



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“BÚSQUEDA DE PATRONES DE EXPRESIÓN
DIFERENCIAL EN UN MODELO DE ATEROSCLEROSIS
MEDIANTE LA INDUCCIÓN AL ESTRÉS OXIDATIVO”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

MABEL ZAMIRA IBARRA ABUNDIS



MÉXICO, D.F.

2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: REBECCA ELIZABETH FRANCO Y BOURLAND

VOCAL: Profesor: FELIPE CRUZ GARCIA

SECRETARIO: Profesor: JUAN PABLO REYES GRAJEDA

1er. SUPLENTE: Profesor: JOSE PREDRAZA CHAVERRI

2° SUPLENTE: Profesor: MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE
MEDICINA GENÓMICA (INMEGEN)**

ASESOR DEL TEMA: DR. JUAN PABLO REYES GRAJEDA

SUSTENTANTE: MABEL ZAMIRA IBARRA ABUNDIS

INDICE

	Página
ABREVIATURAS.	I
RESUMEN.	1
1. ANTECEDENTES	2
1.1. Aterosclerosis	2
1.2. Lipoproteínas	5
1.3. Estrés oxidativo	9
1.4. Microarreglos	14
2. HIPOTESIS.	17
3. OBJETIVO GENERAL.	17
4. OBJETIVOS PARTICULARES.	17
5. MATERIALES Y METODOS.	18
5.1 Cultivo celular de VSMC.	18
5.2 Aislamiento y purificación de LDLn.	19
5.3 Modificación de LDLn.	21
5.4 Ensayo de internalización.	21
5.5 Extracción de ARN.	22
5.6 Elaboración de microarreglos.	23
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	24
7. CONCLUSIONES	38
8. PRESPECTIVAS.	39
9. BIBLIOGRAFÍA.	40

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Apo: Apolipoproteínas

ARN: Ácido ribonucleico

ATCC: American Type Culture Collection

C-HDL: Colesterol de HDL

C-LDL: Colesterol de LDL

CT: Colesterol total

DUSP1: Fosfatasa específica dual 1 (Dual specificity phosphatase 1)

ERCC2: Gen de reparación por escisión 2 (Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2)

ERCC6: Gen de reparación por escisión 6 (Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6)

ERN: Especies reactivas de nitrógeno

ERO: Especies reactivas de oxígeno

FPLC: Cromatografía líquida rápida de proteínas (Fast protein liquid chromatography)

GCLM: Subunidad moduladora de la glutamato cisteína ligasa (Glutamate-cysteine ligase modifier subunit)

GSH: Glutación

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LDLR: Receptor de LDL (Low density lipoprotein receptor)

LIAS: Acido lipoico sintetasa (Lipoic acid synthetase)

Lp: Lipoproteínas

LRRK2: Cinasa 2 rica en repeticiones de leucinas (Leucin-rich repeat kinase 2)

MUC1: Mucina 1 (Mucin 1)

NAMPT: Nicotinamida fosforribosil transferasa (Nicotinamide phosphoribosyl transferase)

NFE2L2: Factor nuclear eritroide derivado 2L2 (Nuclear factor erytroid-derived 2-like-2)

OXR1: Gen de resistencia a la oxidación 1 (Oxidation resistance 1)

PPP1R15B: Subunidad reguladora 15B de la proteína fosfatasa 1 (Protein phosphatase 1, regulatory subunit 15B)

QM: Quilomicrones

SCARA3: Receptor scavenger clase A tipo 3 (Scavenger receptor class A, member 3)

SEPP1: Selenoproteína P plasma 1 (Selenoprotein P plasma 1)

SR-BI: Receptor scavenger clase B tipo I

Tg: Triglicéridos

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

VSMC: Células de músculo liso vascular

RESUMEN

El estrés oxidativo es un estado de la célula en la cual se encuentra alterada la homeostasis de óxido-reducción intracelular es decir, el balance entre prooxidantes y antioxidantes. Este desbalance se produce a causa de una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ERO's) y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes, conduciendo a daño celular.

En los últimos tiempos a aumentado el número de enfermedades en cuya etiología está involucrado el estrés oxidativo que se produce cuando el ataque oxidativo supera las defensas antioxidantes, una de estas patologías es la aterosclerosis.

La aterosclerosis es un proceso activo, degenerativo, largo y lento, que cursa con la formación de placas de ateroma en el sistema arterial en el que participan los elementos característicos de la inflamación crónica con mecanismos celulares (células endoteliales, monocitos, células de músculo liso y plaquetas) y moleculares (alteración en endotelio y lesión con aumento en la permeabilidad) de distinta relevancia, que pueden trascurrir sin sintomatología hasta estadios avanzados en los que se manifiestan complicaciones coronarias, cerebrales, digestivas o enfermedades oclusivas de las arterias periféricas.

El presente trabajo pretendió evaluar mediante microarreglos la expresión génica de los fenómenos moleculares asociados a la endocitosis de lipoproteínas de baja densidad nativas y oxidadas, haciendo énfasis en aquellos relacionados con el estrés oxidativo.

1. ANTECEDENTES

1.1 Aterosclerosis.

La aterosclerosis es la principal fuente de morbilidad y mortalidad en el mundo desarrollado. Se caracteriza por la acumulación de depósitos de colesterol en las arterias de mediano y gran tamaño. Esta situación da lugar a una proliferación de cierto tipo de células dentro de la pared arterial que poco a poco inciden en la luz del vaso e impiden el flujo sanguíneo. Este proceso puede durar décadas hasta que una lesión aterosclerótica, a través de las fuerzas físicas del flujo de sangre, se altera y son expuestos componentes profundo de la pared arterial a la sangre circulante, lo que lleva a la trombosis y queda comprometido el suministro de oxígeno a órganos como el corazón y el cerebro.²

La pérdida de la función cardíaca y cerebral como resultado de la reducción del flujo sanguíneo se conoce como ataque cardíaco y accidente cerebro vascular, respectivamente, y estas dos manifestaciones clínicas de la aterosclerosis se refieren a menudo como enfermedad de las arterias coronarias y la enfermedad cerebro vascular.

Los factores de riesgo pueden ser definidos como las características biológicas de los individuos en los que los estudios epidemiológicos han demostrado que se correlacionan con el subsecuente desarrollo de enfermedades cardiovasculares.²

- ➔ Edad
- ➔ Género
- ➔ Obesidad
- ➔ Tabaquismo
- ➔ Hipertensión
- ➔ Diabetes mellitus
- ➔ Colesterol sérico

La aterosclerosis se manifiesta con una serie de lesiones histológicas de la arteria conocidas como placa y que se caracterizan en seis tipos diferentes, los cuales reflejan el principio, desarrollo y maduración de la enfermedad, Figura 1.

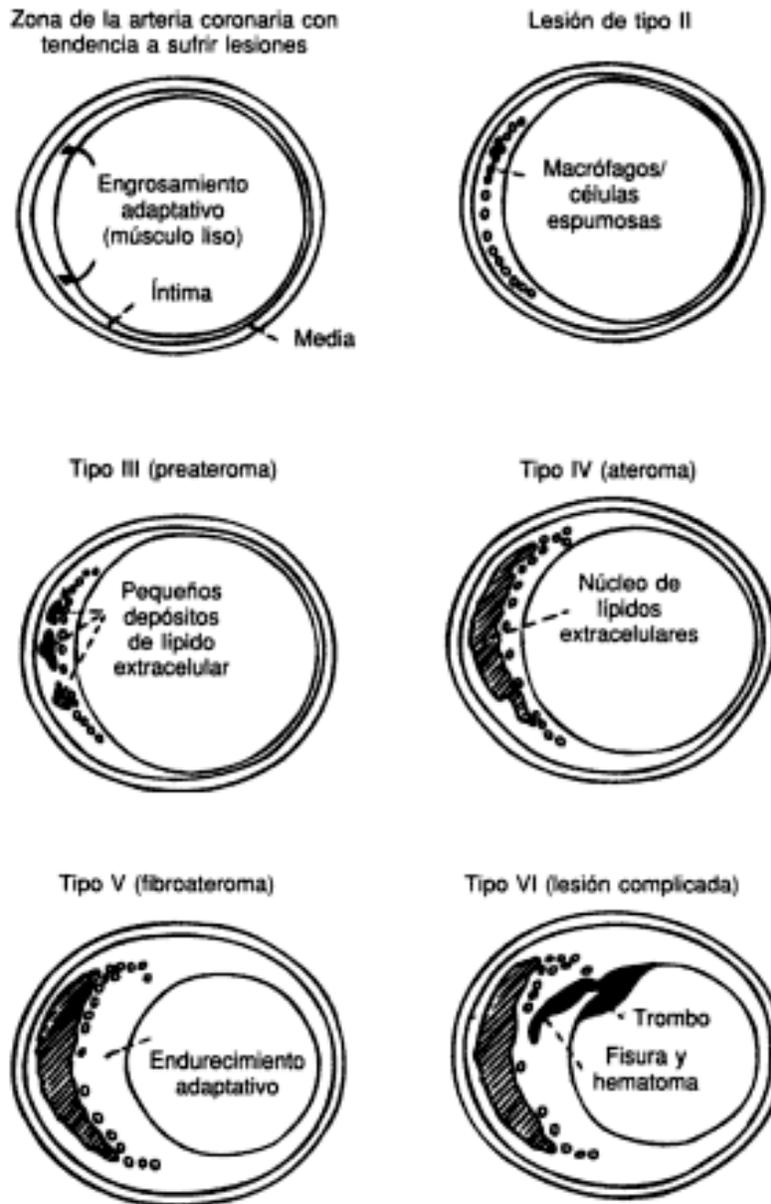


FIGURA 1. Diferentes tipos de lesiones ateroscleróticas.

La progresión de la lesión de la aterosclerosis se representa desde la etapa más temprana (superior izquierda) a la más avanzada (inferior derecha) culminando con la ruptura de la placa y la trombosis asociada.

Fisiopatología de la aterosclerosis.

Durante los últimos 150 años se han hecho numerosos esfuerzos para explicar los complejos acontecimientos relacionados con el desarrollo de la aterosclerosis. Hay tres hipótesis acerca de esta patología que se han desarrollado bajo varios trabajos de investigación: respuesta a la lesión, respuesta a la retención y la modificación oxidativa. En esta investigación tomamos en cuenta la hipótesis de modificación oxidativa.²

La hipótesis de modificación oxidativa, se centra en el concepto de que las LDL en su estado natural no son aterogénicas. Sin embargo, las LDL modificadas químicamente son fácilmente internalizadas por los macrófagos a través del "receptor scavenger. Figura 2

Estas observaciones constituyen la base de la hipótesis de modificación oxidativa de la aterosclerosis, en los que la LDL atraviesa el espacio subendotelial arterial. Durante este proceso, los lípidos de las LDL están sujetos a la oxidación y, en consecuencia, los residuos de lisina de la apolipoproteína B-100 se modifican en tal forma que la carga negativa neta de la partícula aumenta. Esta modificación hace que los macrófagos capten LDL a través de los receptores scavenger, produciendo células espumosas. La acumulación de células espumosas forman la lesión aterosclerótica.

El proceso de oxidación de LDL está asociado con numerosos eventos potencialmente proaterogénicos. Por ejemplo, durante las etapas iniciales de la oxidación de LDL "*in vitro*", la modificación de los lípidos de LDL puede producirse en ausencia de cualquier cambio en la apolipoproteína B-100. Estas LDL se dice que están mínimamente modificadas y se ha demostrado "*in vitro*" que inducen oxidación tanto en el músculo liso como en las células endoteliales, lo que resulta en el reclutamiento de células inflamatorias.²

Las LDL oxidadas (LDLox) son quimiotácticas para los monocitos y los linfocitos T, y estimulan la proliferación de células de músculo liso. El reclutamiento de células

inflamatorias puede dar lugar a la oxidación continua de las LDL, preparando el escenario para la expansión de la lesión aterosclerótica.

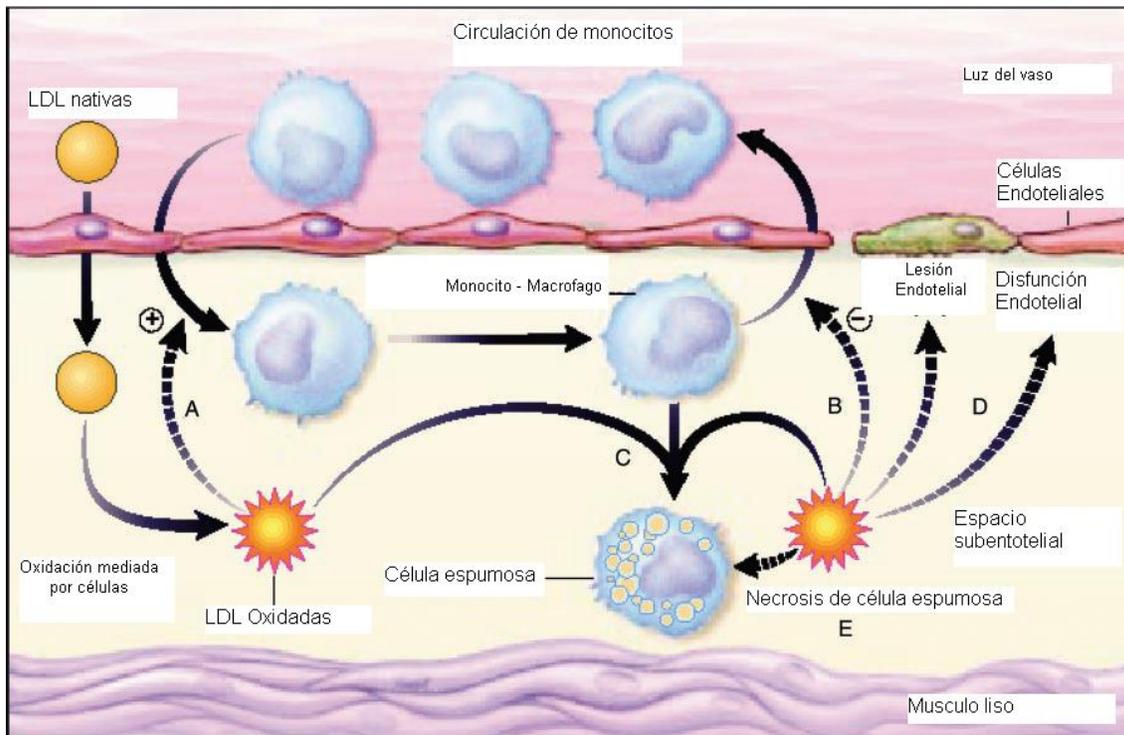


FIGURA 2. Hipótesis de la modificación oxidativa de la aterosclerosis.

Las LDL quedan atrapadas en el espacio subendotelial donde son sujetas a la oxidación por células vasculares residente como son las células de músculo liso, células endoteliales y macrófagos. Las LDL oxidadas estimulan la quimiotaxis de monocitos (A), impide la salida de monocitos (B) y genera la formación de células espumosas (C). Una vez formadas, las LDL oxidadas también producen la disfunción y lesión endotelial, lo que las convierte en células espumosas necróticas debido a la acumulación de LDL oxidadas.

1.2 Lipoproteínas.

Buena parte de los lípidos son insolubles en agua, lo que plantea un problema para su transporte por los líquidos biológicos, sangre y linfa. Para superarlo, existen mecanismos celulares como una familia de proteínas plasmáticas denominadas lipoproteínas, de naturaleza globular, que se componen de lípidos y proteínas y están diseñadas para formar un núcleo hidrofóbico constituido por los

materiales más insolubles (triacilgliceroles, ésteres de colesterol), circundado por una periferia hidrofílica en la que predominan las proteínas (denominadas genéricamente apolipoproteínas) y los lípidos más polares (fosfolípidos y colesterol). Con ello se consigue que los lípidos más apolares no se relacionen con el entorno acuoso. En la Figura 3 se ejemplifica la composición de una lipoproteína.⁴

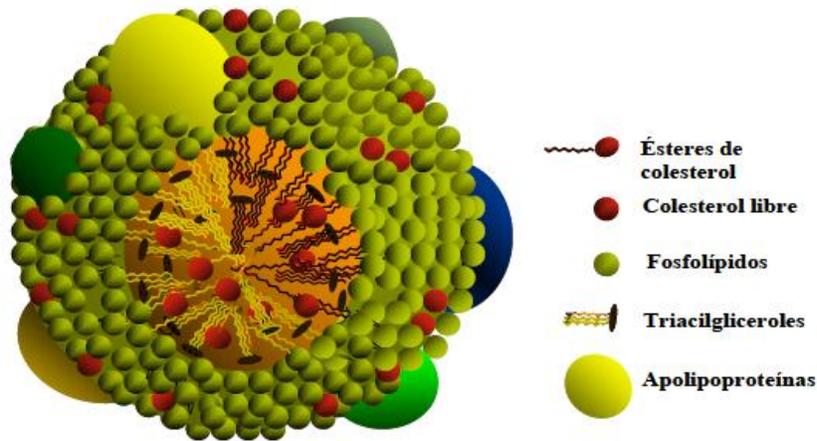


FIGURA 3. Composición de las lipoproteínas, se esquematiza la estructura pseudomicelar de la partícula, los lípidos anfipáticos en la superficie, los hidrófobos en el interior y las apolipoproteínas que se integran a la partícula estabilizándola.

Existen varios tipos de lipoproteínas que se diferencian en tamaño, composición y densidad, siendo precisamente esta última propiedad la que ha servido de base para su clasificación como se puede observar en la Tabla 1. En función a su densidad se pueden clasificar en: quilomicrones (QM), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL).⁴

TABLA 1. Clasificación de lipoproteínas circulantes por los líquidos biológicos.⁴

LIPOPROTEINA	DENSIDAD	DIAMETRO (A°)	LÍPIDO PRINCIPAL (%)
HDL	> 1.06	50 – 150	Fosfolípidos
LDL	1.06 – 1.019	200 – 300	Colesterol
IDL	1.019 – 1.006	250	Triacilgliceridos
VLDL	1.006 – 0.95	250 – 750	Triacilglicéridos
QM	0.95	1000 – 10,000	Triacilglicéridos

Las unidades proteicas que se encuentran en las lipoproteínas pero que aún no se incorporan a las partículas de lipoproteínas respectivas se denominan apoproteínas. Cuando forman complejos con las partículas de lipoproteínas se denominan apolipoproteínas, todas las lipoproteínas tienen diversas cantidades de proteínas. Aunque la estructura y funcionamiento de estos compuestos es variable, el componente de apoproteína se asocia con determinadas funciones bioquímicas dentro del medio de las lipoproteínas, como interactuar con receptores celulares para posteriormente determinar el destino metabólico de las lipoproteínas, así como activadores e inhibidores de enzimas implicadas en el metabolismo lipoproteico. Las más importantes son la apoA, apoB, apoC, apoD y apoE.⁵

En la Tabla 2 están las propiedades de las apolipoproteínas del plasma humano.³

TABLA 2. Apolipoproteínas del plasma humano: propiedades y lipoproteínas que las contiene.⁴

TIPO	FUNCIÓN ESTRUCTURAL	TAMAÑO MOLECULAR (kDa)	RECEPTOR	EFEECTO SOBRE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	LUGAR DE ORIGEN
A-I	HDL	28	Receptor SRB1 y de HDL	Activador de LCAT	Intestino, hígado
A-II	HDL	18	Receptor de HDL	Cofactor de LCAT	Hígado
B-48	QM	250	Receptor de LDL	Lipasa hepática de triglicéridos	Intestino
B-100	VLDL, IDL, LDL	500	Receptor de LDL	Reconocida por el receptor de LDL	Hígado
C-II	QM, VLDL, HDL	10		Activación de lipoprotínlipasa	Hígado
E3-4	QM, VLDL, HDL	34	Receptor de LDL	Reconocida por receptor de quilomicrones	Hígado, macrófagos

Las LDL tienen un centro compuesto casi totalmente por colesterol esterificado liposoluble, la mayor parte de su superficie está compuesta de fosfolípidos y colesterol no esterificado. Ambas sustancias superficiales tienen grupos protéticos con carga eléctrica que sobresalen hacia el exterior y proporcionan una carga electrostática negativa sobre la superficie de la lipoproteína; esta carga negativa permite que la proteína permanezca soluble en el plasma. En uno de los polos de la lipoproteína de baja densidad hay una sola molécula de apo B100 (peso molecular de 400 000Da), proteína que constituye el lugar de reconocimiento para los receptores de lipoproteínas de baja densidad de las membranas celulares de casi todas las células del cuerpo. La unión de esta proteína a los receptores hace que toda la proteína sea transportada al interior de la célula por un proceso de pinocitosis; después es digerida en el interior para liberar los constituyentes de la lipoproteína. De esta forma, las lipoproteínas de baja densidad llevan fosfolípidos y colesterol a casi todas las células del cuerpo para su utilización con fines estructurales.⁶

Cuando hay un desbalance en las lipoproteínas de baja densidad y estas elevan su concentración dentro de un sistema biológico, puede ocasionar daños celulares, por ejemplo la aterosclerosis.

1.3 Estrés oxidativo

Definición

En 1985 Helmut Sies elaboró el concepto de estrés oxidativo como una situación de desequilibrio entre un aumento de oxidantes o una disminución de antioxidantes.¹

Sin embargo, la situación real es altamente dinámica, y está muy lejos de parecerse a un equilibrio estático: los oxidantes son producidos de manera continua como productos secundarios de la respiración y del metabolismo oxidativo, y los antioxidantes se encuentran en constante relación con ellos.

La definición original de Sies ha sido modificada para dar una definición más refinada que es “El desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes, que pueden conducir a daño”.

Los sistemas biológicos se caracterizan por las respuestas de adaptación que pueden compensar algún daño, el estrés oxidativo puede manifestarse como una situación de un aumento de especies redox, es decir, un gran aumento en la reducción del potencial celular o una gran disminución en la capacidad reductora de los pares redox celulares. Los efectos del estrés oxidativo dependen de la magnitud de estos cambios, si la célula es capaz de superar las pequeñas perturbaciones y de recuperar su estado original. Sin embargo, el estrés oxidativo severo puede causar la muerte celular y aún una oxidación moderada puede desencadenar la apoptosis, mientras que si es muy intensa puede provocar la necrosis.

De esa manera, se incorporaron los términos prooxidante, oxidante y antioxidante que se ejemplifican en la Tabla 3.

TABLA 3. Principales oxidantes, prooxidantes y antioxidantes en las células de los mamíferos.

OXIDANTES	PROOXIDANTES	ANTIOXIDANTES
Peroxinitrito	Radical superóxido	Enzimáticos
Radical hidroxilo	Peróxido de hidrógeno	Superóxido dismutasas
Radical alquilo	Óxido nítrico	(Mn-SOD y Cu, Zn-SOD)
Radical peroxilo	Ubisemiquinona	Catalasa
Radical alcoxilo		Glutación peroxidasas
Hidroperóxidos orgánicos		(Se-dependiente y Se-independiente)
Oxígeno singulete		No enzimáticos
		Glutación reducido
		α-tocoferol
		Ácido ascórbico

Radicales libres

Un radical libre se define como un átomo o grupo de átomos que contiene un electrón desapareado dentro de su estructura, es decir, es la existencia de un electrón que no tiene una pareja con spin opuesto dentro de un átomo o grupo de átomos.¹

Por otra parte, un radical puede añadirse a una molécula no radical o eliminar un átomo de hidrógeno a partir de un enlace CH, OH o SH de los no radicales. Este tipo de reacciones son comunes en los sistemas biológicos, donde la mayoría de las moléculas son especies no radicales. Las moléculas que puedan verse afectados incluyen los compuestos de bajo peso molecular como los antioxidantes y cofactores de enzimas, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos.²

En los sistemas biológicos, se pueden generar una variedad de radicales dependiendo de su capacidad de reacción en función de su naturaleza y de la molécula con la que se encuentre. Si dos radicales se encuentran, pueden unirse a sus electrones desapareados para formar un enlace covalente en las reacciones

que a menudo son cinéticamente rápidas y que conducen a los productos no radicales. Algunos ejemplos de los radicales libres presentes en los sistemas biológicos se presentan en la Tabla 4.¹

TABLA 4. Radicales libres formados en los sistemas biológicos.

NOMBRE	FÓRMULA	CARACTERÍSTICAS
Radical carbono centrado	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}\cdot \\ \end{array}$	Este radical tiene el electrón desapareado en el carbono, usualmente reacciona rápidamente con O ₂
Anión superóxido y radical hidropéroxido	O ₂ ^{-•} , HO ₂ [•]	Primer radical oxígeno centrado en forma aniónica y protónica.
Radical peroxilo y alcoxilo	RO ₂ [•] , RO [•]	Radical oxígeno centrado que puede formarse por reacción de un radical carbono centrado y O ₂ (RO ₂ [•]), o puede formarse por la ruptura de peróxidos orgánicos como LOOH (RO ₂ [•] , RO [•])
Radical hidroxilo	HO [•]	Altamente reactivo, radical oxígeno centrado que reacciona con todas las biomoléculas.
Óxido nítrico y dióxido de nitrógeno	NO [•] , NO ₂ [•]	El óxido nítrico se forma por la L-arginina y el dióxido de nitrógeno se forma por la reacción de NO [•] con el O ₂ .
Radicales tioil y pertioil	RS [•] , RSS [•]	Grupo de radicales que sus electrones desapareados residen en el sulfuro
Iones metálicos de transición	Fe , Cu , etc.	Habilidad para cambiar su número de oxidación a 1, aceptando o donando electrones simples que pueden catalizar las reacciones de los radicales libres.

Especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno.

La toxicidad del O₂ se explica debido a la formación de las especies reactivas del oxígeno (ERO). Estas especies de O₂ son más reactivas que éste en su estado basal de energía.²

Se consideran ERO al oxígeno atómico (O) y al ozono (O₃) que se genera con la unión del O al O₂, al oxígeno singulete (¹O₂) que se produce con la excitación de uno de los electrones desapareados del O₂ y al superóxido (O₂[•]), al peróxido de

hidrógeno (H_2O_2) y al radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) que son especies parcialmente reducidas.

En 1946, Michaelis describió la reducción univalente secuencial del oxígeno como mecanismo molecular de cuatro pasos de transferencia de un electrón, con formación de radical superóxido, peróxido de hidrogeno y radical hidroxilo, como los intermediarios de la reducción parcial del oxígeno y con formación de agua como producto final y de reducción final.



También el oxígeno forma compuestos con el nitrógeno y estos pueden ser más reactivos que el O_2 en su estado basal de energía. Estas especies son el monóxido de nitrógeno y óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), el dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2\cdot$) y el peroxinitrilo (ONOO^-) y se reconocen como especies reactivas del nitrógeno (ERN).

No hay que considerar que las ERO son inevitablemente tóxicas, sino que su toxicidad depende de su concentración y del contexto en el que se producen. Bajas concentraciones de ERO estimulan el crecimiento de las células, incluso de las bacterias y de otros microorganismos y son indispensables para la diferenciación celular y para la muerte celular programada. Finalmente la reactividad es una característica intrínseca de cada especie de oxígeno sea o no un radical.¹

Antioxidantes

El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias que al estar presentes en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de este.³

Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar interactúan más rápidamente con los radiales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes.

Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos. Actúan como eliminadores, con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante a favor de estos últimos. Algunas clasificaciones de los antioxidantes se presentan en la Tabla 5 y Tabla 6.³

TABLA 5. Clasificación de los antioxidantes según el sitio donde ejercen su acción.³

INTRACELULAR	MEMBRANA	EXTRACELULAR
Superóxido dismutasa	Vitamina E	Ceruloplasmina
Catalasa	Betacarotenos	Transferinas
Peroxidasa	Ubiquinol-10	Lactoferinas
DT-deafarasa		Albúminas
GSH		Haptoglobinas
Proteínas que ligan metales		Vitamina C
Sistemas proteolíticos		Ácido úrico
Vitamina C		Vitamina E

TABLA 6. Clasificación de los antioxidantes según su origen.³

ORIGEN	ACCIÓN
1.Exógenos	
Vitamina E	Neutraliza el oxígeno singulete
	Captura radicales libres hidroxilo
	Captura O ₂
	Neutraliza peróxidos
Vitamina C	Neutraliza el oxígeno singulete
	Captura radicales libres hidroxilo
	Captura O ₂
	Regenera la forma oxidada de la vitamina E
Betacarotenos, Flavonoides, Licopenos.	Neutraliza el oxígeno singulete.
2.Endógenos	
Enzimáticos	Cofactor
Superóxido dismutasa (SOD)	Cobre, sodio y magnesio
Catalasa (CAT)	Hierro
Glutación peroxidasa (GPx)	Selenio
3.No Enzimáticos	
Glutación	Barreras fisiológicas que enfrenta el oxígeno a su paso desde el aire hasta las células
Coenzima Q10, ácido tioctico	Transportadores de metales (tranferrina y ceruloplasmina)

1.4 Microarreglos.

Un gen es un fragmento de ADN formado por una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína o un RNA.⁷

Dentro de cada célula los genes se activan o desactivan de acuerdo a la función que ocupa la célula en un tejido en particular. Se dice que los genes que se encuentran activos están expresados, y los niveles de expresión pueden variar como respuesta a estímulos ajenos al genoma como la temperatura, el alimento y los rayos solares. De la misma manera, los organismos responden a través de la expresión de su genoma ante el contacto con fármacos, infecciones o diferentes estados patológicos, es por ello que las herramientas que permiten estudiar los niveles de expresión genómica de un organismo con miras a diseñar tratamientos específicos que modifiquen nuevamente las expresiones alteradas.⁸

Los microarreglos de ADN son una de las tecnologías más recientes para el estudio de la expresión global de genes. Esta técnica muestra, en un solo experimento los genes que están siendo activados y expresados en forma de ARNm, en un grupo celular determinado y bajo estímulos específicos de cada experimento.

Un microarreglo consiste en un conjunto de secuencias de ácidos nucleicos (oligonucleótidos, ADN, ADNc, etc.) inmovilizadas sobre un soporte sólido en el cual cada una de éstas son llamadas “spots” o “blanco”. Estas secuencias pueden provenir de diversas fuentes (cultivos celulares, muestras de pacientes, etc) y se utilizan diferentes métodos para la impresión sobre el soporte sólido. El tamaño de los spots varía de un sistema a otro, obteniendo diámetros desde 80 micras. La superficie utilizada es un chip que actúa como un soporte sólido para la impresión de cientos o miles de “spots”, de tal manera que puedan ser ordenados dentro del área total de unos pocos centímetros.

El proceso de análisis utilizando microarreglos se puede resumir básicamente en 3 etapas principales: a) la fabricación del arreglo el cual contiene las secuencias de ácidos nucleicos inmovilizadas o blancos, b) el marcado de una o más muestras fluorescentemente o sondas, las cuales son hibridadas con el microarreglo, c) un sistema de detección que cuantifica la señal de hibridación y el análisis.⁸ Figura 4

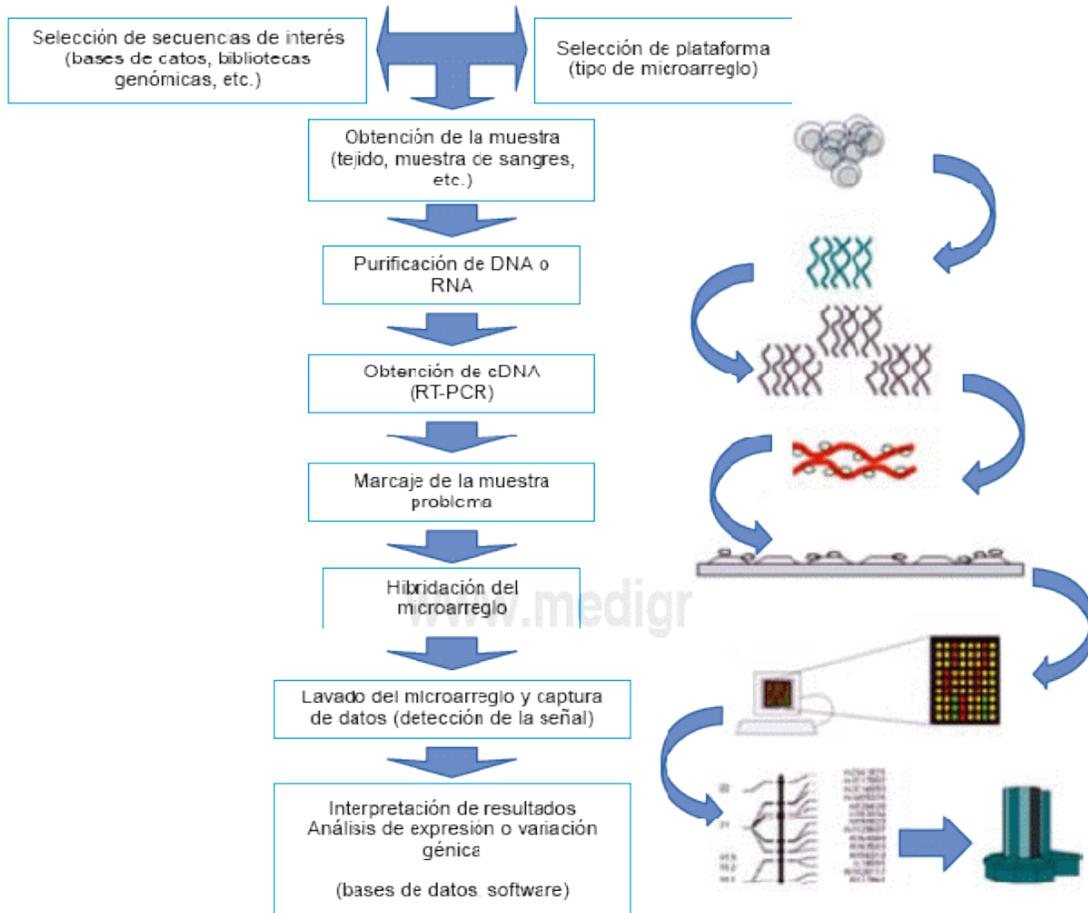


FIGURA 4. Esquema general de trabajo con microarreglos. Se muestran los procedimientos necesarios para la elaboración y análisis de los microarreglos.

En el campo clínico, los microarreglos han facilitado la comprensión de los mecanismos moleculares de carcinogénesis, la identificación de nuevos marcadores tumorales, la clasificación de neoplasias de difícil diferenciación, así como la determinación de los genes involucrados en las respuestas inmunes en diferentes enfermedades o en la respuesta a diferentes microorganismos.

Para entender el desarrollo de un organismo, el comienzo de alguna enfermedad genética o las funciones celulares, el mejor procedimiento es dar seguimiento a las actividades de los genes y sus productos en diferentes tejidos y en diferentes etapas de desarrollo bajo condiciones normales (salud) o alteradas (enfermedad).

2. HIPÓTESIS

Las lipoproteínas de baja densidad oxidadas provocarán un incremento en el estrés oxidativo en las células de músculo liso vascular, el cuál puede ser medido indirectamente al observar los genes sub y sobre expresados.

3. OBJETIVO

Evaluar los cambios en expresión génica expuestas a un estrés oxidativo en células de músculo liso vascular inducido por lipoproteínas de baja densidad.

4. OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer el crecimiento en cultivo de células de músculo liso vascular (VSMC).
- Aislar y purificar lipoproteínas de baja densidad (nativas y oxidadas)
- Realizar los ensayos de internalización de lipoproteínas de baja densidad en células de músculo liso vascular a diferentes tiempos.
- Aislar y purificar el ARN de las células producto de los ensayos de internalización.
- Analizar los cambios de expresión génica de genes asociados a la respuesta molecular al estrés oxidativo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1. Cultivo celular de VSMC

La línea celular con la que se trabajó es de aorta de humano; esto es que son células de músculo liso vascular, las cuales nos sirvieron como modelo in vitro para ver la asociación de estas con las lipoproteínas de baja densidad, y poder inducir el estrés oxidativo. La línea celular se adquirió de ATCC, con número de identificación CRL-1999.

Para propagar las células, se necesitó un medio de crecimiento base F-12K, para complementarlo se requirió de: 0.05mg/mL de ácido ascórbico, 0.01mg/mL insulina, 0.01mg/mL transferrina, 10ng/mL selenito de sodio, 0.03mg/mL de factor de crecimiento endotelial, suero fetal bovino de 10%, HEPES de 10mM y TES de 10mM.

Se inicio el crecimiento con 2 cajas petri de 10cm de diámetro y se les hizo cambio de medio de cultivo al día siguiente de haberlas propagado y cuatro días posteriores a este, hasta obtener una confluencia del 85% para poder realizar el siguiente pase al doble de cajas de las que se tenían al inicio.

La metodología seguida para el pase de células a más cajas fué el siguiente, cabe señalar que toda la metodología citada a continuación se realiza dentro de una campana con flujo laminar y en condiciones de esterilidad.

Retirar el medio de cultivo con pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío, adicionar 2mL de solución PBS 1X, se retira el PBS y se adicionan 2mL de tripsina 1X y se incuba durante 5 minutos a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se raspa la caja con gendarmes para despegar por completo las células y se retira todo el contenido de la caja con micropipeta de 1mL para depositarlo en tubos Falcon de 15mL; posterior a esto se centrifuga a 1000rpm durante 5 minutos, se retira el sobrenadante con mucho cuidado de no tocar el botón formado que es en donde se encuentran las células y se resuspende este

con 1mL de medio de cultivo. Se adicionan 200 μ L a cada una de las 5 cajas nuevas para propagar y se añaden 10mL de medio de cultivo a cada caja y se incuban a 37°C y 5% de CO₂.

Se crecieron 63 cajas que fueron utilizadas para el ensayo de internalización de LDL en asociación con células VSMC.

5.2. Aislamiento y purificación de LDLn

Este procedimiento se realizó con plasma humano y se utilizaron las técnicas de ultracentrifugación, diálisis y cromatografía por exclusión molecular mediante FPLC.

Se inicia midiendo un volumen aproximado de 400mL de plasma y agregando ácido ascórbico 1mM y α -tocoferol 100 μ M, azida de sodio 0.05%, inhibidor de tripsina 0.01%, benzamidina 0.01%, PMSF 1mM, DTNB 1.5mM y EDTA 1%.

Se debe de ajustar la densidad del plasma a 1.019g/mL con KBr, una vez que se añade todo lo anterior al plasma se deja en agitación constante durante una hora y en cuarto frío. Transcurrido el tiempo de agitación se procede a llenar tubos Quick-seal para ultracentrífuga (el volumen aproximado del tubo es de 20mL). Una vez sellados los tubos se ponen en el rotor (con capacidad para 8 tubos) y se colocan las capuchas. Se centrifuga a 70,000rpm durante nueve horas y media a 4°C para observar un gradiente.

Se descarta la parte superior y la parte inferior se recolecta (esto se hace mediante un cortador de tubos de ultracentrífuga). Una vez que se obtiene la parte inferior se debe de ajustar la densidad a 1.05g/mL con KBr y se pone en agitación constante en cuarto frío durante 1 hora. Transcurrido el tiempo de agitación se procede a llenar tubos Quick-seal para ultracentrífuga, se sellan los tubos y se

ponen en el rotor con sus respectivas capuchas. Se ultracentrífuga a 70,000rpm durante once horas y media a 4°C para observar un gradiente.

A partir de este punto de la metodología ya no se descarta nada ya que en la parte superior del tubo se tendrán las LDL y en la parte inferior las HDL. Se recupera la parte superior y se ajusta la densidad a 1.063g/mL, mientras que la parte inferior se ajusta a una densidad de 1.21g/mL con KBr y se pone en agitación constante en cuarto frío durante 1 hora. Transcurrido el tiempo de agitación se procede a llenar tubos Quick-seal para ultracentrífuga, se sellan los tubos y se ponen en el rotor con sus respectivas capuchas. Se ultracentrífuga a 70,000rpm durante ocho horas y cuarenta minutos a 4°C para observar un gradiente. Se recupera la parte superior tanto de LDL como de HDL y se proceden a guardar a 4°C hasta el momento de la diálisis.

Para la diálisis se lleva la fracción de LDL obtenidas de la ultracentrifugación a una celda de ultrafiltración (amicon), se hace pasar por una membrana de 0.45 μ m con una solución de PBS 1X con EDTA, ácido ascórbico y α -tocoferol como antioxidantes, el objetivo es que pase todo por la membrana excepto las LDL, para tener una buena concentración se dializa de 4 a 5 veces hasta obtener un volumen menor de 10mL.

Posterior a esto se pasa este volumen obtenido de la diálisis por una columna de exclusión molecular por medio del FPLC a un flujo de 0.5mL/min y como fase móvil se usa PBS 1X como buffer para hacer la purificación de la fracción de LDL y recolectar esta fracción para su posterior cuantificación.

La cuantificación de las LDL se realizó mediante la técnica del ácido bicinonílico (BCA), para posteriormente hacer los ensayos de internalización con asociación entre LDL nativas y células VSMC se necesita una concentración de 2.5 μ g/mL.

5.3. Modificación de LDLn

Se realizó la oxidación de LDL nativas para ver la diferencia en la asociación con células de músculo liso vascular, esto se realizó dializando con NaCl 150mM unas 3 o 4 veces hasta obtener un volumen final menor a 10mL y se adiciona sulfato cúprico para tener una concentración final de 10mM y aforando con agua, se incubó a 37°C y en agitación durante 5 horas, posteriormente se fracciona en el FPLC a un flujo de 0.5mL/min y utilizando NaCl 150mM como buffer para recolectar las fracciones purificadas de oxLDL y cuantificar, para posteriormente utilizarlas en el ensayo de internalización.

La cuantificación de oxLDL se realizó mediante una técnica espectrofotométrica de UV a longitudes de onda de 215 y 225nm.

5.4. Ensayo de internalización

Para el ensayo de internalización se tomaron en cuenta 3 tiempos designando como control el tiempo cero. Para cada uno de los tiempos se tuvieron 9 cajas y se realizaron tres mezclas de tres cajas cada uno, esto con la finalidad de obtener resultados confiables. A continuación se presenta una tabla con los tiempos de internalización y el número de muestras requeridas para cada tiempo.

TABLA 7. Ensayo de internalización de LDL con VSMC.

Tiempo de internalización (horas)	Muestras nLDL (cajas)	Muestras oxLDL (cajas)	Pool nLDL	Pool oxLDL
0	9		3x3	
1	9	9	3x3	3x3
5	9	9	3x3	3x3
24	9	9	3x3	3x3
Cajas totales	36 cajas	27 cajas		

TABLA 7. Ensayo de internalización de LDL con VSMC.

Para iniciar el ensayo se dejaron las células en ayuno durante 1 hora con medio mínimo, es decir, sin complementar el medio F-12K. Una vez transcurrido este periodo de ayuno se procedió a añadir las nLDL a las cajas de 24 horas, posteriormente a las de 5 horas y después a la de 1 hora. Cabe mencionar que las células a las cero horas fueron nuestro control.

Una vez transcurrido los tiempos establecidos (Tabla 7), se quitó el medio mínimo, se añadió 1.5mL de trizol (ya que es el método por el que se obtuvieron la fracción de ARN), se deja reposar durante 5 minutos, se raspa la caja y se deposita el contenido de la caja en criotubos para guardar las muestras en nitrógeno líquido, hasta la extracción de ARN.

5.5. Extracción de ARN.

La extracción de ARN de la línea celular de humano crecida en monocapa se realizó por medio de la técnica de Trizol.

El Trizol es un reactivo listo para utilizarse en la extracción de ARN de células y tejidos, es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que durante la homogenización o la lisis de la muestra mantiene la integridad de ARN, al mismo tiempo que altera la estabilidad de las células y disuelve los componentes celulares.

En la metodología la adición de cloroformo seguida de centrifugación separa la muestra en dos fases, una de ellas acuosa y otra orgánica, el ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa y puede ser recuperado por precipitación con alcohol isopropílico, una vez removida la fase acuosa, el ADN y las proteínas de la muestra pueden ser recuperadas por precipitaciones secuenciales de la misma.

Al finalizar la extracción de ARN, se cuantificó y determinó su integridad, para posteriormente ser utilizado en la elaboración de microarreglos. Esto se realizó mediante el uso de un dispositivo nanodrop tomando en cuenta la relación de absorbancia 280/260 y mediante Chips RNA-Agilent basados en electroforesis capilar.

5.6. Elaboración de microarreglos.

La elaboración de los microarreglos fueron llevados a cabo en el departamento de Affimetrix del INMEGEN y se utilizó como soporte el GeneChip human gene 1.0 st

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CULTIVO CELULAR

El cultivo de las células de músculo liso vascular logró una confluencia del 85% aproximadamente entre 3 o 4 días. Se obtuvieron al final 63 cajas las cuales se utilizaron para el ensayo de internalización.

A continuación se presenta un ejemplo tomado de ATCC de la confluencia requerida en las células para poder realizar los pases necesarios y obtener las cajas deseadas.

ATCC Number: **CRL-1999**
Designation: **T/G HA-VSMC**

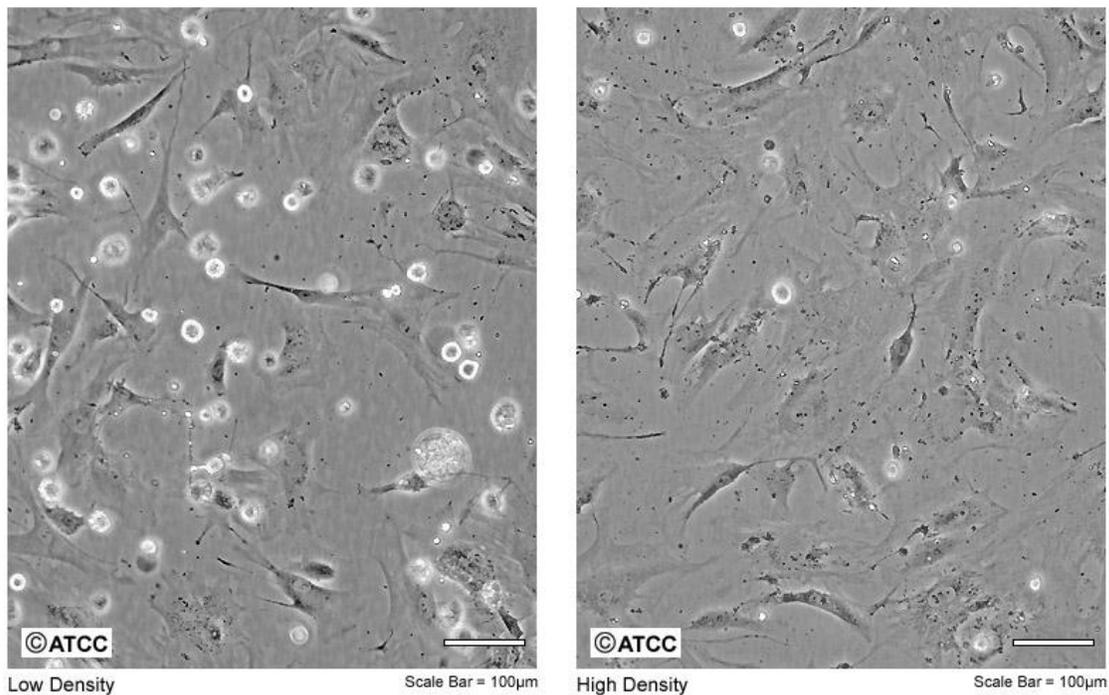


FIGURA 5. Cultivo de células de músculo liso vascular.¹²

En la imagen del lado izquierdo se puede observar el cultivo de VSMC con baja confluencia, mientras que en la imagen de la derecha se encuentra el cultivo con confluencia suficiente para poder hacer un pase a más cajas petri.

CROMATOGRAMAS DE LDLn Y LDLox

Una vez aisladas las LDL se purificaron mediante FPLC para obtener las fracciones de LDL nativas y LDL oxidadas que se utilizaron en el ensayo de asociación junto con las células de músculo liso vascular. A continuación se presentan los cromatogramas.

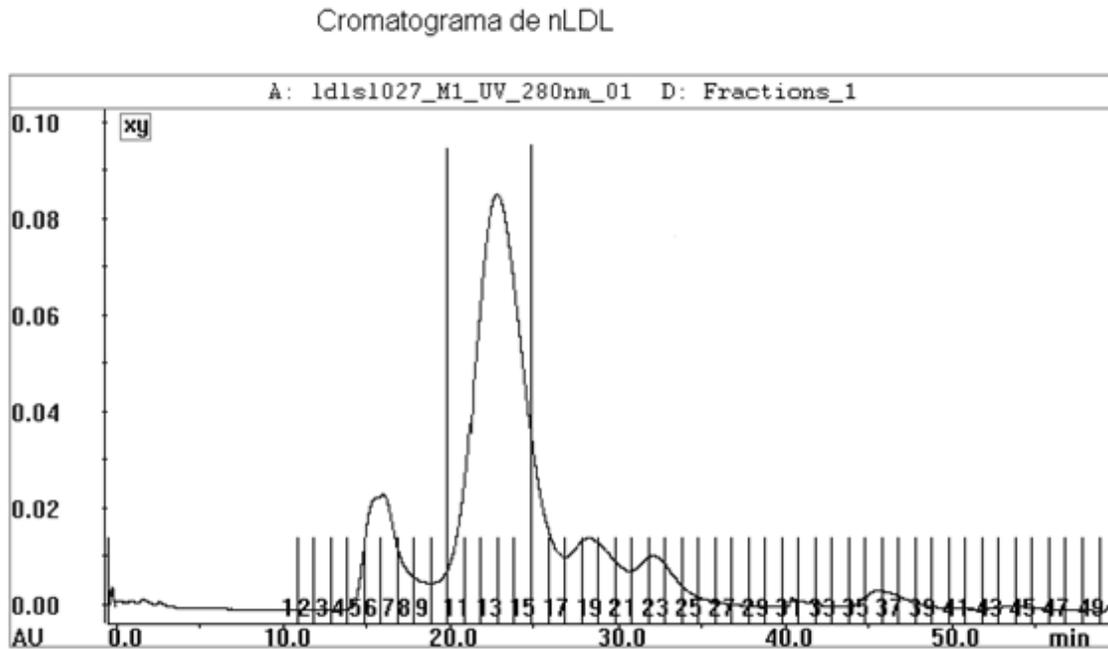


FIGURA 6: Cromatograma de LDL nativas.

El perfil de elución mediante FPLC de la muestra de LDL nativas nos da una concentración de 2.880mg/mL.

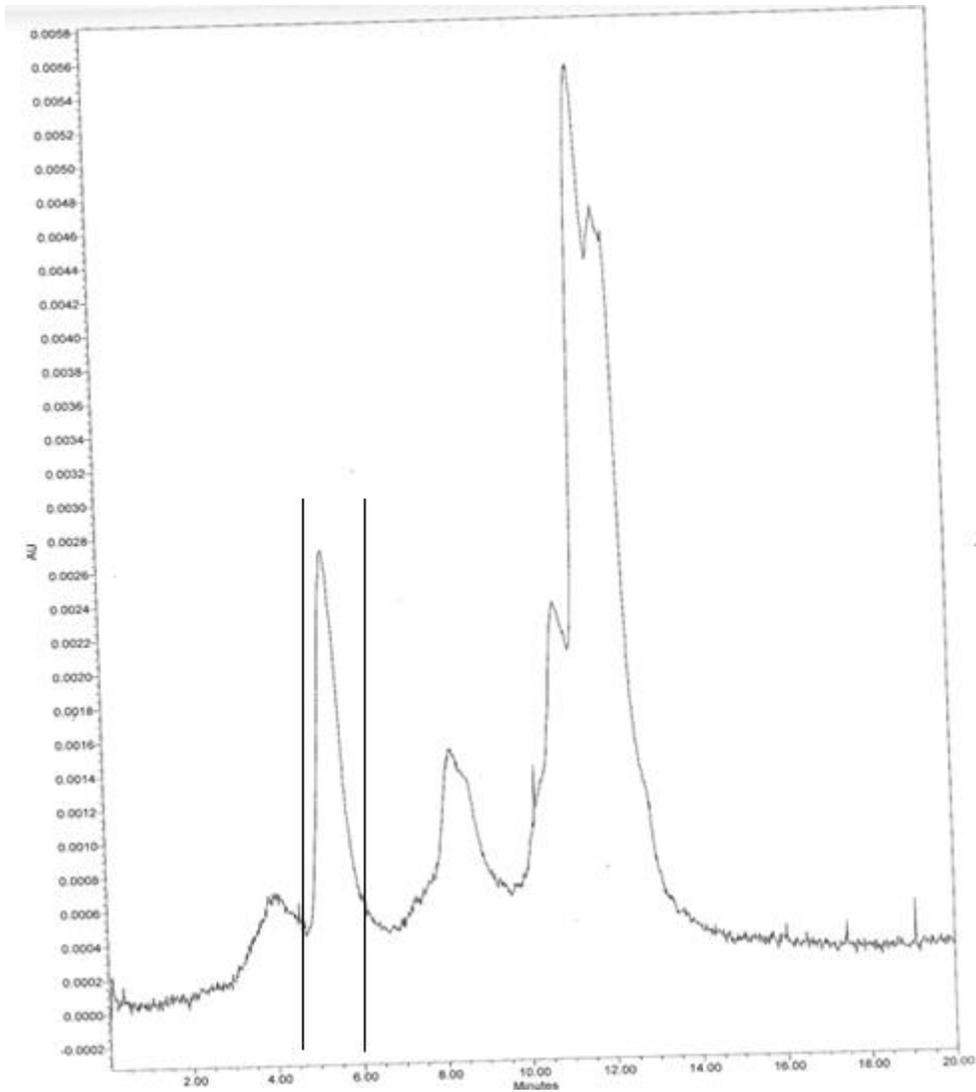


FIGURA 7. Cromatograma de LDL oxidadas.

El perfil de elución mediante FPLC de la muestra de LDL oxidadas nos da una concentración de 2,610mg/mL.

INTEGRIDAD DE ARN

Una vez extraído el ARN se procedió a cuantificarlo y a analizar su integridad para determinar si se podía proceder con la elaboración de los microarreglos. La cuantificación se realizó con un dispositivo Nanodrop tomando en cuenta la relación 280/260nm y posterior a esto se utilizaron chips ARN-Agilent para introducir en el dispositivo Bioanalyzer Agilent 2100 el cual consiste en un sistema de microelectroforesis mediante el uso de nanocapilares. Se utilizó 1µL de cada muestra para el análisis.

Para el análisis de ARN mediante el Bioanalyzer, el software contiene un algoritmo llamado RIN (RNA Integrity Number) que permite determinar la calidad de las muestras de ARN eucariótico total en base a un rango numérico del 1 al 10, siendo 1 el valor para una muestra de ARN totalmente degradada y 10 el valor obtenido para una muestra intacta.

A continuación se muestran las imágenes donde se demuestra que la integridad de ARN es muy buena debido a que los valores de RIN obtenidos van de 9.4 a 10.

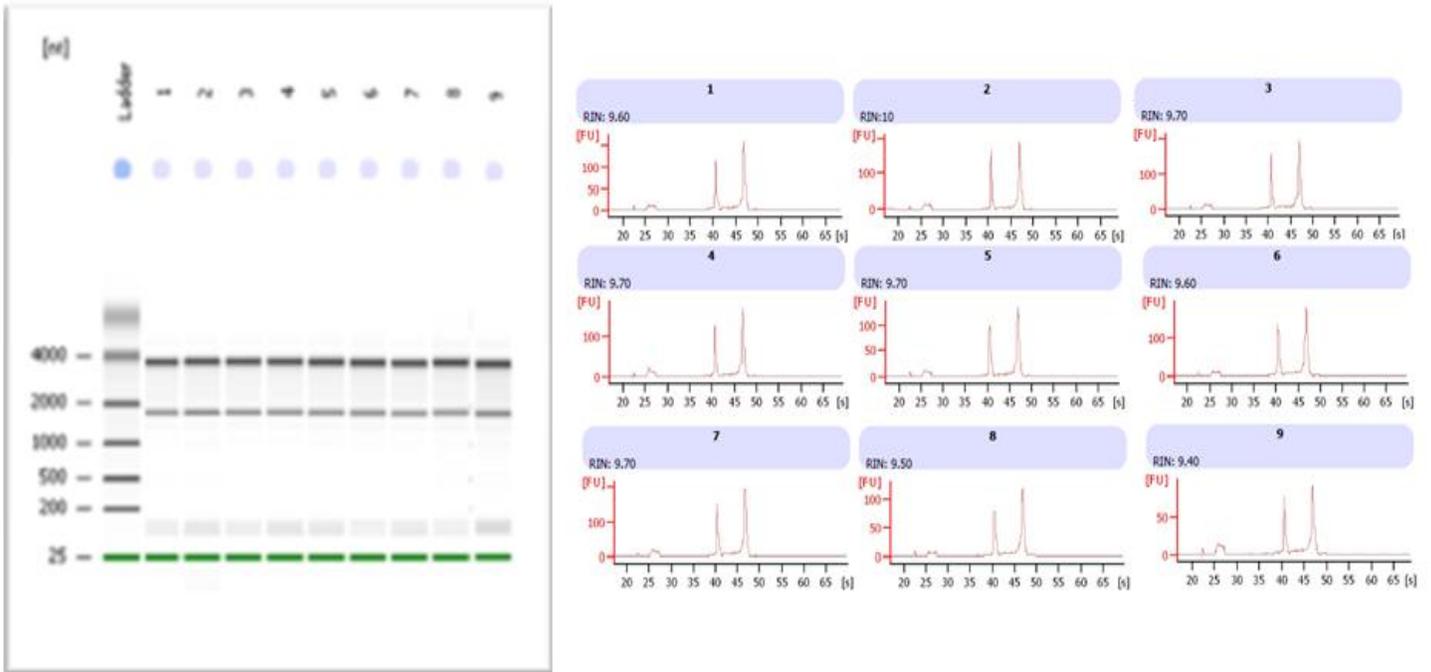


FIGURA 8. Integridad de ARN extraído de VSMC.

En la imagen de la izquierda se observa la microelectroforesis de nueve muestras y se pueden identificar dos bandas bien definidas las cuales corresponden al número de nucleótidos de cada una de las subunidades ribosomales del ARN. En el lado derecho de la imagen se visualiza otra representación de la calidad del ARN de cada muestra, la cual incluye el RIN y la representación en los picos cromatográficos de los coeficientes de sedimentación 18S y 28S correspondiendo a la subunidad pequeña y al subunidad grande del ARN ribosomal.

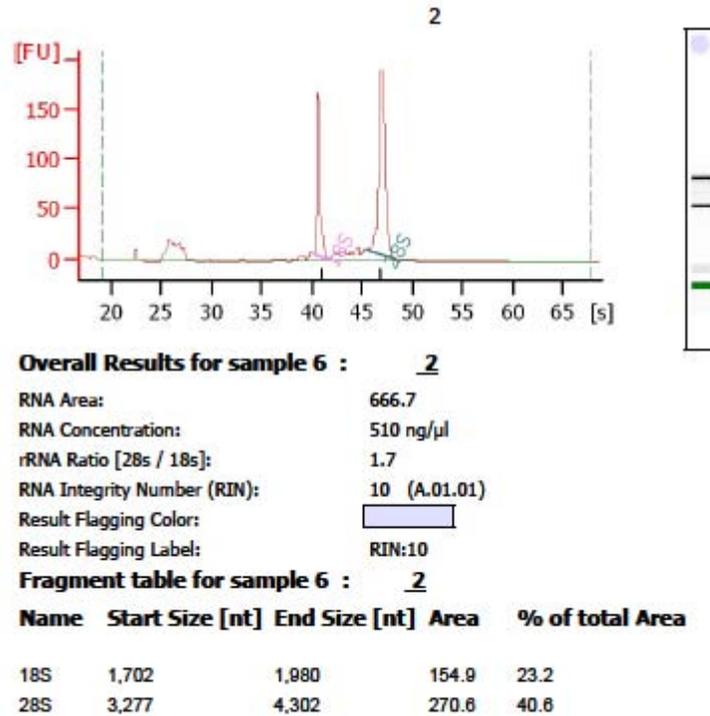


FIGURA 9: Resumen de los resultados obtenidos mediante el Bioanalyzer Agilent 2100. Se observan los resultados detallados de una de las muestras de ARN obtenidas, pudiendo verse la concentración de la muestra, la integridad del ARN (por medio del RIN) y el tamaño de los picos 18S y 28S obtenidos en el cromatograma.

MICROARREGLOS

Una vez que se obtuvo una integridad favorable de ARN de cada una de las muestras se procedió a realizar la hibridación de los microarreglos. A continuación se presenta la imagen de los genes totales obtenidos mediante esta técnica.

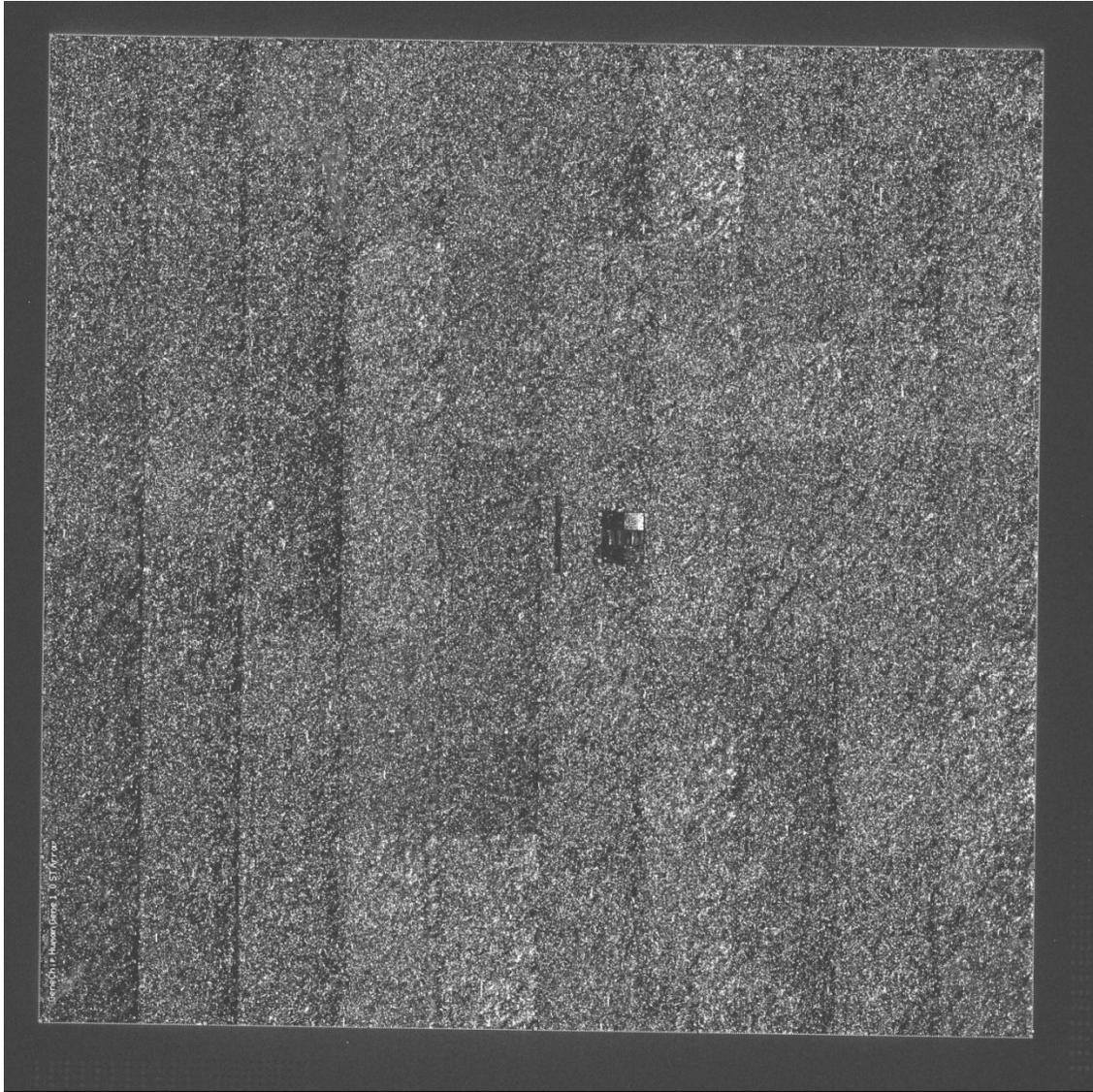


FIGURA 10: Escaneo del microarreglo Human Gene ST1.0 de Affimetrix. Cada uno de los puntos que se observan en la imagen son genes sobre expresados o sub expresados, la cuenta total fue de 22,081 genes.

Los datos obtenidos después de utilizar la técnica de microarreglos son muy numerosos, dando un total de 22,081 genes. Debido a esto fue necesario utilizar una herramienta de cómputo para delimitar los genes que están asociados al estrés oxidativo.

Para este fin se utilizó el software llamado Ingenuity, el cual categoriza los diferentes genes en función de sus anotaciones de Ontología Génica (Gene

Ontology). Se analizaron 14 genes relacionados con la condición de estrés oxidativo, los cuales tienen significado fisiológico en la situación de sobre expresión o sub expresión, medida por el rango de intensidades y delimitada por la razón de cambio, teniendo como línea de corte el valor de +/- 2 en escala logarítmica.

A continuación se presenta una tabla con los genes obtenidos con su expresión en los diferentes tiempos y condiciones.

GEN	FUNCIÓN	EXPRESIÓN	INTERPRETACION DE EXPRESIÓN
DUSP1	Es la proteína fosfatasa dual específica 1. Es inducido en fibroblasto de piel humana por estrés oxidativo o térmico y por factores de crecimiento. Tiene importancia en la regulación negativa de la proliferación celular. ³¹	N1=2.15728 N24=2.10188	Debido a la sobre expresión del gen nos indica un nivel de proliferación celular controlada por lo que el nivel de transcripción está bien regulado.
OXR1	Es el gen resistente a la oxidación, está implicado en la protección contra el daño oxidativo del ADN producido por agentes oxidantes tanto endógenos como exógenos. ³¹	N1=-2.02669 N5=-2.28454	Hay una sub expresión del gen la cual nos refiere que no hay activación de las defensas antioxidantes.
GCLM	La glutamato cisteína ligasa, con subunidad moduladora es la enzima limitante del primer paso de la síntesis de glutatión. ³¹	N5=-2.84893	Debido a la sub expresión del gen se puede decir que no se activa la síntesis de glutatión.
NAMPT	La nicotinamida fosforribosil transferasa es un gen que codifica a una proteína catalizadora de la condensación de un intermediario para producir NAD. La proteína es una adipocina que se localiza en el torrente sanguíneo y promueve las enfermedades vasculares de músculo liso. ³¹	N5=-2.23122	Por la sub expresión del gen podemos indicar que las células no necesitan un requerimiento mayor de energía al normal, ya que no hay una producción desequilibrada de NAD.
NFE2L2	Es conocido como el factor nuclear eritroide derivado 2L2. Es un regulador clave en la respuesta antioxidante, es decir, regula la transcripción de los productos de varios genes implicados en la respuesta de protección al estrés oxidativo. ³¹	N5=-2.08238	Ya que se tiene una sub expresión del gen, se puede decir que no hay un desequilibrio generado por estrés oxidativo, ya que las defensas antioxidantes no se activaron.

PPP1R15B	Es una proteína fosfatasa 1, subunidad reguladora 15B, la cual cataliza el primer paso regulado de la iniciación de la síntesis proteica, es decir, activa el metabolismo de síntesis de proteínas que podrían ser de defensa. ³¹	N5=-2.48852	Debido a la sub expresión del gen se puede suponer que no hay síntesis de proteínas de defensa asociadas al estrés oxidativo.
LDLR	El receptor de las lipoproteínas de baja densidad es la principal proteína responsable de la absorción de colesterol en la célula.	N24=-4.10276	La sub expresión del gen indica que no hay endocitosis asociada a partículas lipoproteicas.
LIAS	El ácido alfa lipoico sintetasa es un potente antioxidante, ya que tiene la capacidad de restaurar los niveles intracelulares de glutatión. ³¹	N24=2.03104 Ox24=2.44645	Se observa una sobre expresión del gen tanto en la condición nativa como en la oxidada en el tiempo mas tardío, lo que hace suponer que las defensas antioxidantes se activan por presencia de estrés oxidativo.
LRRK2	Este gen codifica la cinasa 2 rica en repeticiones de leucina, que es una proteína citoplasmática asociada a la activación por estrés. ³¹	N24=2.32613 Ox24=2.09364	En el tiempo de 24 horas, dada la sobre expresión del gen se puede indicar que hay presencia de estrés oxidativo.
SEPP1	La selenoproteina 1 es responsable de algunas de las propiedades antioxidantes de defensa extracelular de selenio o puede participar en el transporte de selenio. ³¹	N24=2.2004	A las 24 horas hay una sobre expresión del gen por lo cual hay estrés oxidativo, lo que requiere la presencia de defensas antioxidantes para evitar un daño celular.
ERCC6	El gen de la reparación por escisión 6 codifica una proteína de unión al ADN, su función es mantener la integridad de los cromosomas y eliminar las lesiones del ADN provocadas por estrés. ³¹	Ox1=2.10416 Ox5=3.01423 Ox24=2.06556	En toda la condición de LDL oxidadas se observa el gen sobre expresado por lo que se infiere que hay estrés oxidativo ya que se activan los mecanismos de reparación de la célula.
MUC1	La función primaria de las mucinas es hidratar, proteger y lubricar la superficie luminal endotelial del cuerpo humano. La mucina 1 asociada a la superficie celular tiene la función de aumentar la adhesión celular en las superficies endoteliales lumbales de los conductos dentro del cuerpo humano. ³¹	Ox5=-2.15913 Ox24=-2.81800	En la condición oxidada la tendencia en que el gen se encuentra sub expresado, por lo que la adhesión endotelial se presenta menos activa, a nivel fisiológico esto puede indicar daño celular como el que se presenta en la aterosclerosis.

SCARA3	El receptor scavenger clase A tipo 3 es un gen que codifica un receptor de tipo carroñero. Esta proteína se ha demostrado que reduce las especies reactivas de oxígeno, y por lo tanto juega un papel importante en la protección de las células al estrés oxidativo. ³¹	Ox5=-2.002114	Debido a que hay una sub expresión del gen se puede intuir que existe estrés oxidativo y que este puede generar daño celular.
ERCC2	El gen de la reparación por escisión 2 proporciona instrucciones para la fabricación de una proteína llamada XPD. Esta proteína es una parte esencial de un grupo de proteínas conocidas como el factor general de transcripción IIIH (TFIIH). El complejo TFIIH tiene dos funciones principales: está implicado en un proceso denominado transcripción de genes, y ayuda a reparar el ADN dañado. ³¹	Ox24=-2.09785	Por la sub expresión del gen podemos suponer que la transcripción de genes se está restringiendo para poder recuperar el estado normal de la célula, que pudo haberse modificado por la presencia de daño celular debido al estrés oxidativo.

TABLA 8: Resultados de expresión génica.

Las abreviaturas utilizadas en la tabla representan lo siguiente.

N1= Lipoproteínas de baja densidad nativas al tiempo de 1 hora.

N5= Lipoproteínas de baja densidad nativas al tiempo de 5 horas.

N24= Lipoproteínas de baja densidad nativas al tiempo de 24 horas.

Ox1= Lipoproteínas de baja densidad oxidadas al tiempo de 1 hora.

Ox5= Lipoproteínas de baja densidad oxidadas al tiempo de 5 horas.

Ox24= Lipoproteínas de baja densidad oxidadas al tiempo de 24 horas.

A continuación se presenta un panorama general de los genes sobre y sub expresados en cada una de las condiciones analizadas.

LDLn1

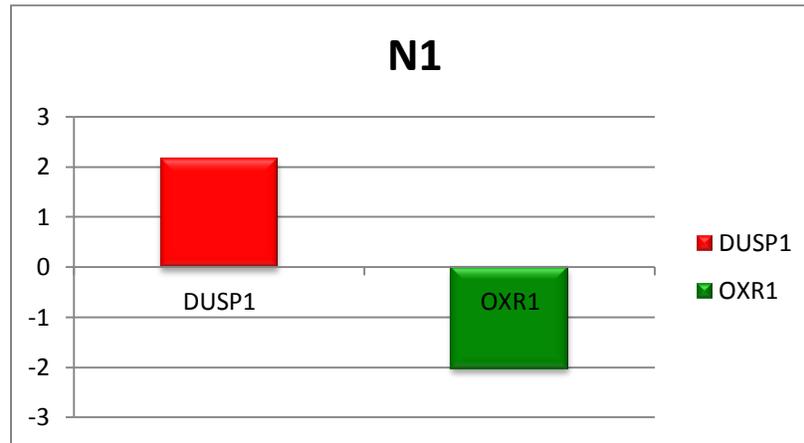


FIGURA 11. Genes expresados en condición nativa al tiempo de 1 hora.

El panorama general de las células en este tiempo nos indica que la proliferación celular está controlada por la expresión del gen DUSP1, y debido a que el mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo está sub expresado (OXR1), se puede observar que no hay presencia significativa de estrés oxidativo que este causando algún tipo de daño celular.

LDLn5

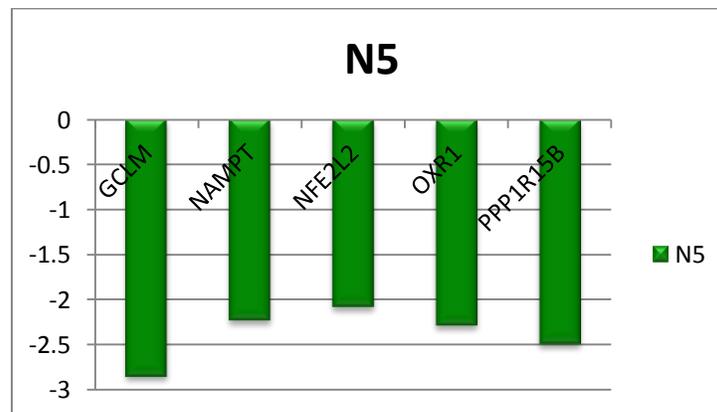


FIGURA 12. Genes expresados en condición nativa al tiempo de 5 horas.

En este tiempo se puede observar que existe una subexpresión en GCLM, NAMPT, NFE2L2, OXR1 Y PPP1R15B; los cuales nos indican que no están activadas las defensas antioxidantes y el metabolismo energético se encuentra

estable, esto nos hace pensar que la célula se encuentra en este momento sin daño aparente del estrés oxidativo, es decir no hay una desestabilidad en las especies reactivas de oxígeno como para que los mecanismos de defensa se activen y las eliminen.

LDLn24

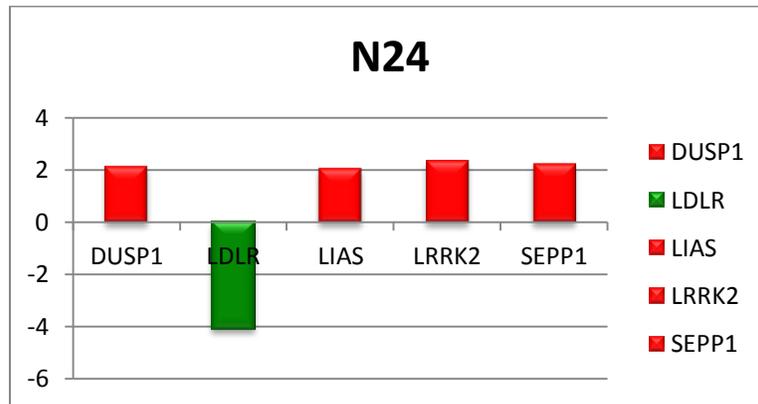


FIGURA 13. Genes expresados en condición nativa al tiempo de 24 horas.

Los genes que se encuentran presentes son activadores de defensas antioxidantes (LDLR, LIAS, LRRK2 Y SEPP1) y también activadores de la proliferación celular (DUSP1).

Esto nos pone en evidencia que las células están presentando un desequilibrio en la generación de radicales libres, lo que nos lleva al estrés oxidativo y al mismo tiempo se inicia el aumento en la proliferación celular inducido por este fenómeno.

LDLox1

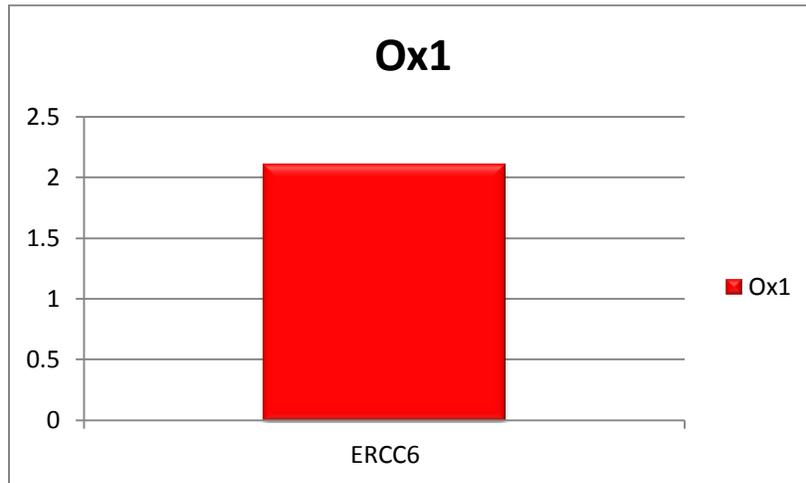


FIGURA 14. Gen expresado en condición oxidada al tiempo de 1 hora.

Este gen activa los mecanismos de reparación del DNA debido a la presencia de daño por la acción de estrés oxidativo, por lo cual podemos indicar que a un tiempo muy temprano ya hay presencia de estrés oxidativo y que este ha generado daño en la célula.

LDLox5

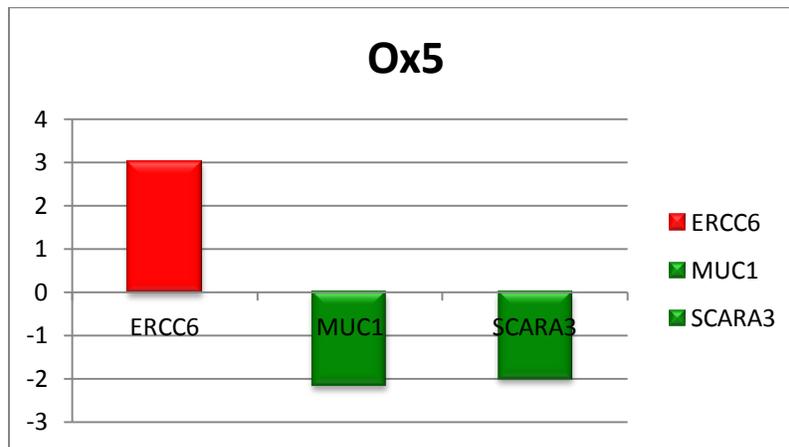


FIGURA 15. Genes expresados en la condición oxidada al tiempo de 5 horas.

Este panorama nos indica que la célula está en un marcado ambiente de estrés oxidativo debido a que los mecanismos de reparación del DNA se encuentran sobre

expresados (ERCC6), la adhesión celular (MUC1) es menor y los antioxidantes se encuentran apagados (SCARA3).

LDLox24

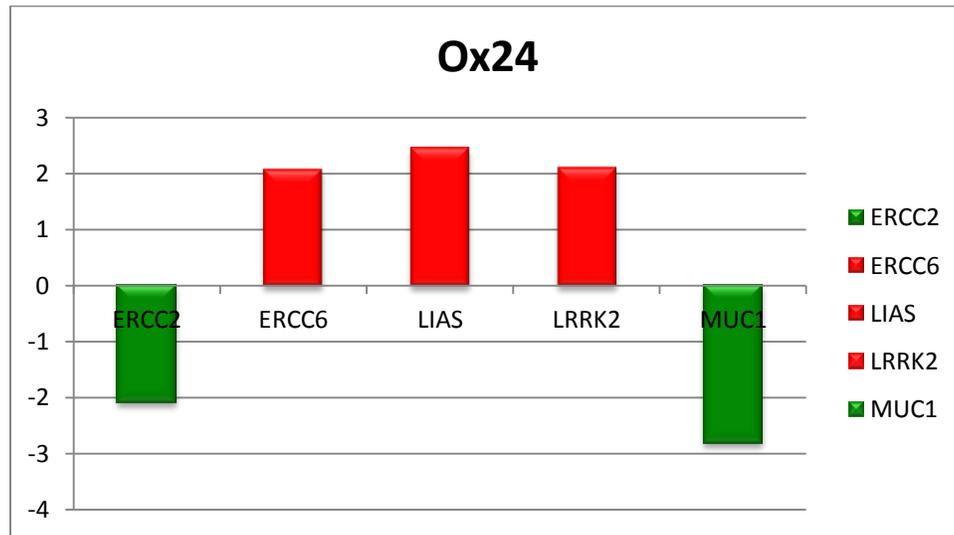


FIGURA 16. Genes expresados en la condición oxidada al tiempo de 24 horas. Aquí podemos apreciar que la célula aún se encuentra en presencia de estrés oxidativo, pero ya hay defensas antioxidantes (LIAS, LRRK2, MUC1) prendidas para equilibrar nuevamente los niveles de radicales libres; así como mecanismos de reparación para el ADN dañado (ERCC6) y restricción en la transcripción de genes para poder enfocarse en la reparación del daño celular (ERCC2) y que la célula pueda funcionar debidamente.

7. CONCLUSIONES

Después de haber observado y analizado todos los genes obtenidos mediante el programa Ingenuity y que fueron seleccionados de los resultado arrojados por la técnica de microarreglos se puede concluir que si hay una diferencia en las condiciones estudiadas.

Las LDL nativas por sí solas no ocasionan un grado de desequilibrio suficiente para generar estrés oxidativo y que este cause un daño celular. Esto se debe valorar mediante técnicas alternativas como citometría de flujo e inmunohistoquímica. El estrés oxidativo que se aprecia en esta condición es en el tiempo más tardío, que es a las 24 horas.

En la condición de las LDL oxidadas por el contrario, se observa presencia de estrés oxidativo desde la primera hora de estudio, siendo las 5 horas la etapa más crítica y en donde se pone en evidencia el daño celular. Esto nos indica que la condición temprana de exposición a las LDLox genera un ambiente de estrés oxidativo suficiente para generar los daños celulares asociados a esta enfermedad.

Para asegurar que los resultados obtenidos en el presente trabajo son confiables, es necesario validarlos, y así poder utilizarlos de una manera segura y que los estudios posteriores que se generen sean viables.

Cabe mencionar que la técnica de microarreglos es una herramienta para poder tener un panorama general y particular de lo que ocurre en la célula al tener la posibilidad de estudiar un gran número genes al mismo tiempo. Sin embargo, es necesario mencionar que no es una herramienta fácil de utilizar, ya que debido al gran número de genes que explora, es necesario utilizar herramientas bioinformáticas para poder delimitar los genes de nuestro interés.

8. PRESPECTIVAS

Una vez obtenidos estos resultados, se continuará el proyecto de investigación validando dichos resultados por PCR en tiempo real por medio de sondas taqman, para asegurar que los resultados son confiables.

Además se continuará la investigación por la parte proteómica, utilizando la fracción protéica extraída por la técnica de trizol.

Por otro lado, una vez trabajando con las proteínas y sabiendo cuales están asociadas al fenómeno de estrés oxidativo, la siguiente parte es trabajar sobre ellas para posteriormente poder hacer búsqueda de proteínas que nos sirvan como biomarcadores, y que estos puedan funcionar como un modelo preventivo en pacientes que tengan herencia de enfermedades cardiovasculares.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Konigsberg Fainstein, Mina. *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*. Editorial el manual moderno, México 2008.
2. Stocker, Roland y Keane, John F. *Role of oxidative modifications in atherosclerosis*. *Physiol. Rev.* 84:1381-1478, 2004.
3. Venereo Gutierrez, Justo R. *Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes*. Instituto Superior de Medicina Militar “Dr Luis Díaz Soto”. *Rev cubana Med milit.* 2002;31(2):126-33.
4. Lozano Teruel, Galindo Cascales, García-Borrón Martínez, Martínez-Liarte, Peñafiel García y Solano Muñoz. *Bioquímica y biología molecular para ciencias de la salud*. 3ª edición, Editorial Mc Graw-Hill, España 2005.
5. Anderson Shauna C, Cockayne Susan. *Química clínica*. Traducción de 1ª edición. Editorial Mc Graw-Hill. México 1995.
6. Guyton, Arthur C. et al. *Tratado de fisiología médica*. Elsevier, España, 2006.
7. Becker Wayne, Kleinsmith Lewis, Hardin Jeff. *El mundo de la célula*. 6ª edición. Editorial Pearson Addison Wesley. Traducción España 2007.
8. Schena, Mark. *Microarrays analysis*. Editorial Wiley-Less. Estados Unidos de América, 2003.
9. Read, Andrew y Donnai, Dian. *Nueva genética clínica*. Ediciones Omega. Barcelona, 2009. Traducción.

10. Hilario, Elena y Mackay John. *Protocols for nucleic acid analysis by nonradioactive probes*. 2ª Edición. Editorial Humana Press. Estados Unidos de América, 2007.
11. Universidad Nacional de Quilmes. *Mantenimiento de líneas celulares*. Guía de TP Nro. 2. Biología celular y molecular (cáncer.unq.edu.ar/Tpnro2bis.pdf)
12. www.atcc.org
13. Ordovas José. *Lipoprotein protocols*. 1ª edición, Editorial humana press. EUA, 1998.
14. Tahiguchi Naoyuki y Gutteridge John. *Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species*. 1ª edición, Editorial Oxford University Press, EUA, 2000. Traducción.
15. Chamley-Champbell J, Campbell GR y Ross R. *The smooth muscle cells in culture*. *Physiol. Rev*, 59:1-6, 1979.
16. Sambrook, Joseph y Bowtell, David. *DNA Microarrays. A molecular cloning manual*. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press. Estados Unidos de América 2003.
17. www.invitrogen.com
18. www.genecards.org
19. www.ingenuity.com
20. Durand Mathieu, Kolpak Adrienne, Timothy Farrell, Nathan Elliott, Wenlin Shao, Myles Brown y Michael Volkert. *The OXR domain defines a*

- conserved family of eukaryotic oxidation resistance protein*. BMC cell biology 2007, 8:13.doi:10.1186/1471-2121-8-13.
21. MN Wills, Liu Y, Biterova EI, Simpson MA, Kim H, Lee J, Bary Cki JJ. *Enzymatic defectos underlying hereditary glutamate xystaine ligase deficiency are mitigated by association of the catalytic and regulatory subunits*. Biochemistry 2011 Jul 26;50(29):6508-17.Epub 2011 Jun 29.
22. Fiebre Daniela, Löffler Dennis, et al. *Impact of metabolic regulators on the expression of the obesity associated gene FTO and NAMPT in human preadipocytes and adipocytes*. Plos one 6(6):e19526.doi:10.1371/journal.pone.0019526.
23. Lay Lay Saw Constance, Wu Qing, Ah-Ng Tony Kong. *Anti-cancer and potential chemopreventive actions of ginseng by activating Nrf2 (NFE2L2) anti-oxidative stress/anti-inflammatory pathway*. Chinese Medicine 2010.5:37.
24. Boyce Michael, et al. *A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorilation protects cells from ER Stress*. Science 307, 935 (2005): doi:10.1126/science.1101902.
25. Dogachev Oleg, Majdalawieh Amin, Pan Xuefang, Zhang Lei, Ro Hyo-Sung. *Aebp1 a novel macrophage proinflammatory melator over-expression promotes and ablation attenuates atherosclerosis in ApoE^{-/-} and LDLR^{-/-} mice*. www.molmed.org.
26. Yi Xianwen, Xu Longquan, Kim Kuikwon, Kim Hyung-Suk y Maeda Nobuyo. *Genetic reduction of lipoic acid synthase expression modesty increases atherosclerosis in male, but not in female, apolipoprotein E decient mice*. Atherosclerosis, 2010; 211(2):424-430.

27. Thévenet Jonathan, Pescini Gobert Rossana, Hoort van Huijsduijnen Roberts, Wiessner Christoph, Jean Sagot Yves. *Regulation of LRRK2 expression points to a functional role in human monocyte maturation*. PLoS ONE 6 (6): E215-19.
28. F Burk Raymond, E. Hill Kristina. *Selenoprotein P- Expression, functions and roles in mammals*. Biochim Biophys acta. 2009 November; 1790(11): 1441-1447. doi:10.1016/j.bbagen.2009.03.026.
29. www.ghr.nlm.nih.gov
30. S. Bafna, S.Kaur, SK Batra. *Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells*. Oncogene May 20; 29(20):2893-2904. doi:10.1038/onc.2010.87.
31. www.ncbi.nlm.nih.gov