizontales) y su desvío estándar (líneas verticales). La comparación de las áreas entre los diferentes lotes se realizó utilizando el t-test no paramétrico Mann-Whitney, pero no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$). $n=4$ para PBS/DN y $n=5$ para PBS/DHC, Veh/DHC y AANO2/DHC.

En conjunto, los resultados obtenidos en este experimento, mostraron que el protocolo utilizado para inducir la formación de placas de aterosclerosis en la válvula aórtica no fue adecuado. Los aumentos alcanzados en los niveles de TG, pero sobre todo en los de CL, de los animales pertenecientes a los grupos PBS/DHC y Veh/DHC, fueron menores a los reportados en la literatura. Esto sin duda explica porqué en estos lotes no se logró desarrollar niveles de placa significativamente diferentes a los mostrados por el grupo PBS/DN. En este contexto, el experimento no permitió analizar el efecto del AANO2 sobre el desarrollo de la aterosclerosis. Por otro lado, el experimento permitió constatar que la metodología utilizada para la cuantificación del área de placa desarrollada no estaba totalmente ajustada, porque la pérdida de un gran número de cortes reduce la sensibilidad del método, y por tanto, la potencia para discriminar los efectos de los distintos tratamientos.

4.2. Experimento final

En base a los resultados obtenidos en el experimento piloto, se diseñó un segundo experimento en el que se aumentó el tiempo de ingesta de la dieta, pasando de 4 a 7 semanas con el fin de mejorar la respuesta aterogénica en los ratones (nivel de placa desarrollado a nivel de la válvula aórtica), factor crucial para poder evaluar el efecto del tratamiento con el compuesto de interés. En este experimento se trabajó con una DHC preparada por nosotros pero equivalente a la DHC utilizada en el experimento piloto. Se realizaron además algunos cambios en el diseño experimental. Se mantuvieron 4 lotes de animales pero se aumentó el número de animales por grupo, llegando a $n=7$ para el grupo alimentado con la DN, y $n=9$ para los grupos alimentados con la DHC, ya que este factor es muy importante a la hora de realizar comparaciones entre los diferentes lotes. Además se modificaron parcialmente los tratamientos. El grupo PBS/DN mantuvo las características del experimento anterior, porque fue alimentado con DN e inyectado con PBS con la misma frecuencia que los otros, para controlar los efectos de toda la manipulación. En los lotes alimentados con DHC se realizaron algunas modificaciones. Se utilizó un lote Veh/DHC, inyectado con la mezcla PEG₄₀₀:EtOH, un lote AA/DHC, inyectado con el ácido araquidónico precursor del compuesto de interés a la misma dosis que el AANO₂ y un lote AANO₂/DHC inyectado con la misma dosis que en el experimento piloto ($1 \mu\text{mol/dosis/kg}$). No se introdujeron variaciones en la dosis de AANO₂ dado que no se observaron efectos adversos. Las inyecciones se dieron una vez por semana, pero se agregaron dos inyecciones previo al cambio de dieta con el fin de favorecer la detección de un efecto, si se lograra de esa manera condicionar el ambiente celular con el que interaccionarán los lípidos oxidados.

En el experimento final, al igual que en el experimento piloto, se evaluó si la alimentación con DHC indujo modificaciones en el perfil lipídico, los niveles de SAP en plasma y el área de placa desarrollada comparando los grupos alimentados con DN y DHC. Simultáneamente se estudió si la administración del AANO₂ fue capaz de modular los cambios inducidos por la DHC, a través de la comparación de estas mismas variables pero entre los grupos tratados con AA y AANO₂. Además se continuó con la observación cuidadosa del estado de los animales en busca de cualquier cambio que sugiriera algún indicio de malestar o sufrimiento.

4.2.1. Efecto de la dieta hipercolesterolémica sobre el estado general de los animales: monitoreo del peso corporal y el aspecto físico

En este experimento se utilizaron animales que tenían al inicio del protocolo pesos que variaban entre 15.7 y 20.6 g, con una media de 18.6 g, o sea que algunos se encontraban

levemente por debajo del peso esperado para animales de 10-12 semanas (media= 20 ± 2 g). De todas maneras sus pesos fueron más cercanos a la media que en los animales utilizados en el experimento piloto. Al final del experimento, los pesos de los animales estuvieron entre 19 y 25 g, con una media de 21.6 g, o sea que todos crecieron y alcanzaron en general los valores esperados para su edad (media= 22.5 ± 2.5 g).

A lo largo de las 9 semanas que duró el experimento (dos semanas de pre-inyecciones y 7 semanas con la DHC+inyecciones), el peso de los animales individuales mostró altibajos, sin embargo como se comentó arriba todos los animales evidenciaron un aumento final del peso. Por un lado, los promedios del peso final fueron mayores a los promedios iniciales en un mismo lote (ver Figura 12 A). Por otro lado al evaluar el aumento de peso individual (Pf-Pi) en función de los distintos tratamientos (ver Figura 12 B) se observa que todos los lotes aumentaron de peso en la misma medida, aproximadamente 3 g.

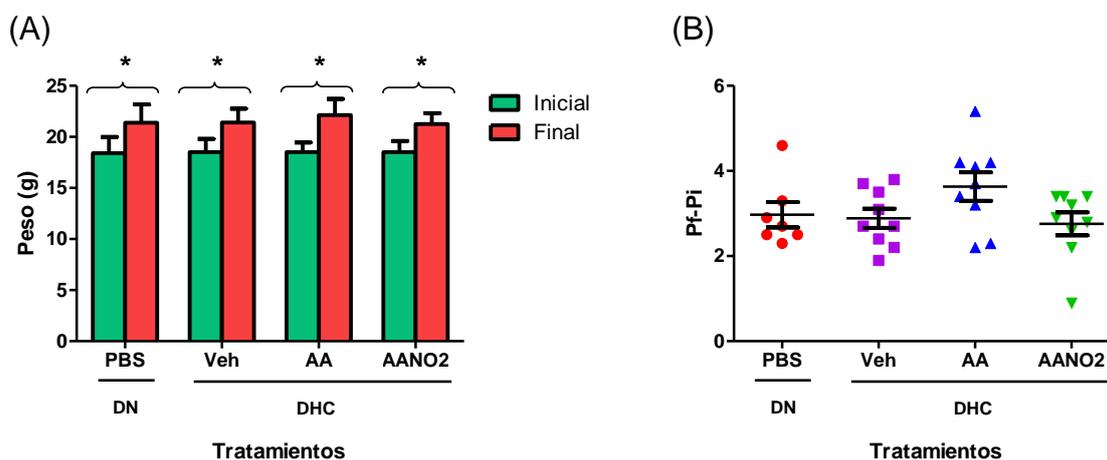


Figura 12: Evolución del peso corporal en los ratones LDLr ^{-/-} durante su alimentación con DN o DHC, y tratamiento con Vehículo (PEG₄₀₀:EtOH), AA o AANO₂.

Todos los ratones se pesaron al inicio y al final del experimento y a partir de los datos, se calcularon los aumentos para cada lote. En (A) se muestran los promedios de los pesos iniciales (barras rojas) y finales (barras verdes) y el grado de dispersión dentro de cada lote o desvío estándar (líneas verticales). La comparación de los valores iniciales y finales dentro de cada grupo mostró en todos los casos diferencias significativas indicadas con un * (test Tukey de comparación múltiple $p < 0.05$). En (B) se muestran los valores individuales de Pf-Pi (símbolos), los promedios de estos valores (líneas horizontales) y el desvío estándar (líneas verticales). Se observa que en promedio todos los grupos aumentaron de peso en el correr de las 9 semanas de tratamiento, con una ganancia neta de aproximadamente 3 g. La comparación de estos valores entre los distintos lotes no mostró diferencias significativas (t-test Mann-Whitney $p > 0.05$). $n=7$ para el lote PBS/DN y $n=9$ para los lotes Veh/DHC, AA/DHC y AANO₂/DHC.

Comparando los resultados de peso final con el valor que se sabe alcanza un ratón C57BL/6 adulto (16 semanas de edad= 25 g), finalmente se puede decir que a pesar del tratamiento, tanto el de inyecciones como el de dieta, los animales mostraron un crecimiento normal. Esto resultó muy importante considerando que la dieta, si bien fue equivalente a la DHC comercial, fue preparada por nosotros; esto significa que el procedimiento para la adición de grasa y CL a la dieta, sumado al proceso de esterilización, no alteraron las propiedades nutricionales, la calidad microbiológica ni adulteraron el sabor. Al igual que en el experimento piloto, la observación del aspecto general de los animales no indicó ningún cambio en el comportamiento, pero evidenció cambios similares de pelaje en aquellos alimentados con DHC, detectándose los peores casos en los animales tratados con AA. Nuevamente la mayoría de los ratones tratados con AANO₂ fueron la excepción a estas observaciones, presentando un aspecto más parecido a los del lote PBS/DN (ver Figura 13).

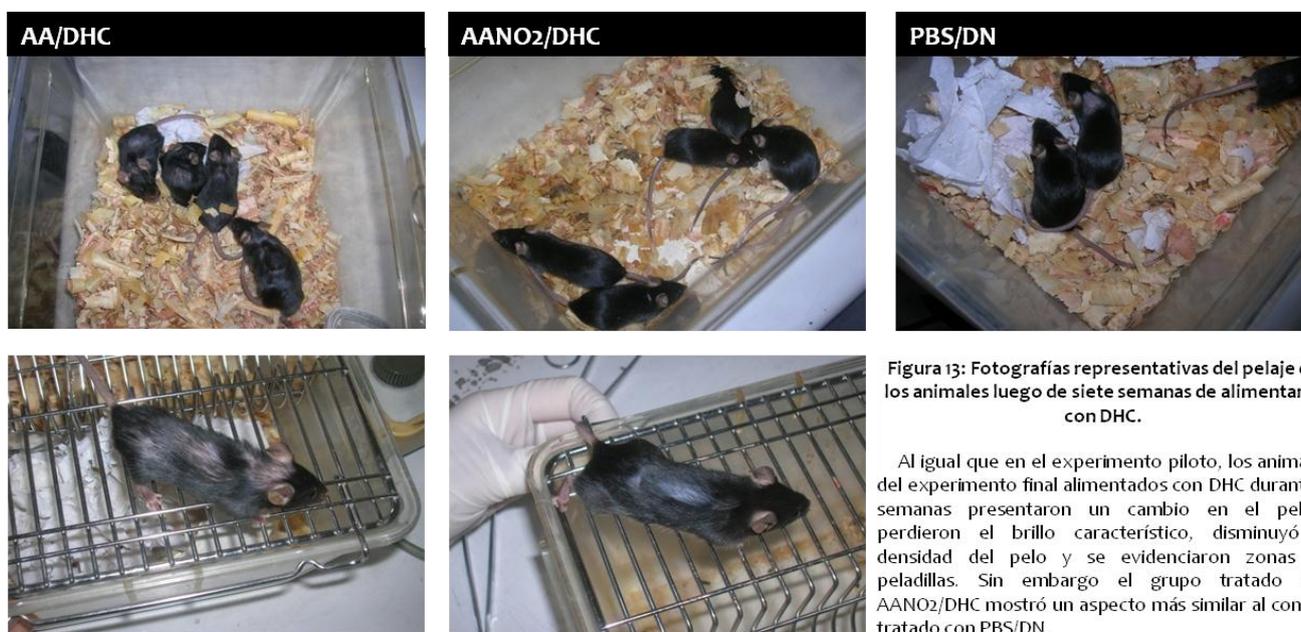


Figura 13: Fotografías representativas del pelaje de los animales luego de siete semanas de alimentarse con DHC.

Al igual que en el experimento piloto, los animales del experimento final alimentados con DHC durante 7 semanas presentaron un cambio en el pelaje: perdieron el brillo característico, disminuyó la densidad del pelo y se evidenciaron zonas de peladillas. Sin embargo el grupo tratado con AANO₂/DHC mostró un aspecto más similar al control tratado con PBS/DN.

4.2.2. Efecto de la dieta hipercolesterolémica sobre los niveles de lípidos en sangre:

En este experimento se siguieron los cambios en los niveles de CL y TG en sangre, pero a diferencia del experimento piloto se tomaron muestras en tres momentos distintos: antes de comenzar el protocolo para obtener los valores iniciales, a dos semanas del tratamiento con la dieta como forma de monitorear si la DHC estaba incrementando los valores de lípidos en sangre, y el día del sacrificio para obtener los valores finales.

4.2.2.a. Niveles de triglicéridos en sangre

De la misma manera que en el experimento piloto, primero se compararon dentro de un mismo grupo los promedios finales con los iniciales, para luego comparar entre los distintos lotes los eventuales aumentos, calculados como TGf/TGi. Los valores basales registrados al inicio del experimento fueron en todos los ratones cercanos a los 170 mg/dL, coincidiendo con el nivel observado en los animales al inicio del experimento piloto. El grupo que se alimentó únicamente con la DN, mantuvo constantes dichos niveles tal como se esperaba, comprobando nuevamente que con una dieta de bajo contenido graso la ausencia del receptor para la LDL no afecta los niveles de TG en sangre, aún en lapsos de tiempo más prolongados. Por otro lado, la ingesta de la DHC provocó un aumento significativo en los niveles de TG respecto al valor inicial en todos los lotes, independientemente del tratamiento que hubieran recibido (ver Figura 14 A). Además, los valores finales de los lotes alimentados con DHC fueron estadísticamente mayores que el valor final del lote PBS/DN. En este caso los lotes AA/DHC y AANO2/DHC mostraron niveles mayores que el lote PBS/DN pero menores que el lote Veh/DHC, lo que estaría indicando cierta modulación de los niveles de TG por parte de estos compuestos.

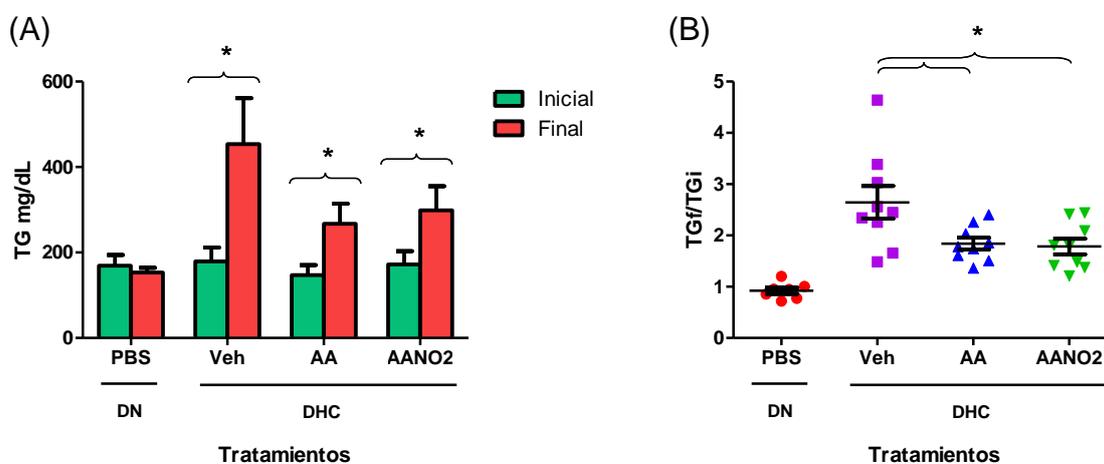


Figura 14: Efecto de la DHC sobre los niveles de TG en sangre al inicio y luego de siete semanas de ingesta en los ratones LDLr-/-.

Todos los ratones fueron sangrados al inicio y final del experimento y se determinaron los niveles de TG en sangre utilizando el kit Accutrend Plus de Roche. En (A) se muestran los valores obtenidos como el promedio \pm el desvío estándar de los valores iniciales (barras verdes) y finales (barras rojas). Los asteriscos muestran diferencias significativas entre las barras indicadas (test Tukey de comparación múltiple, $p < 0.05$). En (B) se muestran la variación en los niveles de TG (cociente TGf/TGi) para cada ratón (símbolos), graficada en función del tratamiento correspondiente. También se grafican el promedio (líneas horizontales) y el desvío estándar (líneas verticales). La comparación de los aumentos del Veh/DHC, AA/DHC y AANO2/DHC con respecto al lote PBS/DN mostró diferencias significativas (dato no indicado en el gráfico). A su vez el aumento del AANO2/DHC y AA/DHC fue significativamente

menor que el del Veh/DHC. En ambos casos se aplicó test Tukey de comparación múltiple, los asteriscos indican $p < 0.05$ Tanto en (A) como en (B) $n=7$ para el lote PBS/DN y $n=9$ para los lotes Veh/DHC, AA/DHC y AANO₂/DHC.

Por otro lado cuando se analizan los incrementos individuales en los niveles de TG, se observa que el lote Veh/DHC fue el que presentó la mayor relación TGf/TGi, siendo esta de 2.6 veces, mientras que los lotes AA/DHC y AANO₂/DHC se comportaron de manera similar, mostrando un aumento de aproximadamente 1.7 veces (ver Figura 14 B). Así todos los lotes alimentados con DHC presentaron un aumento significativo de los TG comparado con el lote PBS/DN, evidenciando el efecto de la dieta. Sin embargo, este aumento no fue del mismo orden en todos los lotes; los lotes AA/DHC y AANO₂/DHC presentaron valores significativamente menores a los del grupo Veh/DHC, lo que sugiere nuevamente un control parcial en el aumento de los niveles de TG como consecuencia del tratamiento con el AA o AANO₂ (ver Figura 14 B). Es importante hacer notar que no se observaron diferencias entre los cocientes de los grupos AA/DHC y AANO₂/DHC.

En resumen el protocolo utilizado con la DHC logró aumentar hasta 2.5 veces sobre el valor basal los niveles de TG luego de 7 semanas de ingesta, y los tratamientos con AA y AANO₂ lograron modular dicho aumento.

4.2.2.b. Niveles de colesterol en sangre

Los resultados de la medida de CL en sangre mostraron que la cepa utilizada posee niveles basales de CL del orden de 200 mg/dL, y luego de 7 semanas de tratamiento con DHC se alcanzaron valores de hasta 1000 mg/dL, siendo este resultado semejante a los reportados en la bibliografía [71-72]. La comparación del nivel de CL en sangre en base a la determinación de los promedios iniciales y finales dentro de cada grupo, mostró un incremento significativo del CL en los lotes alimentados con la DHC pero no con la DN (ver Figura 15 A).

Si se analiza el cociente CLf/CLi en cada grupo (ver Figura 15 B), se observa que la ingesta de la DHC provocó aumentos del 4.7, 4.0 y 3.8 para los lotes Veh/DHC, AA/DHC y AANO₂/DHC, respectivamente; estos aumentos fueron significativamente diferentes que el cociente CLf/CLi correspondiente al lote PBS/DN. A su vez si se comparan entre sí los lotes alimentados con DHC, se ve que el lote AANO₂/DHC presentó valores significativamente menores que el lote Veh/DHC, pero no que el lote AA/DHC. A diferencia de lo visto en los niveles de TG, el grupo AA/DHC no presentó diferencias con el grupo Veh/DHC (ver Figura 15 B).

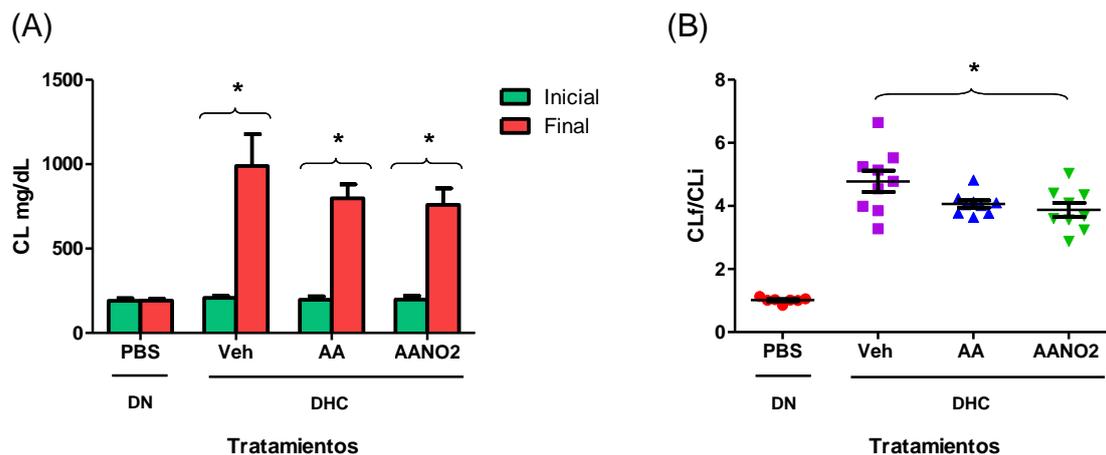


Figura 15: Efecto de la DHC sobre los niveles de CL en sangre al inicio y luego de siete semanas de ingesta en los ratones LDLr^{-/-}.

Todos los ratones fueron sangrados al inicio y final del experimento y se determinaron los niveles de CL en sangre utilizando el kit Accutrend Plus de Roche. En (A) se muestran los valores obtenidos como el promedio \pm el desvío estándar de los valores iniciales (barras verdes) y finales (barras rojas). Los asteriscos indican diferencias significativas entre las barras indicadas (test paramétrico Tukey de comparación múltiple, $p < 0.05$). En (B) se muestran la variación en los niveles de CL (cociente CLf/CLi) para cada ratón (símbolos), graficada en función del tratamiento correspondiente. También se grafican el promedio (líneas horizontales) y el desvío estándar (líneas verticales). La comparación de los aumentos del Veh/DHC, AA/DHC y AANO₂/DHC con respecto al lote PBS/DN mostró diferencias significativas (dato no indicado en el gráfico). A su vez el aumento presentado por el lote AANO₂/DHC fue significativamente menor que el del Veh/DHC. En ambos casos se aplicó test Tukey de comparación múltiple, los asteriscos indican $p < 0.05$. Tanto en (A) como en (B) $n = 7$ para el lote PBS/DN y $n = 9$ para los lotes Veh/DHC, AA/DHC y AANO₂/DHC.

Recapitulando los resultados anteriores se puede afirmar que luego de 7 semanas de ingesta de la DHC los niveles de CL en sangre aumentaron significativamente, registrándose niveles en promedio 4 veces mayores que el basal. Además, el tratamiento con el AANO₂, pero no con AA, moduló este incremento en los niveles de CL.

Como mencionamos anteriormente, además de los sangrados inicial y final algunos individuos de cada lote se sangraron el día 28, tiempo que correspondió a dos semanas luego de comenzada la ingesta de la DHC. A estas muestras también se les determinaron los niveles de TG y CL, como forma de registrar el aumento de estos niveles a tiempos menores. A continuación se presentan dos gráficos con los valores iniciales, intermedios y finales de CL y TG de los grupos tratados con PBS/DN y Veh/DHC.

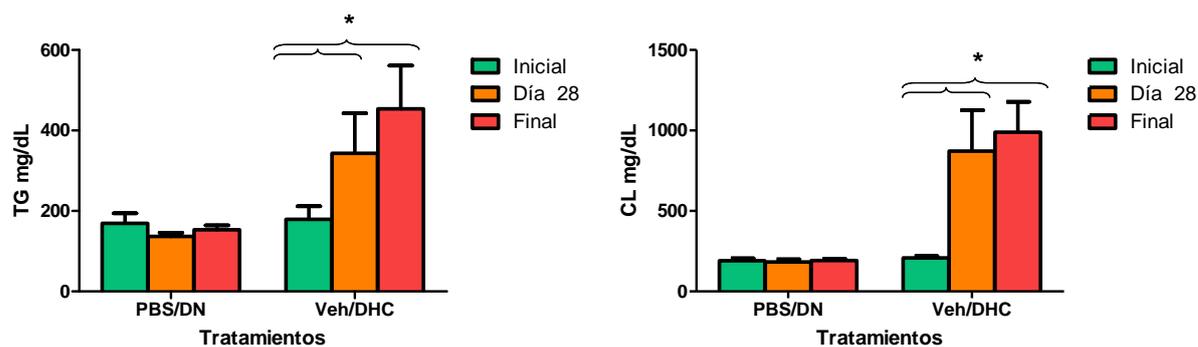


Figura 16: Efecto de la DHC sobre los niveles de TG y CL en los grupos tratados con PBS/DN y Veh/DHC en el correr de las 7 semanas de duración del experimento final.

Los animales fueron sangrados en tres momentos del experimento: al inicio (barras verdes), a mitad o día 28 (barras naranjas), y al final del experimento (barras rojas) para medir los niveles de TG (A) y CL (B) en sangre. Los gráficos muestran los promedios de los valores de TG y CL en cada grupo (barras), y sus desvíos estándar (líneas verticales). Tanto en (A) como en (B) el grupo PBS/DN no mostró variación de los valores con el correr del tiempo. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre las barras indicadas (t-test despareado, $p < 0.05$), no se observaron diferencias entre los valores del día 28 y los finales del grupo Veh/DHC ($p > 0.05$). $n=7$ para el lote PBS/DN inicial y final, $n=9$ para el lote Veh/DHC inicial y final, $n=5$ para los lotes PBS/DN y Veh/DHC día 28.

Los resultados de la Figura 16 indican que como observamos anteriormente, el lote PBS/DN no varió los niveles de lípidos en sangre en ningún momento del experimento. Por su parte el lote tratado con Veh/DHC mostró un aumento importante de los niveles de TG y CL a las dos semanas de ingesta de la DHC, los cuales alcanzaron valores apenas menores (pero no significativamente diferentes) a los registrados en el día final. Así se evidenció que dos semanas de ingesta de la DHC provocan un aumento en los niveles de lípidos en sangre bastante similar al generado por 7 semanas de ingesta de la misma dieta. En la literatura está descrito para los niveles de CL (y no así para los de TG), que la ingesta de una DHC provoca un rápido aumento de los niveles de CL a las dos semanas de tratamiento, los cuales posteriormente continúan aumentando pero de manera más gradual. Las variaciones en los niveles de TG fueron menores que en el caso del CL, y no han sido reportadas en otros trabajos [72].

Es importante resaltar que en el marco de los estudios que se han realizado en nuestro grupo si bien se habían ensayado experimentos bajo otras condiciones (utilizando tiempos menores de tratamientos y otro tipo de DHC) nunca se habían logrado niveles tan altos de CL y TG en sangre. Por lo que estos resultados indican que un protocolo de 7 semanas de ingesta con la DHC es adecuado para obtener un aumento considerable del nivel de CL y TG en sangre, así como también modulación de estos niveles.

4.2.3. Efecto de la dieta hipercolesterolémica sobre los niveles de SAP en plasma

Al igual que en el experimento piloto se analizaron los niveles de SAP en muestras de plasma del día final, de los animales del grupo Veh/DHC y PBS/DN. Es importante aclarar que los plasmas de todos los lotes alimentados con DHC, pero no con DN, presentaban un notorio incremento en los lípidos, evidenciado por la opacidad y el color blancuzco del plasma. Por esa razón, las muestras fueron previamente centrifugadas para separar, dentro de lo posible, los lípidos del plasma y evitar que estos interfirieran en la detección de la proteína por ELISA.

Nuevamente, el análisis de los niveles de SAP en los ratones de los lotes PBS/DN y Veh/DHC no mostró inducción de dicha proteína por el tratamiento con la DHC (ver Figura 17). No se detectaron diferencias entre ambos grupos e incluso, los valores obtenidos para estos lotes fueron más cercanos que los observados en los lotes del experimento piloto.

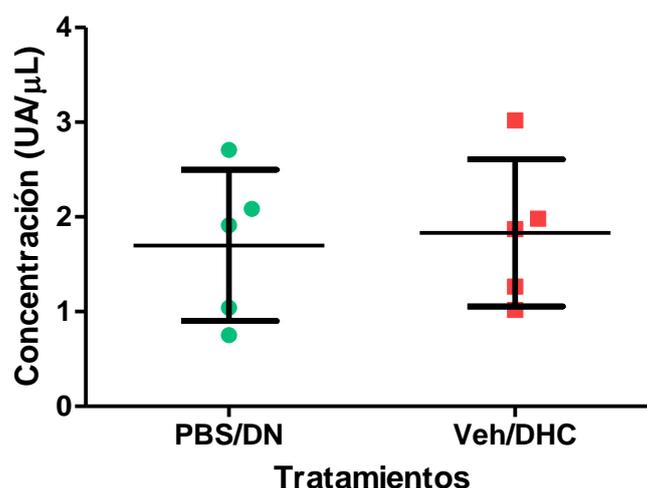


Figura 17: Efecto de la ingesta de la DHC sobre los niveles de SAP en plasma de ratones LDLr^{-/-}.

Los plasmas de los ratones de los lotes PBS/DN y Veh/DHC obtenidos al final de experimento fueron analizados por ELISA de captura para determinar el nivel de la proteína SAP inducida por la ingesta de DHC. Los resultados se expresan como UA/μL en relación con un suero control (suero de ratón inyectado con ACF+LPS) al que se le asignaron 100 UA/μL. Los datos corresponden a los valores individuales (símbolos), y en cada lote se representa el promedio (líneas horizontales) y el desvío estándar (líneas verticales). La comparación de los dos grupos no mostró diferencias significativas (t-test Mann-Whitney, $p > 0.05$). $n=7$ para el lote PBS/DN y $n=9$ para el lote Veh/DHC.

Considerando que por ser una proteína de fase aguda, SAP puede alcanzar picos de concentración temprano en el proceso inflamatorio, se vuelve importante intentar detectarla en muestras de plasma anteriores a las del día final. Por eso a modo de prueba se determinaron los niveles de SAP por ELISA en 4 muestras correspondientes al día 28 (sangrado intermedio), cada una representativa de un tratamiento diferente. Estos plasmas por su aspecto y color contenían menor cantidad de lípidos que los obtenidos el día final, siendo esto

una característica prometedora ya que era posible que los lípidos estuvieran interfiriendo con la detección de la proteína. De todos modos los niveles de CL y TG en las muestras del día 28 fueron altos en comparación con los ratones control alimentados con la DN (ver Figura 16). A continuación se presenta una tabla con los resultados del ELISA de SAP, para dichas muestras.

Tabla 1: Concentraciones de SAP en muestras de sangre del día 28.

Se ensayó a modo de prueba el ELISA de SAP para 4 muestras del sangrado del día 28 representativas de cada tratamiento. Los resultados se presentan en UA/ μ L en relación al control positivo, correspondiente al plasma de un animal inyectado con ACF+LPS, al que se le adjudicaron 100 UA/ μ L. Estos valores son tomados como preliminares y no admiten ningún tipo de análisis estadístico.

Muestra	Concentración SAP (UA)
DN	1,74
Veh	5,55
AA	1,84
AANO ₂	3,76

Es importante enfatizar que estos datos son preliminares y tuvieron un carácter meramente exploratorio. El resultado obtenido sugiere que en estas muestras el valor correspondiente al ratón del grupo Veh/DHC fue mayor que el correspondiente al ratón del grupo PBS/DN y además mayor que el obtenido para todos los ratones analizados al día final (Figura 17). Así, es posible que la medición a tiempos menores y/o en plasmas con menor contenido de lípidos pueda arrojar una información útil en relación a la evolución de los niveles de SAP en este modelo.

4.2.4. Efecto de la dieta hipercolesterolémica sobre el nivel de placa desarrollada en la válvula aórtica

En este experimento se midió el nivel de placa de ateroma generado en la válvula aórtica del corazón, utilizando la misma metodología que en el experimento piloto, pero con algunas modificaciones. En vista de que se perdían muchos cortes durante la tinción con Oil Red por falta de adherencia de éstos al portaobjetos, se buscaron alternativas para obtener cortes más finos que seguramente permitieran mejores resultados. Se realizaron cortes variando la técnica, por ejemplo, conservando o no la gelatina exterior en que se embebió al corazón y variando la forma de congelación del bloque. Los mejores resultados se lograron cuando se conservó el bloque de gelatina íntegro al momento del corte, congelado previamente en N₂

líquido y se cortó a 14 μm de grosor. Este conjunto de condiciones parece proporcionar una matriz de corte más suave (seguramente por la presencia de la gelatina) que facilita el avance de la cuchilla sin dañar la muestra y permite la obtención de cortes más finos y de gran calidad. Además, la obtención de cortes de menor grosor mejoró la adherencia. Estas modificaciones permitieron realizar la cuantificación en base a 10 cortes por corazón (separados cada uno del otro por tres cortes), lo que mejoró notoriamente la sensibilidad de la técnica.

A continuación se presenta el gráfico de área de placa desarrollada en función de los distintos tratamientos.

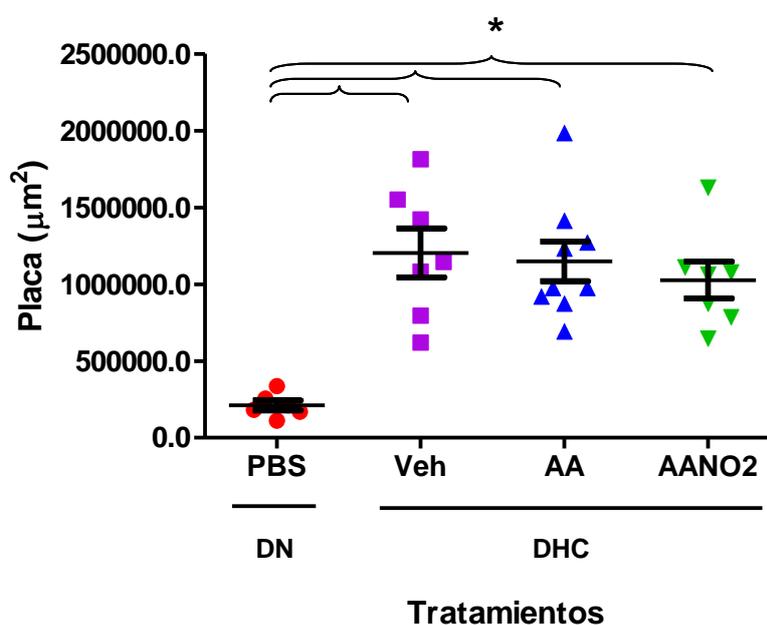


Figura 18: Efecto del tratamiento con AANO2 sobre el área de placa (μm^2) desarrollada por ratones LDLr-/- a lo largo de 7 semanas de alimentación con DHC.

Se cuantificó el área de placa desarrollada a nivel de la válvula aórtica integrando el área teñida con un colorante específico para lípidos en 10 cortes espaciados 3 cortes uno del otro. Para determinar el área de la zona teñida se utilizó el programa AxioVision Rel 4.8. y luego se convirtieron los valores de pix^2 a μm^2 . Se muestran los valores individuales (símbolos), y en cada lote se representa el promedio (líneas horizontales) y su desvío estándar (líneas verticales). Los asteriscos muestran diferencias significativas entre los grupos indicados con las llaves (test Tukey de comparación múltiple, $p < 0.05$). No hubo diferencias significativas entre los lotes alimentados con DHC (dato no mostrado en el gráfico). $n=7$ para PBS/DN y $n=9$ para Veh/DHC, AA/DHC y AANO2/DHC.

Los resultados presentados en la Figura 18 muestran que los tres lotes alimentados con DHC desarrollaron niveles de placa mucho mayores que los animales alimentados con DN. Estos últimos mostraron valores máximos de $300.000 \mu\text{m}^2$, mientras que los lotes alimentados con DHC alcanzaron valores de hasta $1.990.000 \mu\text{m}^2$. En el marco de nuestro grupo de trabajo nunca se habían detectado niveles de placa tan elevados como los observados en esta

oportunidad, aunque se debe tener en cuenta que los cambios en el protocolo de cuantificación aumentaron el área total de la válvula que fue analizada y por ende la sensibilidad de la técnica. En promedio el aumento del nivel de placa en el grupo Veh/DHC respecto al PBS/DN fue del orden de 6 veces más. En relación al efecto del AANO₂, no se evidenció una reducción de la placa en el grupo tratado con AANO₂/DHC en comparación con los tratados con Veh/DHC o AA/DHC, lo que indica que en las condiciones en que se administró, el AANO₂ no mostró actividad anti-aterogénica.

5. Discusión

El primer objetivo de este trabajo fue la puesta a punto del modelo de aterosclerosis basado en la utilización de ratones LDLr^{-/-}, que permitiera posteriormente ensayar drogas con potenciales efectos anti-aterogénicos. Para cumplir este propósito se realizó el experimento piloto y a partir del análisis de los resultados obtenidos se ajustó el protocolo poniéndolo a prueba en el experimento final.

La primera sección de la discusión se centra en la evaluación crítica de los resultados del primer experimento, comparando sobre todo los datos obtenidos del perfil lipídico y nivel de placa desarrollada en los grupos PBS/DN, PBS/DHC y Veh/DHC. Posteriormente, se contrastan estos resultados con los obtenidos tras el ajuste del protocolo en el experimento final.

5.1. Puesta a punto: comparación de los resultados obtenidos en ambos experimentos para el lote PBS/DN y Veh/DHC.

El éxito del modelo de aterosclerosis reside en lograr que los ratones LDLr^{-/-} alimentados con la DHC presenten lesiones apreciables en la válvula aórtica, estadísticamente diferenciables de las correspondientes a animales alimentados con DN, de forma de que sea posible evaluar si un compuesto puede prevenir el desarrollo de la placa al administrarlo en paralelo a la alimentación con la DHC. De acuerdo con la literatura, un buen desarrollo del modelo implica la detección de variaciones en el perfil lipídico, además del aumento en el desarrollo de la placa de ateroma. No se esperan efectos secundarios que afecten el estado general de los animales en los tiempos del experimento. Se consideró que el abordaje correcto para evaluar el funcionamiento del modelo era la comparación de dichos parámetros entre animales alimentados con DN y DHC que hubieran sufrido además una manipulación similar en relación con las inyecciones destinadas al análisis de las propiedades anti-aterogénicas del compuesto de interés.

En el contexto del experimento piloto, la evaluación del funcionamiento del protocolo utilizado se realizó mediante la comparación entre los grupos PBS/DN y PBS/DHC, los cuales fueron tratados con el mismo compuesto pero alimentados con dietas diferentes y nos permitieron evaluar específicamente el efecto de la dieta sobre el desarrollo de la enfermedad. En el contexto del experimento final esta comparación se hizo entre el grupo PBS/DN y Veh/DHC, ya que no se contó con un grupo PBS/DHC. Esto fue porque los resultados del primer experimento indicaron que era fundamental aumentar el número de individuos por grupo, debido a que el análisis estadístico con pocos animales arrojó resultados poco robustos, y era

necesario además agregar un grupo control del compuesto tratado con el precursor del AANO₂, el AA. Dado que, el número de individuos disponibles era limitado nos vimos obligados a descartar el grupo tratado con PBS/DHC para poder introducir el grupo AA/DHC. A su vez la eliminación del grupo PBS/DHC se vio apoyada en que los resultados en los niveles de CL, TG y placa desarrollada observados en el experimento piloto fueron muy similares a los observados para el lote Veh/DHC, dentro de la baja respuesta que hubo en esa experiencia. De todos modos consideramos que hubiese sido más correcto comparar al lote Veh/DHC con un lote tratado con el Veh/DN. Este cambio se tendrá en cuenta para un experimento futuro.

La ingesta de DHC no afectó el desarrollo normal de los animales

Como se mostró en la Figura 6, en el experimento piloto se evidenció un aumento neto y parejo del peso de los animales, lo que comprueba que las dietas ingeridas (ya sea la DN o la DHC) colmaron los requerimientos nutricionales de los animales permitiendo un crecimiento normal y que además, el mayor contenido de grasa de la DHC no alteró este crecimiento. Esta observación es importante ya que existen registros en la literatura de casos en que la ingesta de dietas con altos contenidos de grasa y colesterol llevan finalmente a una reducción en el peso de los animales (revisado por [67]). Se ha adjudicado este adelgazamiento a que los animales desarrollan gastritis como consecuencia del alto contenido de grasa de la dieta. La disminución en el peso es un hecho que habíamos observado en estudios previos de nuestro grupo, aunque es importante señalar que las dietas utilizadas en esos experimentos, tanto la DN como la DHC, no tenían los controles de calidad de las comerciales que se usaron en este trabajo, por lo cual es probable que en los casos anteriores en que observamos adelgazamiento los efectos de la DHC sobre el crecimiento fueran causados por otros componentes de la dieta. Por tanto, en relación con su capacidad nutricional las raciones comerciales 5K52 de LabDiet y 5TJT de TestDiet fueron adecuadas para el trabajo propuesto.

La ingesta de una DHC durante 4 semanas no fue suficiente para modificar el perfil lipídico de los ratones

A pesar de que la DHC favoreció el desarrollo normal de los animales, los resultados obtenidos en el perfil lipídico no fueron los esperados. El lote tratado con PBS/DHC aumentó en menos de 3 veces los niveles de CL luego de las 4 semanas de ingesta de la DHC, comparado con los valores presentados al inicio. Si bien este resultado mostró diferencias significativas con el control tratado con PBS/DN, no alcanzó los niveles registrados en la literatura. Animales LDLr^{-/-} alimentados con una dieta similar en el contenido de CL al de la utilizada en el

experimento piloto, mostraron un aumento del CL del orden de 5 veces comparado con los valores iniciales a las 4 semanas de ingesta de la DHC y lograron mantener estos niveles después de 8 semanas de comenzada la ingesta [72]. Por otro lado animales de esta misma cepa alimentados con una dieta de composición 10 veces menor en el contenido de CL que la DHC del experimento piloto, aumentaron los niveles de CL más de 6 veces a las 4 semanas luego de comenzada la ingesta [71]. Estos resultados indican que la DHC utilizada en nuestra experiencia tuvo un efecto pobre en el aumento de los niveles de CL en sangre. En cuanto a los niveles de TG el panorama fue diferente. El grupo PBS/DHC luego de las cuatro semanas de ingesta de la DHC, aumentó en menos de 2 veces estos valores, que si bien es un efecto pobre, llegó a ser significativamente diferente al del grupo PBS/DN. Sin embargo los datos reportados indican que los niveles de TG se mantienen constantes a pesar de la ingesta de una dieta hipercolesterolémica [71-72]. En conjunto, los resultados reportados muestran que la ingesta de una dieta hipercolesterolémica, induce aumentos en los niveles de CL del orden de 10 veces, mientras que no afecta los niveles de TG, por lo que concluimos que los efectos de la DHC utilizada en el experimento piloto fueron pobres.

Como se mencionó anteriormente debemos destacar que el grupo Veh/DHC no mostró diferencias significativas en los aumentos de TG y CL comparado con el lote PBS/DHC, indicando que el vehículo utilizado no altera el perfil lipídico de los animales. De todos modos la falta de respuestas robustas por parte de los grupos PBS/DHC y Veh/DHC es llamativa y podría tener dos causas. Por un lado podría deberse a que el tiempo de ingesta de la DHC no fue suficiente para provocar aumentos importantes en los niveles de CL en sangre. De todos modos está reportado que los niveles de CL aumentan rápidamente luego de 2 semanas de ingesta de una DHC y continúan aumentando pero en menor medida con el correr de las semanas [71-72]. Esto sugeriría que por alguna razón la DHC o bien la repuesta de los ratones a la DHC no funcionaron como se esperaba. Por otro lado no puede descartarse que como estos ratones tenían un peso y por ende un tamaño menor al normal, las cantidades de ración que ingerían por día fueran menores, lo que de alguna manera podría haber retrasado el aumento de los niveles de CL en sangre.

El experimento piloto falló en la inducción de una respuesta aterogénica robusta a nivel del desarrollo de placa

Si bien las variaciones en el perfil lipídico son un parámetro importante en el funcionamiento del modelo, los niveles de placa desarrollados por la ingesta de DHC, indican en última instancia el éxito del mismo. En el experimento piloto la ingesta de la DHC no provocó el aumento de placa esperado, por el contrario el lote PBS/DN y el PBS/DHC

desarrollaron áreas de placa similares. Continuando con lo visto en el perfil lipídico, queríamos hacer notar que el área de las lesiones observadas en el grupo Veh/DHC fue similar a la correspondiente al grupo PBS/DN. Este resultado termina confirmando que las condiciones utilizadas para el experimento piloto -cuatro semanas de ingesta de DHC- no fueron las adecuadas como se había sospechado al analizar el perfil lipídico. En forma posterior a este estudio, experimentos realizados por otros miembros de nuestro grupo, mostraron que 6 semanas de ingesta de la misma dieta provocaron aumentos más claros en los niveles de TG y CL en sangre y en la placa desarrollada (Luis Gómez, Laboratorio de Química Orgánica y Cátedra de Inmunología, Facultad de Ciencias, datos no publicados). A partir de esta información se concluyó que para lograr inducir aumentos significativos en los niveles de CL y TG en sangre y en el área de las lesiones a nivel de la válvula aórtica es necesario alimentar a los ratones LDLr^{-/-} por 6 o más semanas con la DHC.

La ingesta de DHC por un lapso de 7 semanas indujo un aumento significativo en los niveles de lípidos en sangre y placa de ateroma, sin provocar efectos secundarios adversos en los ratones.

En base a los resultados obtenidos en el experimento piloto así como también a la información generada en nuestro grupo se realizó un segundo experimento (experimento final), donde se esperó inducir una respuesta aterogénica robusta que permitiera testear el eventual efecto protector del AANO₂. Se realizaron algunas modificaciones en el protocolo respecto al utilizado en el experimento piloto. Se aumentó el tiempo de tratamiento con la DHC (de 4 a 7 semanas), para dar más tiempo al desarrollo de las lesiones inducido por el consumo elevado de grasas y CL. Además, por razones de disponibilidad, fue necesario cambiar la ración, así que en vez de utilizar una DHC comercial, se preparó una DHC en base a una dieta comercial con un contenido normal de CL (5k52 LabDiet) tal como se explicó en el capítulo de Diseño Experimental (sección 2.3.1.). Los resultados obtenidos fueron muy alentadores. En primer lugar la ingesta de la DHC condujo a un aumento normal del peso de los ratones y no provocó efectos adversos graves (salvo la caída del pelo, también observada en el experimento piloto), lo cual se vio reflejado en que los animales crecieron alcanzando en su mayoría el peso esperado para su edad. En segundo lugar las variaciones en el perfil lipídico fueron notorias. Mientras que en el experimento piloto los niveles de CL habían aumentado 2.76 veces y los niveles de TG 1.68 veces cuando se comparó el lote PBS/DHC con el lote PBS/DN, en el experimento final los aumentos de CL y TG fueron 4.77 y 2.64 respectivamente al comparar el grupo Veh/DHC con el grupo PBS/DN. Vale notar que se obtuvieron valores finales de TG cercanos a los 450 mg/dL, mientras que los valores de CL fueron del orden de 1000

mg/dL, más cercanos a los datos publicados por otros autores [71-72, 74]. Además, la determinación de los niveles de TG y CL a las dos semanas de ingesta de la DHC permitió comprobar que dichos niveles habían aumentado rápidamente hasta alcanzar en casi todos los casos valores cercanos a los finales, tal como está registrado en la literatura [71-72].

Finalmente, el grado de aumento en los niveles de CL y TG en sangre se asoció con un aumento significativo y robusto en el área de la placa de ateroma desarrollada a nivel de la válvula aórtica (ver Figura 18). En este caso se registró un aumento de la placa de 5.97 veces al comparar el grupo Veh/DHC con el grupo PBS/DN, mientras que este aumento fue mucho menor en el experimento piloto (1.97 veces entre el lote PBS/DHC y el lote PBS/DN). Además, el nivel de las lesiones desarrolladas es razonable en comparación con los datos obtenidos en el experimento realizado por nuestro grupo alimentando a los ratones por 6 semanas con la DHC, donde el área de la placa aumentó 5.35 veces (Luis Gómez, datos no publicados). La observación de que los niveles de CL en sangre ya habían aumentado en forma notoria (4.75 veces) en el lote Veh/DHC, a las 2 semanas de comenzada la ingesta de la DHC es un dato importante, porque el área de la lesión desarrollada es probablemente producto de un proceso que ocurre cuando los niveles de CL aumentan y se mantienen elevados en un período considerable de tiempo.

Además del aumento de tiempo de ingesta de la DHC, vale la pena resaltar que los valores absolutos del área de lesión detectada a nivel de la válvula aórtica son mayores como consecuencia de las mejoras introducidas en el método de cuantificación de la placa. Como se mencionó en el capítulo de Resultados, en el experimento piloto se perdió gran cantidad de muestras al momento de la tinción por falta de adherencia de los cortes al portaobjetos, lo que nos obligó a buscar una alternativa para solucionar este problema. Luego de probar distintas variaciones en la técnica de corte, finalmente se concluyó que conservar el bloque de gelatina en el que se encuentra incluido el corazón y congelarlo en N₂ líquido previo a cortarlo a -25°C, era la mejor combinación de condiciones para aumentar la adherencia de las muestras. Estos cambios no solo eliminaron el problema de la pérdida de cortes sino que nos permitieron obtener cortes más finos y de mejor calidad, lo que se traduce en la obtención de un mayor número de cortes de la válvula aórtica y en última instancia permite cuantificar más cantidad de cortes por corazón. La integración del área de placa desarrollada en un número mayor de cortes mejora ampliamente la sensibilidad de la técnica, y en nuestro caso se pasó de cuantificar 6 cortes a 10 cortes en cada corazón, lo que indudablemente permitió detectar más cantidad de placa desarrollada por individuo.

En conclusión, el tratamiento de ratones LDLr^{-/-} con una DHC (conteniendo 1% colesterol) durante siete semanas permitió reproducir el modelo de aterosclerosis tal como se describe

en la literatura. Además, utilizando este protocolo y las mejoras introducidas en la técnica de determinación de la placa, fue posible alcanzar una respuesta aterogénica robusta que permita ensayar el potencial anti-aterogénico de distintos compuestos.

5.2. Relación Placa-CL, Placa-TG, CL vs TG

Ya se mencionó que la LDL es una de las moléculas que participa en el desencadenamiento de la aterosclerosis, a través de su oxidación e interacción con los macrófagos residentes del espacio subendotelial. Así, dado que los niveles altos de CL conducen a aumentar la concentración de la LDL en sangre, la hipercolesterolemia se correlaciona con el desarrollo de la placa. Además está reportado en la literatura la existencia de una correlación entre los niveles de placa desarrollados y los niveles de CL, en animales LDLr^{-/-}, cuando fueron alimentados con dos DHC que diferían en la composición de CL y TG [72]. Este mismo grupo planteó además, que no existía relación entre la placa y los niveles de TG. Para corroborar la existencia de esta correlación en nuestro experimento, se realizaron gráficos del área de placa desarrollada en función del aumento de CL o de TG, para los grupos PBS/DN, PBS/DHC y Veh/DHC del experimento piloto, y PBS/DN, Veh/DHC y AA/DHC del experimento final. Debemos aclarar que para la búsqueda de estas correlaciones no se consideró al grupo tratado con AANO₂/DHC, debido a que en el experimento piloto mostró una marcada modulación de los niveles de lípidos en sangre, lo que podía afectar de algún modo la correlación que se estaba buscando. En cambio se consideró al grupo tratado con AA/DHC, porque la modulación que presentó del perfil lipídico fue más débil que la mostrada por el tratamiento con AANO₂, y además nos pareció importante no reducir la cantidad de valores a utilizar al momento de buscar la correlación.

Al graficar el área de placa desarrollada en función del aumento de CL o TG para el experimento piloto (ver Figura 19 A y B), no se observó ninguna correlación. En cambio, al realizar estos mismos gráficos pero para el experimento final (ver Figura 19 C y D), se obtuvo un resultado totalmente diferente ya que se observó correlación entre los valores de placa y los aumentos de CL y TG (test de Pearson, $p < 0.05$). En vistas de estas diferencias de comportamiento, se decidió juntar en un mismo par de ejes los valores de ambos experimentos y repetir los gráficos anteriores (ver Figura 19 E y F). Si bien los conjuntos de valores no pasaron el test de normalidad, se observó una correlación en los dos casos (test de Spearman, $p < 0.05$). Es posible que esta correlación no sea apreciable con un número pequeño de datos dada la gran dispersión que presentan, pero se evidencia al considerar una mayor cantidad de valores (Figura 19 C y D). Por otra parte creemos que a un único tiempo de ingesta

de la DHC es más difícil observar una correlación entre la placa y los aumentos de lípidos en sangre, pero la relación entre estos parámetros se hace más notoria si se consideran valores obtenidos a distintos tiempos de ingesta de la DHC (ver Figura 19 E y F).

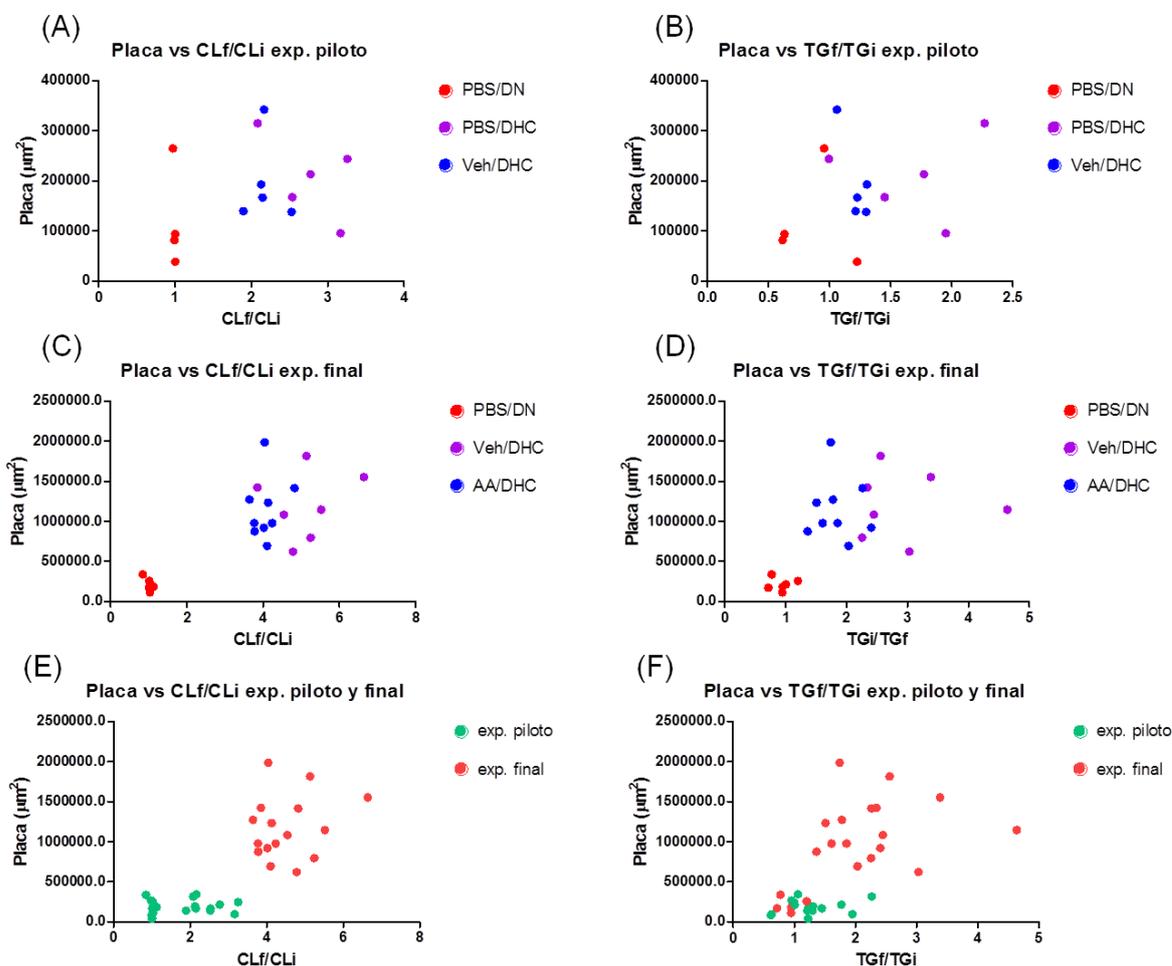


Figura 19: Relación entre el área de placa desarrollada en función del aumento de CL o TG para los grupos PBS/DN, PBS/DHC, Veh/DHC del experimento piloto, y PBS/DN, Veh/DHC y AA/DHC del experimento final.

Se graficaron los valores de placa desarrollados en μm^2 , en función del aumento de CL o el aumento de TG, calculados como el cociente entre los valores finales y los iniciales (CLf/CLi o TGf/TGi). Se representan cada individuo como un punto. En (A) y en (C) se grafica la placa vs CLf/CLi para el experimento piloto y final respectivamente. En (B) y en (D) se grafica la placa vs TGf/TGi para el experimento piloto y final respectivamente. Para (A) y (B) el código de colores es rojo= lote PBS/DN, violeta= PBS/DHC y azul= Veh/DHC. Para (C) y (D) el código de colores es rojo= lote PBS/DN, violeta= Veh/DHC y azul= AA/DHC. En (E) se superpusieron (A) y (C) y en (F) se superpusieron (B) y (D). El código de colores para (E) y (F) es verde= experimento piloto y rojo= experimento final. Los valores de (C), (D), (E) y (F) presentaron correlación (Test de Pearson, $p < 0.05$ para C y D; test de Spearman $p < 0.05$ para E y F). Los valores de (A) y (B) no presentaron correlación (Test de Pearson, $p > 0.05$). $n = 4$ para PBS/DN y $n = 5$ para PBS/DHC y Veh/DHC del experimento piloto. $n = 6$ para PBS/DN, $n = 7$ Veh/DHC y $n = 9$ para AA/DHC del experimento final.

Además de la relación entre la placa y los aumentos de CL y TG, creímos que podía ser posible encontrar alguna correspondencia entre los aumentos de CL y de TG entre sí. De modo que procedimos a graficar los valores de todos los individuos de los grupos PBS/DN, PBS/DHC, Veh/DHC y AA/DHC del experimento piloto y final en un mismo par de ejes.

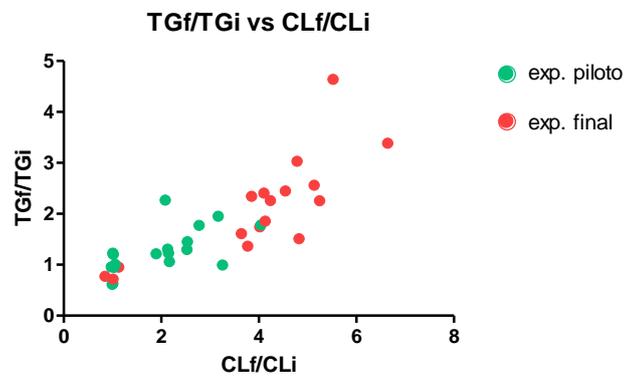


Figura 20: Relación entre el aumento de TG en función del aumento de CL para los lotes PBS/DN, PBS/DHC, Veh/DHC y AA/DHC del experimento piloto y final.

Se graficaron en un mismo par de ejes el aumento de TG en función del aumento de CL correspondiente a todos los animales de los lotes PBS/DN, PBS/DHC, Veh/DHC y AA/DHC del experimento piloto y final. Cada punto corresponde a un individuo. El código de colores es verde= experimento piloto y rojo= experimento final. Los valores mostraron tener correlación cuando fueron sometidos al test de Spearman ($p < 0.05$). $n=14$ para el experimento piloto, y $n=22$ para el experimento final.

El gráfico de la Figura 20 evidenció una correlación más clara que la presentada entre el área de placa y los aumentos de CL y TG en sangre, mostrando que los cocientes de CLf/CLi y TGf/TGi aumentan manteniendo una proporción cercana a 2:1 respectivamente.

Resumiendo todos estos resultados se podría decir que cuando se dispone de gran cantidad de datos o cuando estos provienen de experimentos realizados a distintos tiempos de ingesta de la DHC, se observa que aquellos animales que desarrollaron mayor cantidad de placa tienden a ser aquellos que presentaron los niveles más elevados de CL o TG en sangre, y que a su vez los animales que presentaron niveles elevados de CL también suelen mostrar altos niveles de TG. De esta forma pudimos evidenciar la íntima relación que existe entre las alteraciones en el perfil lipídico y el desarrollo de la enfermedad.

La DHC no indujo variaciones en la expresión de la proteína de fase aguda SAP

La proteína SAP forma parte de una familia de proteínas de la inmunidad innata altamente conservadas llamadas Pentraxinas, con funciones relacionadas al reconocimiento de patógenos microbianos, activación del complemento y estimulación de la fagocitosis [75-76].

SAP es sintetizada y volcada a la circulación por los hepatocitos en respuesta a estímulos inflamatorios como IL-1 e IL-6, por lo cual su síntesis forma parte de los efectos sistémicos que induce la inflamación a través de la acción de citoquinas [75]. Como la aterosclerosis constituye un proceso inflamatorio durante el cual se espera que se sinteticen interleuquinas como las mencionadas anteriormente, resultó lógico suponer que los niveles de la proteína SAP pudieran estar aumentados. En este sentido hay muy poca información, al menos en lo que respecta a los niveles de SAP en modelos de aterosclerosis en ratón. Sin embargo, en la literatura encontramos que en el ser humano (tanto hombres como mujeres) los niveles altos de SAP constituyen un factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares correspondiéndose con casos subclínicos de las mismas, sucesos de angina e infarto del miocardio y desarrollo o progreso de aterosclerosis subyacente a angina o infarto del miocardio [14]. A esto se le suman las evidencias sobre la co-localización de SAP en las placas de ateroma humanas [10-11] y el reconocimiento específico de la LDLox por parte de dicha proteína [11]. De todas maneras el papel de SAP como biomarcador se sigue debatiendo [77] y por eso resultó interesante explorar, al menos en forma preliminar, qué sucedía con los niveles de SAP en el modelo de aterosclerosis desarrollado en ratones LDLr^{-/-}. Además, la observación de una respuesta de SAP en este modelo permitiría monitorear el nivel de inflamación sistémica en una forma simple, desarrollando una herramienta muy útil a la hora de analizar el efecto de la DHC en el modelo y su posible modulación por drogas.

Para esta exploración se puso a punto un ELISA de captura para la detección de la proteína, y se analizaron sus niveles en las muestras de plasma de los animales del grupo PBS/DN y PBS/DHC o Veh/DHC, como forma de valorar si la ingesta de la DHC se asociaba a un aumento en la síntesis de SAP. De ser los resultados positivos se evaluaría posteriormente si el tratamiento con AANO₂ disminuía la expresión de dichos indicadores.

Los resultados obtenidos tanto en el experimento piloto como en el experimento final no revelaron un aumento en la síntesis de SAP a 4 y 7 semanas de tratamiento con la DHC. En el caso del experimento piloto se considera que como el efecto de la ingesta de la DHC sobre los niveles de lípidos en sangre y las lesiones en la válvula fueron relativamente débiles, sería posible que el grado de inflamación alcanzado en estos ratones no se acompañara con la inducción de SAP, al menos en cantidades significativas. Sin embargo a pesar de que en el experimento final la DHC provocó un contexto favorable para acelerar la enfermedad, y en consecuencia se esperaba que hubiera existido una respuesta inflamatoria notoria, no fue posible de medir una respuesta inflamatoria sistémica de SAP. Una explicación posible sería que la concentración de SAP en plasma durante una respuesta de este tipo experimente variaciones (picos de altas concentraciones seguidos de caídas asociadas a ciclos de

autorregulación de la respuesta), por lo cual la medida puntual a la semana 7 no permite concluir que no exista una respuesta de SAP como consecuencia del proceso inflamatorio que ocurre durante el desarrollo de las lesiones. Considerando que SAP es un marcador de fase aguda, sería razonable analizar si ocurre un aumento en su concentración a tiempos más tempranos. Al diseñar este ensayo y en base a la experiencia previa con esta cepa, se tomó en cuenta que el sangrado frecuente de los animales podría ser muy estresante y podría de alguna manera alterar el desarrollo de la enfermedad, por lo cual no se tomaron muestras semanalmente. Para poder resolver este problema se debería contar con una gran cantidad de animales por lote, que permitiera alternar los individuos que son sangrados, de modo de reducir el estrés inducido sobre cada animal. Esto no es sencillo dado que el número de animales con el que se trabaja depende de la producción de los mismos y ésta ha sido de menor rendimiento que el obtenido con otras cepas (Martina Crispo, Instituto Pasteur de Montevideo, comunicación personal). Por otro lado, no es claro cuál sería el tiempo óptimo para analizar la respuesta de SAP; el antecedente más importante muestra evidencias, mediante el análisis por northern blot, de un aumento de SAP, a las 16 semanas después de comenzada la ingesta de la DHC [78]. A pesar de que este experimento se realizó en ratones LDLr^{-/-}, que además eran parcialmente deficientes en el gen de la IL-6, y que la sensibilidad de la técnica puede haber sido mayor que la obtenida con el ELISA, estos resultados estarían indicando que es posible la detección de la proteína a tiempos posteriores a los ensayados por nosotros [10]. Otro factor que podría estar involucrado en el resultado negativo obtenido, es que el gran contenido de lípidos en las muestras de plasma haya interferido con la determinación por ELISA. Si bien se intentó centrifugar los plasmas para separar la fase lipídica del resto de la muestra, es probable que este método no sea del todo eficiente y que parte de los lípidos hayan quedado en la muestra interfiriendo con el ensayo. Como alternativa se intentó precipitar las muestras con TCA como forma de eliminar los lípidos y recuperar la fracción proteica, pero lamentablemente el pellet proteico obtenido no pudo resuspenderse en el tampón fisiológico que se usa en el ELISA. Sin embargo sería interesante realizar un análisis de estos pellets proteicos por western blot, como forma al menos cualitativa de buscar la presencia de SAP.

Por otro lado, como se contaba con algunas muestras de plasma de un ratón representativo de cada tratamiento obtenidas luego de 2 semanas de ingesta de la DHC, se analizó el contenido de SAP en estas muestras que tenían niveles menores de lípidos. El resultado obtenido fue interesante porque el nivel de SAP en el ratón del lote Veh/DHC fue mayor al del lote PBS/DN y los valores de los lotes AA/DHC y AANO₂/DHC fueron menores al del Veh/DHC. Obviamente estos datos no permiten ninguna conclusión, ya que no tenemos medida de la

dispersión biológica asociada. De todas maneras, podrían reflejar una tendencia que merezca ser explorada, apuntando al análisis del nivel de la proteína a tiempos tempranos del experimento en los cuales el contenido de lípidos en sangre es algo inferior.

Debido a que no se observó una respuesta de SAP inducida por la DHC al tiempo final del experimento, sumada a la acotada disponibilidad de los reactivos necesarios para el ELISA, no se realizó el ensayo con las muestras del día final de los grupos AA/DHC y AANO₂/DHC.

En conclusión, el conjunto de los resultados sobre la inducción de SAP durante el desarrollo de la aterosclerosis en el modelo de ratones LDLr^{-/-}, indican que no se pudo detectar un aumento en los niveles de la proteína inducido por la ingesta de la DHC durante 4 y 7, y resaltan la importancia de obtener muestras de sangre a distintos tiempos, sobre todo al inicio del tratamiento, que permitan detectar una respuesta temprana de las proteínas de fase aguda. Además, el análisis de muestras a tiempos menores también tendría la ventaja de un menor contenido de lípidos en el plasma, que sospechamos generan interferencias con la determinación por ELISA.

5.3. Evaluación de las propiedades anti-aterogénicas del AANO₂

El segundo objetivo de este trabajo fue analizar si el AANO₂ posee propiedades anti-aterogénicas utilizando el modelo experimental puesto a punto. En este sentido se discuten solamente los resultados obtenidos en el experimento final ya que fue, de los dos ensayos, el único en el cual se logró inducir una respuesta aterogénica.

Al momento de planear el experimento final se consideró que un cambio importante a introducir era agregar un grupo tratado con el AA, ácido graso precursor del AANO₂, para evaluar los posibles efectos provocados por éste ácido, ya que si bien el AANO₂ podría presentar propiedades anti-aterogénicas comparado con el grupo Veh/DHC, es importante asegurar que estas cualidades se deban a la presencia del grupo nitroalqueno y no fueran producto de la estructura compartida con su precursor, que invalidaría cualquier propiedad moduladora novedosa del AANO₂. Por lo que en esta segunda parte de la discusión se compararán los resultados obtenidos en el experimento final para los grupos Veh/DHC, AA/DHC y AANO₂/DHC, en busca de los posibles efectos anti-aterogénicos del AANO₂.

El AANO₂ y su precursor fueron capaces de modular el perfil lipídico en los ratones alimentados con DHC

En relación con las variaciones en el perfil lipídico y tal como se describió en el capítulo de Resultados, los niveles de TG en sangre del grupo tratado con AANO₂/DHC mostraron un

aumento con respecto al lote PBS/DN y una disminución en comparación con el lote Veh/DHC estadísticamente significativas, pero no se diferenciaron del lote AA/DHC. Por otra parte los niveles finales de CL alcanzados por el grupo AANO₂/DHC y AA/DHC fueron muy cercanos entre sí y mayores a los del grupo PBS/DN, pero únicamente el grupo AANO₂/DHC presentó valores estadísticamente menores que el lote Veh/DHC. Estos resultados indicaron que el AANO₂ y en menor medida el AA, modularon los niveles de lípidos en sangre. En contraste, en un modelo de aterosclerosis en ratones apoE^{-/-} alimentados con una DHC, Rudolph y colaboradores no evidenciaron modulación del perfil lipídico por parte del OANO₂, comparando los niveles de TG y de CL con animales tratados con el vehículo o el OA [79]. Por lo tanto, estos resultados sugieren que existen diferencias en las propiedades biológicas del AANO₂ y del OANO₂, siendo el primero capaz de modular los niveles de lípidos en sangre en el modelo de aterosclerosis utilizado.

Por otro lado, la modulación observada por el AANO₂ y el AA podría estar indicando que el AANO₂ no presenta ninguna propiedad diferente a su precursor, lo cual sugeriría que su actividad moduladora no está vinculada al grupo nitroalqueno, y que por lo tanto ambos compuestos estarían actuando a través del mismo mecanismo. Sin embargo no puede descartarse la posibilidad de que el grupo nitroalqueno sí esté involucrado en la actividad del AANO₂ y que por ende el AA haya actuado por otra vía. En el marco de esta hipótesis podríamos plantear que es posible que a las concentraciones utilizadas el AANO₂, pero no el AA, interaccione directamente con PPAR- γ dado que pertenece a la familia de los nitroalquenos. Como PPAR- γ controla el metabolismo lipídico su activación por el AANO₂ podría justificar la modulación observada de los niveles de TG y CL por parte de este compuesto. De todos modos es importante aclarar que no existen evidencias de la interacción directa del AANO₂ con PPAR- γ , por lo que resulta interesante realizar a futuro ensayos que evalúen dicha interacción, y contribuyan a comprender el mecanismo de acción del AANO₂ en la modulación del perfil lipídico.

Por su parte, el AA no es ligando de PPAR- γ , por lo que no podría haber activado *per se* dicho factor. Se ha descrito la capacidad del AA de activar otros miembros de esta familia, como ser PPAR- α , en un cultivo primario de endometrio bovino, pero para ello se necesitaron concentraciones mucho mayores (del orden de 50 μ M) a las empleadas en nuestro ensayo [80]. En el marco del experimento final, las condiciones de administración del AA alcanzarían como máximo una concentración 10 μ M si se hubiera distribuido homogéneamente en todo el organismo y considerando una volemia de 2 mL para un ratón de 20 g. En conjunto, es improbable que los efectos del AA en las condiciones ensayadas sean consecuencia de la activación directa por el AA de algún miembro de la familia de receptores PPAR. Esto lleva

entonces a la idea de que debe existir otra vía por la cual el AA haya modulado los niveles lipídicos en sangre. Como se mencionó anteriormente el AA es sustrato de la PGHS, enzima que a través de sus actividades POX y COX, metaboliza el AA originando la Prostaglandina H₂ (revisado por [61]). Por otro lado se ha visto que el AA puede ser oxidado por la Xantina Óxido Reductasa (XOR), originando ácido hidroperoxieicosatetraenoico (HPETE), el cual puede ser a su vez dioxigenado por la acción de una lipooxigenasa específica, la eLOX₃. Esta enzima origina epoxialcoholes derivados de ácidos grasos conocidos como hepoxilinas [81]. Tanto las prostaglandinas como las hepoxilinas son capaces de actuar como ligandos endógenos de PPAR-γ [81-82], activando la expresión de los genes a cargo de este receptor. De este modo, sería posible que en nuestro experimento a través de la acción de las PGHS sobre el AA, se hayan generado moléculas que podrían actuar por la vía de PPAR-γ, mediando los efectos moduladores sobre el perfil lipídico.

El AANO₂ mostró una tendencia no significativa a prevenir el desarrollo de lesiones en la válvula

Si se evalúa el desarrollo de la placa se observa que los grupos Veh/DHC, AANO₂/DHC y AA/DHC se comportaron de manera similar, ya que mostraron aumentos significativos con respecto al grupo PBS/DN, alcanzando casi los mismos valores de superficie de placa. Este patrón de comportamiento fue diferente al obtenido al analizar el perfil lipídico, en el que tanto el lote AANO₂/DHC como el AA/DHC provocaron una reducción significativa en comparación con el Veh/DHC. Vale la pena mencionar que si bien no hay diferencias significativas en comparación con el control, se evidenció en los grupos AANO₂/DHC y AA/DHC una tendencia hacia valores menores del área de placa generada y esta tendencia se había observado en experimentos anteriores realizados por nuestro grupo (Mariana Ferrari, Cátedra de Inmunología, datos no publicados). Además es importante hacer notar que en el experimento piloto se observó el mismo patrón, ya que si bien no hubo una reducción significativa de la placa en el grupo AANO₂/DHC al compararlo con el grupo Veh/DHC, la mayoría del grupo (con excepción del individuo que mostró un comportamiento extraordinario), presentó valores menores de placa. El hecho de que esta tendencia se repitiera en varios experimentos nos lleva a pensar que el AANO₂ tiene actividad anti-aterogénica, pero que en las condiciones en que lo ensayamos no alcanzó a prevenir la formación de lesiones. Es plausible que el potencial anti-aterogénico del AANO₂ esté condicionado por la concentración a la que se suministró, y que aumentando dicha concentración se logre transformar la tendencia en un efecto significativo. Esto encuentra apoyo también en que se ha descrito una correlación entre los niveles de lípidos en sangre y el

área de placa desarrollada [72], por lo que es probable que la modulación del perfil lipídico (ver Figura 14 y Figura 15) conlleve a una disminución en los niveles de placa desarrollados. El uso de concentraciones mayores de AANO₂ podría conducir a una modulación más fuerte de los niveles de CL y TG en sangre y por ende aumentar su efecto protector sobre el desarrollo de placa. Es importante recordar que el AANO₂ como parte de la familia de los NO₂-FA, es un compuesto muy electrófilo que rápidamente reacciona con nucleófilos, por lo cual es complicado estimar en qué concentración estuvo disponible para interactuar con el endotelio de las arterias y del corazón así como también con las células inflamatorias que inician el desarrollo de las lesiones. Para verificar que esta tendencia es genuina y obtener datos confiables en relación con el efecto del AANO₂ sobre la formación de placas de ateroma, sería necesario aumentar la concentración de AANO₂ suministrada a los animales. Esta hipótesis además encuentra apoyo en datos publicados sobre el potencial anti-aterogénico del OANO₂, obtenidos en un modelo experimental similar (ratones apoE^{-/-}), en donde los efectos protectores del nitroalqueno fueron alcanzados utilizando concentraciones 166 veces mayores a las ensayadas por nosotros. Vale la pena mencionar que en nuestro trabajo no se utilizó una dosis mayor porque no contábamos con la cantidad de AANO₂ necesaria, y además las tendencias observadas en ensayos preliminares sugerían que el AANO₂ tenía una potencia mayor en comparación con otros nitroalquenos. Por otro lado, es importante mencionar que, en el trabajo donde se analizó el efecto del OANO₂, la administración del nitroalqueno se realizó con una mini-bomba osmótica subcutánea que bombea de manera continua el compuesto que contiene, permitiendo obtener una concentración constante del mismo en sangre. En cambio no se pudo utilizar estas mini-bombas subcutáneas en nuestro experimento, lo cual constituye una desventaja. Se solubilizó el AANO₂ en la mezcla PEG:EtOH y no solo en EtOH, como forma de favorecer una difusión lenta y prolongar el tiempo de vida media del compuesto. Finalmente debemos tener presente que, el tratamiento con el OANO₂ luego de 12 semanas, indujo una reducción de la placa de aproximadamente 32% comparado con el vehículo y del 28% comparado con el OA. Si bien este efecto protector fue genuino (se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas), no fue una modulación robusta sobre la formación de placa de ateroma. **Así, no debe descartarse que el AANO₂ tenga efectos anti-aterogénicos dado que las condiciones en que fue ensayado son notoriamente desfavorables en comparación con las utilizadas con el OANO₂.**

permite evaluar el efecto anti-aterogénico del AANO₂ plantear al menos dos cambios posibles a realizar en el protocolo. El primero es elevar la dosis de AANO₂ de forma de

aumentar su nivel en sangre. Esto puede lograrse aumentando la concentración de la solución a inyectar y/o la frecuencia de las inyecciones. Para poder determinar dicha concentración, se harán ensayos que evalúen el nivel del AANO₂ libre en plasma de ratones inyectados con distintas concentraciones del compuesto luego de 30 min, 1h y 2h de la administración. La concentración de AANO₂ libre en el plasma es un índice de disponibilidad del compuesto en la sangre; recordemos que es esperable que una gran fracción del nitroalqueno forme rápidamente aductos con proteínas de la sangre reduciendo los niveles de AANO₂ capaces de ejercer su poder anti-aterogénico en el sitio de interés. Tanto el aumento de la dosis como el cambio en la frecuencia de inyección, requieren del monitoreo de algunos parámetros que aportaran información sobre la toxicidad del compuesto (peso, aspecto general, pelaje, niveles de enzimas hepáticas), ya que no tenemos información de efectos nocivos a dosis mayores del mismo que no se pueden descartar. Por otro lado, aumentar la frecuencia de las inyecciones tampoco es trivial porque los animales sufren mucho estrés al momento de la inyección y además, como ya se mencionó en el capítulo de Resultados, existe la posibilidad de generar pequeñas lesiones –granulomas-. Por esto, no sería razonable administrar los compuestos todos los días; pero se podría intentar aumentar la frecuencia de la dosificación a 2 veces por semana.

El segundo cambio en el protocolo del experimento, está relacionado con evaluar en paralelo la potencia del AANO₂ con la de una droga anti-aterogénica conocida (control positivo capaz de prevenir la placa). En este sentido en el experimento con el OANO₂, no se incluyó un control de este tipo que permitiera valorar si un porcentaje de reducción del 28% es relevante en relación con las drogas actualmente disponibles. Para dicho control se podría hacer uso de sustancias como las estatinas, que constituyen una clase de drogas ampliamente utilizadas en el tratamiento de la hipercolesterolemia como prevención de la aterosclerosis. Inicialmente se las conoció por su capacidad de inhibir el paso limitante en la biosíntesis del CL mediante el bloqueo de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA) [83], que lleva a la detención de la biosíntesis de CL en el hígado y al concomitante aumento de la expresión del receptor para la LDL en los hepatocitos; ésto provoca finalmente una disminución de los niveles de la lipoproteína en sangre, y por tanto constituye un mecanismo eficiente para evitar el inicio de la aterosclerosis. Posteriormente se descubrió que las estatinas poseían “efectos pleiotrópicos” benéficos e independientes del mecanismo anterior, que involucraban actividades anti-inflamatorias como ser la inhibición de la expresión de VCAM-1, la estimulación de la eNOS, la activación de PPAR- γ , la inhibición de la expresión de citoquinas inducida por LPS en macrófagos y la estabilización de la placa de ateroma (revisado por [84] y [85]). Es lógico considerar que un control de tratamiento con estatinas, nos permitiría establecer cuál

es del grado de reducción en las lesiones que deberíamos aspirar a obtener del tratamiento con nuestro compuesto, para que sea competitivo en relación con las drogas disponibles. Además, en caso de que el AANO₂ prevenga la formación de la placa, la comparación con dicho control permite tener una idea cualitativa de la potencia anti-aterogénica del compuesto.

6. Conclusiones

Se pudo poner a punto el modelo de aterosclerosis en ratones LDLr^{-/-}, determinando que las condiciones apropiadas para obtener una respuesta aterogénica robusta, reflejada en las variaciones del perfil lipídico y el aumento en el desarrollo de la placa de ateroma, fueron siete semanas de ingesta de la DHC.

Por otro lado el AANO₂ logró modular los niveles de CL y TG en sangre de aquellos animales alimentados con DHC, pero no pudo prevenir el desarrollo de placa inducido por la dieta en las condiciones ensayadas. Sin embargo basándonos en: i) los datos reportados en la bibliografía sobre la falta de modulación del perfil lipídico por parte del tratamiento con el OANO₂, en contraposición con ii) la modulación inducida por el tratamiento con el AANO₂ observada en nuestro experimento, iii) el control poco robusto en cuanto al desarrollo de placa por parte del OANO₂, incluso al ser administrado a concentraciones mucho mayores que las utilizadas por nosotros, y iv) la tendencia varias veces reproducida a desarrollar menores niveles de placa bajo el tratamiento con AANO₂, pensamos que es necesario ensayar concentraciones mayores del NO₂-FA para poder concluir sobre su efecto en relación al control del desarrollo de la placa a nivel de la válvula aórtica.

7. Perspectivas

En vista de la modulación del perfil lipídico observada en el tratamiento con el AANO₂, pero ausente en el tratamiento con el OANO₂, resulta importante estudiar dos aspectos relacionados con este efecto. En primer lugar, creemos que el mecanismo subyacente podría involucrar la activación de PPAR- γ , receptor que participa en el control del metabolismo lipídico, sin embargo no hay evidencias claras que lo comprueben. Por lo tanto deberíamos por un lado estudiar la existencia de ésta activación, por ejemplo a través ensayos con células, en dónde se incuben macrófagos con el AANO₂, y luego se evalúe la expresión de mensajeros (mediante PCR cuantitativa), de genes controlados por PPAR- γ como CD36, ABCA, entre otros. En segundo lugar, es posible que la reducción de los niveles de lípidos en sangre se deba a un control en alguna de las enzimas relacionadas con las vías de metabolización de los mismos. De modo que un abordaje posible sería estudiar los niveles de expresión en el hígado de dichas enzimas, comparando los resultados obtenidos para ratones tratados con AANO₂, AA y Veh, bajo un régimen de DHC.

Por otro lado como la aterosclerosis es una enfermedad de base inflamatoria, y pensamos que el AANO₂ podría modularla a través de sus propiedades anti-inflamatorias, sería interesante analizar a lo largo de un experimento otros marcadores inflamatorios/anti-inflamatorios que nos permitieran valorar si el AANO₂ está ejerciendo los efectos esperados. Algunos ejemplos de marcadores inflamatorios podrían ser VCAM-1 y TNF- α a nivel de la aorta, o MCP-1 en los monocitos del bazo. Por su parte la HO-1 sería un buen candidato a estudiar como marcador anti-inflamatorio, dada la demostrada capacidad de los NO₂-FA de inducir su expresión en el endotelio.

Para finalizar, en el marco de las teorías más modernas sobre el desarrollo de la placa de ateroma, resultaría interesante un último experimento centrado en la interacción de células derivadas de monocitos y células musculares de la pared de las arterias, que abriría un tema de estudio más novedoso en esta área. Como mencionamos anteriormente se cree que la retención de los monocitos en el espacio subendotelial, mediante la interacción con células del músculo liso de las arterias, está íntimamente relacionada con el desarrollo de la placa de ateroma. En la literatura existen registros de experimentos, que observaron un aumento en la adhesión entre macrófagos derivados de monocitos de la sangre y células musculares, cuando los primeros eran pre-incubados con productos de la oxidación de la LDL [17]. Así, sería novedoso estudiar si el tratamiento con AANO₂ puede inhibir las interacciones adhesivas entre las células musculares y monocitos pre-incubados con lípidos oxidados, de forma de contribuir

a la resolución de la inflamación en la pared arterial y por ende a prevenir el desarrollo de la lesión.

8. Bibliografía

1. Stocker, R. and J.F. Keane, Jr., Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*, 2004. **84**(4): p. 1381-478.
2. Kojda, G. and D. Harrison, Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res*, 1999. **43**(3): p. 562-71.
3. Frei, B., R. Stocker, and B.N. Ames, Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(24): p. 9748-52.
4. Cybulsky, M.I. and J. Jongstra-Bilen, Resident intimal dendritic cells and the initiation of atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 2010. **21**(5): p. 397-403.
5. Randolph, G.J. and S. Potteaux, Vascular dendritic cells as gatekeepers of lipid accumulation within nascent atherosclerotic plaques. *Circ Res*, 2010. **106**(2): p. 227-9.
6. Heier, I., et al., Characterisation of bronchus-associated lymphoid tissue and antigen-presenting cells in central airway mucosa of children. *Thorax*, 2011. **66**(2): p. 151-6.
7. Sabeva, N.S., et al., Phytosterols differentially influence ABC transporter expression, cholesterol efflux and inflammatory cytokine secretion in macrophage foam cells. *J Nutr Biochem*, 2011. **22**(8): p. 777-83.
8. Stiko-Rahm, A., et al., Native and oxidized LDL enhances production of PDGF AA and the surface expression of PDGF receptors in cultured human smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb*, 1992. **12**(9): p. 1099-109.
9. Llodra, J., et al., Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(32): p. 11779-84.
10. Song, Z., et al., Accumulation and expression of serum amyloid P component in human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*, 2010. **211**(1): p. 90-5.
11. Stewart, C.R., et al., Oxidation of low-density lipoproteins induces amyloid-like structures that are recognized by macrophages. *Biochemistry*, 2005. **44**(25): p. 9108-16.
12. Singh, U., Human C-reactive protein promotes oxidized low-density lipoprotein uptake and matrix metalloproteinase-9 release in Wistar rats. *J Lipid Res* 2008. **49**: p. 1015-1023.
13. Ridker, P.M., et al., C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med*, 2000. **342**(12): p. 836-43.
14. Jenny, N.S., et al., Serum amyloid P and cardiovascular disease in older men and women: results from the Cardiovascular Health Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(2): p. 352-8.
15. Dal Canto, A.J., et al., IFN-gamma action in the media of the great elastic arteries, a novel immunoprivileged site. *J Clin Invest*, 2001. **107**(2): p. R15-22.
16. Gautier, E.L., C. Jakubzick, and G.J. Randolph, Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(10): p. 1412-8.
17. Barlic, J., et al., Oxidized lipid-driven chemokine receptor switch, CCR2 to CX3CR1, mediates adhesion of human macrophages to coronary artery smooth muscle cells through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent pathway. *Circulation*, 2006. **114**(8): p. 807-19.
18. Tacke, F., et al., Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 2007. **117**(1): p. 185-94.
19. Potteaux, S., et al., Suppressed monocyte recruitment drives macrophage removal from atherosclerotic plaques of Apoe^{-/-} mice during disease regression. *J Clin Invest*, 2011. **121**(5): p. 2025-36.

20. Rubbo, H. and R. Radi, *Protein and lipid nitration: role in redox signaling and injury*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1780**(11): p. 1318-24.
21. Baker, P.R., et al., *Fatty Acid Transduction of Nitric Oxide Signaling: MULTIPLE NITRATED UNSATURATED FATTY ACID DERIVATIVES EXIST IN HUMAN BLOOD AND URINE AND SERVE AS ENDOGENOUS PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR LIGANDS*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(51): p. 42464-75.
22. Freeman, B.A., et al., *Nitro-fatty acid formation and signaling*. *J Biol Chem*, 2008.
23. Rudolph, V., et al., *Nitro-fatty acid metabolome: saturation, desaturation, beta-oxidation, and protein adduction*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(3): p. 1461-73.
24. Lima, E.S., et al., *Characterization of linoleic acid nitration in human blood plasma by mass spectrometry*. *Biochemistry*, 2002. **41**(34): p. 10717-22.
25. Baker, P.R., et al., *Red cell membrane and plasma linoleic acid nitration products: synthesis, clinical identification, and quantitation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(32): p. 11577-82.
26. Cui, T., et al., *Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(47): p. 35686-98.
27. Batthyany, C., et al., *Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(29): p. 20450-63.
28. Nadtochiy, S.M., et al., *Mitochondrial nitroalkene formation and mild uncoupling in ischaemic preconditioning: implications for cardioprotection*. *Cardiovasc Res*, 2009. **82**(2): p. 333-40.
29. Rudolph, V., et al., *Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion*. *Cardiovasc Res*, 2010. **85**(1): p. 155-66.
30. Ferreira, A.M., et al., *Macrophage activation induces formation of the anti-inflammatory lipid cholesteryl-nitrolinoleate*. *Biochem J*, 2009. **417**(1): p. 223-34.
31. Coles, B., et al., *Nitrolinoleate inhibits superoxide generation, degranulation, and integrin expression by human neutrophils: novel antiinflammatory properties of nitric oxide-derived reactive species in vascular cells*. *Circ Res*, 2002. **91**(5): p. 375-81.
32. Coles, B., et al., *Nitrolinoleate inhibits platelet activation by attenuating calcium mobilization and inducing phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein through elevation of cAMP*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(8): p. 5832-40.
33. Trostchansky, A., et al., *Synthesis, isomer characterization, and anti-inflammatory properties of nitroarachidonate*. *Biochemistry*, 2007. **46**(15): p. 4645-53.
34. Abraham, N.G. and A. Kappas, *Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system*. *Free Radic Biol Med*, 2005. **39**(1): p. 1-25.
35. Nath, K.A., *Heme oxygenase-1: a provenance for cytoprotective pathways in the kidney and other tissues*. *Kidney Int*, 2006. **70**(3): p. 432-43.
36. Wright, M.M., et al., *Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: nitrolinoleic acid potently activates endothelial heme oxygenase 1 expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(11): p. 4299-304.
37. Lee, T.S., H.L. Tsai, and L.Y. Chau, *Induction of heme oxygenase-1 expression in murine macrophages is essential for the anti-inflammatory effect of low dose 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(21): p. 19325-30.
38. Lim, D.G., et al., *Nitrolinoleate, a nitric oxide-derived mediator of cell function: synthesis, characterization, and vasomotor activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(25): p. 15941-6.
39. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. *Annu Rev Immunol*, 1998. **16**: p. 225-60.
40. Tkachev, V.O., E.B. Menshchikova, and N.K. Zenkov, *Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system*. *Biochemistry (Mosc)*, 2011. **76**(4): p. 407-22.

41. Villacorta, L., et al., Nitro-linoleic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via the Keap1/Nrf2 signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **293**(1): p. H770-6.
42. Chinetti, G., J.C. Fruchart, and B. Staels, Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res*, 2000. **49**(10): p. 497-505.
43. Chinetti, G., J.C. Fruchart, and B. Staels, Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors with functions in the vascular wall. *Z Kardiol*, 2001. **90 Suppl 3**: p. 125-32.
44. Schopfer, F.J., et al., Fatty acid transduction of nitric oxide signaling. Nitrolinoleic acid is a hydrophobically stabilized nitric oxide donor. *J Biol Chem*, 2005. **280**(19): p. 19289-97.
45. Fernandez, A.Z., Peroxisome proliferator-activated receptors in the modulation of the immune/inflammatory response in atherosclerosis. *PPAR Res*, 2008. **2008**: p. 285842.
46. Lehrke, M. and M.A. Lazar, The many faces of PPARgamma. *Cell*, 2005. **123**(6): p. 993-9.
47. Bell-Parikh, L.C., et al., Biosynthesis of 15-deoxy-delta12,14-PGJ2 and the ligation of PPARgamma. *J Clin Invest*, 2003. **112**(6): p. 945-55.
48. Lazar, M.A., Progress in cardiovascular biology: PPAR for the course. *Nat Med*, 2001. **7**(1): p. 23-4.
49. Nef, P., et al., Structure linkage, and sequence of the two genes encoding the delta and gamma subunits of the nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. **81**(24): p. 7975-9.
50. Lima, E.S., et al., Nitrated lipids decompose to nitric oxide and lipid radicals and cause vasorelaxation. *Free Radic Biol Med*, 2005. **39**(4): p. 532-9.
51. Balazy, M., Vicinal Nitrohydroxyecosatrienoic Acids: Vasodilator Lipids Formed by Reaction of Nitrogen Dioxide with Arachidonic Acid. *THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS*, 2001. **299**(2): p. 611-619.
52. Rubbo, H., et al., Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem*, 1994. **269**(42): p. 26066-75.
53. Ignarro, L.J., et al., Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res*, 1987. **61**(6): p. 866-79.
54. Schopfer, F.J., P.R. Baker, and B.A. Freeman, NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem Sci*, 2003. **28**(12): p. 646-54.
55. Cole, M.P., et al., Nitro-fatty acid inhibition of neointima formation after endoluminal vessel injury. *Circ Res*, 2009. **105**(10): p. 965-72.
56. Borniquel, S., et al., Nitrated oleic acid up-regulates PPARgamma and attenuates experimental inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med*. **48**(4): p. 499-505.
57. Rudolph, T.K., et al., Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apoE-/- mice. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology*, 2010. **in press**.
58. Samuelsson, B., Arachidonic acid metabolism: role in inflammation. *Z Rheumatol*, 1991. **50 Suppl 1**: p. 3-6.
59. Blanco, F., et al., 6-Methylnitroarachidonate: a novel esterified nitroalkene that potently inhibits platelet aggregation and exerts cGMP-mediated vascular relaxation. *Free Radic Biol Med*. **50**(3): p. 411-8.
60. Spencer, A.G., et al., Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem*, 1998. **273**(16): p. 9886-93.
61. Tsai, A.L. and R.J. Kulmacz, Prostaglandin H synthase: resolved and unresolved mechanistic issues. *Arch Biochem Biophys*, 2010. **493**(1): p. 103-24.
62. Trostchansky, A., et al., Nitroarachidonic acid: A novel peroxidase inhibitor of prostaglandin endoperoxide H synthases 1 and 2. *J Biol Chem*.

63. Kelley, E.E., et al., Nitro-oleic acid, a novel and irreversible inhibitor of xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem*, 2008. **283**(52): p. 36176-84.
64. Meurs, I., et al., The effect of ABCG1 deficiency on atherosclerotic lesion development in LDL receptor knockout mice depends on the stage of atherogenesis. *Atherosclerosis*, 2011.
65. Paigen, B., et al., Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis*, 1987. **68**(3): p. 231-40.
66. Daugherty, A. and C.W. Stewart, Quantification of Atherosclerosis in Mice, in *Methods on Molecular Biology: Transgenic Mouse Methods and Protocols*, M.H. Hofker and J. van Deursen, Editors. 2003, Humana Press Inc. : Totowa, NJ. p. 293-309.
67. Jawien, J., P. Nastalek, and R. Korbut, Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol*, 2004. **55**(3): p. 503-17.
68. Ferrari, M., Nitroarachidonic Acid plays a beneficial role in atherosclerosis: involvement of heme oxygenase-1/Nrf-2 pathway. Free Radicals in Montevideo, V Meeting of SFRBM, 2-6 Setiembre, Montevideo, Uruguay., 2007.
69. López, V., Diseño, síntesis y evaluación biológica de tocoferol miméticos liberadores de óxido nítrico. Tesis de Doctorado. Facultad de Química (UdelaR)-PEDECIBA, 2006.
70. Página oficial de Jackson Laboratory <http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html>.
71. Kim, H.J., et al., Naringin alters the cholesterol biosynthesis and antioxidant enzyme activities in LDL receptor-knockout mice under cholesterol fed condition. *Life Sci*, 2004. **74**(13): p. 1621-34.
72. Kowala, M.C., et al., Characterization of atherosclerosis in LDL receptor knockout mice: macrophage accumulation correlates with rapid and sustained expression of aortic MCP-1/JE. *Atherosclerosis*, 2000. **149**(2): p. 323-30.
73. Pepys MB, B.M., Gomer K, Davies AJS, Doenhoff M, Serum amyloid P-component is an acute-phase reactant in the mouse. *Nature*, 1979. **278**: p. 259-261.
74. Thirumangalakudi, L., et al., High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. *J Neurochem*, 2008. **106**(1): p. 475-85.
75. Bjorkbacka, H., Multiple roles of Toll-like receptor signaling in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 2006. **17**(5): p. 527-33.
76. Yan, Z.Q. and G.K. Hansson, Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis. *Immunol Rev*, 2007. **219**: p. 187-203.
77. Koenig, W., Serum amyloid P component and cardiovascular disease: is there a sensible link? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(4): p. 698-700.
78. Song, L. and C. Schindler, IL-6 and the acute phase response in murine atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2004. **177**(1): p. 43-51.
79. Rudolph, T.K., et al., Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **30**(5): p. 938-45.
80. Sheldrick, E.L., et al., Peroxisome-proliferator-activated receptors and the control of levels of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 by arachidonic acid in the bovine uterus. *Biochem J*, 2007. **406**(1): p. 175-83.
81. Hallenborg, P., et al., Epidermis-type lipoxigenase 3 regulates adipocyte differentiation and peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity. *Mol Cell Biol*, 2010. **30**(16): p. 4077-91.
82. Forman, B.M., et al., 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell*, 1995. **83**(5): p. 803-12.
83. Istvan, E.S. and J. Deisenhofer, Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*, 2001. **292**(5519): p. 1160-4.
84. Kong, W. and Y. Zhu, The Pleiotropic Effects of Statins in the Prevention of Atherosclerosis : Editorial to: "Simvastatin Suppresses Apoptosis in Vulnerable

- Atherosclerotic Plaques Through Regulating the Expression of p53, Bcl-2 en Bcl-xL*" by Weiwei Qin et al. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2011.
85. Mizuno, Y., R.F. Jacob, and R.P. Mason, *Inflammation and the development of atherosclerosis*. *J Atheroscler Thromb*, 2011. **18**(5): p. 351-8.