

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
DIRECCION DE POSTGRADO
FACULTAD DE FARMACIA
PROGRAMA DE MAGISTER EN BIOQUIMICA CLINICA E INMUNOLOGIA

**EFFECTO DE LOXIN SOBRE LA EXPRESION DE LOX-1 Y
FORMACION DE LA PLACA ATHEROSCLEROTICA EN
RATONES ALIMENTADOS CON UNA DIETA ALTA EN
GRASA.**

**Tesis para optar al grado de Magister en Bioquímica Clínica e
Inmunología**

Camila de los Angeles Reyes Vivero

Concepción-Chile

2018

PROFESOR GUIA: DR.CLAUDIO AGUAYO TAPIA

Dpto. de Bioquímica Clínica e Inmunología

Facultad de farmacia

Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

MAGISTER EN BIOQUIMICA CLINICA E INMUNOLOGIA,UNIVERSIDAD CE CONCEPCION.

***MENCION HONROSA A ALUMNAS DEL MAGISTER GENERACION 2015.**

***MENCION ESPECIAL A DANIELA ROJAS,QUIEN AYUDO EN LOS EXPERIMENTOS DE HISTOLOGIA.**

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA CLINICA E INMUNOLOGIA,FACULTAD DE FARMACIA.

***MENCION HONROSA A MI TUTOR DR.CLAUDIO AGUAYO Y EL DR.FELIPE ZUÑIGA POR COMPARTIR SU SABIDURIA CONMIGO.**

***MENCION HONROSA A MIS COMPAÑERAS DE TRABAJO DENTRO DEL DEPARTAMENTO, EN ESPECIAL A PAULA GUZMAN,ROMINA CARVAJAL Y DANITZA SOTO.**

***MENCION ESPECIAL AL DR.DANIEL DURAN POR SU AYUDA EN EXPERIMENTOS EN MODELOS DE ANIMALES.**

FACULTAD DE FARMACIA,UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

***MENCION HONROSA AL DR.MARIO ARANDA. DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, FACULTAD DE FARMACIA.**

ESCUELA DE GRADUADOS

DEPARTAMENTO DE FISIOPATOLOGIA,FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS, UNIVERSIDAD DE CONCEPCION.

***MENCION HONROSA A RAFAEL MAURA POR COMPARTIR SUS CONOCIMIENTOS SOBRE EL TRABAJO DE ANIMALES CONMIGO Y A MI COMPAÑERA DE MAGISTER YOSSELYN VARGA POR AYUDARME.**

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA, FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN.

***MENCION HONROSA A LA DR. VALESKA ORMAZABAL POR COMPARTIR SUS CONOCIMIENTOS CONMIGO Y AL DR. OLIBERTO SANCHEZ POR FACILITARME EQUIPOS DE TRABAJO.**

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

***MENCION HONROSA A LA DRA. VIOLETA MORIN, MI PRIMERA TUTORA DE TESIS DE PREGRADO.**

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA MÉDICA, FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN.

***MENCION HONROSA A LA DRA. AMBART COVARRUBIAS POR AYUDARME EN EL TRABAJO DE HISTOLOGÍA.**

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA E INMUNOLOGÍA, FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD, UNIVERSIDAD DE TALCA.

***MENCION HONROSA AL DR. RODRIGO MOORE POR FACILITAR SU TRABAJO EN ESTUDIO DE ANIMALES APO E KNOCK OUT.**

***A TODOS MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DE TRABAJO QUE ME ACOMPAÑARON EN ESTE PROCESO DE APRENDIZAJE.**

TESIS DEDICADA A JIMENA VIVERO BAQUEDANO, MANUEL REYES CASTRO Y CAROLINA REYES VIVERO. GRACIAS POR SU APOYO INCONDICIONAL.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE DE FIGURAS	vi
INDICE DE TABLAS	vii
ABSTRACT	viii
RESUMEN	x
INTRODUCCION	1
Aterosclerosis	1
Factores de riesgo de aterosclerosis	2
Factores de riesgo modificables	3
Factores de riesgo no modificables	5
Receptores <i>scavenger</i>	10
Receptor de Lipoproteinas de baja densidad oxidada (LOX-1).	15
Gen OLR-1	18
Regulacion del <i>splicing</i> del gen OLR1	21
Heterodimero LOX-1/LOXIN	23
Vectores adenovirales	25
HIPOTESIS	27
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS ESPECIFICOS	28
METODOLOGIA	29
Obtencion de LDL oxidada	29
Generacion de LDL oxidada (oxLDL)	30
Cultivo celular	30
Ensayo de viabilidad	31
Obtencion del adenovirus LOXIN	31
Amplificacion de particulas viral	32
Obtencion del titulo de particulas virales	33
Determinacion de la multiplicidad de infeccion (MOI)	34
Purificacion del adenovirus mediante gradiente de CsCl	34
Extraccion de proteinas totales	35
Inmunoprecipitacion	36
Ensayos de Western blot	36
Inmunofluorescencia	37
Modelos aterogenesis	38
Animales ApoE -/-	39
Genotipificacion de ratones ApoE -/-	39
Animales C57BL/6	40
Analisis de sangre.	41



Deteccion de IL-10	42
Cuantificacion de la formacion de la lesion aterosclerotica.	42
Analisis histologico de tejidos fijados en PFA	42
Desparafinizacion e hidratación	44
Tincion con Hematoxilina-Eosina	44
Inmunohistoquímica de tejido	45
Analisis histologico de tejidos congelados en OCT.	45
Analisis estadístico	46
RESULTADOS	47
Efecto de oxLDL y Lisofosfatidilcolina (LPC) sobre la viabilidad y expresión de LOX-1 en celulas H4-II-E-C3	47
Sobreexpresion de adoLOXIN en celulas H4-II-E-C3	51
Visualizacion de la incorporacion de Apo B 100 en celulas H4-II-E-C3 mediante inmunofluorescencia	52
Inmunoprecipitacion de LOX-1 humano /LOXIN en HEK 293	56
Inmunoprecipitacion de LOX-1 rata /LOXIN en H4-II-E-C3	57
Estudios en modelos Animales	59
Genotipificacion de ratones Apo E Knock Out	59
Ratones Apo E knock out alimentados con una dieta alta en grasas.	61
Estandarizacion de la infeccion de ratones C57BL6 con AdoLOXIN	69
Ratones C57BL6 alimentados con una dieta alta en grasas.	75
Expresion de LOX-1 y LOXIN en Ratones C57 alimentados con una dieta alta en grasas.	80
DISCUSION	95
Expresion de LOX-1 en celulas H4-II-E-C3	96
LOX-1 rata /LOXIN humano	98
Ratones Apo E knock out alimentados con dieta alta en grasas	101
Ratones C57BL6 alimentados con dieta alta en grasas	104
Ratones C57 alimentados con dieta alta en grasas e infectados con AdoLOXIN	108
Estandarizacion del vector adenoviral	108
Expresion de LOX-1 y efecto de LOXIN sobre LOX-1 en ratones C57 alimentados con una dieta alta en grasas.	112
CONCLUSION	114
PROYECCION	114
REFERENCIAS	115

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la progresión de aterosclerosis.	7
Figura 2. Composición de las Lipoproteínas.	9
Figura 3. Clases de receptores <i>scavenger</i> .	14
Figura 4. Estructura de gen OLR1 y la proteína LOX-1.	20
Figura 5. Efecto de oxLDL y Lisofosfatidilcolina (LPC) sobre la viabilidad de células H4-II-E-C3.	49
Figura 6. Determinación de la expresión de LOX-1 en células H4-II-E-C3 en presencia de LOX-1 y LPC.	50
Figura 7. Determinación del MOI en células H4-II-E-C3.	54
Figura 8. Ensayo de internalización de ApoB100 en células H4-II-E-C3 y DU145.	55
Figura 9. Inmunoprecipitación del dímero LOX-1/LOXIN en células HEK 293 y H4-II-E-C3.	58
Figura 10. Análisis de sangre de ratones Apo E knock out alimentados con una dieta alta en grasas.	65
Figura 11. Detección de IL-10 en suero de ratones Apo E Knock out alimentados con una dieta alta en grasas.	66
Figura 12. Análisis histológico de aortas de ratones Apo E knock out.	68
Figura 13. Esquema de estandarización de la infección adenoviral.	71
Figura 14. Estandarización de la infección adenoviral.	73
Figura 15. Detección de IL-10 en suero de ratones C57BL6 inyectados con AdoLOXIN.	74
Figura 16. Esquema utilizados para evaluar el efecto de AdoLOXIN sobre ratones C57BL6 alimentados con una dieta alta en grasas.	77
Figura 17. Análisis de sangre de ratones C57BL6 alimentados con una dieta alta en grasas.	79
Figura 18. Análisis macroscópico de aortas de ratones C57BL6.	83
Figura 19. Análisis histológico de órganos de ratones C57BL6 alimentados con una dieta alta en grasas que sobreexpresan AdoLOXIN.	85
Figura 20. Análisis histológico de tejido hepático de ratones C57BL6 alimentado con una dieta alta en grasas que sobreexpresan LOXIN.	86
Figura 21. Expresión de LOX-1 en ratones C57BL6.	87
Figura 22. Expresión de LOX-1 en ratones C57BL6.	90
Figura 23. Aortas de ratones alimentados con dieta alta en grasas que sobreexpresan LOXIN.	91
Figura 24. Inmunohistoquímica de LOX-1 de aortas de ratones alimentados con dieta alta en grasas que sobreexpresan LOXIN.	93

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores utilizados para el analisis de expresion por PCR
--

41



ABSTRACT

Atherosclerosis is pathology associated with accumulations of lipids and the presence of thrombogenic, inflammatory and cell death components, which ultimately lead to the development of cardiovascular disease (CVD). The CVD are one of the most important causes of morbidity and mortality worldwide, being the atherosclerosis and the lipid accumulation in the arterial wall the origin this pathology. The main atherosclerotic process is the oxidative modifications that circulating low density lipoproteins (LDL), a crucial step for the early development of the lesion, endothelial dysfunction and atherosclerosis. The proatherogenic effect induced by oxLDL is mediated by the interaction with the Lectin Type-1 receptor for Oxidized Low Density Lipoproteins (LOX-1), which is expressed in all cell types involved in the development of the atherosclerotic process: endothelial cells, smooth muscle and macrophages. The interaction of the receptor with its ligand, produces the activation of different intracellular signaling pathways implicated in apoptosis and cell proliferation. A truncated variable of the LOX-1 receptor, named LOXIN, has been described, lacking exon 5 and part of the C-type Lectin domain, which participate in the interaction with its ligand; As a result of this, the LOX-1/LOXIN heterodimer is inactive, lost the capability to internalize oxLDL and doesn't induce the signaling pathways, thus being a modulator of the harmful effects produced by the activation of LOX-1. Recent studies have shown that there is a decrease in endothelial cell apoptosis in the presence of LOX-1/LOXIN, this evidence has been of biomedical interest since it could eventually prevent or stop the development of atherosclerosis. However, it is unknown whether its overexpression by adenoviral vectors could play a protective role in an atherogenic animal model. Therefore, the aim of this study is to investigate whether the decrease in the expression or inactivation of LOX-1 prevents atherosclerosis in mice fed a high-fat diet. Our results showed by functional studies of overexpression LOXIN diminished Apo B100 incorporation in H4-II-E-C3 cells. On the other hand,

to evaluate the protective role of LOXIN in C57BL6 mice feeded a high-fat diet decrease LOX-1 expression in the presence of the AdoLOXIN vector in heart, liver and lung. Histological analysis of the aortic artery showed that in the presence of LOXIN diminished the area of artery injury accompanied by a decrease in the labeling of LOX-1 in areas close to lumen and vascular wall. Therefore, LOXIN would be playing a protective role for atherosclerosis by diminished LOX-1 expression.



RESUMEN

La aterosclerosis es una condición clínica asociada a acumulaciones de lípidos y presencia de componentes trombogénicos, inflamatorios y muerte celular, que llevan finalmente al desarrollo de la enfermedad cardiovascular (ECV). Las ECV son una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, siendo la aterosclerosis y la acumulación de lípidos en la pared arterial el origen de esta patología. Una etapa fundamental en el proceso aterosclerótico son las modificaciones oxidativas que sufren las lipoproteínas de baja densidad (LDL) circulantes, lo cual es crucial para el desarrollo temprano de la lesión e inicio de la disfunción endotelial y aterosclerosis. El efecto proaterogénico inducido por oxLDL es mediado por la interacción con el receptor de Lectina Tipo-1 para Lipoproteínas de Baja Densidad Oxidadas (LOX-1), el que se encuentra expresado en todos los tipos celulares involucrados en el desarrollo del proceso aterosclerótico, como células endoteliales, musculares lisas y macrófagos. La interacción del receptor con su ligando, produce la activación de diferentes vías de señalización intracelular que modulan procesos de apoptosis y proliferación celular. Se ha descrito una variable trunca del receptor LOX-1, llamado LOXIN, que carece del exón 5 y parte del dominio Lectina tipo-C, que contribuye a la interacción con su ligando; producto de esto, el heterodímero LOX-1/LOXIN es inactivo, no internaliza oxLDL y no produce activación de las vías de señalización, siendo así un modulador de los efectos dañinos producto de la activación de LOX-1. En estudios recientes, se ha observado que existe una disminución en la apoptosis de células endoteliales en presencia conjunta de LOX-1/LOXIN. Esta evidencia ha sido de interés biomédico ya que eventualmente se podría prevenir o detener el desarrollo de la aterosclerosis. Sin embargo, se desconoce si su sobreexpresión podría ejercer un rol protector en un modelo de animal aterogénico. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es investigar si la disminución en la expresión o inactivación de LOX-1 previene la aterosclerosis en ratones alimentados con una dieta alta en grasas. Nuestros resultados muestran que la sobreexpresión LOXIN

en células H4-II-E-C3 disminuyó la incorporación de Apo B100. Por otra parte, al evaluar el efecto protector de LOXIN en ratones C57BL6 alimentados con una dieta alta en grasas hubo una baja expresión de LOX-1 en presencia del vector AdoLOXIN en órganos como corazón, hígado y pulmón. Análisis histológicos de la arteria aorta mostraron que en presencia de LOXIN hay una disminución en el área de lesión de la arteria acompañado de una disminución en la expresión de LOX-1 en lumen y pared vascular. Por lo tanto, LOXIN estaría ejerciendo un rol protector de la aterosclerosis mediante la disminución de la expresión de LOX-1.



INTRODUCCIÓN

Aterosclerosis

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico que da origen, entre otras, a enfermedades de las arterias coronarias, la primera causa de muerte a nivel mundial. La aterosclerosis se caracteriza por la formación de estrías lipídicas en la pared arterial, una lesión focal localizada en la íntima de las arterias de mediano y gran calibre (1). La patogénesis de la aterosclerosis es un proceso complejo en el que están involucrados distintos tipos celulares, mediadores inflamatorios y una combinación de factores patogénicos dentro de los cuales se encuentra la inflamación crónica, disfunción endotelial y estrés oxidativo (2, 3). La aterogénesis comienza con la oxidación de Lipoproteínas de baja densidad (LDL) por especies reactivas de oxígeno (ROS), evento inicial en la patogénesis en la aterosclerosis (4, 5). La LDL oxidada (oxLDL) activa a las células endoteliales generando disfunción endotelial por alteración de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS). Luego, estas células son activadas y expresan moléculas de adhesión, lo que conlleva al reclutamiento de monocitos al espacio subendotelial. Una vez en la íntima, los monocitos se diferencian a macrófagos y comienzan a secretar citoquinas proinflamatorias y metaloproteinasas. Tanto los macrófagos como células musculares lisas se

activan y se transforman en células espuma que tienen la capacidad de internalizar oxLDL (6). Las células espuma se acumulan en la íntima y ocurre la liberación de moléculas proinflamatorias, la generación de ROS y la expresión de enzimas que van a degradar la matriz extracelular generada, favoreciendo así a la desestabilización de la placa. En conjunto con las células espuma, linfocitos, mastocitos y restos celulares se generan moléculas que, además de favorecer la desestabilización de la placa, promueven la liberación de citoquinas proinflamatorias, proteasas, factores de coagulación, radicales libres y moléculas vasoactivas que inhiben la formación de una capa fibrosa estable, degradando la capa de colágeno favoreciendo la ruptura de ésta, ya sea por un estímulo externo o interno al vaso. Todas esas reacciones conjuntas promueven la ruptura de la placa (7). Como consecuencia, se genera una oclusión del vaso que conlleva a una isquemia del tejido colindante, privando de oxígeno y nutrientes a la zona afectada provocando una necrosis del tejido que, a la larga, daña el tejido generando un infarto (8).

Factores de riesgo de aterosclerosis

Los factores de riesgo se pueden dividir en factores modificables (tabaquismo, hipertensión, diabetes, dislipidemia, sedentarismo) y no modificables (sexo, edad, genética).

Factores de riesgo modificables

Hipertensión:

En la década de los 40, la hipertensión se definió como un evento adaptativo en personas adultas, lo que permitía que la sangre fluyera por las arterias rígidas. Pero evidencias más actuales de epidemiólogos como Framingham, definieron la hipertensión como evento fisiopatológico en donde la presión es una variable continua e independiente, predictor de la enfermedad cardiovascular (9). El evento de hipertensión es exponencial, es decir, en individuos entre 40 a 70 años por cada 20 mmHg de aumento en presión sistólica o 10 mmHg de aumento en presión diastólica se duplica el riesgo de enfermedad cardiovascular.

El uso de antihipertensivos en pacientes hipertensos, han logrado disminuir en un 35-40% la prevalencia de infarto, un 20 a 25% infarto agudo al miocardio y un 50% la falla cardíaca (10).

Sedentarismo

La correlación entre inactividad física y enfermedad cardiovascular han sido validada por un sinnúmero de científicos. El riesgo relativo de muerte por enfermedad cardiovascular relacionada a sedentarismo es 1,9 veces (9). Esta asociación entre actividad física y enfermedad cardiovascular se debe

principalmente a una regulación de moléculas pro-inflamatorias, presión sanguínea, índice de masa corporal y diabetes.

Por esta razón, entidades como la NICE (Instituto Nacional para la salud y Excelencia Clínica) recomienda 150 minutos de actividad física aeróbica de intensidad moderada a la semana o 75 minutos de actividad física aeróbica intensa a la semana (10).

Tabaquismo

El tabaquismo es el mayor factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular a partir de 1960. En Estados Unidos, el 30% de la mortalidad por enfermedad cardiovascular se asocia a tabaquismo. Incluso, hasta los fumadores pasivos aumentan un 30% el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular (10). La eliminación de este hábito es la intervención más efectiva para la prevención de la enfermedad cardiovascular. Incluso algunos de sus beneficios se observan a los meses de dejar el hábito.

Diabetes

Estudios revelan que padecer diabetes aumenta entre 2 a 3 veces la probabilidad de desarrollar enfermedad cardiovascular. Incluso, la intolerancia a la glucosa aumenta 1,5 veces la probabilidad de riesgo (9). Por otra parte, la reducción de la glicemia en el diabético a rangos aceptables disminuye el riesgo

de enfermedad cardiovascular, con riesgo relativamente bajo en normoglicemia (10).

Dislipidemias

La naturaleza hidrofóbica de los lípidos no permite que estos viajen a través de la sangre por si solos, para el transporte lipídico se utilizan las lipoproteínas. Una alteración en su metabolismo o transporte genera una dislipidemia. La dislipidemia es una alteración en los niveles plasmáticos de lípidos que significan un riesgo para la salud. La alteración de los niveles de colesterol se llama Hipercolesterolemia y se describe con mayor detalle más adelante (9,10).

Factores de riesgo no modificables

Edad

La contribución de la edad como factores de riesgo cardiovascular es irrefutable, ya que la probabilidad de aterosclerosis en pacientes menores a 35 años es baja, en contraste con pacientes que se encuentran en la tercera edad, ya que tanto la prevalencia como incidencia de ateropatía periférica aumenta en este rango etario. Estadísticamente, en una población mayor a 65 años, un 30% padece algún tipo de isquemia miocárdica y un 12,4% tiene evidencia de enfermedad arterial periférica (9,10).

Sexo

La prevalencia de enfermedad aterosclerótica es 1,66 veces mayor en hombres con respecto a las mujeres. En décadas anteriores sólo el 10% de los diagnosticados de enfermedad aterosclerótica eran mujeres, sin embargo, a pesar que en el sexo femenino tiene una aparición en edades más avanzadas, recientemente se ha visto un aumento en la prevalencia de enfermedad aterosclerótica en mujeres alcanzando el 35%. Esta alza se ha relacionado con los cambios de estilo de vida de las mujeres (9,10).

Genética

Existen una serie de genes identificados asociados a enfermedad cardiovascular de origen monogénico, Entre ellos se han descrito 4 alteraciones monogénicas que como consecuencia aumentan los niveles de LDL en circulación. Una de ellas es la hipercolesterolemia familiar. Hasta la fecha se han descrito más de 600 mutaciones del gen que codifica para el receptor de LDL (LDLR). La prevalencia en la población es 1:500 heterocigoto para alguna mutación del gen y 1:1.000.000 es homocigota, siendo considerada una enfermedad de baja prevalencia (9).

Existen una serie de genes identificados asociados a enfermedad cardiovascular de origen monogénico, Entre ellos se han descrito 4 alteraciones monogénicas

que como consecuencia aumentan los niveles de LDL en circulación. Una de ellas es la hipercolesterolemia familiar. Hasta la fecha se han descrito más de 600 mutaciones del gen que codifica para el receptor de LDL (LDLR). La prevalencia en la población es 1:500 heterocigoto para alguna mutación del gen y 1:1.000.000 es homocigota, siendo considerada una enfermedad de baja prevalencia (9).

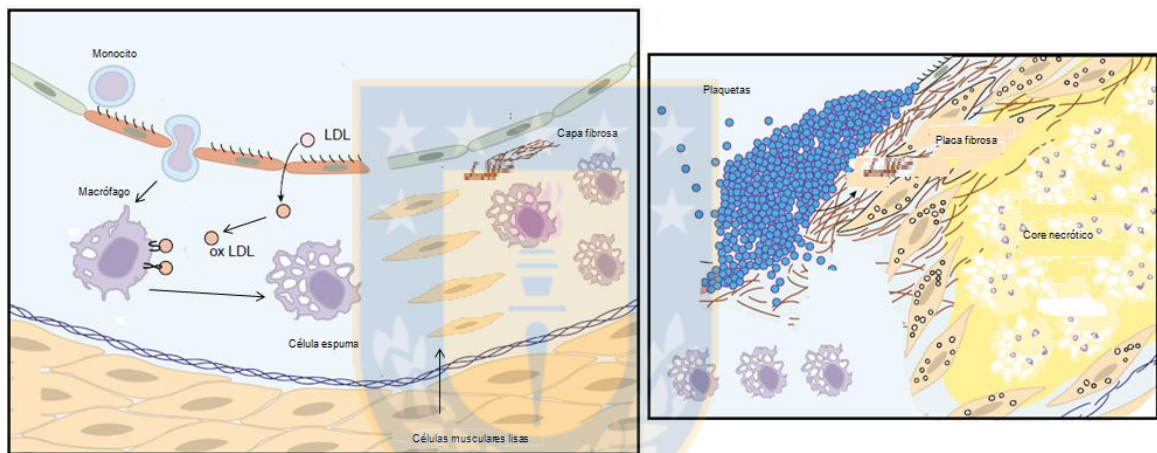


Figura 1. Esquema de la progresión de aterosclerosis.

La disfunción endotelial promueve el ingreso de monocitos desde el lumen vascular a la íntima del vaso. Los macrófagos en presencia de oxLDL comienzan a almacenarlo y se transforman en células espuma, célula altamente inflamatoria que promueve la migración de células musculares lisas, síntesis de la capa fibrosa y degradación de la matriz extracelular. En etapas más tardías de la aterosclerosis se forma un core necrótico que, frente a estímulos externos o internos, puede desestabilizarse generando una ruptura de la placa, acumulación de plaquetas y formación del trombo, que va a ocluir el vaso y por lo tanto a limitar en el tejido colindante los nutrientes y el oxígeno, generando muerte celular del tejido cardíaco (11).

La aterosclerosis es una condición patológica que se asocia clínicamente con altos niveles de LDL, siendo esto considerado uno de los mayores factores de riesgo en el desarrollo de la disfunción endotelial y posteriormente, formación de la placa aterosclerótica. El desarrollo prematuro de enfermedades cardiovasculares en pacientes con hipercolesterolemia familiar demuestra claramente que altos niveles de colesterol, especialmente de colesterol-LDL, son suficientes para el desarrollo de aterosclerosis incluso a edades muy tempranas, en las cuales no están presentes otros factores de riesgo como el tabaquismo, obesidad o hipertensión (12).

Los lípidos plasmáticos están compuestos por un conjunto de moléculas entre las que se encuentran tres componentes esenciales: Colesterol propiamente tal, en su forma libre y esterificada, triglicéridos y fosfolípidos. Debido a su carácter hidrofóbico, éstos deben ser transportados por proteínas lo que da origen a las lipoproteínas, las cuales se clasifican según su composición y densidad en: *i)* Quilomicrones, *ii)* Quilomicrones remanentes, *iii)* Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), *iv)* Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), *v)* Lipoproteínas de baja densidad (LDL) y *vi)* Lipoproteínas de alta densidad (HDL) (13).

Los lípidos plasmáticos están compuestos por un conjunto de moléculas entre las que se encuentran tres componentes esenciales: Colesterol propiamente tal, en su forma libre y esterificada, triglicéridos y fosfolípidos. Debido a su carácter hidrofóbico, éstos deben ser transportados por proteínas lo que da origen a las lipoproteínas, las cuales se clasifican según su composición y densidad en: *i)* Quilomicrones, *ii)* Quilomicrones remanentes, *iii)* Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), *iv)* Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), *v)* Lipoproteínas de baja densidad (LDL) y *vi)* Lipoproteínas de alta densidad (HDL) .

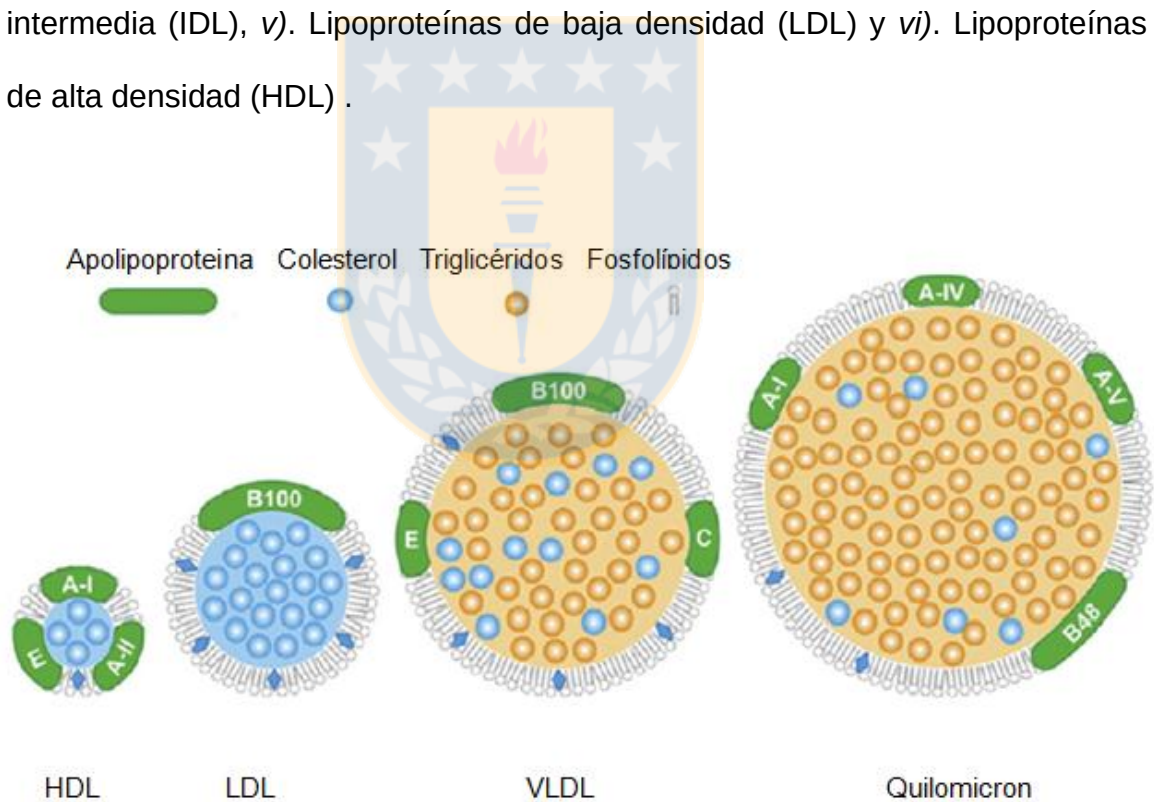


Figura 2. Composición de las Lipoproteínas.

Descripción esquemática de las distintas lipoproteínas, indicando su distinta composición. Imagen adaptada de bibliografía (13).

Receptores scavenger

Los receptores *scavengers* son un grupo heterogéneo de proteínas que se caracterizan por su capacidad de unir lipoproteínas de baja densidad (LDL) en su forma nativa y/o modificada. Dentro de las LDL modificadas de importancia en la aterogénesis se encuentran la LDL acetilada (AcLDL) y LDL oxidada (OxLDL), siendo importantes reguladores del inicio y progresión de la aterosclerosis (14).

Esta familia de receptores incluye 8 clases diferentes de proteínas solubles y unidas a membrana, las cuales son codificadas por genes distintos. Su clasificación está basada en la similitud de sus dominios y por su capacidad de unir partículas lipídicas modificadas y ligando polianiónicos (15).

Así tenemos que la LDL modificada puede interaccionar con:

Receptor *scavenger* tipo A:

Dentro de éstos encontramos al menos 4 receptores: receptor *scavenger* tipo A (SR-A), receptor de macrófagos con estructura de colágeno (MARCO), receptor *scavenger* con lectina tipo-C (SRCL) y el receptor *scavenger* A-5 (SCARA5) (16, 17). De esta familia solo el receptor SR-A, ha sido relacionado con el desarrollo de la aterosclerosis. Se ha postulado que el SR-A es proaterogénico

debido a su capacidad de mediar la incorporación de oxLDL en macrófagos. Sin embargo, este receptor conduce a la formación de lesiones ateroscleróticas de menor tamaño (15).

Receptor *scavenger* tipo B.

Contiene al menos 4 miembros: CD36, SR-B, LIMP II y CD163. Dentro del desarrollo de la aterosclerosis podemos relacionar a los receptores CD36 y SR-B. En humanos, CD36 se encuentra en el cromosoma 7 y se expresa en células linfoides, hematopoyéticas, células endoteliales, adipocitos y células musculares lisas vasculares, estando principalmente expresado en macrófagos(18). Los ratones doble knock out SR-A^{-/-} CD36^{-/-} muestran una disminución en la formación de células de espuma y en el tamaño de la lesión aterosclerótica (14). El receptor SR-B, se localiza en el cromosoma 12 humano codifica para dos isoformas (SR-BI/II), se expresa en monocitos, macrófagos, tejido adiposo y es esteroideogénico. SR-BI aumenta su expresión por estimulación con testosterona y ácidos grasos poli-insaturados y disminuyen por oxLDL, TNF- β e IL-1 (13-15). A diferencia de los otros receptores *scavenger*, SR-BI posee funciones protectoras contra la aterosclerosis, mediante el incremento del eflujo de colesterol de las partículas de HDL, permitiendo el aclaramiento y excreción hepática (16).

Receptor *Scavenger* tipo C.

En esta categoría encontramos sólo un receptor, dsR-C1, el cual se ha identificado en *Drosophila melanogaster*. Su función principal es reconocer bacterias, por lo que juega un papel fundamental en la regulación del sistema inmune innato del insecto (19).

Receptor *Scavenger* tipo D.

Dentro de este grupo encontramos el receptor CD68 (macrosialin en ratones) y la glicoproteína lisosomal de membrana (Lamp). CD68 se localiza en el cromosoma 17 humano y se expresa en macrófagos, células de Langerhans, células dendríticas, con un patrón de distribución similar a los receptores *scavenger* tipo B (17-20). Su expresión puede aumentar por la incubación con OxLDL y ésteres de forbol, pero es inhibida por TNF- α y lipopolisacáridos (20).

Receptor *Scavenger* tipo F

Dentro de éstos encontramos el receptor SREC, el cual es expresado en células endoteliales de mamíferos y macrófagos. Sus niveles aumentan en células tratadas con lipopolisacáridos y disminuyen por efecto de IL-1 α , IL-1 β y TNF- α . (21).

Receptor *Scavenger* tipo G

En este grupo encontramos al receptor de quimioquinas CXCL16, el cual une

fosfatidilserina y lipoproteínas oxidadas (SR-PSOX). Se encuentra localizado en el cromosoma 17 humano y es altamente expresado en macrófagos y células musculares lisas, mientras que presenta una baja expresión en células endoteliales. La expresión del receptor SR-PSOX en monocitos aumenta al ser expuestos a TNF- α , IFN- γ , LPS y oxLDL. (19). Esto ha permitido sugerir que la activación de este receptor puede estar relacionado con el desarrollo de la aterosclerosis mediante la activación de señales inflamatorias (20-21).

Receptor *Scavenger* tipo H

En este grupo se encuentra FEEL-1 y FEEL-2, ubicados en el cromosoma 14 y 12 humano respectivamente. Ambos están altamente expresados en tejido hepático. FEEL-1 se encuentra expresado en monocitos, macrófagos y células endoteliales, mientras que FEEL-2 ha sido detectado en bazo y ganglios linfáticos. FEEL-1 es el principal receptor para la captación de lipoproteínas de baja densidad acetiladas (acLDL), demostrado mediante la expresión transitoria del gen en células CHO (células de ovario de hámster) (22).

Además, de los receptores *scavenger* anteriormente descritos, se ha reportado la existencia de otro receptor para la OxLDL, llamado receptor de lectina tipo-1 para lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LOX-1) (19, 22) que corresponde a un receptor *scavenger* tipo E.

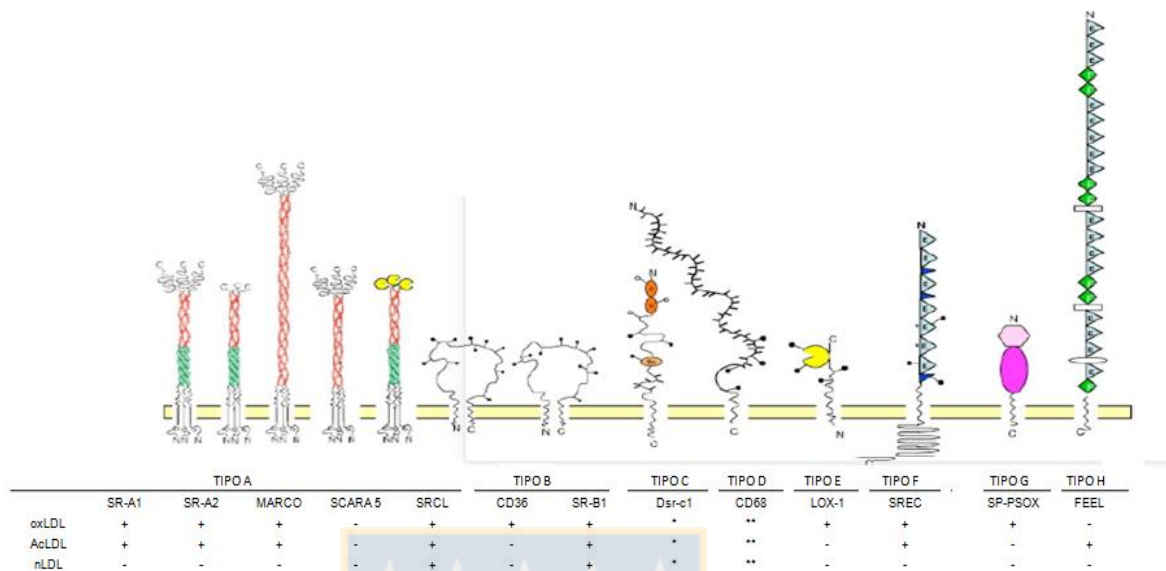


Figura 3. Clases de receptores scavenger.

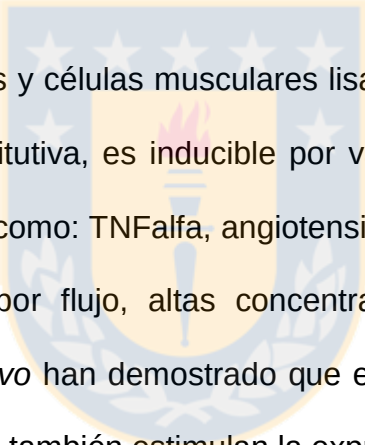
Estructura de los distintos tipos de receptor scavenger para LDL, desde clase A hasta clase H y su afinidad por OxLDL (LDL oxidada), AcLDL (LDL acetilada) y nLDL (LDL nativa). (22, 23)

Receptor de Lipoproteínas de baja densidad oxidada (LOX-1).

LOX-1 es una glicoproteína que pertenece a la familia de receptores de membrana tipo II que se caracteriza por tener un dominio tipo lectina. A nivel molecular, este receptor está compuesto por 4 dominios: un dominio N-terminal citoplasmático corto, un dominio transmembrana, un dominio de cuello y un dominio C-terminal extracelular encargado de interaccionar con oxLDL (24). Si bien la importancia de este receptor radica en su interacción con oxLDL, también tiene la capacidad de interaccionar con otros ligandos como productos de glicosilación avanzada, plaquetas y células apoptóticas (25).

Respecto a su localización, se ha descrito que LOX-1 se ubica en las caveolas, zonas ricas en colesterol en la membrana plasmática. Se ha comprobado que su función es modulada por colesterol, ya que frente a una depleción de colesterol se induce una deslocalización de LOX-1 lo que se traduce en una disminución en la interacción oxLDL/LOX-1, sugiriendo que los *cluster* de LOX-1 en los microdominios de la caveola son necesarios para que exista una interacción entre oxLDL y su receptor (26). La interacción entre oxLDL y LOX-1 se produce mediante la atracción entre cargas de ambas moléculas, por la cual LOX-1 no se une a LDL nativa (23, 27). La funcionalidad del receptor LOX-1 depende de la formación de un homodímero que aumenta su afinidad por las cargas positivas de la oxLDL (28). Esto se respalda mediante

evidencias que LOX-1 se une a oxLDL deslipidada, sugiriendo que se une a Apo B100. Sin embargo, se ha determinado que LOX-1 se une con mayor afinidad a LDL mínimamente oxidada más que a oxLDL altamente oxidada, por lo tanto esto sugiere que LOX-1 tiene la capacidad de interaccionar con lípidos oxidados mediante la unión a la proteína apoB100, los cuales no son removidos por deslipidación (25,26). LOX-1, inicialmente fue descrito como el receptor que se une oxLDL en células endoteliales, pero luego se descubrió que también se



expresa en macrófagos y células musculares lisas (26). Si bien la expresión de este receptor es constitutiva, es inducible por varios estímulos aterogénicos y proinflamatorios, tales como: TNF α , angiotensina II, Lisofosfatidilcolina (LPC), homocisteína, estrés por flujo, altas concentraciones de glucosa y oxLDL. Además, estudios *in vivo* han demostrado que estímulos fisiopatológicos como diabetes e hipertensión también estimulan la expresión de este receptor (29).

LOX-1 se encuentra expresado en casi todos los tipos celulares relacionados al desarrollo del proceso aterosclerótico (células endoteliales, macrófagos y células musculares lisas), produciendo modificaciones en el fenotipo de éstas hacia una forma proaterogénica (30).

Evidencias de la participación de LOX-1 en aterosclerosis se han obtenido a partir de modelos transgénicos. Uno de ellos, es el modelo de ratón LOX-1 knock out, donde aortas de estos ratones se sometieron a estudios de

vasodilatación, observándose que responden mejor a la acetilcolina en presencia de oxLDL que los ratones control. La vasoconstricción en ratones control se revirtió con el uso de un anticuerpo anti LOX-1 , reforzando la observación anterior mejorándola significativamente (25). Histológicamente, en ratones LOX-1 knock out disminuye la formación de estrías lipídicas y la oclusión del vaso en comparación con ratón *wild type*. El efecto inverso se observó en ratones LDLR knock out los cuales sobreexpresan LOX-1, donde las estrías lipídicas aumentaron drásticamente y se observó oclusión del vaso (23).

Paralelamente, otros investigadores realizaron la sobreexpresión de LOX-1 en ratones Apo E knock out, generando un ratón Tg/Apo E knock out y en quienes, como consecuencia, aumentó la expresión de moléculas de adhesión, infiltración de macrófagos y depósito lipídicos en la aorta, todos eventos relacionados directamente con la promoción de la aterosclerosis (31).

Gen OLR-1

El gen OLR1 está localizado en el cromosoma 12p13 en humanos y tiene un tamaño de 7000pb, está compuesto por 6 exones y 5 intrones. El exón 1 codifica para la región citoplasmática, el exón 2 codifica para el dominio transmembrana, el exón 3 codifica para el cuello y el exón 4,5 y 6 codifican para el dominio tipo lectina. Se han descrito 7 mutaciones de nucleótido simple (SNP): uno de ellos en la región codificante, es decir, en el exón 4 y 6 de ellos en la región no codificante, es decir, en el intron 4, 5 y 3'UTR. Estos 6 polimorfismo de la región no codificante se han denominado "bloque de desequilibrio". Así, esta región determina un genotipo de riesgo que promueve la susceptibilidad a infarto agudo al miocardio (IAM) (32). Si bien, los SNP no afectan la secuencia codificante del gen OLR1, existe una posibilidad que estén formando un producto alternativo, es decir, isoformas del ARNm como consecuencia de un *splicing* alternativo. Efectivamente, en el año 2005 se demostró que esta región da origen a un *splicing* alternativo generando una variante trunca del gen OLR1, el transcrito NM_001172633, que tiene un tamaño de 1008 pb y que carece del exón 5. Por lo tanto, a nivel de proteína, se traduce en una alteración del dominio extracelular que permite unir oxLDL. A esta proteína truncada se le denominó **LOXIN** (32, 33). En efecto LOXIN carece del dominio de lectina tipo-C, lo cual impide la unión a su ligando y forma un heterodímero inactivo con LOX-1.

El gen OLR1 también da origen a otras 2 variante de *splicing*, el OLR1D4 y OLR1, ambos productos no se han asociado con ninguna función biológica ni patología.

A partir de OLR1 se origina el transcrito NM_002543 y corresponde a la transcripción de todo el gen OLR1. Se caracteriza por ser la variable de *splicing* más grande del gen, ya que tiene un tamaño de 2462 pb y se compone de los 6 exones. Respecto a su distribución, se ha detectado en tejido cerebral y también se ha descrito en células de cáncer de colon (34).

Por ultimo, se encuentra el transcrito NM_001172632, originado a partir de la variante OLR1D4, que debido a su codón STOP anticipado se genera un transcrito corto de 950pb que carece del exón 4. Como consecuencia de lo anterior se da origen a un LOX-1 putativo, la proteína LOX1D4 que se caracteriza por la pérdida del dominio C-terminal y por lo tanto no puede interaccionar con ligandos. La distribución del gen OLR1D4 fue mínima en comparación con los otros transcritos ya sea en cerebro, aorta y líneas células de cáncer de colon (34).

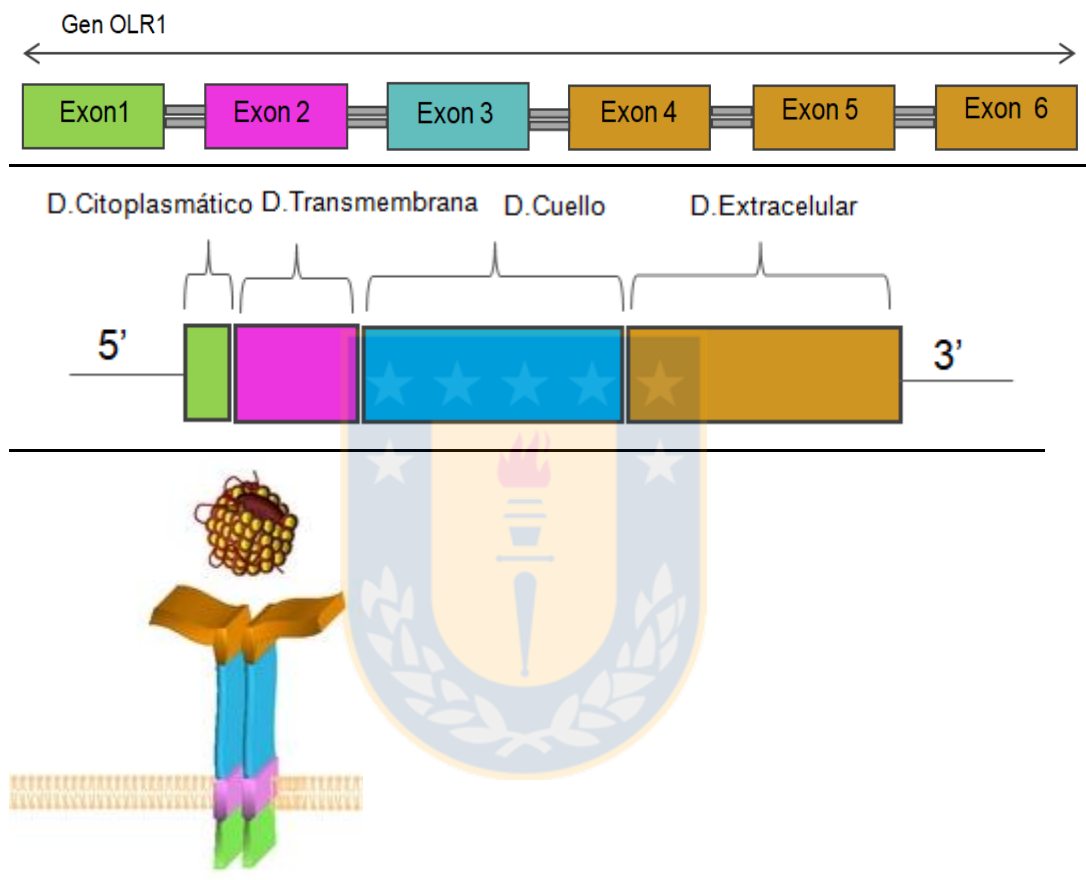


Figura 4. Estructura de gen *OLR1* y la proteína *LOX-1*.

El gen *OLR1* tiene 6 exones y 5 intrones. Cuando los 6 exones son transcritos, se obtiene el ARNm que codifica para los distintos dominios de la proteína: cercano al 5' se encuentra el dominio citoplasmático, dominio transmembrana, dominio de cuello y dominio extracelular. La figura inferior muestra un dímero transmembrana con un dominio intracelular y una dominio extracelular (32)

Regulación del *splicing* del gen OLR1

Existe un creciente consenso que la eficiencia del *splicing* puede ser un significativo contribuyente a la variabilidad fenotípica. Además, el *splicing* alternativo favorece la gravedad y susceptibilidad de enfermedades humanas (35)

Siete diferentes polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) en el gen OLR1 han sido descritos: situado dentro del intrón 4 (rs3736232 G>C; rs3736234 C>T; rs3736235 A>G), intrón 5 (rs17174597 A> G; rs13306593 G> T) y el 3' UTR (rs1050283 C> T) (32, 36). La configuración genotípica de estos SNPs puede generar dos haplotipos diferentes: Uno denominado de "Riesgo" (CTGGTT) y se relaciona con una mayor posibilidad de desarrollar IAM en comparación con el otro haplotipo denominado "Sin riesgo" (GCAAGC) (32).

Ensayos de qRT-PCR realizados en ARN total de macrófagos derivados de monocitos humanos de pacientes con enfermedad coronaria CAD portadores del haplotipo "Riesgo" y "Sin riesgo", demostraron una diferencia significativa en el ratio ARNm OLR1/LOXIN en correlación con su haplotipo. Por ejemplo, sujetos homocigotos con haplotipo "Riesgo" muestran una mayor ratio OLR1/LOXIN en comparación con los homocigotos para el haplotipo "Sin riesgo"(29, 32, 37). Así, la mayor expresión del transcripto LOXIN en sujetos

portadores del haplotipo "Sin riesgo" sugiere un vínculo negativo entre los niveles de LOXIN y la incidencia de IAM en humanos, retratando a LOXIN como una isoforma de *splicing* "protectora" en las patologías cardiovasculares (33, 38). Recientemente, Tejedor et al., evaluó la contribución de cada SNP intrónico en la regulación del *splicing* alternativo de OLR1. Tejedor generó dos series de constructo de minigenes mutantes que contienen las secuencias genómicas definidas como "Riesgo" (CTGGTT) y "Sin Riesgo" (GCAAGC). Mutagénesis sitio-secuencial de cada SNP en mini genes de riesgo o no riesgo reveló que la mutación de SNPs rs3736234 (intrón 4) y rs13306593 (intrón 5) mostró los efectos más importantes sobre la regulación del *splicing* alternativo de OLR1. De hecho, la transición de C>T de rs3736234 en el mini gene "Sin Riesgo" dio como resultado un aumento muy significativo de la inclusión del exón 5, aumentando la expresión de longitud completa de OLR1, mientras que el cambio recíproco en el mini gene de "Riesgo" causó la disminución más fuerte en la inclusión del exón 5 correspondiente a una expresión de LOXIN más alta. Esta aproximación claramente demuestra la implicancia de SNPs específicos (particularmente rs3736234) en la regulación del *splicing* alternativo en *OLR1*.

Heterodímero LOX-1/LOXIN

Como se ha mencionado anteriormente, LOXIN es una variante trunca del receptor LOX-1, que puede formar un heterodímero con LOX-1, el cual no tiene la capacidad de unir y/o internalizar oxLDL. En efecto, recientemente, se ha demostrado que el receptor LOXIN hetero-oligomeriza con LOX-1, y que esta unión sería el mecanismo por el cual LOXIN ejerce su función protectora, bloqueando así la activación de LOX-1 (38). Así, debido a la capacidad de LOXIN a dimerizar con LOX-1, es posible que pueda tener un rol protector que impida la captación de oxLDL y posterior activación de las vías de señalización dependientes de receptor. Por lo tanto, la formación del heterodímero LOXIN/LOX-1 representaría un modelo de regulación endógena de LOX-1 (29, 33). Estudios *ex vivo* muestran que macrófagos de sujetos que poseen los alelos "Sin riesgo" del gen OLR1 poseen una expresión aumentada de LOXIN resultando en la protección del proceso apoptótico mediado por oxLDL (28). En estudios *in vitro* en cultivos celulares, se ha demostrado que los efectos pro-apoptóticos del receptor LOX-1 son prevenidos por la co-expresión de LOXIN (28). Estudios de co-inmunoprecipitación confirmaron la interacción LOXIN/LOX-1 y la formación de hetero-oligómeros no funcionales. Además, cuando se co-transfectaron células COS-7 con el receptor LOX-1 completo y LOXIN, se observó una marcada disminución en la unión e incorporación de la oxLDL. Por otra parte, estudios *in vivo* también abalan las observaciones

descritas anteriormente en un modelo de ratones ApoE knock out (39). En este modelo, se demostró que la sobreexpresión de LOX-1 promueve la aterogénesis en arterias carótidas de ratones hiperlipémicos ApoE knock outy como LOXIN es capaz de inhibir el desarrollo de la aterosclerosis inducida por la sobreexpresión de LOX-1. Estos resultados se relacionan con los datos obtenidos a partir de pacientes con haplotipo de “Sin riesgo” donde la presencia de los SNPs incrementan la expresión de LOXIN y poseen una menor tasa de síndromes coronarios agudos (32)

La formación de la placa aterosclerótica corresponde a la etapa final de una serie de sucesos que comienzan con las modificaciones de la LDL y disfunción endotelial. La oxLDL actúa sobre células endoteliales, mediante un aumento de la formación de especies reactivas del oxígeno, disminución en la actividad y expresión de la sintasa de óxido nítrico endotelial, aumento en actividad y expresión de metaloproteinasas de matriz, proliferación celular, apoptosis y disminución de la adhesión celular entre otros (30, 41). Recientes estudios de nuestro laboratorio sugieren que la sobreexpresión de LOXIN en células progenitoras endoteliales humanas ejerce una actividad anti-apoptótica , lo cual eventualmente promueve la revascularización de la arteria aorta frente a diversos eventos patológicos . Si bien hay evidencia que sugiere la importancia de LOXIN en el desarrollo de la placa aterosclerótica, los datos *in vivo* que demuestren esta asociación son insuficientes. Por ello, la sobreexpresión de

LOXIN en un modelo animal aterogénico surge como una alternativa válida para evaluar esta relación.

Vectores adenovirales

El uso de vectores adenovirales como herramienta de expresión génica tiene la ventaja de infectar todas las células, independiente si éstas se encuentran o no en división celular. Los vectores adenovirales están compuestos por una cápside icosaédrica que envuelven su genoma, un ADN de doble hebra lineal de aproximadamente 36.000pb que codifica 35 proteínas expresadas en distintas fases de infección (42). En la fase temprana, fase que ocurre antes que se inicie la replicación de ADN viral, se expresan alrededor de 25 proteínas que permiten tomar el control de la célula hospedadora. En la fase tardía se expresan proteínas estructurales del virus. El adenovirus más utilizado con este objetivo es el Ad5, especialmente el Ad5 de replicación defectiva, ya que éste reemplaza las proteínas E1A y E2B (esenciales para la fase temprana) por un promotor de alta tasa de replicación como el CMV (43).

La limitación del uso de vectores adenovirales para terapia génica se debe principalmente a su corta duración de expresión y la falla en la reinyección a causa a la respuesta inmune, a pesar que existen otros investigadores que

afirman que la duración efectiva de la infección puede ir desde 15 semanas hasta 17 semanas (44).

Los antígenos del adenovirus son las proteínas de la cápside: hexon (regiones hipervariables), fibra y base pentona. El inicio de la respuesta inmune innata es 6 horas después de la inyección de la cola y va dirigida contra proteínas de la cápside. La respuesta adaptativa está a cargo de linfocitos T CD4+ que van dirigidos contra epítopes del hexon. La inducción de la respuesta inmune va de la mano con la expresión de moléculas proinflamatorias IL-6, IL-12, TNFalfa, IFN gamma (43).

Uso de adenovirales en el estudio de aterosclerosis La sobreexpresión de LOX-1 y LOXIN utilizando vectores adenovirales se ha realizado en estudios *in vitro* con el objetivo de caracterizar la interacción entre ambos variantes del gen OLR1 . Al sobreexpresar ambos vectores en células COS se observó un cambio en la localización de LOX-1, ya que se obtuvo una disminución de LOX-1 en la membrana celular AL co-incubar con LOXIN. Respecto a la funcionalidad del dímero LOX-1, al co-incubar con el vector LOXIN se vio una disminución en la incorporación de dil-oxLDL cuando se co-incubaron con LOX-1/LOXIN (28).

Respecto a evidencias utilizando modelos aterogénicos, ratones Apo E knock out se infectaron con adenovirus LOX-1 y se observó una disminución del

lumen de la aorta producto de la oclusión provocada por la placa, en comparación con ratones inyectados con el vector vacío. Por otra parte, también intentaron co-infectar LOX-1/LOXIN y determinar si existía un efecto positivo en la formación de la placa, sin embargo, la coinyección no disminuyó el tamaño de la placa como se esperaba (estadísticamente no significativo) (39).

En resumen, existen escasas evidencias *in vitro* del rol protector de LOXIN frente al proceso aterosclerótico, además se desconoce el comportamiento de LOXIN en un modelo animal. En este contexto, la pregunta de investigación es:

¿Es capaz LOXIN de inhibir la formación de la placa aterosclerótica en un *modelo in vivo*?



HIPOTESIS

LOXIN disminuye la expresión de LOX-1 e inhibe la formación de la placa aterosclerótica en ratones alimentados con una dieta alta en grasa.

OBJETIVO GENERAL

Investigar si la disminución en la expresión o inactivación de LOX-1 mediada por la sobreexpresión de LOXIN previene la aterosclerosis en ratones alimentados con una dieta alta en grasa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar in vitro si la proteína LOXIN es capaz de dimerizar con LOX-1 en una línea celular de hepatocito de rata.
2. Desarrollar un modelo animal aterogénico, utilizando ratones ApoE^{-/-} y C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasa.
3. Establecer si la proteína LOXIN es capaz de disminuir la expresión LOX-1 en la pared vascular de ratones C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasa.
4. Establecer si la proteína LOXIN es capaz de inhibir la formación de placa aterosclerótica en aorta de ratones C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasa.

METODOLOGÍA

Obtención de LDL oxidada

Las muestras de sangre fueron recolectadas desde pacientes sanos que cumplan con los siguientes criterios: sanos, normolipémicos, normoglicémicos y no fumadores, previo ayuno estricto de 10 horas. El plasma se obtuvo por centrifugación a 2000g por 10 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se le agregó 1 mL de preservante de Alaupovic (ácido ϵ -aminocaproico 1M, EDTA 10%, glutatión 5%, penicilina 10000 U/mL, streptomycin 10000 μ g/mL) por cada 100 mL de plasma. La separación de LDL se realizó mediante la ultra centrifugación secuencial, en primera instancia se centrifugó a 38000g por 20 horas a 15°C. A partir de esto, se obtuvieron dos fracciones, una que contiene los quilomicrones y VLDL, los cuales serán desechados y se trabajará con el infranadante, al cual se le realizó un ajuste de densidad con el bromuro de potasio y se centrifugó nuevamente. El anillo rico en LDL obtenido se dializó en Buffer Fosfato Salino 10 mM (PBS: 137 mM NaCl, 2.7mM KCl, 1.8 mM KH_2PO_4 , 8.2 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4, 37°C) por 48 horas para eliminar el exceso de KBr. Posteriormente, se filtró a través de membranas de nitrocelulosa (0.45 Whatman), y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Generación de LDL oxidada (oxLDL)

Para la oxidación de la LDL, 1 mg de LDL se incubó durante 150 minutos con 10 μM de CuSO_4 en un volumen final de 200 μL a 37 °C. El seguimiento de la oxidación se realizó con el equipo Fluorímetro Biotek Synergy 2, por la determinación de dienos conjugados, midiendo la absorbancia de la muestra a 234 nm cada 2 minutos. Terminada las 2 horas, la reacción se detuvo con EDTA 2 mM y BHT 4.5 μM BHT (hidróxitolueno butilado) y la oxLDL se mantuvo a 4°C protegida de la luz.

Cultivo celular

La línea celular de hepatoma de rata H4-II-E-C3, se utilizó para realizar los estudios in vitro, ya que LOX-1 de esta especie no tiene la cisteína C140 (al igual que en ratones) , aminoácido responsable de formar un puente disulfuro que estabiliza el homodímero LOX-1 humano, Esta línea celular se incubó con medio DMEM 10%SBF, 1% glutamina, 1% penicilina-estreptomicina. Al alcanzar un 80% de confluencia las células se trataron con tripsina 1x durante 2 minutos a 37°C y se incubaron nuevamente con medio. La línea celular de cáncer de próstata humano, DU-145 se utilizó como control positivo de expresión de LOX-1. Esta línea celular se cultivó con medio RPMI 5%SBF, 1% glutamina 1% penicilina-estreptomicina. Al alcanzar un 80% de confluencia las

células se trataron con tripsina 1x, durante 2 minutos a 37°C y se incubaron nuevamente con medio.

Ensayo de viabilidad

Se evaluó la viabilidad celular utilizando el reactivo MTT según lo descrito anteriormente por Veas et al., 2016 (40)

Para esto se disolvió 1 mg/mL de MTT en agua y luego se adicionaron 10 µL de esta solución a las células en cultivo. Posteriormente, se incubaron con el reactivo durante 4 horas y se procedió a realizar la disolución de cristales de MTT utilizan 100 µL de Dimetilsulfóxico (DMSO). Finalmente, la absorbancia fue medida a 540 nm en un espectrofotómetro.

Obtención del adenovirus LOXIN

En el laboratorio se ha generado el vector AdoLOXIN siguiendo el protocolo publicado en Veas et al.,2016.(40) Esta metodología fue sugerida para el sistema AdEasy™-Vector System (Quantum Biotechnologies, EE.UU.) Se diseñó el plásmido basado en la secuencia nucleotídica y se envió a sintetizar a la empresa (BlueHERon Price, USA) obteniendo como producto el plásmido de nombre pMK-LOXIN. La subclonación se realizó en el vector pAdTrack mediante el uso de ligación enzimática. La generación del vector adenoviral

recombinante se hizo a partir del plásmido y el vector recombinante pAdTrack-CMV/LOXIN (15 µg) se linealizó con la enzima EcoRI (New England Biolabs) y la banda correspondiente se purificó desde gel de agarosa 1% mediante el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, EE.UU). Posteriormente el vector fue coelectroporado junto con el plásmido pAd-Easy-1(Quantum Biotechnologies, EE.UU) en E.coli BJ5183. La selección positiva de la recombinación homóloga se realizó a partir de placas con kanamicina y por análisis de restricción con las enzimas PaeI (New England Biolabs). Los plásmidos recombinantes positivos se transformaron para su expansión en E.coli Top10 purificándose desde maxipreps por columnas NucleoBond® Xtra Midi kit.

Para la generación de las partículas adenovirales, el plásmido recombinante (30 µg) se cortó con la enzima PaeI, posteriormente se purificó el vector mediante precipitación con etanol y se resuspendió el precipitado en 30 µL de buffer TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris-Cl, pH 7.5). La cuantificación del plásmido obtenido se realizó por espectrofotometría a 260 nm.

Amplificación de partículas virales

La amplificación de Ado-LOXIN y Ado-MOCK se llevó a cabo utilizando células HEK-293 al 70% de confluencia, las cuales se incubaron con el virus durante 6-8 horas en medio de cultivo DMEM 10% SBF y posteriormente se retiró el medio y se reemplazó por DMEM 3% SBF. Pasado 24 horas, las células fueron

visualizadas en un microscopio de fluorescencia donde se observaron en verde las células infectadas, producto del GFP anclado al vector. Una vez que la totalidad de las células se infectaron, se recolectaron y centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos. Al pellet obtenido se le adicionó medio sin suero y para inducir la liberación del virus se pasaron por tres series de congelación y descongelación, con el objetivo de lisar las células y obtener el virus en el sobrenadante. Posteriormente, los restos celulares fueron precipitados a 2500 rpm, los sobrenadantes que contienen el virus recolectados y almacenados a -80°C hasta su uso.

Obtención del título de partículas virales

El virus obtenido de la amplificación se tituló a partir de una dilución 1/40, desde la cual se realizaron diluciones seriadas. Luego, se tomaron 40 µL de cada dilución y se adicionaron a una placa de 96 pocillos que contiene 10.000 células por pocillo de células HEK 293 y se completaron a 200 µl con DMEM sin suero. Pasado 48 horas se realizó un conteo celular hasta el último pocillo que muestre fluorescencia.

Finalmente, se utilizó la siguiente fórmula para obtener el título (40)

$$(N^{\circ}\text{cel. GFP}^{+} \times 5^n \text{ pocillo}) \times 1000$$

Determinación de la multiplicidad de infección (MOI)

La obtención del MOI permite determinar la concentración de virus que produce mayor expresión de la proteína de interés LOXIN, sin general efecto citopático en la células en estudio. Para esto se utilizó una placa de 96 pocillos y se contaron 10.000 células H4-II-E-C3/pocillo. Luego de 24 horas, las células se incubaron con: 0.25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 y 300 UFC/ml, en DMEM 5% SBF y se evaluó mediante microscopía de fluorescencia la expresión de LOXIN(GFP) y la citotoxicidad celular visualizando la morfología. Paralelamente, se recolectaron las células y se obtuvieron las proteínas totales con el objetivo de hacer un western blot contra LOX-1/LOXIN y verificar la expresión de la proteína.

Purificación del adenovirus mediante gradiente de CsCl

Para realizar el gradiente discontinuo se prepararon dos soluciones de Cloruro de Cesio(CsCl): 1,2 (26,8 g CsCl + 92 ml de 10 mM Tris-HCl pH 7,9) y 1,4 (53 g CsCl + 87 ml de 10 mM Tris-HCl pH 7,9). Luego, con ayuda de una pipeta pasteur se adicionaron 8 ml del 1,4 en un tubo de ultracentrífuga y posteriormente se adicionaron 6 ml del 1,2. Sobre las soluciones el CsCl, se agregó el virus. Finalmente, se realizó una ultracentrifugación a 23.000rpm por 90 minutos. Terminada la centrifugación se eliminó la parte superior del gradiente que corresponde a impurezas. En la porción intermedia del gradiente

se observó un anillo donde se encuentra el virus, el cual se recolectó y se dializó a 4°C con tres cambios de la solución: 10mM pH 8 Tris-HCl, 4% sacarosa, 2mM de MgCl₂. El virus purificado se almacenó a -80°C hasta su uso.

Extracción de proteínas totales

Previo a la extracción de proteínas, las células se rasparon en PBS 1x y luego se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos. Después se utilizó el buffer comercial RIPA al que previamente se le adicionaron inhibidores de proteasas. Esta solución se agregó a un pellet de células, las cuales se resuspendieron en buffer RIPA frío y se incubaron durante 15-30 minutos. Finalmente, el lisado celular fue centrifugado a 14000g durante 15 minutos para eliminar los restos celulares y se recolectó el sobrenadante y se almacenó a -20°C. La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el kit Pierce BCA Protein, siguiendo las indicaciones del fabricante. Un volumen de 20 µL muestra se adicionan a una solución que contiene el reactivo A y B en proporción 50:1 y se incubaron durante 30 minutos a 37°. Pasado el tiempo de espera, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro. La curva de calibración se realizó con BSA a distintas concentraciones.

Inmunoprecipitación

Las células se recolectaron después de 24 h de transfección. Posteriormente se lavaron dos veces con PBS frío y se lisaron durante 30 min con el buffer de lisis EB que contiene: 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% Nonidet P40, 0.5% deoxicolato de sodio, e inhibidores de proteasa (0.1 mM AEBSF hydrochloride, 0.5 μ M aprotinin, 5 mM Bestatin, 1.5 μ M E-64, 10 μ M Leupeptin, 1 mM Pepstatin A) y 1 mM PMSF. Los lisados se centrifugaron durante 15 minutos a 12.000 g a 4°C y los sobrenadantes se sometieron a inmunoprecipitación con IgG anti-myc de ratón unida a 30 μ l de perlas de proteína-A-Sepharose (Sigma). Las proteínas unidas se lavaron seis veces con solución salina tamponada con Tris (TBS, Tris 25 mM, NaCl 140 mM, pH 8) y una vez con Tris-Cl 5 mM pH 7,6, se eluyeron con tampón de muestra y se separaron mediante SDS- PAGE.

Ensayos de Western blot

Entre 30-50 μ g de proteínas totales se separaron en geles al 12% o 6%. Las proteínas se corrieron en un buffer de corrida a 100 v durante 2 horas. Luego el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa a 250 mA durante 90 minutos. La verificación de la transferencia se hizo con tinción 0,01% p/v Rojo Ponceau. La membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con leche 5% durante 1 hora y

luego se procedió a incubar con el anticuerpo primario anti-LOX-1 (1:2000, B&D systems) toda la noche a 4°C en agitación. Luego, la membrana fue lavada con TBS-Tween e incubada con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG (Abcam) durante 1 hora. Posteriormente, la membrana fue lavada y la presencia de la proteína fue detectada en el equipo LICOR utilizando líquidos de revelado en proporción 1:1. Para evaluar el control de carga, la membrana previamente tratada con buffer *stripping* comercial durante 15 minutos y luego se procedió a bloquear con leche 5% y se incubó con el anticuerpo primario dirigido contra β -actina (Santa cruz, 1:1000), Anti LOX-1 (Santa cruz 1:1000), Anti LOX-1 (F&D Systems 1:2000) y el anticuerpo secundario 1:10000 IgG anti mouse (Abcam) o IgG anti goat (Abcam), respectivamente durante 1 hora.

Inmunofluorescencia

Para la inmunofluorescencia, las células fueron plaqueadas sobre un portaobjetos que contiene Polisina 1x e incubadas toda la noche. En los ensayos que implican transducción y estimulación con oxLDL o LPC, las células fueron estimuladas con oxLDL (0, 1, 50, 100, 150 o 200 μ g/mL) o LPC (1 o 50 μ M) por 24 horas. Luego se procedió a fijar con 4% PFA durante 30 minutos y se lavaron con PBS 1x. Después, se realizó la permeabilización celular con Triton 0,5% durante 10 minutos y posteriormente las células se lavaron e incubaron con BSA 1%. Luego de 1 hora las células se lavaron y se procedió a

incubar con el anticuerpo ApoB100 (Abcam) 1:300 en BSA 1% en una cámara húmeda toda la noche. Después de los respectivos lavados con PBS 1x, se incubaron con el anticuerpo secundario (Alexa 488) 1:1000 durante 1 hora. Finalmente, se procedió a realizar lavados con PBS 1x y a montar con cubreobjetos con el medio de montaje Vectashield H-1500 para su posterior visualización en el microscopio de epifluorescencia.

Modelos aterogénesis

Los procedimientos descritos a continuación se realizaron bajo la supervisión del médico veterinario Rafael Maura, del Departamento de Fisiopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. Los desechos generados por la mantención, tratamiento y eutanasia se retiraron por la empresa MATPEL de acuerdo con el reglamento sanitario dictado por la Universidad de Concepción para el manejo de residuos peligrosos.

Respecto al protocolo de eutanasia los animales se sacrificaron por dislocación cervical posterior a la inhalación de isofluorano, previo a la comprobación que el animal no responde a estímulos y cuidando el seguimiento del “Protocolo de supervisión de animales de experimentación” de la Universidad de Concepción.

Animales ApoE -/-

Un total de 10 animales ApoE -/- (8-10 semanas de edad) y 20 animales C57BL/6 (8-10 semanas de edad) fueron obtenidos desde las instalaciones de la Facultad de Ciencia Biológicas de la Universidad de Concepción. Después de período de adaptación de 7 días, 5 de los ratones apoE-/- se alimentaron con una dieta alta en grasa (HFD, que contiene 1,25% colesterol, y 21% de grasa) o 5 con dieta normal (DN, que contiene 4% de grasa).

Genotipificación de ratones ApoE -/-

Mediante la técnica PCR se genotipificaron los ratones. El ADN se obtuvo a partir de 25 mg de la cola y se extrajo el ADN utilizando el kit QIAamp DNA Minikit. Los partidores que amplificaron son los indicados para ratones del modelo de Jackson 002050 especificados por el fabricante. La amplificación se realizó utilizando el kit Taq 2x Biolabs. El producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1,3% a 60v por 1h 30minutos.

Animales C57BL/6

Los estudios realizados en los animales C57BL/6, 10 ejemplares se alimentados con una dieta alta en grasa (HFD, que contiene 1,25% colesterol, 35% de grasa y ácido cítrico 0,25%) y 10 ratones alimentados con dieta normal (DN, que contiene 4% de grasa). El agua y alimentos se dispusieron *ad libitum* durante todo el estudio. Los animales C57BL/6 o ApoE -/- con Ado-LOXIN 5, se dividieron en cuatro grupos: 1) C57BL/6 alimentados con NFD que recibieron Ado-Mock (n = 5) y 2) C57BL/6 alimentados con NFD que se le inyectó Ado-LOXIN (n = 5); 3) C57BL/6 alimentados con HFD que se inyectaron con Ado-Mock (n = 5) y 4) C57BL/6 alimentados con HFD que recibió Ado-LOXIN (n = 5). Los animales se anestesiaron con ketamina/xilasina por vía intraperitoneal y cada semana, cada grupo recibió una inyección de adenovirus (LOXIN o modelos a escala) a través de la vena de la cola. Los virus se administraron por vía intravenosa en un volumen final de 60 µL a una dosis de 3×10^8 UFC/ml. Al final del experimento (semana 8), los animales se sacrificaron bajo anestesia con campana de isoflurano y toda aorta, corazón, hígado, pulmón se recolectaron y lavaron con PBS 1x para su visualización directa en el equipo LICOR, para determinar la localización del virus y posteriormente se fijaron en PFA 4%. Posteriormente, el tejido se fijó directamente en PFA 4%, y se trataron en parafina u OCT. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H & E) para la evaluación histológica o se utilizó inmunohistoquímica.

Paralelamente se recolectaron trozos de los órganos mencionados anteriormente y se almacenaron en ARN later para la posterior extracción de ARN mediante el método de Trizol. La integridad del ARN se visualizó en un gel de agarosa al 1% corrido a 60v por 30 minutos y la cuantificación se realizó en un Nanodrop. La obtención de cADN a partir del ARN se realizó con la Enzima Transcriptasa Reversa M-MULV y posteriormente se hicieron PCR utilizando partidores para LOX-1 de ratón, LOXIN, control de carga mLP 37.

Tabla 1 Partidores utilizados para el análisis de expresión por PCR

	Foward	Reverse
Mlp37	TCTTCCGGTCTCT TTGGCCT	CAAGCTCTTCAGC AATATCACG
Rlox-1	CAAGATGAAGCC TGCGAATGA	ACCTGGCGTAATT GTGTCCAC
LOXIN	GCATGGAGAAAA CTGTTACCT A	TCGGACTCTAAATC AGATCAG

Mlp 37 corresponde al control de carga y Rlox-1 y LOXIN son los genes en estudio.

Análisis de sangre.

La glucosa en sangre se determinó con el método de la glucosa oxidasa. El colesterol total (CT), colesterol HDL, LDL y triglicéridos (TG) se midieron enzimáticamente con kits comerciales.

Detección de IL-10

La detección de IL-10 se realizó mediante la técnica de Elisa sándwich utilizando el kit

BioLegend's ELISA MAX mouse IL-10 a partir de una muestra de suero, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Cuantificación de la formación de la lesión aterosclerótica.

Algunos de los ratones sacrificados mencionados anteriormente se aislaron sus aortas. El grado de aterosclerosis se evaluó en aortas abiertas longitudinalmente tratadas previamente con Oil red, según indicaciones del fabricante. Las imágenes de la aorta se analizaron utilizando el software image J.

Análisis histológico de tejidos fijados en PFA

Los tejidos se fijaron con paraformaldehído 4% por 3 horas y embebidos en parafina. Secciones de 6 micrómetros de grosor se trataron con Hematoxilina-Eosina para su visualización en microscopio óptico, de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Deshidratación, aclaramiento e inclusión en parafina.

Se procedió de la siguiente manera secuencial en:

1. Etanol 70% por 15 minutos (2 veces).
2. Etanol 95% por 15 minutos (2 veces).
3. Etanol 100% por 15 minutos (2 veces).
4. Etanol/Xilol por 15 minutos.
5. Xilol I por 15 minutos.
6. Xilol II por 15 minutos.
7. Parafina I por 30 minutos, a 60°grados.
8. Parafina II por 30 minutos, a 60°grados.
9. Parafina III por 1 horas, a 60°grados.
2. Confección del bloque de parafina.

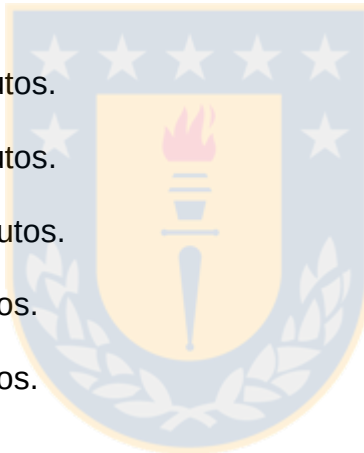
Luego, se colocó la pieza en un molde rectangular que contiene parafina fundida a 60°C, con su correspondiente identificación y se dejó enfriar durante 24 horas a 4 °C.

Finalmente, se realizaron cortes de 6 µm de grosor en micrótopo de las instalaciones de la Universidad San Sebastián. Los cortes se montaron en portaobjetos cargados y se dejaron secar en estufa a 37°C.

Desparafinización e hidratación

Los cortes se trataron en forma consecutiva en:

1. Xilol I, 10 minutos.
2. Xilol II, 10 minutos.
3. Xilol III, 10 minutos.
4. Etanol 100%, 5 minutos.
5. Etanol I 95%, 5 minutos.
6. Etanol II 95%, 5 minutos.
7. Etanol 70%, 5 minutos.
8. Etanol 50%, 5 minutos.
9. Agua destilada



Tinción con Hematoxilina-Eosina

Los portaobjetos se trataron con hematoxilina de Harris durante un 1 minuto, luego se retiró el exceso por lavado con agua corriente por 5 minutos. Posteriormente, se expuso a eosina durante 30 segundos y el exceso se retiró con agua corriente por 5 minutos. Los cortes histológicos se montaron utilizando

vectashield H-1500 (Vector laboratorios, Burlingame, CA) y se almacenaron a oscuridad a 4 °C hasta su observación en microscopio óptico.

Inmunohistoquímica de tejido

Luego de desparafinar las muestras en una batería de alcohol y xilol, el desenmascaramiento de los antígenos se realizó en EDTA pH 8 a 96°C durante 15 minutos. Después, las muestras se expusieron al bloqueo de sitios inespecíficos utilizando peróxido de hidrogeno 5% en PBS 1x. Tras terminar los lavados se bloquearon con BSA y se procedió a incubar con el anticuerpo primario 1:100 LOX-1 y se incubaron durante toda la noche. Finalmente, se incubaron con anticuerpo secundario 1:200 anti-cabra IgG durante 1 hora y se reveló utilizando DAB, para luego preceder con la observación al microscopio óptico.

Análisis histológico de tejidos congelados en OCT

El día de la eutanasia de los ratones se recolectaron los órganos y se embebieron en un cubículo que contiene el medio de inslusión para congelación OCT. Este cubículo se sumergió en isopentano hasta que se congeló. Posteriormente los tejidos se almacenaron en nitrógeno liquido. Para realizar los cortes de 10 µm de grosor, se descongelaron los cubículos y el

órgano preservado se moldeó nuevamente en OCT para generar un bloque que permita utilizar el criostato modelo Leica CM facilitado por la Universidad San Sebastián, los cortes se montaron en portaobjetos con carga positiva y se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media $\pm$ desviación estándar. Las comparaciones entre los grupos con los datos continuos se realizaron con la prueba t para datos distribuidos normalmente y con la prueba de Mann-Whitney para los que no tienen la normalidad distribución. La normalidad se determinó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Las comparaciones entre múltiples grupos se realizaron con ANOVA de una vía para los datos normales y con Kruskal-Wallis de una vía para los que no tienen una distribución normal. Las comparaciones entre grupos múltiples se realizó con ANOVA de dos vías. Un valor de $p < 0,05$ se considerará significativo.

RESULTADOS

Efecto de oxLDL y Lisofosfatidilcolina (LPC) sobre la viabilidad y

expresión de LOX-1 en células H4-II-E-C3

Para comprobar el efecto de oxLDL y Lisofosfatidilcolina (LPC), un componente de la oxLDL que se ha descrito como proaterogénico y promotor de la expresión de LOX-1 (45), se evaluó la viabilidad celular. Para esto se procedió a incubar las células H4-II-E-C3 por 24 hrs con estas moléculas y luego la viabilidad celular fue evaluada utilizando el reactivo Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) que mide la formación de cristales de formazán. A partir de las absorbancias obtenidas a 540 nm se graficó la viabilidad celular. En la Figura 5 A y B, se observa que la viabilidad comienza a disminuir significativamente a partir de los 100 µg/ml de oxLDL con una disminución de un 20%. Utilizando concentraciones de entre 150 – 200 µg/ml de oxLDL, las células vivas representan el 50 % del total de células (Figura 5A). Por otra parte, con el estímulo de LPC, se observa que 1 µM de este fosfolípido disminuye en un 10 % el número de células viables. Un efecto aún más importante fue observado en células incubadas con 50 µM y/o 100 µM, con una viabilidad de solo un 80% o 60%, respectivamente.

Para evaluar el efecto de oxLDL o LPC sobre los niveles de esta proteína LOX-1 en condiciones basales y bajo estímulos, se utilizó la técnica de western blot. A partir del resultado del western blot se observa una banda de 30 kDa que corresponde al peso molecular de LOX-1 reportado en bibliografía (Figura 6A) y la incubación con oxLDL o LPC induce un aumento en la expresión de LOX-1. La expresión relativa fue evaluada por análisis densitométrico. En la Figura 6B, se observa que concentraciones del orden de los 50 $\mu\text{g/ml}$ de oxLDL induce un aumento de 2.5 veces en los niveles de LOX-1 respecto a los niveles basales; concentraciones mayores no aumenta la expresión de este receptor, por el contrario se observó una disminución sobre 100 $\mu\text{g/ml}$. De igual modo el uso de 1 μM de LPC aumenta al doble la expresión basal de LOX-1, concentraciones superiores no cambia su expresión en comparación con las células sin tratar. A partir de los resultados expuestos en las Figura 5 y 6, se decidió utilizar las condiciones de oxLDL de 50 $\mu\text{g/ml}$ y de 1 μM LPC por 24 horas para realizar los experimentos posteriores.

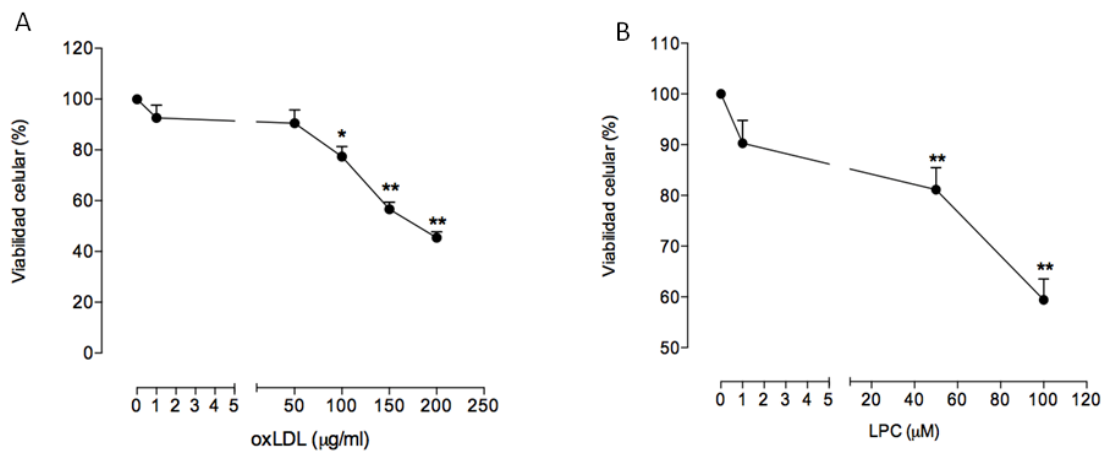


Figura 5. Efecto de oxLDL y Lisofosfatidilcolina (LPC) sobre la viabilidad de células H4-II-E-C3. Las células H4-II-E-C3 se incubaron durante 24 horas con oxLDL (A) o LPC (B) en concentraciones crecientes del reactivo. Pasado este tiempo de incubación, se realizó el ensayo de viabilidad utilizando el reactivo Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). La formación de cristales de formazán es proporcional a la viabilidad celular y éstos se cuantifican a 540nm (n=3). Fuente de figura: Elaboración propia.

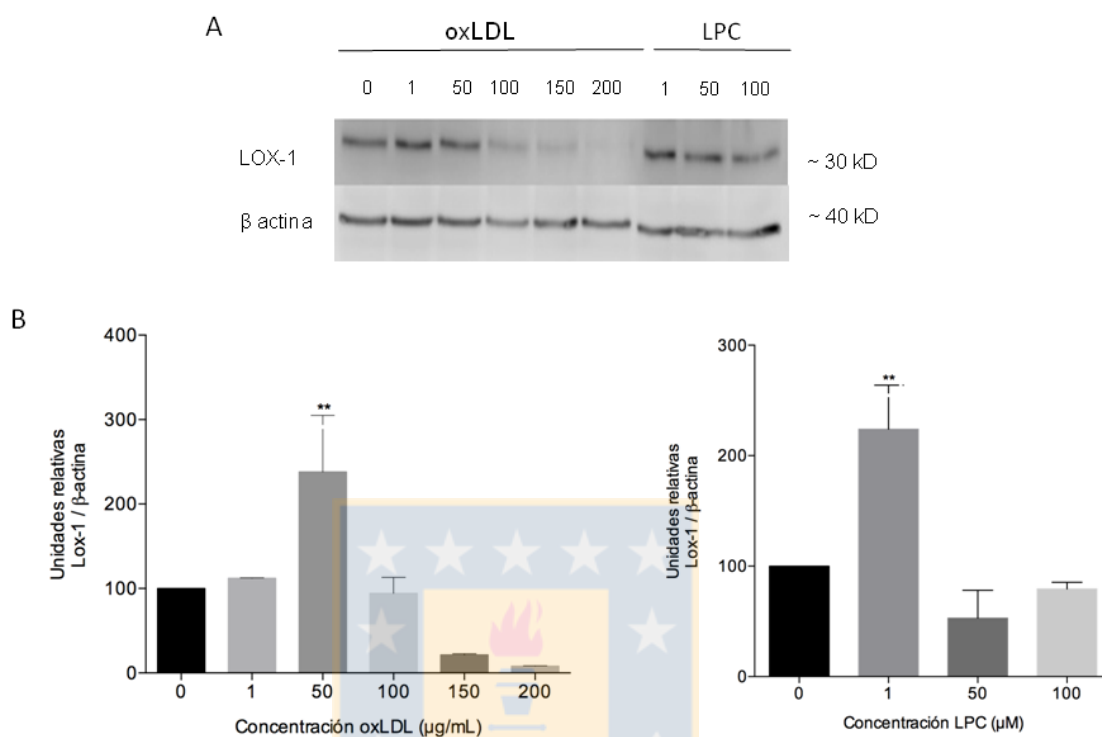


Figura 6. Determinación de la expresión de LOX-1 en células H4-II-E-C3 en presencia de LOX-1 y LPC.

La expresión de LOX-1 se obtuvo a partir de células H4-II-E-C3 incubadas durante 24 horas en presencia de oxLDL o LPC en concentraciones crecientes. En el western blot se utilizó 30 μg de proteínas en un gel de poliacrilamida. Después de la transferencia de proteínas a una membrana de PVDF se incubaron toda la noche con el anticuerpo anti-LOX1 o anti β actina 1 (A) La imagen inferior muestra la densitometría obtenida a partir de la razón expresión de LOX-1/expresión del control de carga (β actina).(B) (n=3). Fuente de figura:Elaboración propia.

Sobreexpresión de adoLOXIN en células H4-II-E-C3

Con el fin de evaluar el efecto de la proteína LOXIN humana sobre la expresión y funcionalidad de LOX-1 de ratón, se evaluó en células H4-II-E-C3 el efecto de la sobreexpresión de LOXIN utilizando un vector de expresión pAdTrack-LOXIN. pAdTrack-LOXIN es un vector adenoviral que porta el gen LOXIN y que ha sido utilizado previamente para la sobreexpresión de la proteína LOXIN. La estandarización de las condiciones de infección se realizó a partir de la multiplicidad de infección (MOI). La condición óptima se obtuvo a partir de la observación mediante microscopio de la fluorescencia emitida por GFP y paralelamente, se analizó mediante western blot la expresión de LOXIN. En la Figura 7A se observa una banda de 28 kDa correspondiente al peso molecular estimado de LOXIN y como los niveles de expresión aumentan, alcanzando su máximo de expresión a 200 UFC/ml.

Visualización de la incorporación de Apo B 100 en células H4-II-E-C3 mediante inmunofluorescencia

Con el objetivo de determinar si existe interacción entre el LOXIN humano y la proteína LOX-1 de ratón, de tal forma que se genere un heterodímero afuncional, se evaluó la internalización de oxLDL y la visualización de la proteína Apo B-100 presente en la oxLDL. Se realizaron dos inmunofluorescencias de células DU145, células de cáncer de próstata humano como control (Figura 8B) y en la línea celular células H4-II-E-C3 (Figura 8A). En la Figura 8 se visualizan los distintos marcajes, el azul corresponde a DAPI (tinción de núcleo), el verde corresponde a LOXIN ya que el vector tiene acoplada a la proteína fluorescente verde (GFP) y el rojo corresponde a la proteína Apo B100 marcada con el anticuerpo Alexa Fluor 592. En ambos tipos se observa que las células que sobreexpresan LOXIN (células verdes) no incorporan Apo B100 (marcaje rojo), por el contrario, las células que incorporan la Apo B100 no sobreexpresan el vector. A partir de esta observación obtenidas en células H4-II-E-C3 sigue que el dímero entre LOX-1 de rata/LOXIN humano se comporta como un heterodímero afuncional de LOX-1, similar a lo observado en células humanas.

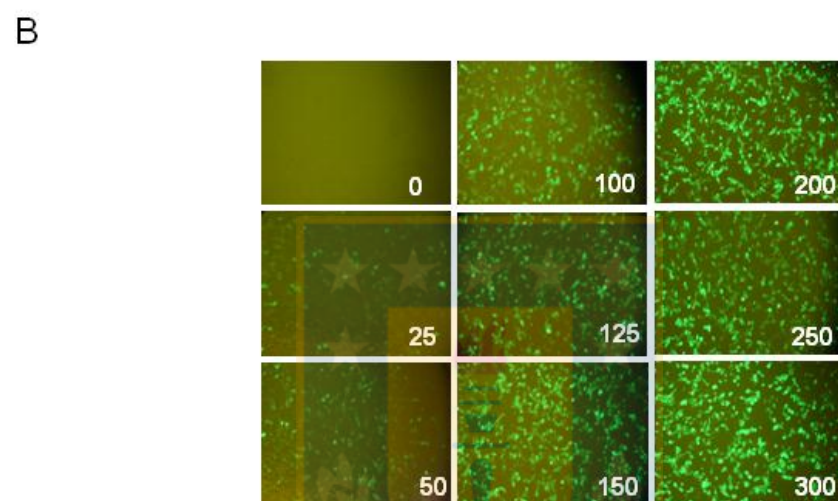
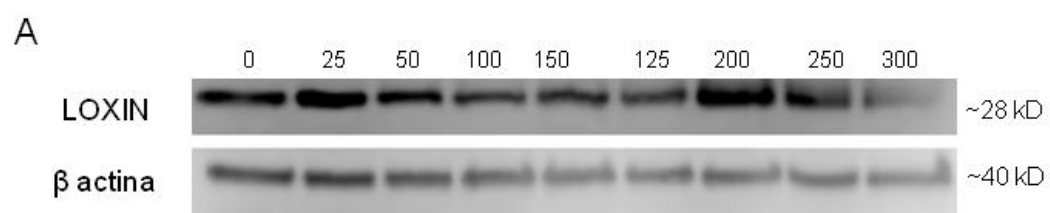
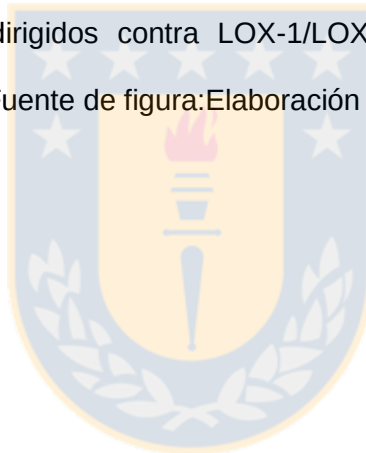


Figura 7. Determinación del MOI en células H4-II-E-C3.

La multiplicidad de infección (MOI) se obtuvo a partir del análisis de la expresión de LOXIN mediante western blot (A) y mediante la visualización de la fluorescencia de GFP (Proteínas Fluorescente Verde, acoplada al vector AdoLOXIN) (B). Las células se incubaron durante 6 horas con el vector AdoLOXIN a distintas concentraciones (UFC) y luego se reemplazó el medio y se mantuvo en cultivo durante 48 horas. Se realizó la visualización de la fluorescencia por microscopía (B). Posteriormente las células se lisaron y las proteínas se analizaron por western blot donde se reveló la membrana utilizando anticuerpos dirigidos contra LOX-1/LOXIN (Reconocimiento del dominio intracelular) o β -actina. Fuente de figura: Elaboración propia.



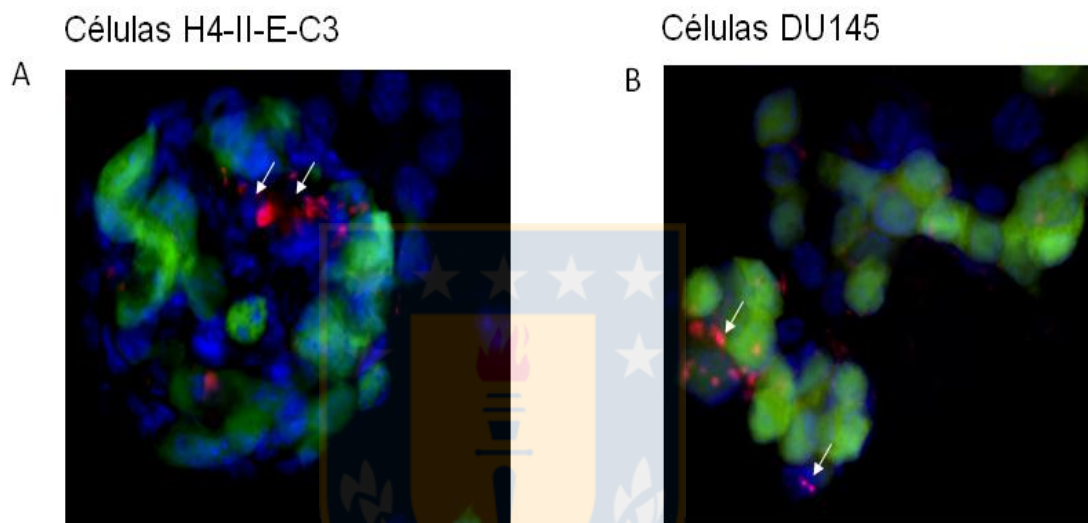


Figura 8. Ensayo de internalización de ApoB100 en células H4-II-E-C3 y DU145.

La internalización de Apo B100 se observó mediante inmunofluorescencia. Ambos tipos celulares se incubaron durante 48 horas con AdoLOXIN, 24 horas antes de la fijación con paraformaldehído las células se incubaron con oxLDL. El marcaje se realizó con DAPI (núcleo), Apo B100 (rojo) y GFP (Proteínas fluorescente verde, acoplada a AdoLOXIN). Las flechas blancas indican los depósitos de ApoB100 en células H4-II-E-C3 (A) o DU145 (B). Fuente de figura:Elaboración propia.

Inmunoprecipitación de LOX-1 humano /LOXIN en HEK 293

La formación del heterodímero LOX-1 de ratón/LOXIN se puede corroborar mediante la técnica de inmunoprecipitación. El control de dimerización que se utilizó son las células HEK 293 transfectadas con los siguientes plásmidos: plásmido que porta el gen de LOX-1 humano, plásmido que porta el gen de LOXIN acoplado a la proteína c-myc y el plásmido que porta a la proteína fluorescente verde (GFP). La estandarización de la transfección para las células HEK 294 se llevó a cabo utilizando el polímero catiónico polietilenimina (PEI) a distintos tiempos, donde a las 24 horas postransfección se ve un alto porcentaje de eficiencia de transfección (Figura 9A).

La inmunoprecipitación se llevó a cabo utilizando como método de precipitación inmunobeads de A/G agarosa acoplados al anticuerpo c-myc con el objetivo de precipitar el dímero a partir del c-myc que porta el plásmido LOXIN. Para el revelado se utilizó un anticuerpo dirigido para LOXIN/LOX-1. El resultado de la inmunoprecipitación (Figura 9B) muestra que utilizando el buffer EB se logró precipitar el dímero de interés, ya que entre la cadena liviana (22 kDa) y pesada (55 kDa) se observa un doble bandeo correspondiente a los pesos moleculares estimados de LOXIN (28 kDa) y LOX-1 (30 kDa).

Inmunoprecipitación de LOX-1 rata /LOXIN en H4-II-E-C3

Para determinar si existe formación de este dímero se realizó una mezcla entre estimulación y transfección, ya que por una parte se indujo la sobreexpresión de LOX-1 con el estímulo LPC 1 μ M durante 24 horas, y por otra parte se sobreexpresó LOXIN transfectando el plásmido LOXIN c-myc.

La estandarización de la transfección de células de hepatoma de rata consistió en probar varias técnicas ya que las células tuvieron nula transfección utilizando PEI (Figura 9C). Se probaron los reactivos Satisfaction Transfection y Lipofectamina 2000. En la figura 9C se observa que la mayor eficiencia se obtuvo mediante la utilización de Lipofectamina 2000 en comparación con el reactivo comercial Satisfaction transfection.

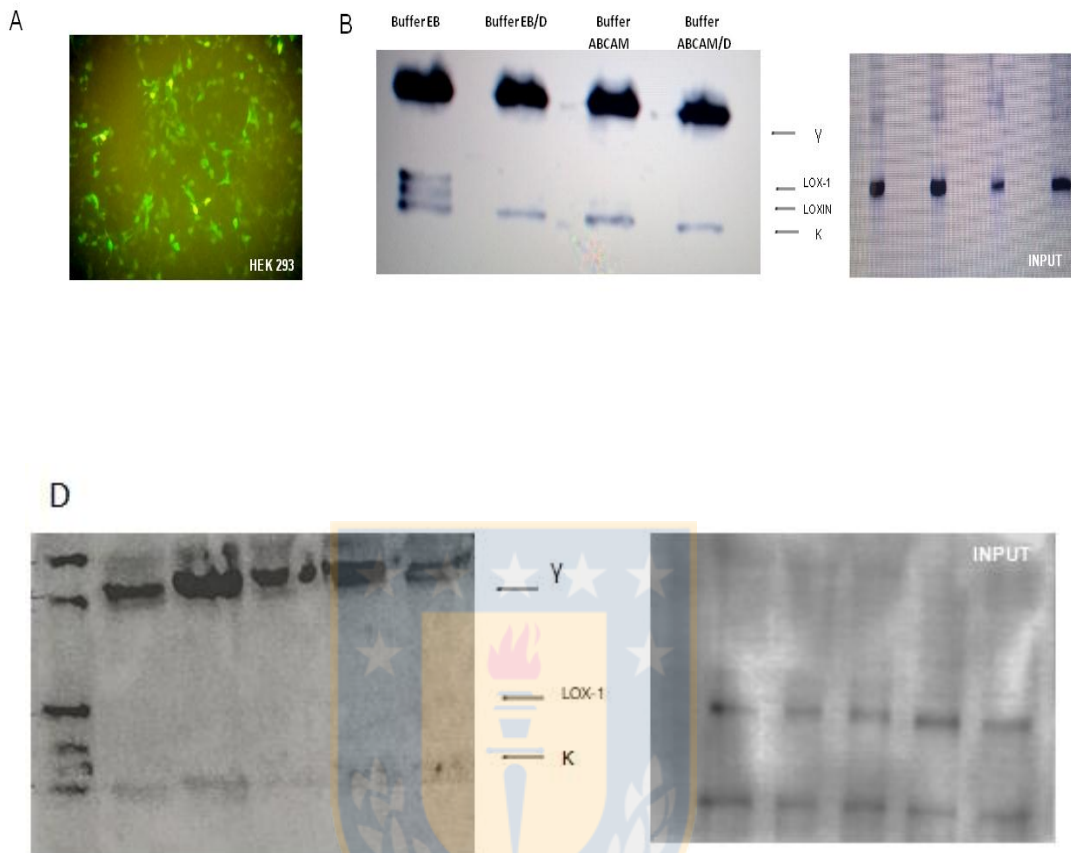


Figura 9. Inmunoprecipitación del dímero LOX-1/LOXIN en células HEK 293 y H4-II-E-C3.

Células HEK293 se transfectaron utilizando PEI con los plásmido en relación 1:1:0,5 LOX-1,LOXIN c-myc y GFP, a las 24 horas se observa alto porcentaje de transfección (A).Luego de 24 horas, las células se lisaron con los siguientes buffer de lisis: EB, EB/D, ABCAM, ABCAM/D) y se incubó con el anticuerpo c-myc durante 4 horas y toda la noche en presencia de los beads A/G agarosa.Finalmente se realizó un western blot utilizando el anticuerpo LOX-1/LOXIN y entre la cadena pesa y liviana de la IgG se observó un doble bandeo de 28kDa (LOXIN) y 30kDa (LOX-1).Su input se reveló con anticuerpo LOX-1 (B).Células y H4-II-E-C3 se transfectaron con el plásmido LOXIN c-

myc y GFP en relación 1:0,25 utilizando los siguientes reactivos: PEI, Satisfaction transfection y Lipofectamine 2000 (C). En paralelo se estimuló con LPC por 24 horas para sobreexpresar LOX-1. Las células se lisaron con los siguientes buffer: EB, EB/D, ABCAM, ABCAM/D. agarosa. Finalmente se realizó un western blot utilizando el anticuerpo LOX-1/LOXIN y no se observan bandas entre la cadena liviana y la pesada de la IgG. Su input se reveló con anticuerpo anti LOX.1 (D). Fuente de figura: Elaboración propia. Igual que en células HEK-293 se realizó la estandarización de la inmunoprecipitación, basándose en lo reportado en bibliografía. Lamentablemente, en esta inmunoprecipitación no se obtuvieron resultados positivos por problemas técnicos que se mencionarán en la discusión.

Estudios en modelos Animales.

Genotipificación de ratones Apo E Knock Out

El modelo de ratón Apo E Knock out ha sido ampliamente utilizado para el estudio de la aterosclerosis, ya que al carecer de la proteína Apo E, que participa en el transporte de colesterol, su déficit genera acumulación de colesterol en la sangre. El efecto que causa este déficit de Apo E en los ratones es la formación de lesiones ateroscleróticas (46)

Los animales fueron obtenidos a partir del bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. Antes de comenzar con los tratamientos, los animales fueron genotipificados por reacción en cadena de

polimerasa con partidores diseñados por Jackson laboratorio, para confirmar su genotipo Apo E Knock Out y descartar contaminaciones de la colonia.

Un total de 10 ratones presuntamente Apo E Knock out se genotipificaron, además de los controles del estudio: murinos heterocigotos obtenidos de la Universidad de Talca, murinos de las primeras generaciones de ratones Apo E Knock out (Control Homocigoto para Apo E knock out) y murinos C57BL6 (Control homocigoto sin la mutación).

A partir de los productos de PCR obtenidos se realizó una electroforesis en geles de agarosa. El resultado de la electroforesis (Figura 10A) muestran 3 patrones de bandeo: i) una banda de 155 pb que corresponde al gen de la Apo E en su estado nativo, el cual fue solo detectado en el producto de PCR del ratón C57BL6 utilizado como control negativo de la mutación en Apo E (carril WT). ii) una banda de 245 pb, tamaño que concuerda con el obtenido en bibliografía para ratones Apo E knock out (carril 1-10). Esta banda se observó en la totalidad de los ratones participantes en el estudio. iii) aquellas muestras en donde se encuentran ambos productos de PCR mencionados anteriormente por lo tanto corresponde a ratones heterocigotos (carril HE).

Ratones Apo E knock out alimentados con una dieta alta en grasas.

Una vez comprobada la pureza de las colonias Apo E knock out, los 10 ratones se dividieron en dos grupos: i) Ratones alimentados con una dieta normal (DN) y ratones alimentados con una dieta alta en grasas(HFD) similar a la descrita por otros autores. Antes de la alimentación los porcentajes de grasa de ambas dietas fueron confirmados en el Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. La dieta normal contiene un porcentaje de grasa de 1,4 % y la dieta alta en grasas un porcentaje de grasa de 15,6 %.

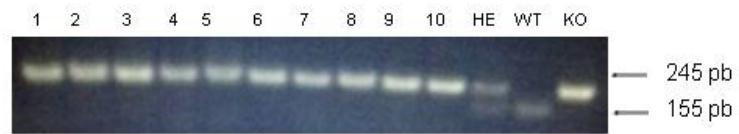
Ambos grupos se alimentaron durante 3 meses *ad libitum* y cada mes se tomó una muestra de sangre a través del seno retro-orbital para determinar parámetros bioquímicos: glucosa, colesterol y triglicéridos (Figura 10 B, C, D).

El análisis de los parámetros bioquímicos obtenidos arroja que no hubo cambios significativos en los niveles de glicemia y triglicéridos, sin embargo, los niveles de colesterol aumentaron significativamente en tiempo con ambas dietas, siendo aún mayor en aquellos animales alimentados con un 15,6% de materia grasa. El valor máximo de colesterol se observó a los tres meses, con niveles de colesterol cercano a 600 mg/dl.

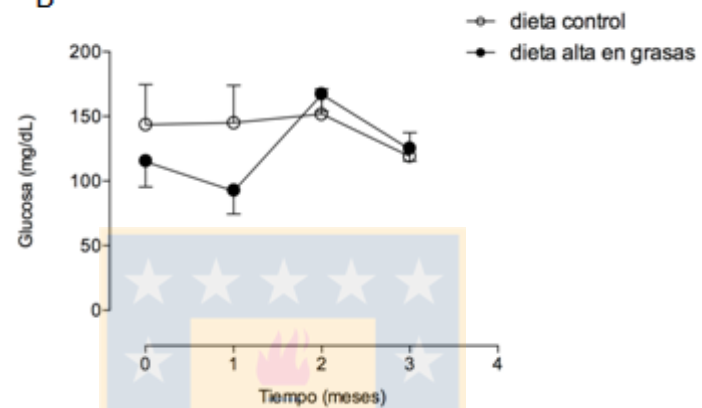
A partir del suero, también se determinó la liberación de la citoquina anti inflamatoria IL-10 a través de tiempo. Como se muestra en la Figura 11 los niveles de IL-10 aumentan a través del tiempo, pero este aumento es independiente de la composición de la dieta.

Una vez finalizado los 3 meses de estudio, los murinos se sacrificaron y se extrajeron las aortas, algunas de ellas fueron sometidas a un corte longitudinal para exponer el lumen y se procedió a visualizar macroscópicamente las presencia de estrías lipídicas con la tinción Oil Red. En la Figura 12 A se observa un aumento de la presencia de acúmulos de lípidos presuntivamente estrías lipídicas. Los análisis cuantitativos sugieren un aumento de 4 veces en la acumulación de lípidos en aquellos animales Apo E knock out alimentado con una dieta alta en grasa (Figura 12 B).

A



B



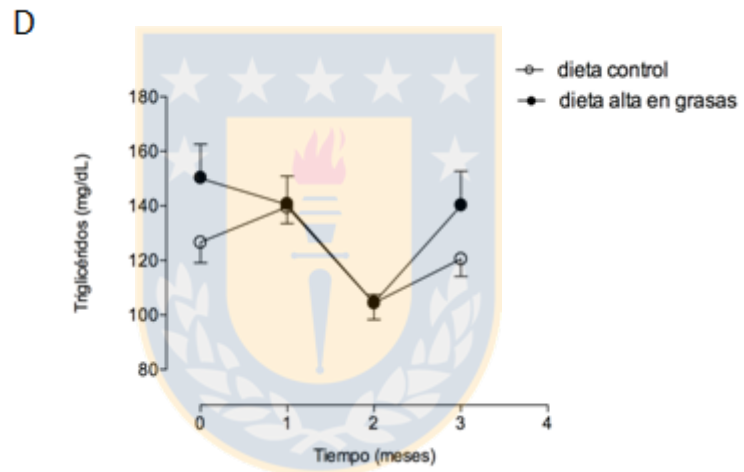
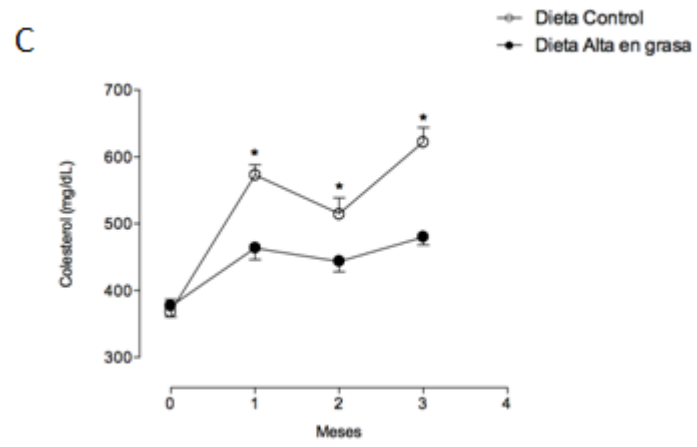


Figura 10. Análisis de sangre de ratones Apo E knock out alimentados con una dieta alta en grasas.

Previo a la dieta, se genotipificaron los 10 ratones hembras participantes en el estudio. A partir de 25 mg de cola se extrajo ADN y mediante PCR se amplificaron los partidores que dan productos de amplificación de 245pb y 155pb los cuales se visualizaron en un gel de agarosa. Los números del 1 al 10 indican los ejemplares participantes y HE (control heterocigoto), WT (C-57 no mutado), KO (Apo E knock out de generaciones anteriores (A). 10 ratones hembras Apo E Knock out , se dividieron en dos grupos 5 ratones ND y 5 ratones HFD, los 10 ejemplares se alimentaron durante 3 meses y se tomó una muestra de sangre a partir del seno retro orbital , a tiempo 0 (día antes del inicio de la dieta) y cada un mes durante 3 meses. A partir del suero se cuantificó los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol mediante kits comerciales (n=10). Fuente de figura:Elaboración propia.

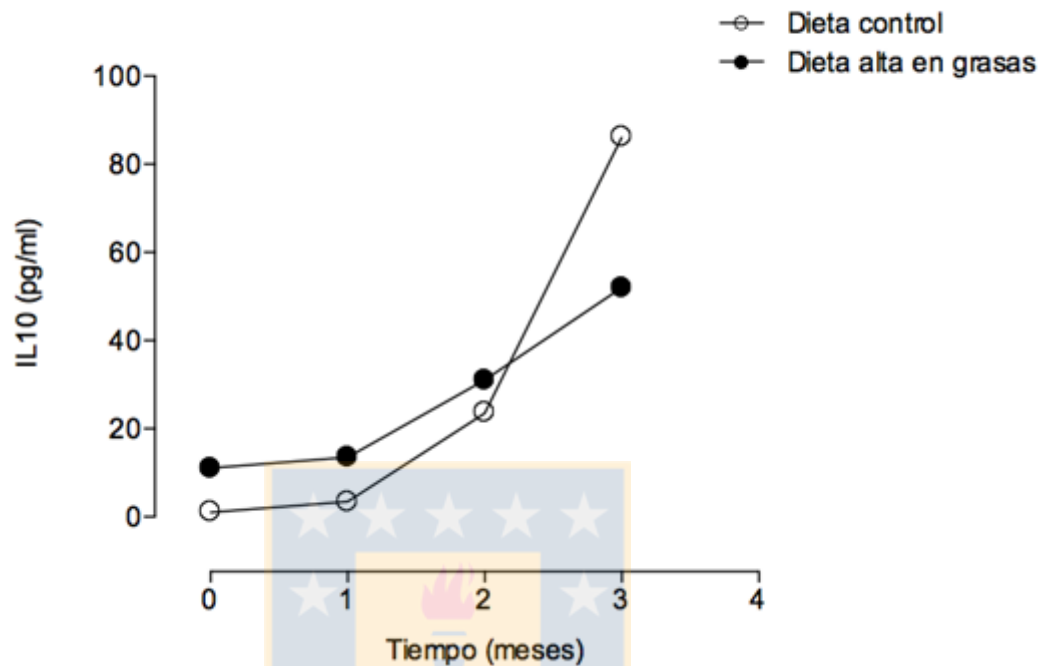
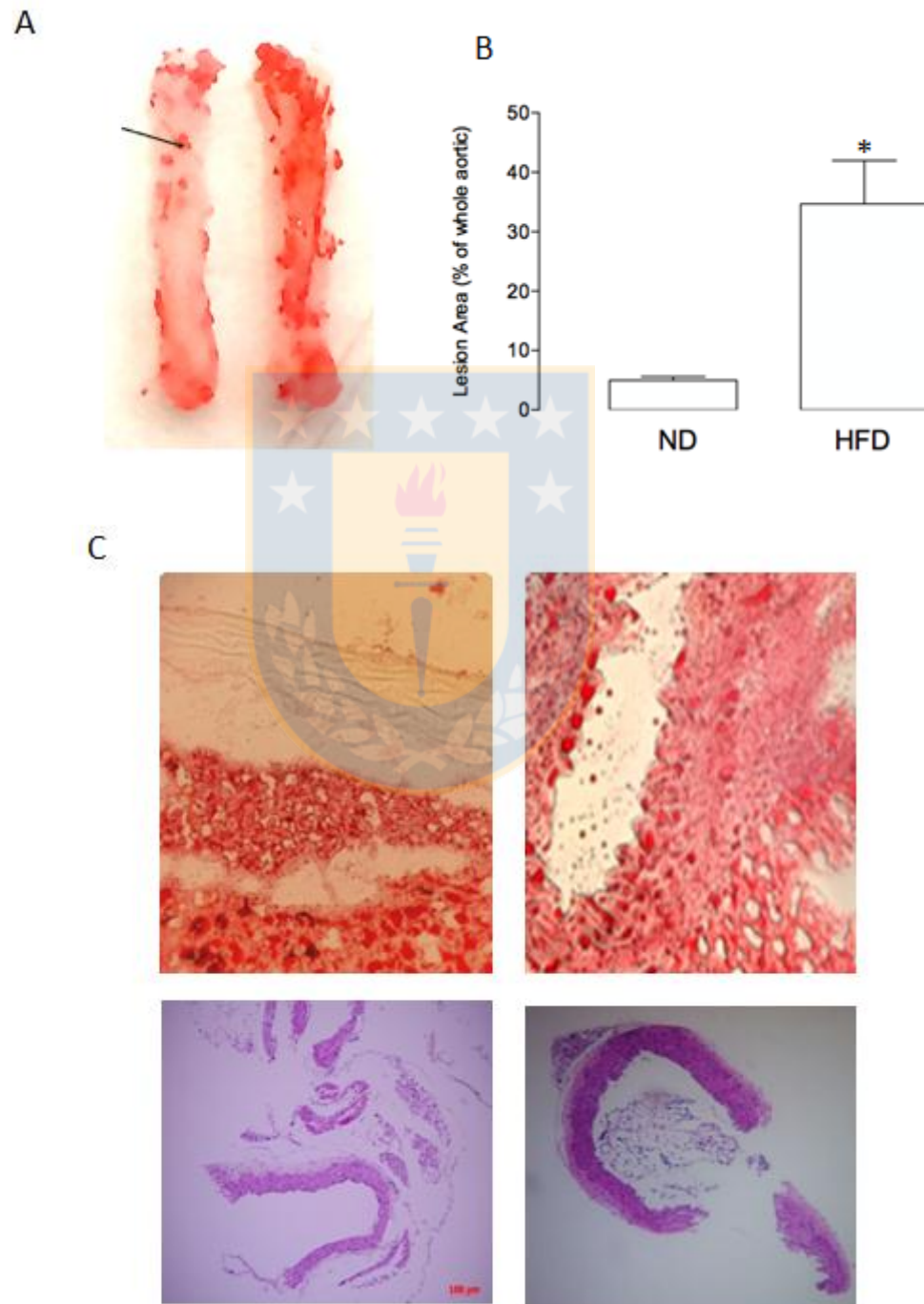


Figura 11. Detección de IL-10 en suero de ratones Apo E Knock out alimentados con una dieta alta en grasas.

La cuantificación de IL-10 se realizó mediante la técnica de Elisa Sandwich utilizando el kit comercial Mouse IL-10 Biolegend y se determinó una vez al mes durante 3 meses. Fuente de figura:Elaboración propia.



D

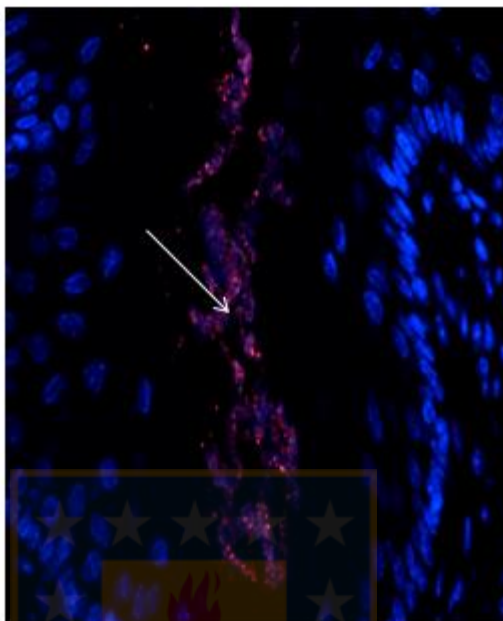


Figura 12. Análisis histológico de aortas de ratones Apo E knock out.

Para el análisis, 10 ratones hembras Apo E knock out , se dividieron en dos grupos 5 ratones ND (dieta normal) y 5 ratones HFD (dieta alta en grasas), los cuales se alimentaron durante 3 meses y luego se sacrificaron. Las aortas se aislaron y abrieron longitudinalmente para exponer el lumen del vaso y se tiñeron con el reactivo Oil Red según indica el fabricante. La afinidad del reactivo Oil Red por los lípidos permite la visualización de depósitos lipídicos (A) .A partir de la figura A , se cuantificaron las áreas ricas en lípidos utilizando el programa Image J y se obtuvo el area de la lesión (%) de ratones ND o HFD (B). Para el análisis microscópico, aortas se congelaron el medio OCT y se realizaron cortes de 10µm. Los cortes se tiñeron con oil red (C, superior) y aortas se fijaron el paraformaldehído y posteriormente se tiñeron con hematoxilina –eosina (C, inferior). A partir de los tejido fijados se realizó una inmunofluorescencia donde se observa en rojo la expresión de LOX-1 y en azul los núcleos (DAPI) . La flecha indica el lumen del vaso (D) Fuente de figura: Elaboración propia.

Esta observación se corrobora con los resultados de la observación microscópica de aortas en donde se ve un aumento de acúmulos lipídicos además de una desorganización de la íntima del vaso (Figura 12C).

Los análisis de inmufluorescencia fueron utilizados para determinar la presencia de LOX-1 en aortas alimentadas con la dieta en estudio. En la Figura 12D muestra un corte transversal de la aorta, en donde se encuentra el lumen del vaso y la íntima, representada por el marcaje del núcleo con DAPI. Nuestros resultados muestran que se detectó expresión de LOX-1 en las aortas, marcado con Alexa Fluor 592 (rojo), y se ve que tiene una localización específica en la pared del vaso. Es decir la dieta alta en grasa aumenta la expresión de LOX-1 en células epiteliales en ratones Apo E Knock Out.

Estandarización de la infección de ratones C57BL6 con AdoLOXIN

Paralelamente, se buscó la dosis de adenovirus requerida para mantener una dosis adecuada de adenovirus en circulación que favorezca la expresión de LOXIN en los tejidos (Figura 13). En base a bibliografía se determinaron 4 condiciones, para ello se utilizaron 4 ratones C57BL6 a los cuales se les realizaron inyecciones seriadas durante 1 mes con 3×10^8 UFC/ml del

adenovirus AdoLOXIN (Figura 13). Terminado el experimento, se realizó el seguimiento de la fluorescencia, que consistió en visualizar los ratones mediante el equipo LI-COR Pearl Impulse y obtener información cualitativa sobre la distribución del adenovirus LOXIN en los ratones inyectados en el animal completo y en los distintos órganos. Debido a la autofluorescencia del pelaje no se pudo determinar cambios en la fluorescencia emitida por el adenovirus (Figura 14A). Visto esto, se aislaron los distintos órganos y se observó la fluorescencia emitida en el equipo LI-COR Pearl Impulse, como se muestra en la Figura 14 B, se logró detectar fluorescencia solo en pulmón. En paralelo, se aisló ARNm de los tejidos en estudio con el objetivo de determinar mediante un método cuantitativo, la expresión de AdoLOXIN. Para esto, se diseñaron partidores para amplificar el gen de LOXIN y se obtuvo producto de PCR en ratones inyectados durante 1 mes con 3×10^8 UFC/ml de AdoLOXIN, una vez por semana. Los resultados muestran que con 4 dosis de adenovirus fue posible detectar el virus en todos los órganos estudiados. Sugiriendo que el virus se mantuvo en circulación al menos una semana después de la última inyección (Figura 14 C). Por otra parte los niveles circulantes de IL-10 aumentan luego de la inyección del adenovirus (Figura 15).

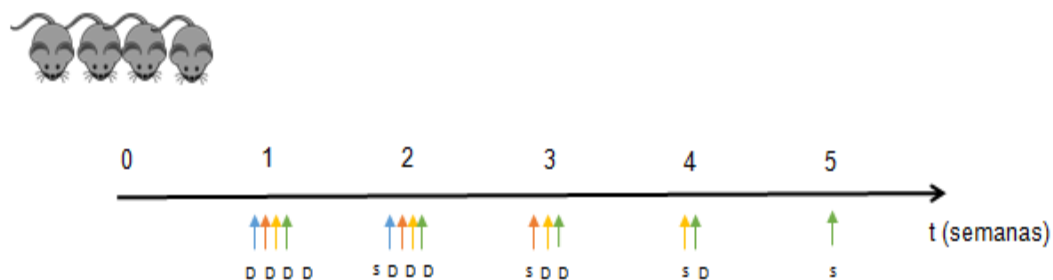
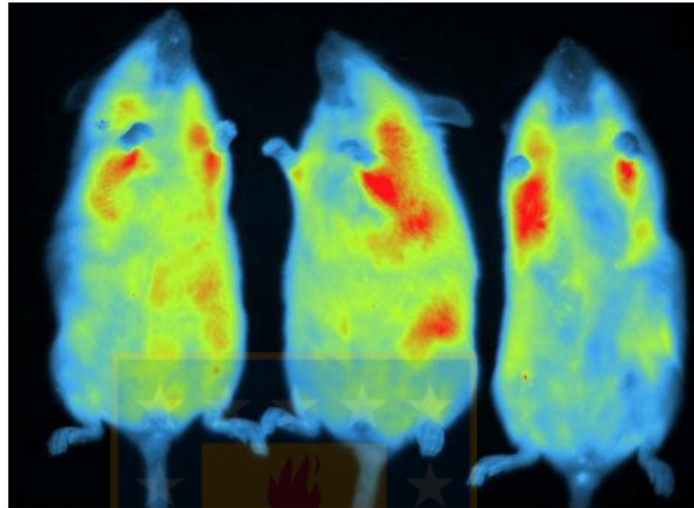


Figura 13. Esquema de estandarización de la infección adenoviral.

Un total de 4 ratones BALB/C se inyectaron con el vector adenoviral AdoLOXIN (D), la segunda semana sólo se inyectaron 3 ratones (D) y el otro ratón permaneció con una dosis durante todo el experimento (W) y así sucesivamente hasta que a la quinta semana donde los ratones se anestesiaron y visualizaron en el equipo LICOR Impulse para observar la fluorescencia emitida por el vector adenoviral AdoLOXIN (acoplado a GFP) y posteriormente se sacrificaron para visualizar los órganos mediante el equipo LICOR Impulse y luego obtener aislar el ARNm para ensayos posteriores. Fuente de figura:Elaboración propia.

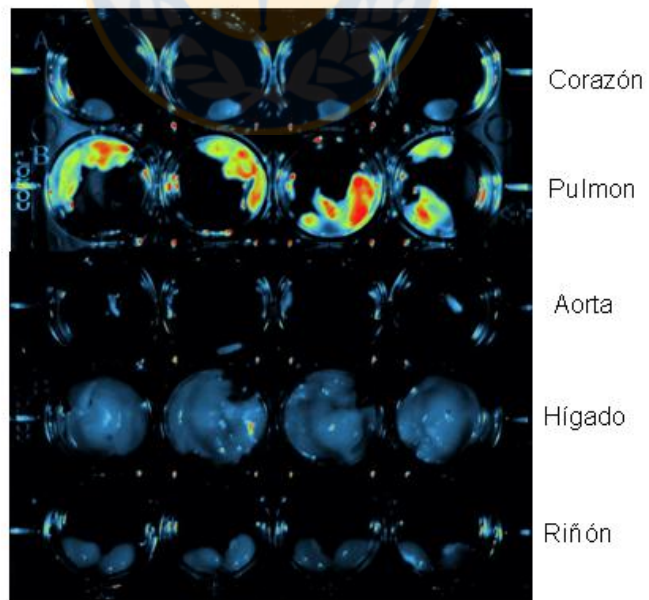
A

Ado-Mock Ado-LOXIN Ado-LOXIN



B

Ado-Mock Ado-LOXIN



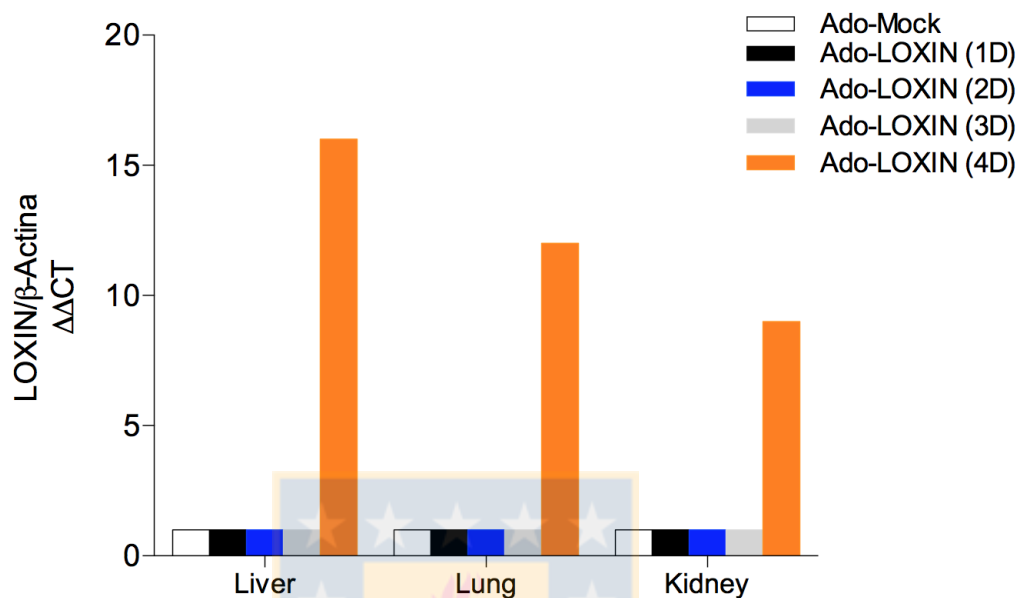


Figura 14. Estandarización de la infección adenoviral.

Un total de 4 ratones BALB/C se inyectaron con el vector adenoviral AdoLOXIN (D), la segunda semana sólo se inyectaron 3 ratones (D) y el otro ratón permaneció con una dosis durante todo el experimento (W) y así sucesivamente hasta que a la quinta semana se anestesiaron y visualizaron en el equipo LICOR Impulse para observar la distribución del vector AdoLOXIN (GFP), pero la autofluorescencia del pelaje no lo permitió (A). Para obtener la distribución del virus se optó por observar la fluorescencia de los órganos: corazón, pulmón, hígado y riñón además de la arteria aorta (B). Posteriormente los órganos se utilizaron para obtener ARNm y localizar el virus mediante la expresión de LOXIN (C). Fuente de figura: Elaboración propia.

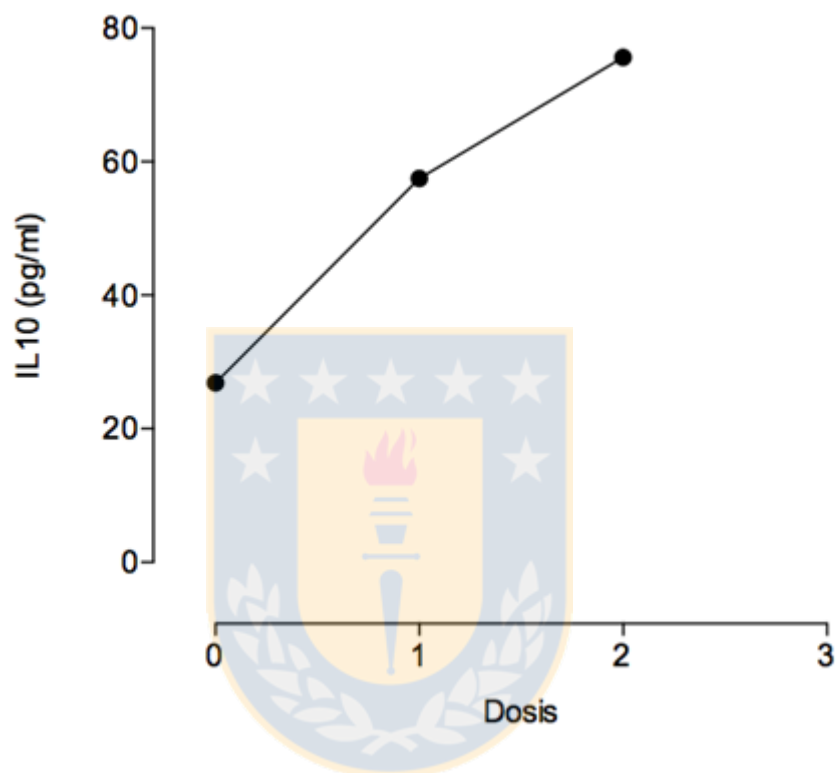


Figura 15. Detección de IL-10 en suero de ratones C57BL6 inyectados con AdoLOXIN. La cuantificación de IL-10 se realizó mediante la técnica de Elisa Sandwich utilizando el kit comercial Mouse IL-10 Biolegend y se determinó utilizando distintas dosis virales. Fuente de figura:Elaboración propia.

Durante el transcurso de esta tesis los ratones Apo E knock out, modelo en estudio, dejaron de reproducirse por lo cual no contamos con los especímenes para realizar el objetivo 3. Como alternativa, se utilizaron ratones C57BL6 ya que según bibliografía este modelo murino también tiene la capacidad de alterar su perfil lipídico con una dieta alta en grasas (47) Por lo tanto, con ayuda del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos se formuló una nueva dieta y se evaluó mediante técnicas de análisis instrumental su porcentaje de grasa conteniendo además ácido cólico, molécula que aumenta los niveles plasmáticos de colesterol (Figura 16).

Ratones C57BL6 alimentados con una dieta alta en grasas.

Un total de 20 ratones C57 se dividieron en 4 grupos: 10 ratones alimentados con una dieta normal, y 5 de ellos fueron inyectados con el vector vacío AdoMOCK y otros 5 ratones con de 3×10^8 UFC/ml de AdoLOXIN. En paralelo 10 ratones fueron alimentados con una dieta alta en grasas y 5 de ello fueron inyectados con el vector AdoMOCK y los otros 5 ratones fueron inyectados con 3×10^8 UFC/ml AdoLOXIN.

Los 4 grupos se alimentaron durante 3 meses con sus respectivas dietas *ad libitum*. A partir del segundo mes los ratones se inyectaron con las dosis ya descritas, una vez a la semana. Finalizada las inyecciones, la semana 13 del experimento, los animales se sacrificaron (Figura 16) y se aislaron: corazón, hígado, pulmón, riñón y desde el callao de la aorta hasta la zona abdominal. Durante el transcurso del experimento, una vez al mes se realizó una toma de muestra de sangre obtenida a partir del seno retro-orbital y se analizaron parámetros como: glucosa y perfil lipídico.

El perfil metabólico de los de los animales muestra que no se observó diferencia significativa a lo largo del experimento (Figura 17 A). En relación al perfil lipídico, los parámetros como triglicéridos y HDL se mantuvieron constantes durante los 3 meses. Fue posible observar una disminución de los niveles de HDL a los 2 meses de la dieta alta en grasa. Pero no se observaron variación a los 3 meses.

Los niveles de colesterol aumentaron significativamente a partir del primer mes de la dieta alta en grasas y se mantuvieron aumentados durante todo el experimento (Figura 17 D).

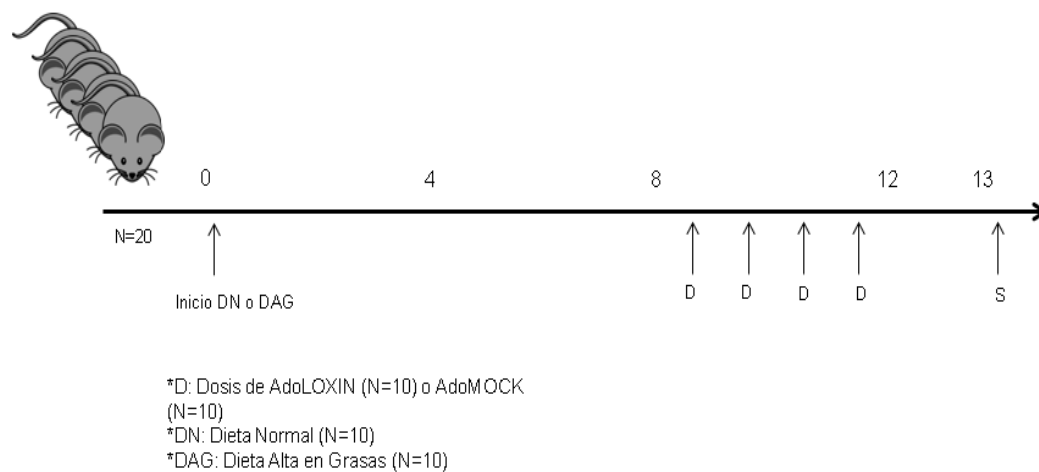
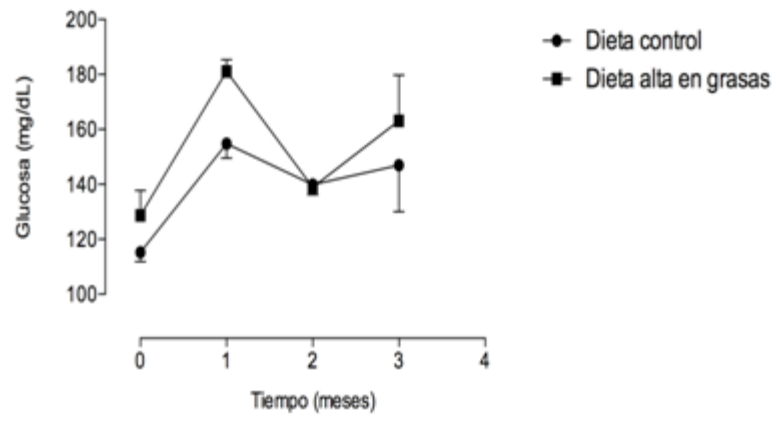


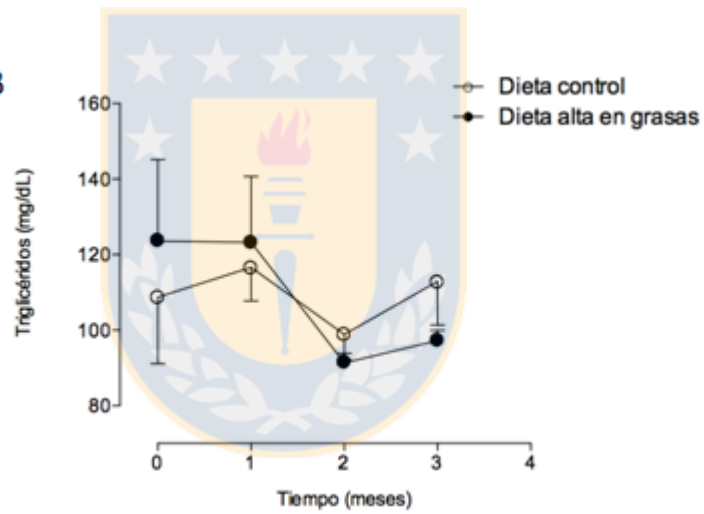
Figura 16. Esquema utilizados para evaluar el efecto de AdoLOXIN sobre ratones C57BL6 alimentados con una dieta alta en grasas.

Un total de 20 hembras ratones C57BL6 se alimentaron con dieta normal (ND) o dieta alta en grasas (HFD) durante 3 meses. A partir de la octava semana se comenzó con la inyección de 3×10^8 UFC/ml a través de la vena de la cola (D), 1 dosis por semana. Terminada la infección con AdoMOCK o AdoLOXIN los ratones se sacrificaron. Fuente de figura: Elaboración propia.

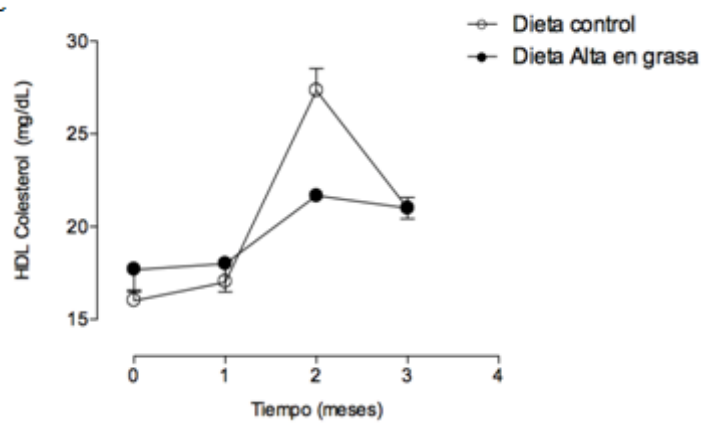
A



B



C



D

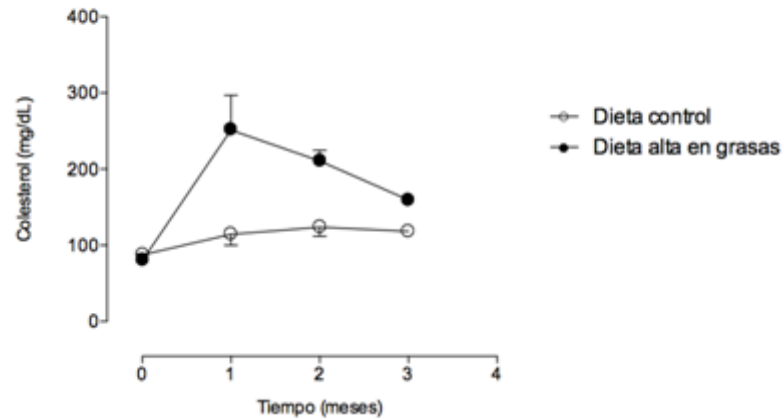


Figura 17. Análisis de sangre de ratones C57BL6 alimentados con una dieta alta en grasas.

Un total de 20 ratones hembras C57BL6 , se dividieron en dos grupos ,10 ratones ND y 10 ratones HFD, los 20 ejemplares se alimentaron durante 3 meses y se tomó una muestra de sangre a partir del seno retro orbital , a tiempo 0(día antes del inicio de la dieta) y cada un mes durante 3 meses. A partir del suero se cuantificó la glucosa, HDL,trigliceridos y colesterol mediante kits comerciales (N=20). Fuente de figura:Elaboración propia.

Se aislaron las aortas de los 4 grupos en estudio y se expuso el lumen y los lípidos fueron teñidos con Oil Red. En la Figura 18 A se muestra la cantidad de los depósitos de lípidos, se observa que existe un mayor depósito de lípidos en las aortas de ratones alimentados con la dieta alta en grasas, al comparar con los ratones alimentados con una dieta normal. Sin embargo, esta diferencia se

atenúa en ratones alimentados con una dieta alta en grasas e inyectados con AdoLOXIN.

Por otra parte, como se puede apreciar en los cortes histológicos mostrados en la Figura 19, no se observaron cambios significativos en ningún grupo experimental. Todas las muestras histológicas mostraron una micro arquitectura normal en pulmón, riñón y corazón, sin signos de inflamación, apoptosis y/o necrosis, reflejando una buena preservación del tejido. En las muestras histológicas de tejido hepático observadas en la Figura 20, los grupos con dieta normal exhibieron una histología típica mientras que el grupo tratado con una dieta alta en grasa presentó esteatosis macro y microvesicular, distorsión en la arquitectura hepática e inflamación lobular.

Expresión de LOX-1 y LOXIN en Ratones C57 alimentados con una dieta alta en grasas.

A partir de los tejidos aislados se obtuvo ARN y se utilizaron partidores contra LOX-1 de ratón y LOXIN para determinar su expresión en los distintos tejidos. Los delta delta CT se obtuvieron a partir de los productos de PCR de ambos partidores y el control de carga mLp 37. Respecto a la expresión de LOX-1 en los distintos tejidos, no se observa un aumento de esta proteína al alimentar los ratones con una dieta alta en grasas (Figura 21). Cabe destacar que fue posible

observar una disminución de la expresión de LOX-1 en ratones inyectados con AdoLOXIN en órganos como: corazón, hígado, pulmón y también en aorta (Figura 22). Por el contrario, se ve un aumento en la expresión de LOX-1 en riñón (Figura 22C). Por otra parte, el resultado de la detección de la proteína LOXIN mediante PCR, se encontró en órganos como: hígado, corazón, pulmón y riñón, pero no se ve un aumento significativo atribuible a la inyección. En aorta no se detectó la proteína LOXIN en ningún murino del experimento (Figura 22).



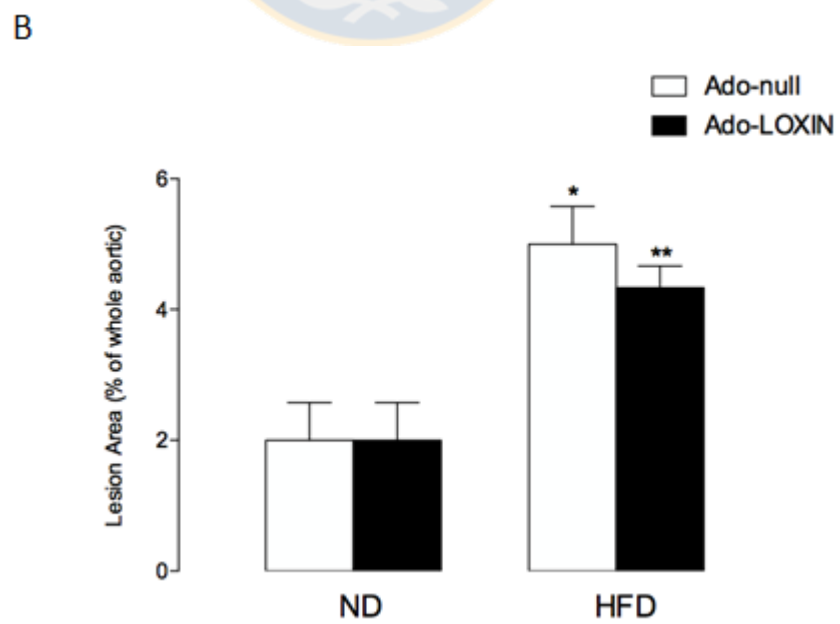
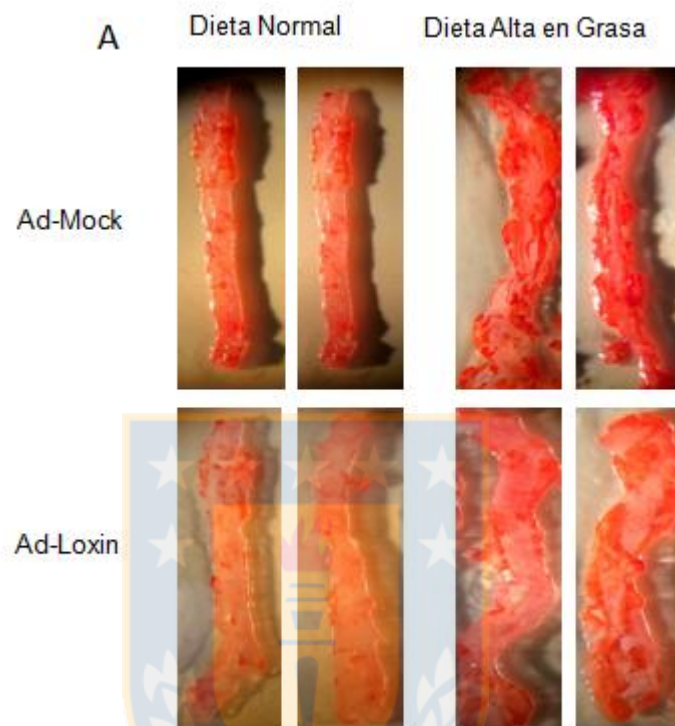
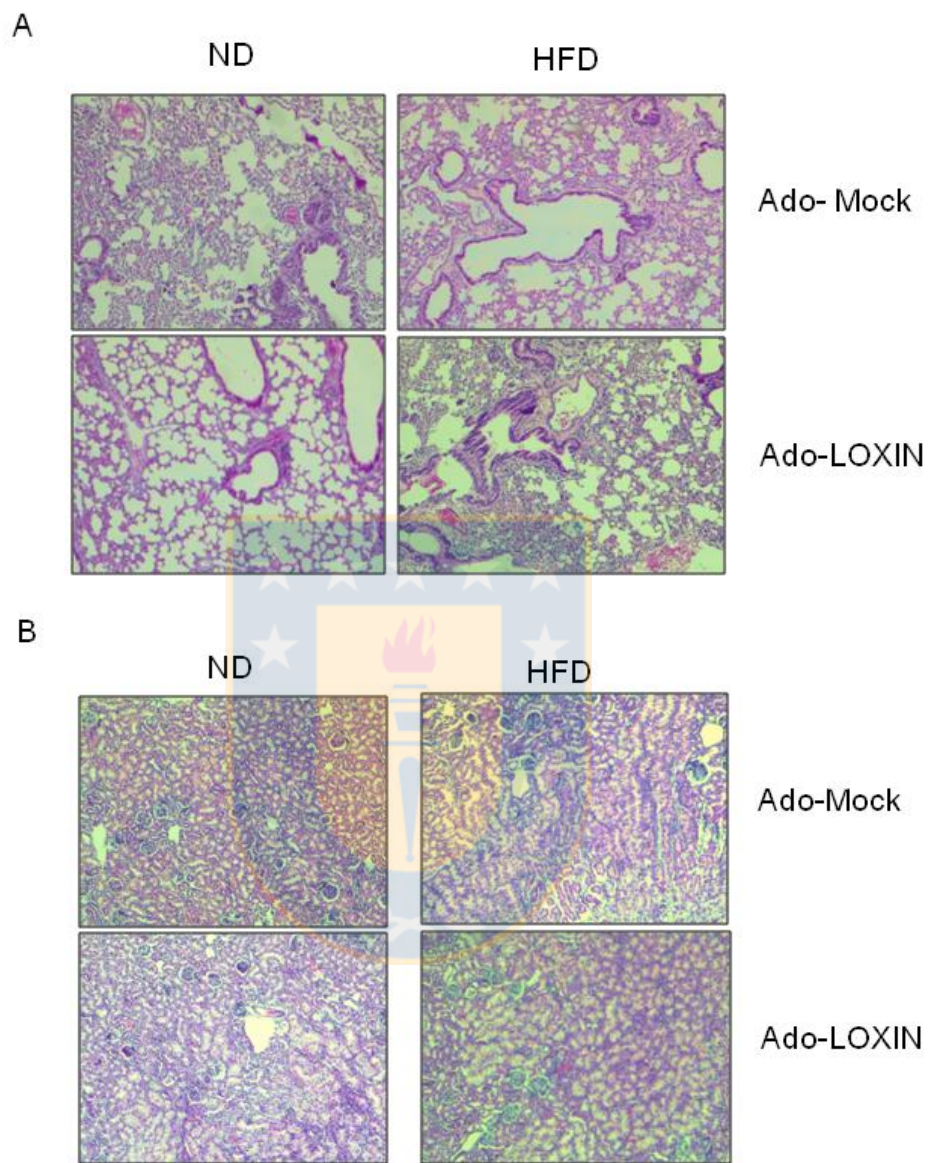


Figura 18. Análisis macroscópico de aortas de ratones C57BL6.

20 ratones hembras C57BL6 , se dividieron en dos grupos 10 ratones ND y 10 ratones HFD, los 20 ejemplares se alimentaron durante 3 meses .A partir del segundo mes se inyectó el vector Ad-Mock o Ad-LOXIN por la vena de la cola a 5 ratones ND y 5 ratones HFD y luego se sacrificaron.Las aortas se aislaron y abrieron longitudinalmente para exponer el lumen del vaso.Una vez retirada la grasa del exterior, las aortas se tiñeron con el reactivo Oil Red según indica el fabricante.La afinidad del reactivo Oil Red por los lípidos permite su visualización.Depósitos lipídicos se observan en DN AdMock(izquierda,superior),HFD AdLOXIN(derecha superior),DN AdLOXIN (izquierda inferior) y HFD AdLOXIN(iderecha inferior)(A).A partir de la Figura A , se cuantificaron las áreas ricas en lípidos utilizando el programa Image J y se obtuvo el area de la lesión (%) de ratones ND o HFD inyectados con Ad-null o Ado-LOXIN (B). Fuente de figura:Elaboración propia.



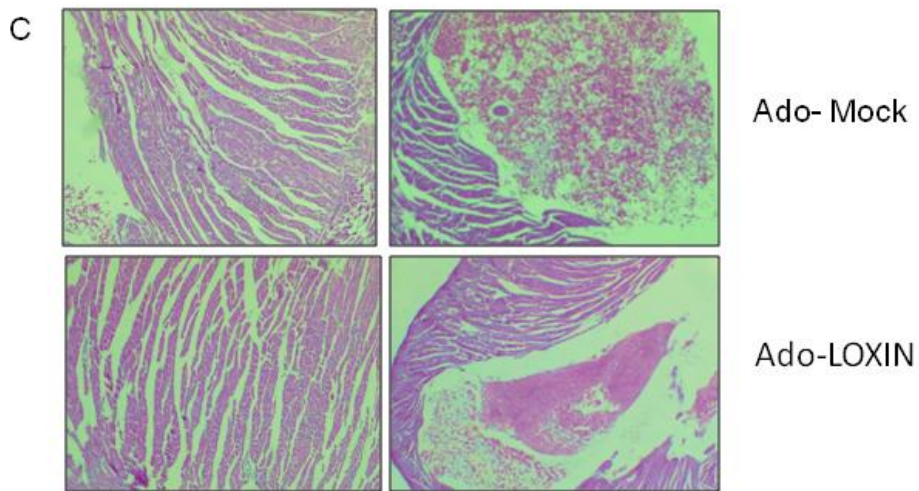


Figura 19. Análisis histológico de órganos de ratones C57BL6 alimentados con una dieta alta en grasas que sobreexpresan AdoLOXIN.

Los tejidos pulmón (A), riñón (B) y corazón (C) se aislaron de ratones con dieta normal(ND) o dieta alta en grasas (HFD) de ambos grupos inyectados con el vector vacío (AdoMock) o el vector de expresión de LOXIN (Ado-LOXIN). Todos los tejidos se incluyeron en parafina y se realizaron cortes con un micrótopo para su visualización en un microscopio óptico utilizando la tinción hematoxilina/eosina. Fuente de figura:Elaboración propia.

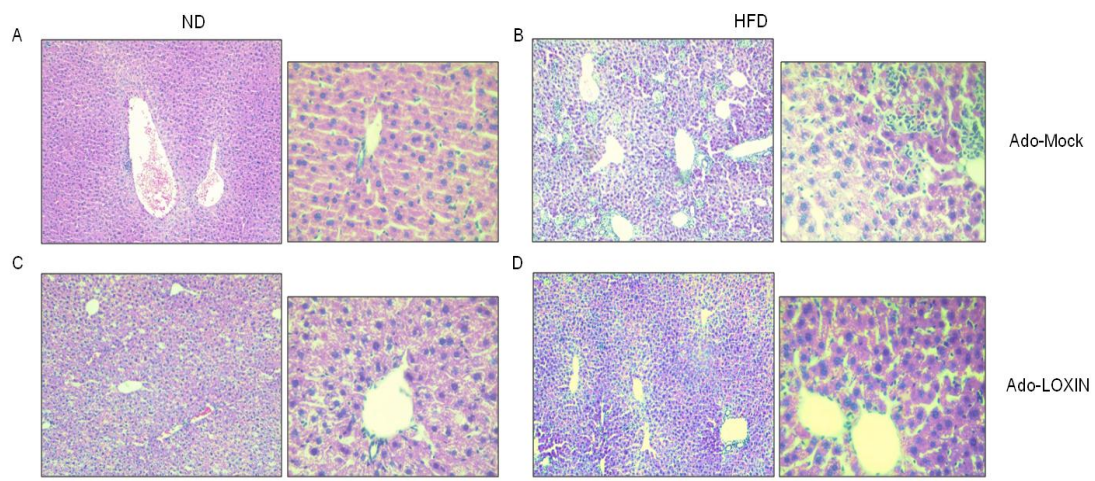


Figura 20. Análisis histológico de tejido hepático de ratones C57BL6 alimentados con una dieta alta en grasas que sobreexpresan LOXIN.

Los hígados de ratones C57BL6 alimentados con una dieta normal(ND) o dieta alta en grasas (HFD) de ambos grupos inyectados con el vector vacío (AdoMock) o el vector de expresión de LOXIN (AdoLOXIN).El tejido se aisló y se incluyó en parafina para su posterior visualización por microscopía óptica utilizando la tinción hematoxilina/eosina.

Fuente de figura:Elaboración propia.

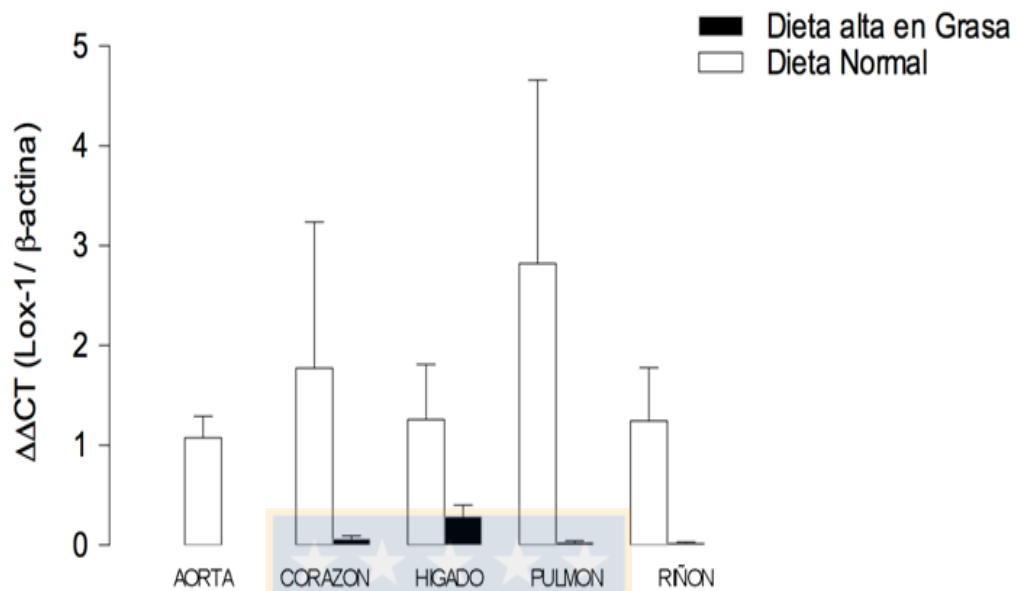
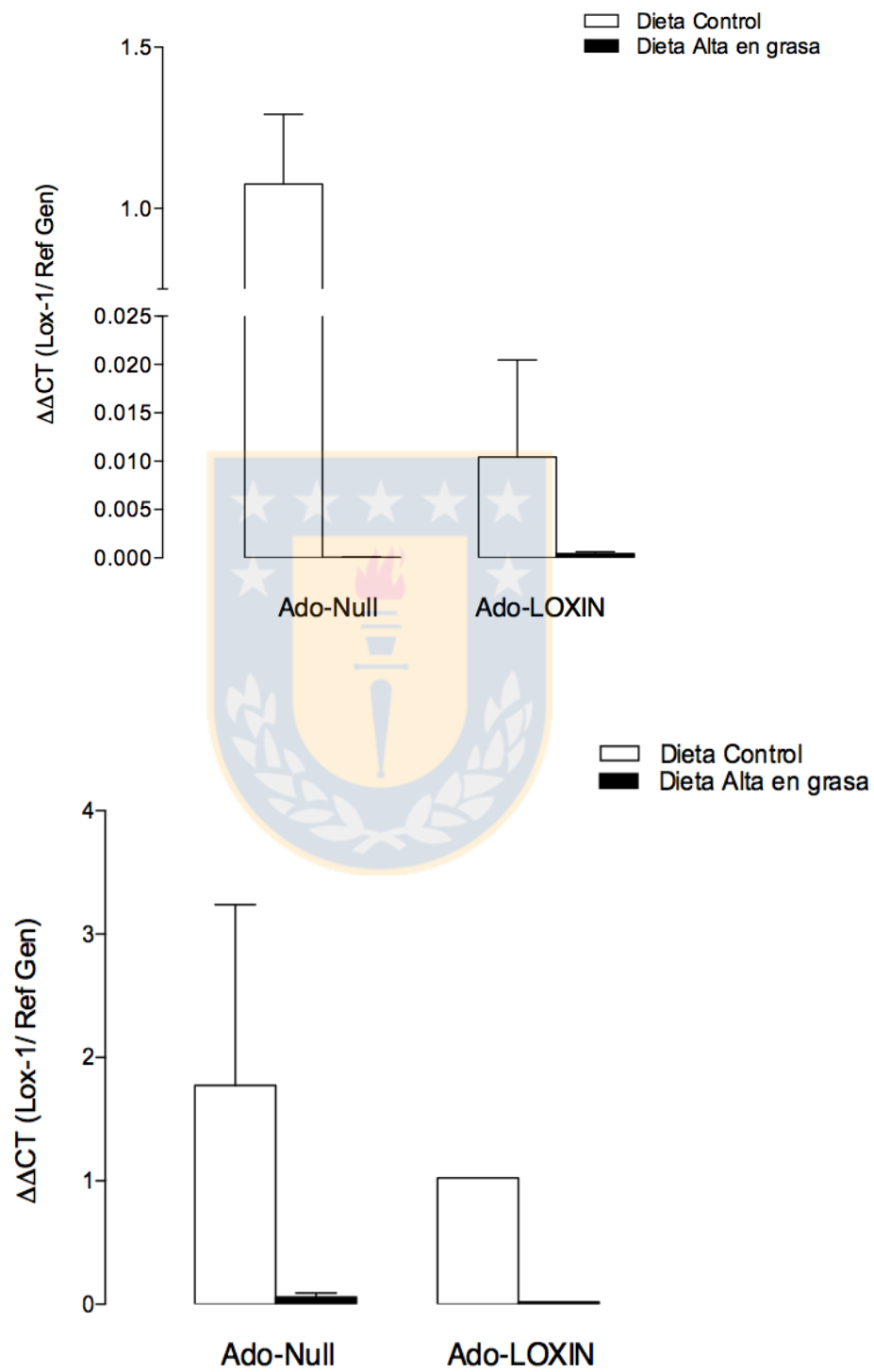
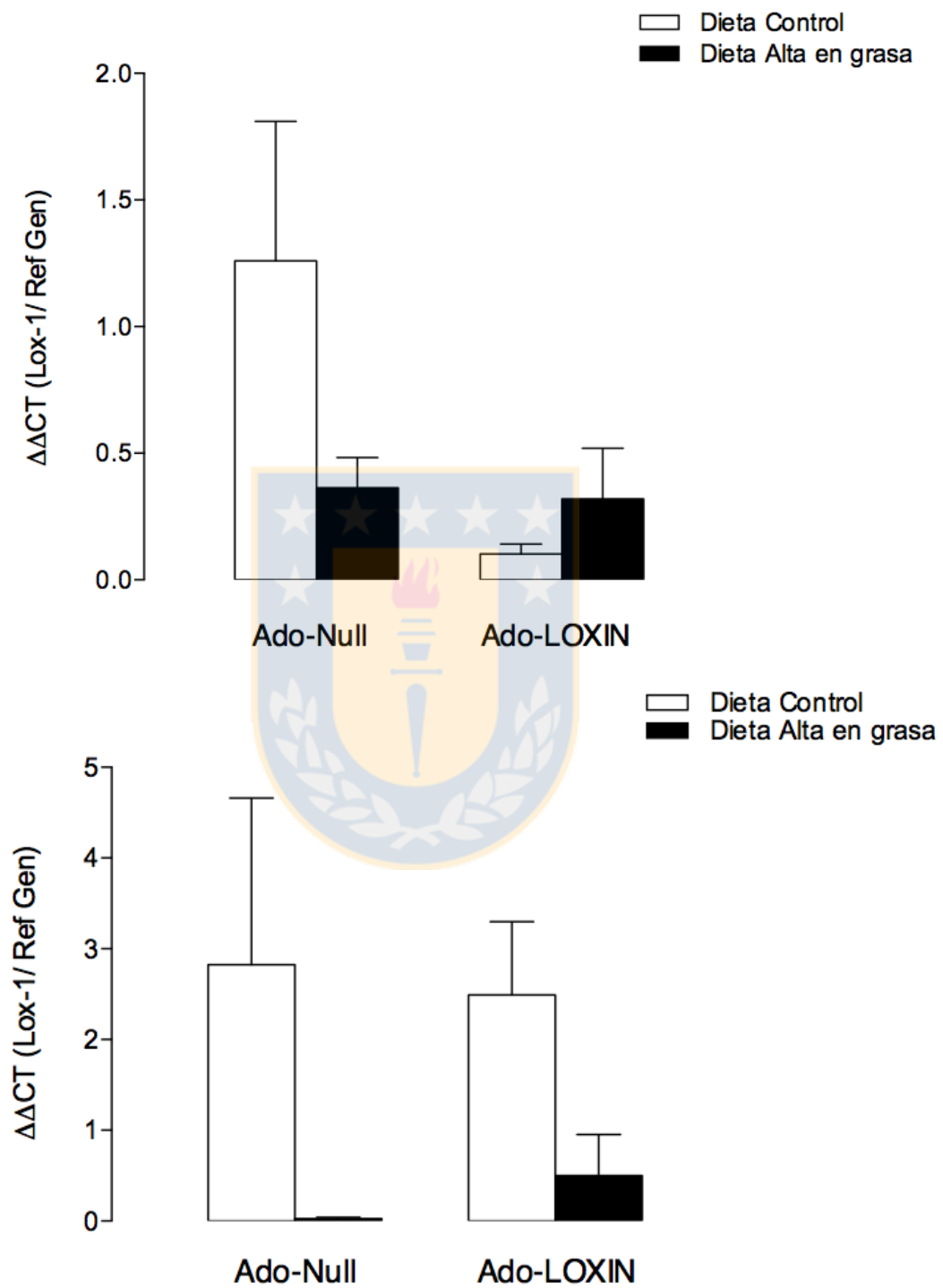


Figura 21. Expresión de LOX-1 en ratones C57BL6.

Ratones hembras C57BL6 (20), se dividieron en dos grupos 10 ratones ND y 10 ratones HFD, los 20 ejemplares se alimentaron durante 3 meses y luego se sacrificaron y aislaron los siguientes órganos: corazón, hígado, pulmón y riñón; además de la arteria aorta. Se extrajo ARN mediante la extracción por Trizol y se transformó a ADN copia con el que se realizaron ensayos de PCR para amplificar LOX-1 y el control de carga mLP57. A partir de las curvas de LOX-1 y mLP57 se obtuvo el $\Delta\Delta CT$ (N=20). Fuente de figura: Elaboración propia.





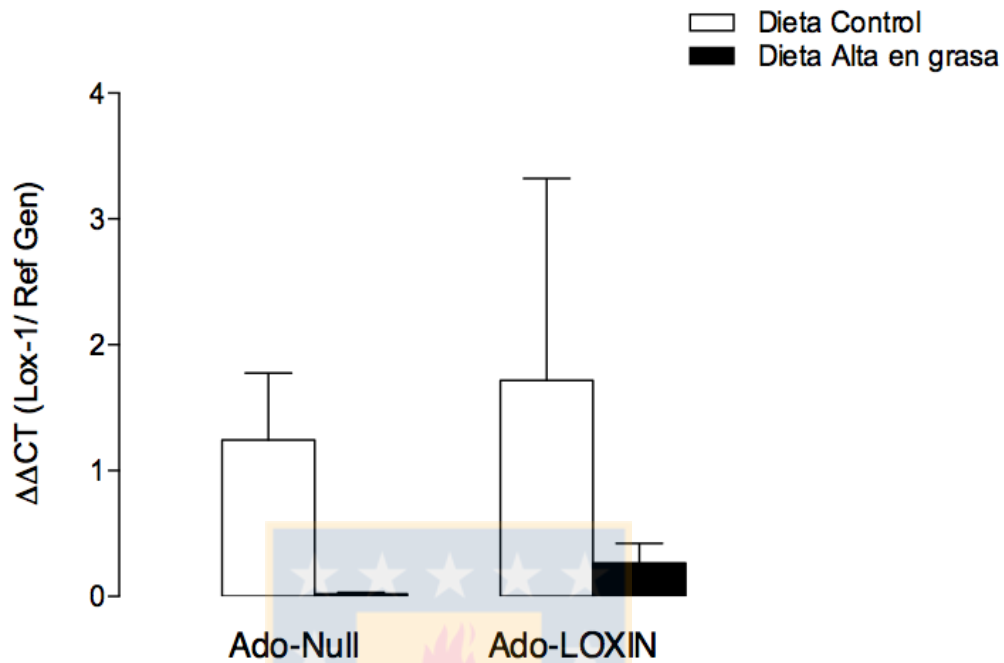


Figura 22. Expresión de LOX-1 en ratones C57BL6.

Ratones hembras C57BL6 (20), se dividieron en dos grupos 10 ratones ND y 10 ratones HFD, los 20 ejemplares se alimentaron durante 3 meses y a los dos meses 5 ratones ND y 5 ratones HFD se inyectó el AdLOXIN o AdMock y luego se sacrificaron. Se aislaron los siguientes órganos: corazón, hígado, pulmón y riñón. Se extrajo ARN mediante la extracción por Trizol y se transformó a ADN copia. Mediante la técnica de PCR se amplificaron LOX-1 y el control de carga mLP57. A partir de las curvas de LOX-1 y mLP57 se obtuvo el $\Delta\Delta CT$ (N= 20). Fuente de figura: Elaboración propia.

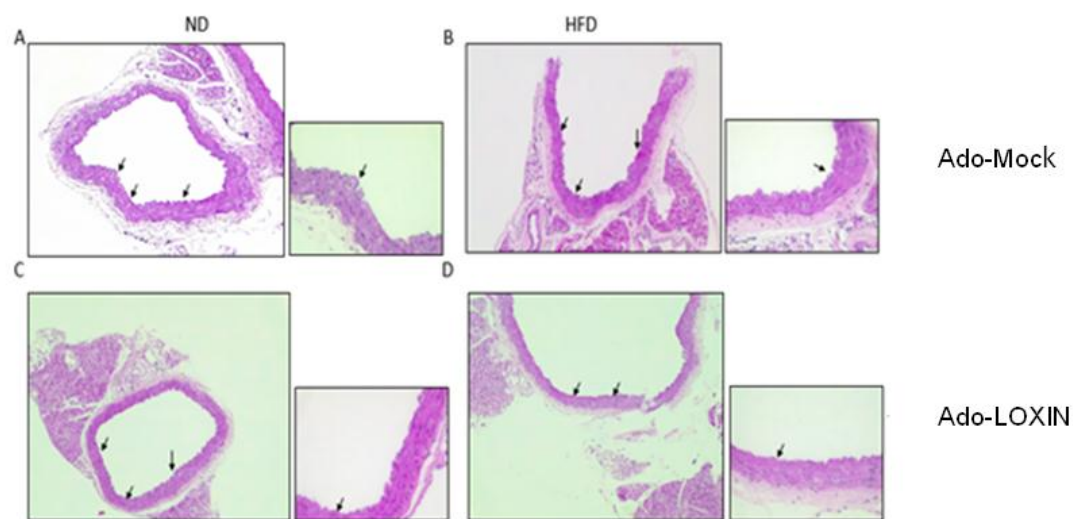
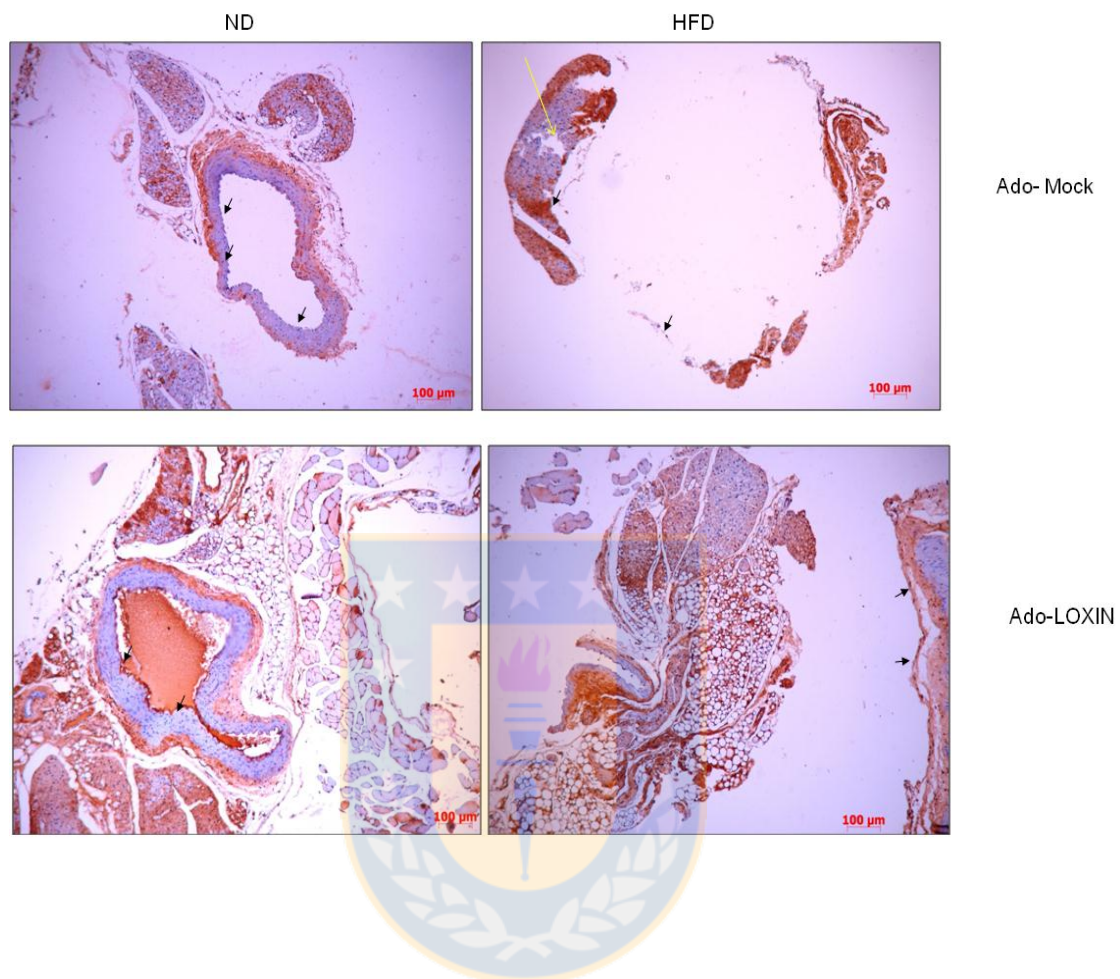


Figura 23. Aortas de ratones alimentados con dieta alta en grasas que sobreexpresan LOXIN.

Ratones hembras C57BL6, se dividieron en dos grupos 10 ratones ND y 10 ratones HFD, los 20 ejemplares se alimentaron durante 3 meses y a los dos meses 5 ratones ND y 5 ratones HFD se inyectó el AdLOXIN o AdMock y luego se sacrificaron y se aislaron las aortas que se incluyeron en parafina y posteriormente se realizaron cortes de 6 μ m en un micrótopo y se tiñeron con hematoxilina eosina. Fuente de figura:Elaboración propia.



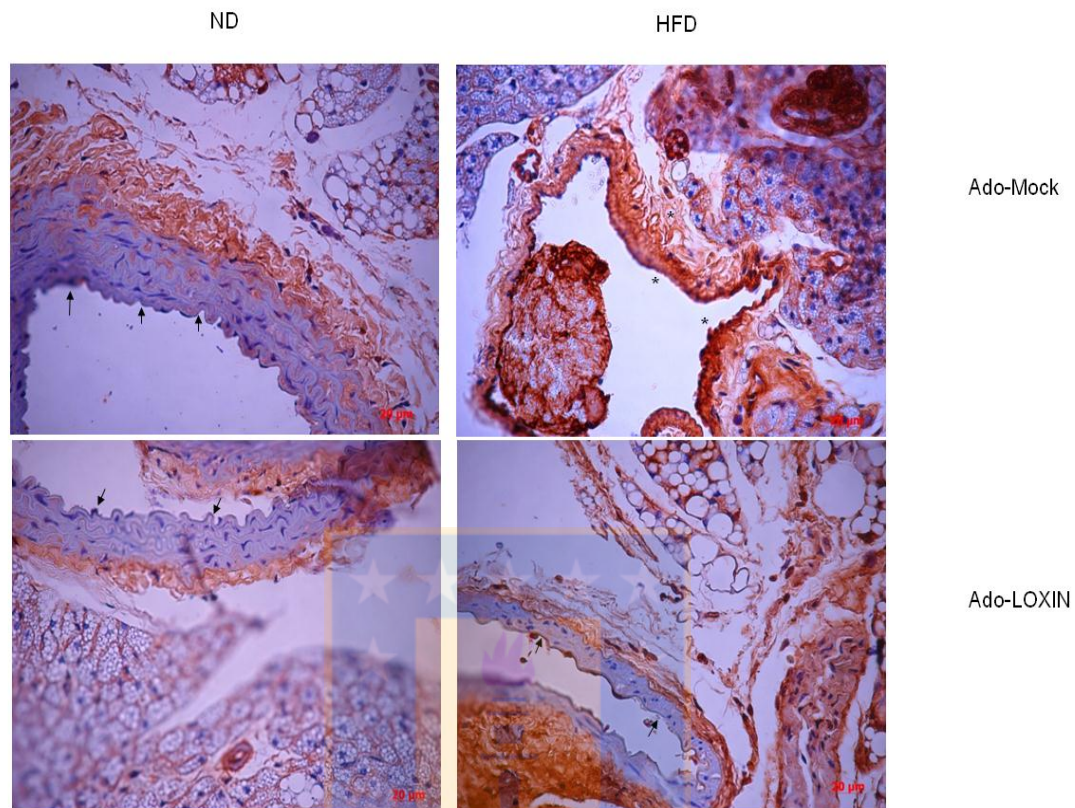
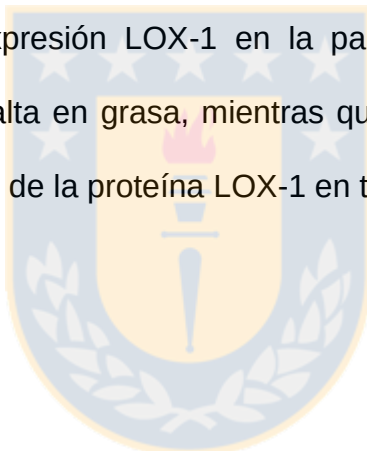


Figura 24. Inmunohistoquímica de LOX-1 de aortas de ratones alimentados con dieta alta en grasas que sobreexpresan LOXIN.

Ratones hembras C57BL6 , se dividieron en dos grupos 10 ratones ND y 10 ratones HFD, los 20 ejemplares se alimentaron durante 3 meses y a los dos meses 5 ratones ND y 5 ratones HFD se inyectó el AdLOXIN o AdMock y luego se sacrificaron y se aislaron las aortas que se incluyeron en parafina y posteriormente se realizaron cortes de 6μm en un micrótopo y se realizó una inmunohistoquímica para la detección de LOX-1. Aumento de 100μm (A) y en aumento 30μm. (B). Fuente de figura: Elaboración propia.

Finalmente, la observación microscópica de aortas, se observa un aumento de acúmulos lipídicos además de una desorganización de la íntima del vaso (Figura 23). El uso del vector adenoviral Ado-LOXIN disminuye el tamaño de la lesión tanto macro como microscópicamente. Los análisis de inmunohistoquímicos para determinar la presencia de LOX-1 en las aortas son mostrados en las Figura 24. Un corte transversal muestra el lumen del vaso y la íntima, con alta expresión LOX-1 en la pared del vaso en los animales alimentado con dieta alta en grasa, mientras que el uso de vector Ado-LOXIN disminuye la expresión de la proteína LOX-1 en toda la pared vascular.



DISCUSION

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico y progresivo, el cual comienza con el fenómeno de aterogénesis generando una placa aterosclerótica en la intima de vasos de tamaño grande y mediano (26). En la aorta esta placa puede colapsar rompiendo el vaso y formando un trombo, ocluyéndolo y generando un infarto agudo al miocardio. En los distintos pasos que conlleva a la aterosclerosis se ha descrito que participa el receptor LOX-1, codificado por el OLR1. A partir de este gen se ha descrito que por *splicing* alternativo de tipo *skipping*, debido a una delección del exón 5, trae como consecuencia la transcripción de una isoforma llamada LOXIN. Hasta la fecha también se han descrito 2 nuevas variables del gen OLR1 productos de *skipping*: el OLR1D4 y OLR1, ambos productos de *splicing* alternativo que no se han asociado con ninguna función ni patología descrita (34). El 95% de los genes humanos tienen *splicing* y hoy en día se sabe que su función es generar diversidad (48). Generalmente los productos de *splicing* tienen efectos contrarios, por ejemplo a partir del gen Bcl-x se originan dos isoformas: Bcl-xs una isoforma pro-apoptótica y Bcl-XI la variante anti-apoptótica (49). En nuestro caso, LOX-1 tiene acción promotora de la aterosclerosis, mientras que LOXIN tiene acción protectora frente a la aterosclerosis, debido a la perdida de la región C-terminar esencial para la internalización de oxLDL.

La internalización de oxLDL conlleva a una serie de eventos que ocurre a lo largo del fenómeno aterosclerótico. En estadios tempranos promueve la disfunción endotelial. En estadios intermedios esta interacción se ha descrito que promueve la proliferación y migración de células musculares lisas que posteriormente van a migrar a la intima del vaso (26, 50). Además liberan enzimas capaces de degradar la matriz extracelular. Otro evento adjudicado a la interacción oxLDL con su receptor LOX-1 es la formación de células espuma que en etapas más tardías de la aterosclerosis van a hacer apoptosis y generar el core necrótico (39, 51). Eventualmente, estos procesos podrían revertirse con el uso de LOXIN, ya que evidencias obtenida del estudio con pacientes, se ha visto en la relación que se obtuvo en la población italiana donde la probabilidad de infarto disminuye cuando se tiene mayor cantidad de LOXIN (32).

Expresión de LOX-1 en células H4-II-E-C3

Las células H4-II-E-C3 son células de cultivo comerciales y pertenecen a la ATCC. Generalmente son utilizadas en el estudio de transportadores de aminoácidos, como los transportadores de glutamato (52). En este trabajo se evaluó la expresión de LOX-1 y efectivamente se encontró que expresan LOX-1 en condiciones basales y que su expresión es regulada por estímulos oxidativos, tales como oxLDL y LPC. Hasta la fecha, estos resultados no han

sido reportados por otros autores en esta línea celular. La aproximación más cercana a la expresión de LOX-1 en tejido hepático es la expresión de receptores *scavenger* en general en este tejido, ya que es esencial para el mantenimiento de la homeostasis de lipoproteínas circulantes.

La expresión de LOX-1 en condiciones fisiológicas se ha descrito en células de kuppfer. En condiciones patológicas se ha relacionado LOX-1 con la esteatosis hepática no alcohólica, ya que se ha encontrado expresado en células endoteliales sinusoidales hepáticas humanas (53) y en macrófagos circulantes que llegan a este tejido. Ambos estudios encontraron que LOX-1 está presente en estas células y es inducible por oxLDL, promoviendo mecanismos proinflamatorios mediante un mecanismo a través de NF-KB (54) ha reportado que las células de hepatoma también expresan otros receptores *scavenger* como el receptor CD36, promotor de la endocitosis de lipoproteínas como LDL, HDL, VLDL pero no oxLDL (55).

Uno de los aspectos evaluados en este trabajo es la citotoxicidad de células de hepatoma de rata frente a oxLDL o LPC y se obtuvo que ambos estímulos son citotóxicos a concentraciones 50µg/ml y 1µM respectivamente. Si bien la variabilidad de las dosis que causan citotoxicidad mediada por oxLDL no permite generalizar sus efectos y posibles mecanismos, existe evidencia en células de cáncer de esófago y leucemia que tienen niveles de citotoxicidad a

concentraciones de 45ug/ml de oxLDL(35). Incluso, estos mismos autores dilucidaron la actividad pro-apoptotica de oxLDL que fue revertido al incubar con un anticuerpo que bloquea el receptor LOX-1. El mecanismo que se propone para este efectos proapoptótico de LOX-1 inducido por oxLDL es por promover la expresión de caspasa-3 y Bax, disminuyendo Bcl-2 (35). Por otra parte, también se han obtenido dosis de citotoxicidad frente a oxLDL en otras líneas celulares cancerígenas como en células HT29(colon), OVCAR3(ovario), MCF-7(pulmón) y PC (próstata) de una forma dosis dependiente. Con las evidencias expuestas anteriormente, es convincente que el uso de LOXIN, el cual no permite la interacción entre oxLDL y LOX-1, puede generar un rol protector frente a tumorigénesis (56).

LOX-1 rata /LOXIN humano

La formación de células de espuma, es un paso determinante en la progresión de la aterosclerosis (23). Una célula espuma se forma a partir del ingreso de oxLDL al macrófago a través del receptor LOX-1. El ingreso de oxLDL al macrófago se ha caracterizado y hasta la fecha se sabe que la unión ocurre a través de la atracción entre región hidrofóbica de ApoB 100 y el *cluster* formado por 3 homodímeros de LOX-1. La formación del dímero es esencial para la interacción entre oxLDL y LOX-1. Esta dimerización ocurre gracias a un puente disulfuro generado por cisteína C140 y las fuerzas

hidrofóbicas que lo rodean (57, 58). La cisteína C140 sólo está presente en humanos,; en ratas y ratones los aminoácidos presentes son serina y fenilalanina respectivamente. Con el objetivo de interpolar los resultados obtenidos en ratones y que estos sean comparables con el fenómeno en humanos, es necesario comprobar que existe dimerización en ausencia de C140, por eso se usó línea celular de rata.

LOXIN, una de las isoformas obtenidas a partir del gen OLR1, es producto de la pérdida del exón 5 y como consecuencia esta proteína no tiene el dominio C-terminal necesario para la interacción con Apo B 100 de oxLDL, pero mantiene la capacidad de dimerizar con LOX-1. Como consecuencia, la formación de células de espuma y la contribución de estas células en el fenómeno de aterosclerosis, provocaría al menos un retardo en la aparición de la aterosclerosis y en otras patologías asociadas a tejidos altamente vascularizados como la tumorigénesis y complicaciones del embarazo, donde esta expresado LOX-1 y actualmente se estudia relación con la cantidad relativa de su polimorfismo LOXIN (59).

Para comprobar la dimerización de LOX-1 de rata y LOXIN humano se utilizaron las células de hepatoma de rata y se realizó un estudio funcional de internalización de Apo B100 dentro de estas células. Biocca y sus colaboradores comprobaron que existe una disminución de incorporación de

oxLDL cuando células COS se cotransfectaron con LOX-1 humano y LOXIN. Pero no existe reporte hasta la fecha de la internalización de LOX-1 rata con LOXIN. Por lo tanto, a pesar de la ausencia de la cisteína C140 en este modelo de estudio si es posible generar el dímero entre LOX-1 de rata /LOXIN y este es afuncional.

Investigadores anteriores han inmunoprecipitado LOX-1 humano/LOXIN para comprobar mediante otra técnica que existe formación del dímero. En este reciente trabajo también se logró inmunoprecipitar ese dímero, corroborando la metodología de Biocca y sus colaboradores. Si bien se intentó inmunoprecipitar el dímero LOX-1 de rata/LOXIN no obtuvieron resultados positivos.

Una de las principales complicaciones de la metodología de inmunoprecipitación es encontrar el buffer de lisis que no altere la dimerización ya que como es un enlace no covalente es muy susceptible a los cambios de sales y pH y no son capaces de resistir tanto como el enlace covalente de LOX-1/LOXIN humano, el puente disulfuro entre las cisteína en la posición (140).

Ratones Apo E knock out alimentados con dieta alta en grasas

Los modelos ateroscleróticos de ratones transgénicos son el *gold standard* para el estudio de esta patología, ya que como se describió anteriormente la importancia de la carga genética, un factor no modificable de esta patología genera aterosclerosis con lesiones de mayor tamaño y complejidad que la inducción de aterosclerosis por dieta. A pesar de lo anterior, una variable a considerar es que los ratones inducidos con dietas si bien promueven un ambiente proinflamatorio agudo, se alegan más a la cronicidad de la enfermedad que en modelos de animales transgénicos.

Una de las grandes ventajas respecto a los modelos dietario es que los ratones transgénicos, ya sea Apo knock out o LDL-R, no necesitan del uso de ácido cólico para la formación de estrías lipídicas, disminuyendo la toxicidad de la dieta. Ahora, si se comparan los dos modelos aterogénicos modificados genéticamente disponibles, Apo E knock es el modelo de excelencia para investigar los mecanismos moleculares ya que por una razón que aún se investiga LDL-R es más resistente a las injurias del vaso, que ocurren a pesar de que el ratón LDLR tiene un perfil proteínas de lipoproteínas descrito como más aterogénico, porque aumenta la LDL, en comparación con Apo E knock out que es la HDL (60).

Por esta razón la formación de placa en ratones Apo E knock out ha sido arduamente estudiada. Cronológicamente, la evolución de la patología en este modelo comienza con la adhesión de monocitos, lo que ocurre entre 5 a 6 semanas de edad. Entre la sexta y décima semana ya comienzan a aparecer las estrías lipídicas con formación de células de espuma y migración de células musculares lisas. En teoría todo es igual al humano en cuanto a la progresión de la aterosclerosis, excepto que no hay ruptura de placa, ni en este ni en otro modelo murino descrito hasta la fecha (61).

Otro factor no modificable a considerar en este estudio es el sexo de los ratones participantes en el estudio. Este trabajo se llevó a cabo con hembras porque si bien estas tienen un efecto protector de los estrógenos, las hembras postmenopausicas tienen lesiones mucho más grandes que los machos (46). Las posibles causas son: la baja expresión de Apo A I y II, los niveles menores de tromboxano, entre otras.

Generalmente, los estudios en ratones Apo E knock se realizan con una dieta comercial tipo western. La dieta utilizada se formuló inicialmente para desarrollar síndrome metabólico (62). El estudio realizado por estos mismos investigadores, en ratones CF-1, demostró que luego de 40 semanas de dieta alta en grasas (25%) se lograba aumentar el colesterol de 108 mg/dl a 174 mg/dl, además de aumentar otros parámetros como la glucosa y los

triglicéridos. En la práctica se desarrolló esta dieta y el porcentaje de grasa obtenido fue de un 15%. Los ratones se alimentaron con esta dieta durante 3 meses pero no se obtuvieron variaciones en el colesterol sanguíneo. A pesar de los niveles de colesterol normales, histologicamente se observaron estrías lipídicas a nivel macroscópico, que coinciden con las visualizadas por otros investigadores que alimentaron durante 3 meses a ratones Apo E knock out con dieta tipo western (63). Microscópicamente se observa una desorganización de la íntima y acumulación de lípidos como lo observado por otras investigaciones (64). Respecto a la expresión de LOX-1, mediante inmunofluorescencia se detectó presencia de LOX-1 pero esta no aumentó con la dieta. Los resultados obtenidos coinciden con lo observado por Fisker y colaboradores (65)

En el análisis del perfil lipídico, se obtuvieron valores mayores respecto a un ratón C57B6 no mutado. Un ratón C57BL6 a las 14 semanas de edad tiene un valor de colesterol de $79,57 \pm 20,04$ mg/dl(66)). Por otra parte, los valores de colesterol obtenidos son menores a los valores reportado para un Apo E Knock out que va desde 5 veces (47, 61) hasta 8 veces (46), mayor que el valor obtenido de un ratón C57BL6 no transgénico. Por lo tanto, los valores de colesterol coinciden con los reportados para un ratón Apo E knock out heterocigoto. Por esta razón se planteó la idea de genotipificar los ratones Apo E knock out para confirmar su cosanguineidad y eliminar la hipótesis de una

eventual contaminación de la colonia. El resultado de PCR confirmó que todos los ratones del estudio tenían el genotipo homocigoto para Apo E knock out.

Lamentablemente el modelo de estudio Apo E knock out dejó de reproducirse. Esta infertilidad se asocia a la cosanguinidad de la colonia, ya que se ha descrito que esta mutación no afecta la fertilidad de los ratones (61)

Ratones C57BL6 alimentados con dieta alta en grasas

Uno de los precursores del estudio de la aterosclerosis fue Beverly Piagen, quien estudió la susceptibilidad de aterosclerosis en 10 razas de ratones alimentados con una dieta alta en grasas formulada por él. Dentro de las cepas más susceptibles se encuentran los ratones C57L/J y C57BL/6. Si bien la dieta indujo hipercolesterolemia en todos los ratones del estudio, sólo en 5 razas se produjo aterosclerosis. La dieta Piagen consiste en una dieta en la cual hay un 15% de grasas saturadas derivadas de la mantequilla de coco, 1% de aceite de maíz, 1,25% de colesterol y 0,5% de ácido cítrico (67). A partir de la dieta Piagen se formuló una nueva en conjunto con el Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, con la diferencia que los aportes de grasas y colesterol provienen de yema y clara de huevo. Si bien la formulación no es isocalórica, se acerca bastante el porcentaje de colesterol (0,94%) y el aporte de grasas aumentó a un 28%. El porcentaje de ácido cítrico se mantuvo en

0,5% durante los 3 meses del estudio. El ácido cólico es una sal biliar que aumenta la absorción de colesterol a nivel hepático e inhibe la excreción de ácidos grasos, pero el inconveniente es su hepatotoxicidad (68, 69) que se evidenció también en este trabajo ya que se observó hipertrofia de la vesícula biliar y cirrosis hepática de los ratones (datos no mostrados).

Respecto a la utilización del huevo en la dieta, ha sido debatido si realmente su colesterol aporta negativamente en la aterosclerosis. Un estudio retrospectivo en 2831 pacientes demostró que aquellos que consumen más de 3 yemas a la semana, tienen un área de la placa carótida comparable con los pacientes fumadores. Entonces, si bien el huevo tiene moléculas antiinflamatorias que podrían haber interferido en el evento aterosclerótico, el exceso de yema lo revirtió.

El perfil hepático obtenido de los ratones C57BL6 alimentados con la dieta elaborada, demostró que hay un aumento significativo del colesterol. Por lo tanto, la dieta formulada por el laboratorio es hipercolesterolémica manteniendo otros parámetros del perfil como triglicéridos normales. Los valores de colesterol obtenidos coinciden con los reportados por otros investigadores al igual que la disminución de HDL obtenida a partir del segundo mes de la dieta en estudio (70)

Una variable a considerar es la composición de la dieta ya que si bien mantiene los porcentajes descritos por Piagen, varía en su composición. A pesar de esto se siguen utilizando variables de la dieta Piagen ya que su principal ventaja es la reproducibilidad del perfil lipídico obtenido (71). Otros trabajos han intentado proponer otras dietas aterogénicas, como por ejemplo una dieta diabétogénica, es decir, una dieta 35% de grasa, 36% de carbohidratos de 6 a 14 semanas, con la ventaja que esta dieta no tiene ácido cólico, por lo tanto, se evita su toxicidad. Si bien esta dieta era prometedora ya que variaba el perfil lipídico, el colesterol aumentó de 69µg/ml a 185µg/ml, similar a lo obtenido en ratones con dieta tipo Piagen (de 73µg/ml a 160µg/ml), no logrando generar aumento en el área de las lesiones aórticas. Por lo tanto, si bien esta dieta promovía dos factores de riesgo de aterosclerosis como la diabetes y la hipercolesterolemia, no provocó alteraciones del área, presuntamente por la falta de ácido cólico en la dieta (70). Así, el ácido cólico es esencial para la efectividad de una dieta aterogénica en ratones no transgénicos (C57BL6) (70)

El efecto del ácido cólico en la dieta no es sobre el colesterol, ya que estudios han demostrado que ratones C57BL6 alimentados con ácido cólico no variaron el colesterol comparado con ratones alimentados sin esta sal biliar. Por el contrario, el ácido cólico actúa sobre el HDL ya que disminuye su

concentración plasmática hasta un 35% en ratones no transgénicos y el ratones Apo AI también disminuye su HDL circulante (250%) y Apo AI circulante disminuye a la mitad de su concentración inicial (69). La formación de estrías lipídicas con la dieta proporcionada a los ratones se lograron a los 3 meses, pero se obtuvieron pequeños acúmulos de lípidos como lo mencionado en bibliografía sobre las estrías lipídicas de ratones no transgénicos en los que se intentaba generar aterosclerosis mediante la dieta (46)

Respecto al análisis histológicos de los otros tejidos extraídos de ratones sujetos a experimentación, no se observaron alteraciones. Esta observación contrasta o se asemeja a lo publicado en bibliografía dependiendo del órgano en estudio ya que:

- En tejido renal, lo obtenido se contradice con lo publicado en bibliografía ya que se ha descrito que las dietas altas en grasas, independiente del ácido cólico, inducen nefropatía en rata(72) y en ratones C57BL6, donde se observó acumulación de lípidos a nivel renal (73)
- En tejido pulmonar existe evidencia similar reportada en bibliografía donde se apoya la observación obtenida, ya que no se observa ni acumulación lipídica ni estrías del septo alveolar (74) en ratones C57BL6 alimentados con una dieta tipo western (sin el uso del ácido cólico).

El tejido hepático presenta un evidente deterioro a nivel micro y macroscópico comparable a lo observado por otros investigadores donde histológicamente se observa esteatosis hepática, inflamación lobular y *ballooning* por el solo hecho de utilizar una dieta alta en grasas (75).

Ratones C57 alimentados con dieta alta en grasas e infectados con

AdoLOXIN

Estandarización del vector adenoviral

La infección del ratones C57 se realizó mediante la utilización del vector Adenoviral L5 (Ads 5), uno de los mayormente utilizados en células humanas porque tienen una alta velocidad de replicación y son capaces de alcanza altas concentraciones en suero (76).

El tropismo de los Ads 5 se ha descrito mediante la cuantificación de la carga viral 1h post infección en ratones y se ha obtenido que el Ad5 tiene las siguientes afinidades: Tejido hepático>Tejido pulmonar>bazo>riñon>pulmón (77).En este trabajo, utilizando el equipo LICOR Impulse, se visualizó sólo expresión mediante el seguimiento de GFP en pulmón.

En ratones, la inyección de adenovirus a través de la vena de la cola se caracteriza por levantar una respuesta inmune innata 6 horas post infección levantada por las proteínas de cápside y la respuesta adaptativa se lleva a cabo principalmente con linfocitos T CD4⁺ que reconocen epítopes de las regiones hipervariables del hexon ((43, 44). La liberación de anticuerpos es directamente proporcional a la dosis utilizada y se ha visto que la expresión de dosis que van desde 1×10^9 hasta 1×10^{11} UFC/ml duran en circulación entre 12 a 16 semanas declinando todas las dosis entre ese tiempo. Respecto a la funcionalidad del virus se observa que en altas dosis de vector hay un alto porcentaje de la proteína de interés que no presenta funcionalidad, por lo cual no tiene sentido inyectar altas dosis virales.

El uso de vectores adenovirales ha sido ampliamente utilizado para el estudio de la aterosclerosis, a pesar de que ha sido cuestionada de efectividad por su corto tiempo en circulación. Es por esto que se ha desarrollado nuevos protocolos para intentar suplir la baja afinidad de Ad5 con el corazón. Una de estas herramientas es la entrega de Ad5 a nivel local, es decir exponer el lumen de la arteria a una solución adenoviral durante 10 minutos. Si bien esta técnica tiene como ventaja la desaparición de efectos secundarios producto del virus. Al comparar la eficiencia del vector Ad-IL10, no hubo diferencias comparada con la entrega sistémica del virus (vía venosa). Respecto a su

efecto en la reversión de la aterosclerosis, se observó que el porcentaje del área de placa disminuyó en ambos sistemas de entrega vectorial (43, 76)

Idealmente, los ensayos de sobreexpresión utilizando vectores virales necesitan cuantificar la proteína en cuestión en el modelo animal de experimentación. En este trabajo, también se cuantificó el ARNm del LOXIN en los distintos órganos utilizados. Si bien se detectó con una señal muy baja en todos los ratones del estudio, sin diferenciar entre ratones inyectados con el vector vacío o vector AdoLOXIN. Este resultado es discordante pero puede deberse a una falla en la metodología de detección utilizada. La mayoría de los investigadores utilizan ensayos de ELISA para detectar el virus en circulación y es posible realizar un seguimiento vectorial logrando obtener su *peak* de expresión. En algunos experimentos el *peak* de expresión es 12 días y luego comienza a disminuir su concentración. Sin embargo, hay investigadores que lo han logrado detectar hasta 217 días. Otra metodología utilizada es la detección del ARNm de la proteína en estudio en distintos órganos, pero 1 hora después de la inyección del vector adenoviral, en cambio, la detección de LOXIN que se realizó en el laboratorio fue terminado el experimento, una semana después de la última dosis (43, 76). Por último, una posible causa de obtener expresión basal de LOXIN es el uso de partidores dirigidos contra LOXIN, una proteína que eventualmente se podría estar expresando constitutivamente en ratón. Para

eliminar esa interferencia, algunos investigadores utilizan partidores dirigidos contra alguna proteína viral presente en el adenovirus como el hexon (77)

En base a estos antecedentes se decidió utilizar una dosis de 3×10^8 UFC/ml para evitar levantar demasiado la respuesta inmune adaptativa y lograr los efectos de expresión de la proteína LOXIN. Además existe evidencia que 5×10^8 UFC/ml y 2×10^8 UFC/ml son capaces de lograr un efecto de la proteína deseada cuando se inyectan por la cola (78, 79) y es capaz de encontrarse en circulación a pesar que muchos investigadores utilizan dosis del orden de 10^{10} u 10^{11} para generar una concentración alta de virus circulantes (80).

La desventaja del uso de vectores adenovirales es la discrepancia que existe en la eficacia de la reinyección para reforzar la primera dosis ya que se ha visto en ratones adultos la reinyección no aumenta el vector en circulación, al contrario de la inyección en ratones recién nacidos que la reinyección es exitosa , aumentando el vector el circulación y no levantando los títulos de anticuerpos en sangre. A pesar de estas evidencias el equipo del laboratorio decidió hacer reforzamiento de la dosis, ya que se estandarizó el número de dosis necesaria para mantener el ARNm de LOXIN en altos niveles y se obtuvo que 4 dosis mensuales se lograba este efecto. En bibliografía también hay equipos que han decidido reforzar la dosis obteniendo buenos resultados en vector circulante (81).

Expresión de LOX-1 y efecto de LOXIN sobre LOX-1 en ratones C57 alimentados con una dieta alta en grasas.

La distribución de LOX-1 en los distintos órganos del cuerpo ha sido arduamente caracterizada, según las bases de datos FANTOM5, GTEX y HPA los tejidos que tienen mayor expresión de ARNm son pulmón y placenta, lo cual se contradice con los resultados obtenidos, ya que si bien también se encontró expresión de LOX-1 en pulmón, en tejidos como corazón, riñón e hígado también se encontró expresión constitutiva del receptor. Por otra parte, se encontró expresión de LOX-1 en aorta y esta no se vio aumentada por la dieta alta en grasas, evidencia que también han encontrado otros investigadores (65). Respecto a los tejidos, no hubo una inducción de expresión de LOX-1 con dieta hipercolesterolemica en corazón, pulmón, hígado o riñón.

La infección de ratones C57 con el adenovirus AdoLOXIN o AdoMOCK a partir de los 2 meses de dieta alta en grasa cuya dosis se reforzó 4 veces, una vez por semana, durante un mes. El análisis macroscópico de las arterias expuestas a la tinción de lípidos evidenció una disminución en la acumulación de acúmulos lipídicos cuando los ratones se trataron con el vector adenoviral que porta el gen de LOXIN. Estos resultados se condicen con las evidencias

obtenidas en ratones Apo E knock out donde el uso del vector LOX-1 humano y el vector LOXIN son capaces de disminuir el porcentaje de área de la placa (39)

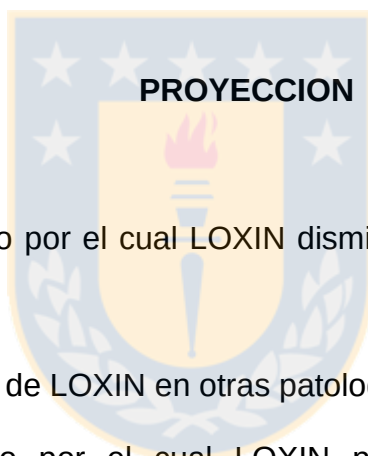
A partir de los tejidos aislados de los ratones en estudio se evaluó la expresión de ARN mensajero. Se observó una aparente disminución en la expresión de LOX-1 en órganos como pulmón, corazón, hígado y la aorta cuando los ratones sobreexpresaron el adenovirus AdoLOXIN,; no así en el tejido renal donde la sobreexpresión de LOXIN provocó un aumento en la expresión del mensajero para LOX-1.

Es importante destacar que cuando se relacionan las expresiones relativas del mensajero con lo observado en la histología de los distintos tejidos se encuentra que hay una reversión en los hallazgos patológicos asociados al tejido hepático y aorta cuando existe la presencia de la proteína LOXIN. En el caso de la aorta, esta observación se corrobora con la disminución de la proteína LOX-1 observada en la inmunohistoquímica.

La integración de los resultados obtenidos en aorta en ratones C57BL6 inyectados con AdoLOXIN permiten concluir que, como consecuencia de la disminución de LOX-1, se ven los efectos protectores sobre la arteria aorta. Por lo tanto LOXIN por un mecanismo que aún no ha sido dilucidado, presuntamente mediante un *feedback* negativo estaría regulando la expresión de una las variantes del *splicing* alternativo del gen OLR-1, LOX-1.

CONCLUSION

La sobreexpresión de la proteína LOXIN in vivo es capaz de disminuir la expresión de proteínas y ARNm de LOX-1 y, como consecuencia, generar un rol protector frente a aterosclerosis.



Dilucidar el mecanismo por el cual LOXIN disminuye la expresión de LOX-1 in vivo.

El uso del rol protector de LOXIN en otras patologías como la tumorigénesis.

Evaluar el mecanismo por el cual LOXIN permite la recuperación de la esteatosis hepática.

REFERENCIAS

1. Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension*. 2005;45(3):321-5.
2. Ankeny RF, Ankeny CJ, Nerem RM, Jo H. Maturing EPCs into endothelial cells: may the force be with the EPCs: focus on "Fluid shear stress induces differentiation of circulating phenotype endothelial progenitor cells". *Am J Physiol Cell Physiol*. 303. United States 2012. p. C589-91.
3. Alexandru N, Popov D, Dragan E, Andrei E, Georgescu A. Circulating endothelial progenitor cell and platelet microparticle impact on platelet activation in hypertension associated with hypercholesterolemia. *PLoS One*. 2013;8(1):e52058.
4. Arjuman A, Chandra NC. Effect of IL-10 on LOX-1 expression, signalling and functional activity: an atheroprotective response. *Diab Vasc Dis Res*. 2013;10(5):442-51.
5. Auge N, Garcia V, Maupas-Schwalm F, Levade T, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Oxidized LDL-induced smooth muscle cell proliferation involves the EGF receptor/PI-3 kinase/Akt and the sphingolipid signaling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(12):1990-5.
6. Bakthavatsalam D, Soung RH, Tweardy DJ, Chiu W, Dixon RA, Woodside DG. Chaperonin-containing TCP-1 complex directly binds to the cytoplasmic domain of the LOX-1 receptor. *FEBS Lett*. 2014;588(13):2133-40.
7. Hansson GK, Robertson AK, Soderberg-Naucler C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:297-329.
8. Ruiz-Esparza GU, Flores-Arredondo JH, Segura-Ibarra V, Torre-Amione G, Ferrari M, Blanco E, et al. The physiology of cardiovascular disease and innovative liposomal platforms for therapy. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:629-40.
9. O'Donnell CJ, Elosua R. [Cardiovascular risk factors. Insights from Framingham Heart Study]. *Rev Esp Cardiol*. 2008;61(3):299-310.
10. Nabel EG. Cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2003;349(1):60-72.
11. Scott J. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. *Curr Opin Genet Dev*. 2004;14(3):271-9.
12. Eisenberg S, Windmueller HG, Levy RI. Metabolic fate of rat and human lipoprotein apoproteins in the rat. *J Lipid Res*. 1973;14(4):446-58.

13. Thaxton CS, Rink JS, Naha PC, Cormode DP. Lipoproteins and lipoprotein mimetics for imaging and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;106(Pt A):116-31.
14. Yu X, Guo C, Fisher PB, Subjeck JR, Wang XY. Scavenger Receptors: Emerging Roles in Cancer Biology and Immunology. *Adv Cancer Res.* 2015;128:309-64.
15. Pluddemann A, Neyen C, Gordon S. Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods.* 2007;43(3):207-17.
16. Greaves DR, Gordon S. The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl:S282-6.
17. Gowen BB, Borg TK, Ghaffar A, Mayer EP. The collagenous domain of class A scavenger receptors is involved in macrophage adhesion to collagens. *J Leukoc Biol.* 2001;69(4):575-82.
18. Guo L, Chen M, Song Z, Daugherty A, Li XA. C323 of SR-BI is required for SR-BI-mediated HDL binding and cholesteryl ester uptake. *J Lipid Res.* 2011;52(12):2272-8.
19. Zani IA, Stephen SL, Mughal NA, Russell D, Homer-Vanniasinkam S, Wheatcroft SB, et al. Scavenger receptor structure and function in health and disease. *Cells.* 2015;4(2):178-201.
20. Ramprasad MP, Terpstra V, Kondratenko N, Quehenberger O, Steinberg D. Cell surface expression of mouse macrosialin and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(25):14833-8.
21. Adachi H, Tsujimoto M. Characterization of the human gene encoding the scavenger receptor expressed by endothelial cell and its regulation by a novel transcription factor, endothelial zinc finger protein-2. *J Biol Chem.* 2002;277(27):24014-21.
22. Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2002;14(1):123-8.
23. Goyal T, Mitra S, Khaidakov M, Wang X, Singla S, Ding Z, et al. Current Concepts of the Role of Oxidized LDL Receptors in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2012.
24. Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, et al. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature.* 1997;386(6620):73-7.

25. Mehta JL, Chen J, Hermonat PL, Romeo F, Novelli G. Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiovasc Res.* 2006;69(1):36-45.
26. Pirillo A, Norata GD, Catapano AL. LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:152786.
27. Chen XP, Du GH. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1: protein, ligands, expression and pathophysiological significance. *Chin Med J (Engl).* 2007;120(5):421-6.
28. Biocca S, Filesi I, Mango R, Maggiore L, Baldini F, Vecchione L, et al. The splice variant LOXIN inhibits LOX-1 receptor function through hetero-oligomerization. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;44(3):561-70.
29. Pothineni NVK, Karathanasis SK, Ding Z, Arulandu A, Varughese KI, Mehta JL. LOX-1 in Atherosclerosis and Myocardial Ischemia: Biology, Genetics, and Modulation. *J Am Coll Cardiol.* 2017;69(22):2759-68.
30. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. LOX-1-Mediated Effects on Vascular Cells in Atherosclerosis. *Cell Physiol Biochem.* 2016;38(5):1851-9.
31. Inoue K, Arai Y, Kurihara H, Kita T, Sawamura T. Overexpression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 induces intramyocardial vasculopathy in apolipoprotein E-null mice. *Circ Res.* 2005;97(2):176-84.
32. Mango R, Biocca S, del Vecchio F, Clementi F, Sangiuolo F, Amati F, et al. In vivo and in vitro studies support that a new splicing isoform of OLR1 gene is protective against acute myocardial infarction. *Circ Res.* 2005;97(2):152-8.
33. Mango R, Predazzi IM, Romeo F, Novelli G. LOX-1/LOXIN: the yin/yang of atherosclerosis. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2011;25(5):489-94.
34. Rizzacasa B, Morini E, Pucci S, Murdocca M, Novelli G, Amati F. LOX-1 and Its Splice Variants: A New Challenge for Atherosclerosis and Cancer-Targeted Therapies. *Int J Mol Sci.* 2017;18(2).
35. Li H, Li XX, Ma Q, Cui J. The variability of oxLDL-induced cytotoxicity on different types of cell lines. *Cell Biochem Biophys.* 2013;67(2):635-44.
36. Tejedor JR, Tilgner H, Iannone C, Guigo R, Valcarcel J. Role of six single nucleotide polymorphisms, risk factors in coronary disease, in OLR1 alternative splicing. *Rna.* 2015;21(6):1187-202.
37. Gambino R, Bo S, Musso G, Pagano G, Cassader M. Loxin polymorphism is associated with increased resistin levels and with oxidative status. *Clin Biochem.* 2011;44(12):1015-7.

38. Biocca S, Falconi M, Filesi I, Baldini F, Vecchione L, Mango R, et al. Functional analysis and molecular dynamics simulation of LOX-1 K167N polymorphism reveal alteration of receptor activity. *PLoS One*. 2009;4(2):e4648.
39. White SJ, Sala-Newby GB, Newby AC. Overexpression of scavenger receptor LOX-1 in endothelial cells promotes atherogenesis in the ApoE(-/-) mouse model. *Cardiovasc Pathol*. 2011;20(6):369-73.
40. Veas C, Jara C, Willis ND, Perez-Contreras K, Gutierrez N, Toledo J, et al. Overexpression of LOXIN Protects Endothelial Progenitor Cells From Apoptosis Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2016;67(4):326-35.
41. Sawamura T, Wakabayashi I, Okamura T. LOX-1 in atherosclerotic disease. *Clin Chim Acta*. 2015;440:157-63.
42. Wong CM, McFall ER, Burns JK, Parks RJ. The role of chromatin in adenoviral vector function. *Viruses*. 2013;5(6):1500-15.
43. Wold WS, Toth K. Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy. *Curr Gene Ther*. 2013;13(6):421-33.
44. Walter J, You Q, Hagstrom JN, Sands M, High KA. Successful expression of human factor IX following repeat administration of adenoviral vector in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(7):3056-61.
45. Aoyama T, Chen M, Fujiwara H, Masaki T, Sawamura T. LOX-1 mediates lysophosphatidylcholine-induced oxidized LDL uptake in smooth muscle cells. *FEBS Lett*. 2000;467(2-3):217-20.
46. Meyrelles SS, Peotta VA, Pereira TM, Vasquez EC. Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids Health Dis*. 2011;10:211.
47. Bond AR, Jackson CL. The fat-fed apolipoprotein E knockout mouse brachiocephalic artery in the study of atherosclerotic plaque rupture. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:379069.
48. Rehman SU, Husain MA, Sarwar T, Ishqi HM, Tabish M. Modulation of alternative splicing by anticancer drugs. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2015;6(4):369-79.
49. Cho HJ, Kim JK, Kim KD, Yoon HK, Cho MY, Park YP, et al. Upregulation of Bcl-2 is associated with cisplatin-resistance via inhibition of Bax translocation in human bladder cancer cells. *Cancer Lett*. 2006;237(1):56-66.
50. Wang LJ, Yu YH, Zhang LG, Wang Y, Niu N, Li Q, et al. Taurine rescues vascular endothelial dysfunction in streptozocin-induced diabetic rats: correlated

with downregulation of LOX-1 and ICAM-1 expression on aortas. *Eur J Pharmacol.* 2008;597(1-3):75-80.

51. Gradinaru D, Borsa C, Ionescu C, Prada GI. Oxidized LDL and NO synthesis--Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing. *Mech Ageing Dev.* 2015;151:101-13.

52. Pollard M, McGivan J. The rat hepatoma cell line H4-II-E-C3 expresses high activities of the high-affinity glutamate transporter GLT-1A. *FEBS Lett.* 2000;484(2):74-6.

53. Zhang Q, Liu J, Huang W, Tian L, Quan J, Wang Y, et al. oxLDL induces injury and defenestration of human liver sinusoidal endothelial cells via LOX1. *J Mol Endocrinol.* 2014;53(2):281-93.

54. Cominacini L, Pasini AF, Garbin U, Davoli A, Tosetti ML, Campagnola M, et al. Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2000;275(17):12633-8.

55. Terpstra V, van Amersfoort ES, van Velzen AG, Kuiper J, van Berkel TJ. Hepatic and extrahepatic scavenger receptors: function in relation to disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(8):1860-72.

56. Zabirnyk O, Liu W, Khalil S, Sharma A, Phang JM. Oxidized low-density lipoproteins upregulate proline oxidase to initiate ROS-dependent autophagy. *Carcinogenesis.* 2010;31(3):446-54.

57. Nakano S, Sugihara M, Yamada R, Katayanagi K, Tate S. Structural implication for the impaired binding of W150A mutant LOX-1 to oxidized low density lipoprotein, OxLDL. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1824(5):739-49.

58. Park H, Adsit FG, Boyington JC. The 1.4 angstrom crystal structure of the human oxidized low density lipoprotein receptor lox-1. *J Biol Chem.* 2005;280(14):13593-9.

59. Bruno V, Rizzacasa B, Pietropolli A, Capogna MV, Massoud R, Ticconi C, et al. OLR1 and Loxin Expression in PBMCs of Women with a History of Unexplained Recurrent Miscarriage: A Pilot Study. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2017;21(6):363-72.

60. Lee YT, Lin HY, Chan YW, Li KH, To OT, Yan BP, et al. Mouse models of atherosclerosis: a historical perspective and recent advances. *Lipids Health Dis.* 2017;16(1):12.

61. Jawien J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol.* 2004;55(3):503-17.

62. Moore-Carrasco R, Aranguéz-Arellano C, Razmilic I, Toloza L, Morales E, Argiles JM, et al. A high fat diet in CF-1 mice: An experimental model for metabolic syndrome. *Mol Med Rep*. 2008;1(3):401-5.
63. Kuhlencordt PJ, Hotten S, Schodel J, Rutzel S, Hu K, Widder J, et al. Atheroprotective effects of neuronal nitric oxide synthase in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(7):1539-44.
64. Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, et al. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2002;106(22):2767-70.
65. Fisker Hag AM, Pedersen SF, Kjaer A. Gene expression of LOX-1, VCAM-1, and ICAM-1 in pre-atherosclerotic mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;377(2):689-93.
66. M F, L A, P R. Perfil lipídico, protéico y glicemia en ratones NMRI, C57BL/6 y Balb/c producidos en la UCLA. Venezuela. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*. 2008;13:92-103.
67. C S-G, J B, B I. Modelos experimentales de aterosclerosis. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2013;13:3-12.
68. Song P, Zhang Y, Klaassen CD. Dose-response of five bile acids on serum and liver bile acid concentrations and hepatotoxicity in mice. *Toxicol Sci*. 2011;123(2):359-67.
69. Srivastava RA, Srivastava N, Averna M. Dietary cholic acid lowers plasma levels of mouse and human apolipoprotein A-I primarily via a transcriptional mechanism. *Eur J Biochem*. 2000;267(13):4272-80.
70. Schreyer SA, Wilson DL, LeBoeuf RC. C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1998;136(1):17-24.
71. Paigen B, Morrow A, Brandon C, Mitchell D, Holmes P. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis*. 1985;57(1):65-73.
72. M N, T K, C N, M S, S M, K M, et al. An Atherogenic Paigen-Diet Aggravates Nephropathy in Type 2 Diabetic OLETF Rats. *PLoS ONE* 2015;10.
73. Jiang T, Wang Z, Proctor G, Moskowitz S, Liebman SE, Rogers T, et al. Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2005;280(37):32317-25.

74. Ouyang Q, Huang Z, Lin H, Ni J, Lu H, Chen X, et al. Apolipoprotein E deficiency and high-fat diet cooperate to trigger lipodosis and inflammation in the lung via the toll-like receptor 4 pathway. *Mol Med Rep.* 2015;12(2):2589-97.
75. Pindjakova J, Sartini C, Lo Re O, Rappa F, Coupe B, Lelouvier B, et al. Gut Dysbiosis and Adaptive Immune Response in Diet-induced Obesity vs. Systemic Inflammation. *Front Microbiol.* 2017;8:1157.
76. Von Der Thusen JH, Kuiper J, Fekkes ML, De Vos P, Van Berkel TJ, Biessen EA. Attenuation of atherogenesis by systemic and local adenovirus-mediated gene transfer of interleukin-10 in LDLr^{-/-} mice. *Faseb j.* 2001;15(14):2730-2.
77. Alba R, Bradshaw AC, Coughlan L, Denby L, McDonald RA, Waddington SN, et al. Biodistribution and retargeting of FX-binding ablated adenovirus serotype 5 vectors. *Blood.* 2010;116(15):2656-64.
78. K E, K O, M M, A F, K M, S K, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of adiponectin reduces the severity of collagen-induced arthritis in mice *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2009;378:186–91.
79. Z H, J R, A P, M Z, Z Z, J G, et al. A modified hTERT Promoter-directed Oncolytic Adenovirus Replication with Concurrent Inhibition of TGF β Signaling for Breast Cancer Therapy *Cancer Gene Ther.* 2010;17(4):235–43.
80. T T, S M, A S, J W, M M, K O, et al. A mouse model for adenovirus gene delivery. *PNAS.* 2001;98:7911.
81. Stermann DH, Recio A, Haas AR, Vachani A, Katz SI, Gillespie CT, et al. A phase I trial of repeated intrapleural adenoviral-mediated interferon-beta gene transfer for mesothelioma and metastatic pleural effusions. *Mol Ther.* 2010;18(4):852-60.