



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFECTO DE LA GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y NITRÓGENO
SOBRE LA EXPRESIÓN TRANSCRIPTÓMICA Y DE LA PROTEÍNA SR-B1 EN DOS
MODELOS *IN VITRO* RELACIONADOS CON PROCESOS DE LA ATEROSCLEROSIS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

PAOLA TOLEDO IBELLES

TUTOR PRINCIPAL

DR JAIME MAS OLIVA

[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. ÓSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ

[Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"](#)

DR SERGIO ENCARNACIÓN GUEVARA

[Centro de Ciencias Genómicas](#)

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Febrero, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*“En un lugar de la Mancha de cuyo
nombre no quiero acordarme...”
-Miguel Cervantes de Saavedra*

*“Sólo quien abandona el laberinto puede ser dichoso,
pero sólo quien es dichoso puede escapar de él”
-Michael Ende*

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, porque en sus instalaciones aprendí no sólo de Bioquímica, aprendí que la educación debe ser integral si uno aspira a contribuir a un cambio en el mundo.

A CONACYT, porque el programa de becas para posgrado son el único camino en el que muchos alumnos, yo incluida, podríamos dedicarnos de tiempo completo a generar conocimiento útil y novedoso, y convertirnos en personas que puedan ofrecerle algo adicional a su país y sociedad.

A mi tutor, el Dr. Jaime Mas. Como su alumna aprendí a ser independiente y no claudicar, a defender mis ideales y trabajo.

A mi Comité Tutor, quienes siempre tuvieron paciencia y estuvieron dispuestos a ayudarme en el largo camino de este proyecto.

Al Dr. Óscar Pérez porque no sólo me enseñó que la ciencia tiene alma e integridad, me presentó la cara de la ciencia por la que todo esfuerzo vale la pena.

Al Dr. Sergio Encarnación, por sus valiosas contribuciones y su apoyo constante. Además de su genuino interés no sólo en lograr lo mejor posible del proyecto, sino también la mejor versión posible de mí. Gracias por ser un verdadero maestro.

Al Instituto de Fisiología Celular, por convertirse en un hogar, en sus instalaciones muchos compañeros sufríamos y reíamos, vivíamos todas las emociones y todos los esfuerzos juntos. Gracias por ser la sede de todos nuestros anhelos.

A los hermanos académicos: Chava, Pao, Dana, Harry, Sandra, Moshi. El tiempo del doctorado es una prueba que nos agota mental y emocionalmente, gracias porque recorrer juntos ese camino lo hizo más sencillo y con muchos momentos gratos.

A mis abuelos, su esfuerzo nos dio la oportunidad de estudiar, y abrió para mí la puerta hacia la vida que hoy me hace feliz. Se los agradezco con todo el corazón.

A mi madre, que con mucho cariño me ayudó y me alentó, incluso cuando parecía ser una espera eterna. Este logro lo comparto contigo con mucho cariño.

A mi hermano Toño, por todas las alegrías que compartimos. Por reírnos y apoyarnos, como si siguiésemos siendo unos niños.

A mi hermana Aimée, porque nos cuidamos y apoyamos, porque te quiero y te agradezco que cada día seas mi amiga además de mi hermana.

A mis pequeños sobrinitos Emilio, Andrés y Leonardo, los adoro y son mi motor para buscar que el mundo sea un mejor lugar en que puedan ser muy felices.

A los amigos, han sido muchos años frustrantes, y no lo hubiera logrado sin el apoyo, las alegrías y cariño que podía encontrar con ustedes, no quisiera olvidar mencionar a ninguno porque todos han sido importantes en mi vida. Especialmente gracias: Ceci, por tu apoyo y cariño, por ser una hermana. A Antonio, porque de alguna forma sabes el momento exacto en que se acerca otro examen y estás a mi lado, y reímos juntos como si no hubiésemos dejado de hacerlo nunca. Paco, siempre me has dado aliento y aun cuando no se veía el final me ayudabas a mantener la esperanza y el ánimo, eso ha sido invaluable. Edgar, que día a día me enseñas cosas nuevas, confío en tu criterio y admiro tu serenidad, es fantástico poder trabajar a tu lado y valorar la gran persona que eres.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	1
2. RESUMEN	2
3. ABSTRACT	4
4. INTRODUCCIÓN	6
4.1 Síntesis y metabolismo de lipoproteínas	8
4.2 Familia de apo B-100	9
4.3 Estrés oxidante en la aterogénesis	13
4.4 Xantina oxidasa como fuente de estrés oxidante celular	18
5. OBJETIVOS	21
6. HIPÓTESIS	22
7. MATERIALES Y MÉTODOS	
7.1 Reactivos	23
7.2 Ensayo con células vasculares	
7.2.1 Diseño experimental	24
7.2.2 Cultivo celular	24
7.2.3 Preparación, oxidación e internalización de lipoproteínas	25
7.2.4 Transcripción in vitro e hibridación al GeneChip de genoma humano	25
7.2.5 Validación por q-PCR	26
7.3 Modelo con células hepáticas	
7.3.1 Cultivo celular	28
7.3.2 Viabilidad celular	28
7.3.3 Niveles de ERO intracelulares	29
7.3.4 Determinaciones por Western Blot	29
7.4 Análisis estadístico	
7.4.1 Análisis de datos de microarreglos	30
7.4.2 Análisis por redes	31

7.4.3	Análisis de la validación por qPCR	32
7.4.4	Comparación en el modelo de células hepáticas	32
8.	RESULTADOS	
8.1	Modelo con células vasculares	33
8.2	Determinación de procesos biológicos regulados	36
8.3	Validación de los datos del microarreglo por cuantificación de mRNA	48
8.4	Modelo de células hepáticas incubadas con Hipoxantina	50
9.	DISCUSIÓN	54
10.	CONCLUSIONES	64
11.	BIBLIOGRAFÍA	67
12.	ANEXO I. Publicaciones derivadas del proyecto	81
12.1	Early transcriptomic response to LDL and oxLDL in human vascular smooth muscle cells	82
12.2	Antioxidants in the fight against atherosclerosis: is this a dead end?	104
12.3	Hepatic accumulation of hypoxanthine: A link between hiperuricemia and nonalcoholic fatty liver disease	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Panorama del impacto de los estímulos pro-oxidantes y antioxidantes sobre la expresión celular en el entorno vascular.	15
Figura 2. Agrupamiento jerárquico de la respuesta transcriptómica de células VSMC al estímulo con nLDL y oxLDL.	34
Figura 3. Principales procesos biológicos modulados ante el estímulo de nLDL y oxLDL	39
Figura 4. Procesos biológicos regulados por los genes con cambio de 8 veces los niveles de ARNm del control.	41
Figura 5. Mapa de expresión génica y su potencial impacto sobre procesos celulares.	45
Figura 6. Comprobación por qPCR para validar las cuantificaciones del microarreglo	49
Figura 7. Comparación de ERO intracelular y viabilidad en las células HepG2 estimuladas con H ₂ O ₂ .	50
Figura 8. Impacto en ERO intracelular de mayor actividad de la xantina oxidasa.	51
Figura 9. Expresión de SRB1 y regulación de ERO intracelular por alopurinol y antioxidantes en el modelo de células hepáticas estimuladas con hipoxantina.	53

1. ABREVIATURAS O SIGLAS USADAS

ARN m	Ácido ribonucleico mensajero
EAC	Enfermedad aterosclerosa coronaria
ECV	Enfermedades cardiovasculares
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótico reducida
OMS	Organización mundial de la salud
oxLDL	LDL oxidadas
nLDL	LDL oxidadas mediante exposición a células en cultivo
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados por sus siglas en inglés.
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
SR-B1	Receptor scavenger tipo B1
VSMC	Células de músculo liso vascular
XDH	Xantina deshidrogenasa
XO	Xantina Oxidasa
XOR	Xantina Oxidoreductasa

2. RESUMEN

La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial que se desarrolla principalmente en grandes vasos sanguíneos y es caracterizada por el depósito de lípidos oxidados. Se ha postulado que cuando las concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) exceden a las especies antioxidantes del organismo, se favorece la oxidación de lípidos y consecuente acumulación en las capas musculares de los vasos. Las ERO y ERN también juegan un papel fundamental en la señalización celular y son capaces de modificar la concentración de diversas proteínas, lo cual favorece la adaptación a condiciones potencialmente dañinas. En este sentido, nuestro trabajo se enfocó en desarrollar y caracterizar dos modelos *in vitro* que promueven la generación de ERO y ERN intracelulares, donde se determinaron las concentraciones relativas tanto de todo el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) como de una proteína con respecto a células cultivadas en ausencia los estímulos. Debido a que la hipótesis más aceptada sobre el origen de la aterosclerosis considera crucial el paso de lipoproteínas de baja densidad (LDL) al espacio subendotelial, donde su oxidación exacerba la producción de ERO y ERN, el primer modelo se enfocó en determinar la concentración relativa de los ARNm para identificar potenciales procesos biológicos modificados como respuesta de las células de músculo liso vascular ante la exposición de LDL oxidadas previamente *in vitro* (LDLox) y a LDL que en ausencia de antioxidantes son oxidadas durante el transcurso de la incubación (LDLn). Con esto visualizamos que, de acuerdo a los cambios en los ARNm, los procesos biológicos potencialmente modificados por la incubación con LDL oxidadas por el cultivo tras 24 horas de incubación muestran similitudes con las primeras 5 horas de incubación con LDL oxidadas por sulfato de cobre. Esto permitirá establecer con mayor claridad modelos más apegados a la oxidación de LDL que ocurre en el espacio subendotelial, y obtener información precisa que permita entender el origen de la enfermedad.

Por otra parte, considerando la capacidad de generar un ambiente oxidante de diversas reacciones químicas del metabolismo celular, nuestro trabajo también se aventuró al desarrollo de un segundo modelo de estudio centrado en estimular la producción de

especies oxidantes intracelulares en células hepáticas, a través de una de las isoformas de la enzima Xantina Oxido Reductasa (XOR), aquella con actividad de Xantina Oxidasa (XO). Con el aumento de especies oxidantes intracelulares, identificamos un aumento en la cantidad relativa de SR-B1, receptor transmembranal con afinidad a múltiples ligandos que media la captura selectiva o influjo de ésteres de colesterol en las lipoproteínas de alta densidad (HDL) hacia las células, además de facilitar el eflujo de colesterol de tejidos periféricos con la finalidad de que sean captados en el hígado. Y aunque la aterosclerosis es una enfermedad multifactorial, aún se considera al transporte del colesterol como un factor de suma importancia para el desarrollo de la enfermedad. Así ambos modelos establecen evidencias sobre el impacto de un ambiente prooxidante en la respuesta celular al modificar la cantidad de ARNm o de proteína, que en futuros trabajos sería interesante profundizar en el conocimiento del posible efecto fisiológico de estos cambios.

3. ABSTRACT

Atherosclerosis is a multifactorial disease that is developed mainly on large blood vessel and is characterized by cholesterol deposition as oxidized lipids. It has been proposed that when oxygen and nitrogen reactive species exceed antioxidant species on the organisms, lipid oxidation is promoted and the consequent accumulation between the muscle layers on the vessels. Oxygen and nitrogen reactive species also play a fundamental role on cellular signaling and are capable of modify proteins concentration, this facilitates adaptation to potentially harmful. In this sense, our work was focused to development and characterization for two *in vitro* models where generation of intracellular reactive oxygen and nitrogen species was promoted, there we determined relative concentrations for all messenger ribonucleic acid (mRNA) as for one protein and compared to cells incubated without stimulus. Due to the most accepted hypothesis on atherosclerosis origin considers as crucial the low density lipoproteins (LDL) flow to subendothelial space, where its oxidation exacerbates ROS and RNS production, the first model was focused on determinate relative concentrations of the mRNA to identify potentially modified biological processes as a response of the vascular smooth muscle cells to LDL exposure, either previously oxidized *in vitro* (LDLox) or to oxidized by cell culture in absence of antioxidants during incubation (LDLn). With this, we visualized according to mRNA changes, biological processes potentially modified for cell culture-oxidized LDL after 24 hours shows similarities with initial 5 hours of incubation with LDL oxidized by copper sulphate. This will allow to clearly stablish models closely related with the oxidation of LDL that actually occurs on the subendothelial space, and to get accurate information to understand the origin for this disease.

On the other hand, considering the capacity to generate an oxidant environment on behalf of cellular metabolism chemical reactions, our work also got ventured to development of a second study model focused on stimulate intracellular oxidant species production on hepatic cells, through one of the xanthine oxidase enzyme (XOR) isoform, the one with xanthine oxidase (XO) activity. Increment of intracellular oxidant

species, we identified an increase on SR-B1 relative amount, the transmembrane receptor with multiple ligand affinity mediates selective uptake or influx for cholesteryl esters on high density lipoproteins (HDL) towards cells, besides to facilitate the efflux of cholesterol from peripheric tissues for hepatic capture. Eventhough the atherosclerosis is a multifactorial disease, cholesterol transport is still considered a major significance factor for disease development. So, both models stablish evidence on the effect of an oxidative environment over the cellular response to modify the mRNA or protein levels, that in future research will be of special interest to analyze in depth the possible physiological effect due to these exchanges.

4. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la primera causa de muerte a nivel global son las enfermedades cardiovasculares, las cuales contribuyeron con un 31% de los fallecimientos registrados en todo el mundo en el 2016¹. Las enfermedades cardiovasculares son un grupo de desórdenes fisiológicos que afectan al corazón y vasos sanguíneos, dentro de los cuales se cuentan aquellos con etiologías reumáticas, congénitas, trombóticas, las enfermedades cerebrovasculares y la arterial coronaria. En la mortalidad relacionada con las enfermedades cardiovasculares (ECV), la aterosclerosis es la enfermedad causal de mayor incidencia, pues contribuyen a ella la enfermedad cerebrovascular, de vasos periféricos y muy particularmente la enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC). El impacto de las ECV en la mortalidad de la población enmarca la importancia de entender su desarrollo e inicio para poder proveer medidas clínicas efectivas de prevención. En la mayoría de los casos la aterosclerosis comienza desde la primera década de vida y se desarrolla de modo asintomático por largos períodos de tiempo, por lo que la detección e intervención médica usualmente se provee posterior a un evento agudo como el infarto. Dentro de las ECV la cardiopatía isquémica y los accidentes cerebrovasculares son las enfermedades con mayor impacto ya que además de una alta frecuencia de muertes por esta causa, éstas ocurren en edades mucho menores a la expectativa máxima de vida, lo que implica un mayor número de años de vida perdidos².

Las ECV presentan una etiología tan compleja que la información disponible hasta el momento no nos permite explicar con certeza sus causas principales y la posible contribución de diferentes factores. Sin embargo, los estudios clínicos enfocados a encontrar las causas han relacionado estadísticamente algunos parámetros clínicos y patrones de conducta con la presencia de EAC³. Así, se ha propuesto que existen condiciones o *factores de riesgo cardiovascular* asociadas con la probabilidad de desarrollar la enfermedad, y que pueden actuar sinérgicamente en el deterioro del organismo. Aunque una serie de estos factores se presentan en prácticamente todos los

casos y se ha postulado que sean parte de la causa subyacente de la patología, no son indicios inequívocos de su desarrollo. Dentro de los factores de riesgo más recurrentes se encuentran las dislipidemias, las cuales son evaluadas a través de las concentraciones de colesterol y triglicéridos plasmáticos y su comparación con poblaciones sin EAC.

Los depósitos de lípidos característicos de la aterosclerosis se denominan ateromas y contienen hasta 14 veces más colesterol y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) que en las arterias sanas⁴; ambos tipos de lípidos se encuentran como cetonas e hidróxidos derivados de su oxidación en mecanismos no mediados por enzimas⁵. La estructura de los ateromas incluye capas de tejido fibroso que confinan a los lípidos, y aumentan el grosor de las capas musculares de los vasos sanguíneos, de modo que disminuye la luz del vaso con las consecuentes complicaciones hemodinámicas. Aunque los detalles de la formación inicial de las placas son inciertos se han propuesto diversas hipótesis al respecto, las cuales consideran a la aterosclerosis una respuesta a una lesión primaria, o a la retención de lipoproteínas, o bien una consecuencia de modificaciones por oxidación en las lipoproteínas. Stocker postuló la hipótesis de que el estrés oxidante es la causa principal de la generación del ateroma, la cual se enfoca en observaciones de que los lípidos contenidos en el ateroma parecen provenir específicamente de las lipoproteínas de baja densidad oxidadas; y hasta el momento la comunidad científica aún refiere a esta hipótesis para integrar las evidencias disponibles⁶. Se ha observado que previo a la presencia de la placa ateromatosa se pueden identificar estrías grasas, las cuales se desarrollan generalmente en áreas donde la permeabilidad de las uniones intercelulares de los vasos sanguíneos es mayor, lo cual puede favorecer la migración de algunas macromoléculas a través de la monocapa de células endoteliales⁷. Las estrías grasas se estructuran por medio de una capa de células endoteliales de morfología heterogénea, éstas sirven de barrera para contener la masa del ateroma que consta primordialmente de macrófagos con un contenido de lípidos excesivo, en particular colesterol con altos niveles de peroxidación, y a las que por su apariencia se denominan células espumosas⁸. Reportes sobre las etapas tempranas de la estría grasa, detallan que las células del espacio subendotelial presentan depósitos compuestos

principalmente de lípidos, esto incluso antes de ser consideradas células espumosas; por lo cual, se considera que este enriquecimiento es fundamental para originar a la estría grasa^{9,10}. En su conjunto, estas observaciones sugieren que el transporte de los lípidos en la sangre a través de las lipoproteínas es de gran importancia para la EAC.

4.1 Síntesis y metabolismo de lipoproteínas

Los lípidos plasmáticos se solubilizan en medios acuosos como el plasma a través de la integración de estructuras complejas donde se ensamblan biomoléculas completamente hidrófobas y anfipáticas, como proteínas que al interactuar con los lípidos y el medio acuoso circundante favorecen la estabilidad de las estructuras denominadas lipoproteínas. El acomodo fisicoquímicamente más favorable de estas partículas es de una estructura pseudomicelar en donde los fragmentos hidrofóbicos de las biomoléculas integradas se alojan en el núcleo, mientras que en la superficie se sitúan los segmentos polares de los componentes anfipáticos. Las proteínas de estas lipoproteínas se conocen como apolipoproteínas (apo) y cuentan con segmentos hidrofóbicos que interactúan con los lípidos del núcleo, segmentos polares que interactúan con los grupos polares de lípidos anfipáticos y aminoácidos cargados en la frontera entre los segmentos polares e hidrófobos.

La composición y características de las lipoproteínas son muy variables, y dependen de su origen y metabolismo. Las diversas características bioquímicas de las lipoproteínas como su densidad, diámetro hidrodinámico, y carga permiten diferenciarlas en poblaciones que suelen interactuar constantemente. La clasificación más aceptada se basa en su densidad de flotación, generando las siguientes cinco clases de lipoproteínas:

Quilomicrones (Qm): Son las lipoproteínas de mayor tamaño, con densidad < 0.94 g/mL. En electroforesis de agarosa se mantienen en el punto de aplicación. Se compone principalmente de triglicéridos y apo B-48, A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E.

Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, "Very Low Density Lipoproteins"): 0.94 g/mL < densidad < 1.006 g/mL. Se separan en la fracción pre- β del plasma en electroforesis de agarosa. Contienen principalmente triglicéridos, apo B-100, C-I, C-II, C-III y E.

Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, "Intermediate Density Lipoproteins"): 1.006 g/mL < densidad < 1.019 g/mL. Migran en la fracción pre- β del plasma. Estas partículas contienen colesterol y triglicéridos, apo B-100, C-I, C-II, C-III y E.

Lipoproteínas de baja densidad (LDL, "Low Density Lipoproteins"): 1.019 g/mL < densidad < 1.063 g/mL. En electroforesis de agarosa se separan en la fracción β del plasma. Tienen un alto contenido en colesterol y apo B-100, que se aproxima al 98% de la apo B-100 presente en plasma.

Lipoproteínas de alta densidad (HDL, "High Density Lipoproteins"): 1.063 g/mL < densidad < 1.210 g/mL. Se separan en la fracción α del plasma, por lo que en la práctica clínica suelen referirse al valor de colesterol asociado a estas lipoproteínas como alfalipoproteinemia. Presentan un alto contenido en proteínas, fosfolípidos y colesterol. Su principal apolipoproteína es la A-I, además contienen A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E.

4.2 Familia de apo B-100

En particular, las lipoproteínas VLDL, IDL y LDL son una familia de lipoproteínas que comparten un proceso metabólico iniciado con la síntesis de apo B en hepatocitos. La proteína completa es un monómero con un peso aproximado de 517-550 kDa que se compone de 5 dominios diferenciados en función de su estructura secundaria¹¹. Algunas proteínas chaperonas se unen a una región cercana a uno de los dominios más hidrófobos con el fin de evitar la agregación de la proteína hasta su correcto ensamblaje en una lipoproteína¹². La proteína inmadura tiene un péptido señal de aproximadamente 27 residuos de aminoácidos que permite su movilización hacia el

retículo endoplásmico aún con los ribosomas asociados, en donde adquiere su fracción lipídica para el ensamblado de la pre-VLDL. Se ha propuesto que la generación de una cavidad hidrófoba por la unión de dos dominios de fosfolípidos de la membrana del retículo endoplásmico para comenzar el ensamblado de la lipoproteína¹³. Adicionalmente, la estructura permite la unión de la proteína de transferencia de triglicéridos microsomal (MTP) que, junto con la proteína disulfuro isomerasa (PDI), catalizan la lipidación de la apo B en partículas pre-VLDL¹⁴. La MTP transfiere varios lípidos, experimentos *in vitro* han mostrado que además de triglicéridos, esta proteína transfiere con menor afinidad, ésteres de colesterol y fosfolípidos¹⁵. Las proteínas con un plegamiento erróneo o una asociación de lípidos deficiente son rápidamente eliminadas por la alta sensibilidad de uno de sus dominios a degradación en proteosomas¹⁶. La pre-VLDL es transportada al aparato de Golgi, donde ocurre una segunda etapa de lipidación que es independiente de MTP y es dirigida únicamente por las características hidrofóbicas de la apo B; dicha lipidación es más rápida y conduce a la secreción de la VLDL madura¹⁷. Además de la apo B y de los lípidos incorporados, el ensamble de las VLDL requiere la asociación de otras apolipoproteínas estructurales como son la apo AI, AII y E antes de ser secretadas por los hepatocitos. La estructura de las VLDL sintetizadas es dependiente de la proporción de sus componentes, por lo que según la integración de triacilgliceroles o colesterol sus características son variables y pueden diferenciarse en dos tipos de partículas (VLDL-1 y VLDL-2). La concentración plasmática de las VLDL-1 presenta una mayor dependencia de la concentración de triglicéridos en plasma mientras que la secreción de VLDL-2 se relaciona con la disponibilidad de ésteres de colesterol y de la MTP. Al margen de la síntesis independiente de ambas subclases, las VLDL-2 también se forman a partir de VLDL-1 al hidrolizarse su contenido de triglicéridos por la lipoproteína lipasa (LPL) que suele estar expuesta en las paredes de los vasos¹⁸.

La degradación intravascular de las VLDL, vía la hidrólisis de triglicéridos, puede continuar en reacciones secuenciales en una cascada lipolítica, en donde se liberan remanentes de lipoproteína con características variables que acentúan la heterogeneidad de las poblaciones. La hidrólisis de las VLDL genera IDL, que pueden

continuar bajo la lipólisis de su núcleo de triglicéridos, toda vez que el contenido de los mismos sea suficiente para mantener los pasos de hidrólisis, generando LDL. Aunque la hidrólisis se considera el mecanismo de mayor contribución al origen de las IDL y LDL, una fracción de ellas proviene de síntesis y está relacionada con el balance de lípidos del organismo.

Una vez en plasma, las VLDL adquieren apo C y apo E por intercambio con las HDL de apo A y fosfolípidos; esta adquisición es de gran importancia ya que la apo C activa a la lipoproteína lipasa endotelial localizada principalmente en el endotelio capilar. Las VLDL son retenidas por unión de apo E al endotelio, facilitando la interacción con la lipoproteína lipasa endotelial que hidroliza triglicéridos y algunos fosfolípidos, entonces los ácidos grasos liberados difunden a las células aledañas y la reestructuración de la partícula provoca la pérdida de apo C¹⁹.

La apo CI es una apolipoproteína que activa a la LPL, enzima que se encuentra unida al endotelio vascular por medio de interacción con dominios heparina, y que cataliza la hidrólisis de triglicéridos en el interior de las lipoproteínas. Los ácidos grasos liberados pueden difundir libremente por las membranas de células aledañas y contribuir como un aporte energético o estructural de la célula. Por otra parte, los remanentes de VLDL presentan modestas diferencias que generan una población que puede caracterizarse por tener propiedades fisicoquímicas variables, este cambio por la hidrólisis de sus componentes puede generar una partícula con una mayor densidad a la que se clasifica como IDL. Existe la posibilidad de que además de las IDL originadas por hidrólisis de VLDL, tengan una síntesis hepática similar a la de las VLDL, sin embargo, se les considera resultado del catabolismo de las VLDL prácticamente en su totalidad. Las IDL aún poseen triglicéridos que pueden ser hidrolizados por la lipoproteína lipasa endotelial o lipasa hepática generando una gama de partículas caracterizadas por una población nativa de lipoproteínas heterogénea.

Las estructuras de las VLDL adquieren colesterol no esterificado o libre durante su maduración en el aparato de Golgi, por lo que son un medio normofisiológico para la exportación de colesterol del hígado hacia los tejidos. La hidrólisis de una fracción de fosfolípidos y del contenido de triglicéridos de las VLDL por la LPL endotelial genera lipoproteínas con un menor contenido de triglicéridos, menor volumen y consecuentemente una mayor densidad. Los remanentes de las lipoproteínas hidrolizadas pueden mantenerse dentro de los amplios intervalos de propiedades fisicoquímicas que caracterizan a las VLDL o diferenciarse en tal medida que se les reconozca como una clase diferente de partículas que son las IDL. Se ha sugerido que los niveles de colesterol del sistema son un factor determinante en la tasa de síntesis y secreción de las VLDL, donde una proporción de tales lipoproteínas corresponde a los triglicéridos, que son sustratos de la LPL^{20,21}.

Algunas de las lipoproteínas lipasas pueden disociarse de las células endoteliales durante la lipólisis y continuar con la hidrólisis de los triacilglicerolos de las lipoproteínas en el torrente sanguíneo. La hidrólisis de triglicéridos de los quilomicrones ocurre más rápido que la de las VLDL. Las VLDL de mayor tamaño son eliminadas del torrente sanguíneo antes de su conversión a LDL, pero las más pequeñas son hidrolizadas hasta su cambio de densidad a características de LDL²².

4.3 Estrés oxidante en la aterogénesis

Como se ha mencionado previamente, el postulado de que el estrés oxidante es la principal causa del desarrollo de la aterosclerosis es la hipótesis que integra la mayor parte de la evidencia recabada sobre el origen de la enfermedad²³. Las estrías grasas y ateromas son un indicador de que los lípidos oxidados en el entorno vascular juegan un papel importante en el desarrollo de la lesión y la gravedad de los cuadros clínicos que se producen²⁴.

Un ambiente oxidante puede modificar la estructura de enzimas y receptores que modulan en gran medida la dinámica de interacción del sistema de transporte de colesterol conformado por las lipoproteínas y sus factores de regulación, por lo que su alteración puede alterar el equilibrio del metabolismo celular, y por lo tanto promover o prevenir el desarrollo de la aterosclerosis. Algunos estudios han demostrado que las LDL nativas son internalizadas en células vasculares y macrófagos a una tasa inferior que las LDL modificadas *in vitro* por oxidación²⁵. Se ha propuesto que la oxidación se ve favorecida por la permanencia de estas lipoproteínas en el espacio subendotelial, aumentando así la afinidad de los macrófagos por ellas y, por tanto, su potencial aterogénico^{26,27}. La oxidación de las LDL puede darse por exposición a las ERO generadas en diversas reacciones del metabolismo normal, una vez oxidadas son fagocitadas por macrófagos, y se acumulan en el interior celular por lo que les denominan células espumosas^{28,29}. Diversos estudios han postulado que las oxLDL exacerbaban el crecimiento de las lesiones ateroscleróticas al inducir la expresión de moléculas de adhesión, quimiocinas para monocitos y, ante una exposición prolongada, la apoptosis de células endoteliales³⁰⁻³². En este sentido, las oxLDL se consideran como partículas proaterogénicas al favorecer la formación de las células espumosas que se encuentran característicamente en el ateroma³³, y su equilibrio depende en gran medida de las otras lipoproteínas pues cuentan también con actividades antioxidantes y antiinflamatorias³⁴; asimismo, se ha demostrado que el nivel de enzimas responsables de la remodelación intravascular y captación hepática de las lipoproteínas se modifican

cuando se enfrenta a un elevado estrés oxidante^{35,36}. Una concentración elevada de las ERO juega un papel importante en el inicio de las lesiones y en la progresión de la aterosclerosis. En algunos modelos *in vivo* se ha demostrado que evitar la consolidación de un estado de estrés oxidante a causa de una cantidad elevada de ERO y ERN puede lograrse con un adecuado balance de especies químicas antioxidantes en circulación y esto limita el progreso de la enfermedad^{37,38}. Las oxLDL no son sólo consecuencia del estrés oxidante, sino que lipoperóxidos y radicales derivados de las oxLDL migran al interior de las células aledañas propagando las ERO hacia el interior celular en un efecto crónico³⁹. Son las células del entorno endotelial y vascular las que reciben una mayor exposición según la evidencia histológica, y en cuya respuesta celular puede estar el punto determinante entre la persistencia de la estría grasa o su evolución hacia placa ateromatosa. En la figura 1, se muestra un esquema sobre los procesos biológicos involucrados como respuesta a la exposición de las lipoproteínas y el estrés oxidante dentro del entorno vascular.

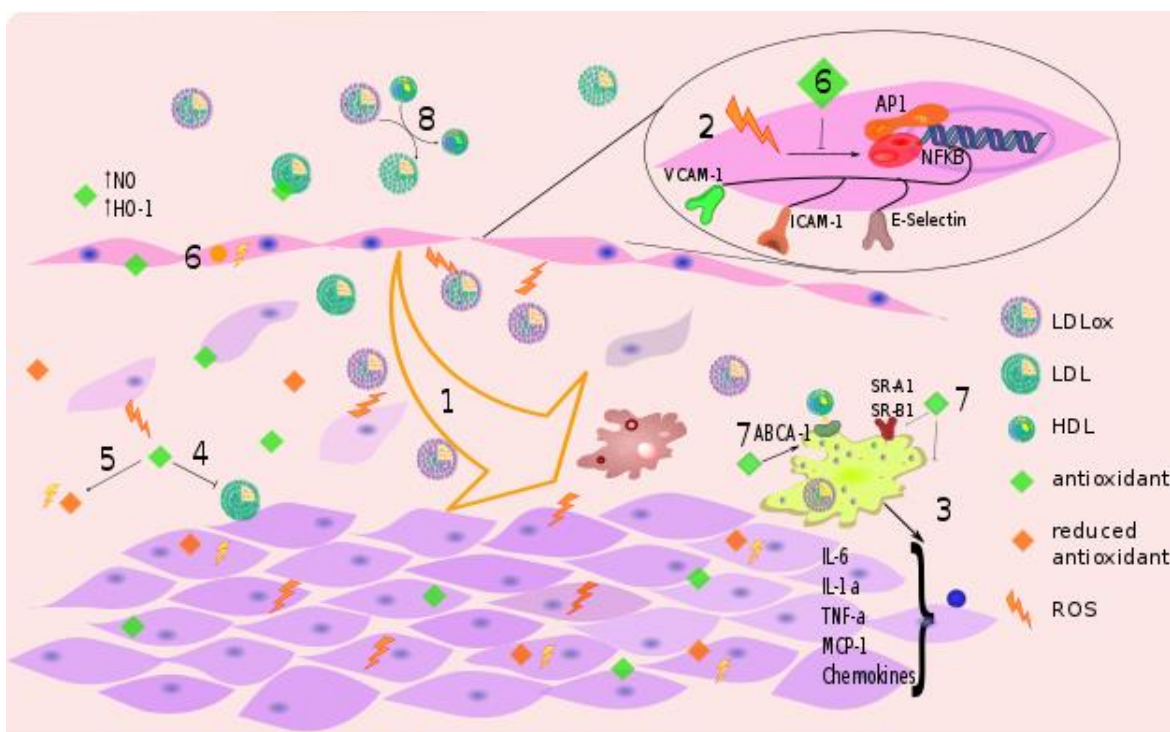


Figura 1. El esquema representa la pared vascular y los eventos de oxidación relacionados con la formación del ateroma. En la parte superior del esquema se representa la luz del vaso por donde pasa el flujo sanguíneo, contenido por las células más próximas de la capa denominada íntima. Al atravesar la capa íntima, las LDL se ubican en un espacio por debajo del endotelio vascular o espacio subendotelial donde permanecen constantemente expuestas a ERO y ERN; las lipoproteínas comienzan gradualmente a oxidarse (oxLDL) (1). Las células expuestas a oxLDL activan factores transcripcionales y cambian la cantidad de algunos receptores como ICAM, VCAM y E-Selectina, generando cambios en el metabolismo celular (2). Cuando los macrófagos fagocitan a las oxLDL las acumulan al interior celular y se convierten en células espumosas, propensas a liberar moléculas de señalización intercelular que favorecen la inflamación (3). No obstante, la presencia de antioxidantes en el espacio subendotelial puede evitar la oxidación de las LDL (4). Los antioxidantes reaccionan con las ERO y ERN (5), ejerciendo un papel protector contra el daño celular debido a la formación de oxLDL (6). Los antioxidantes modifican la cantidad de receptores y enzimas intracelulares que promueven la presencia de un estado metabólico antiaterogénico (7). Adicionalmente, pesar de la oxidación, la interacción con las HDL puede regenerar las LDL a partir de oxLDL (8).

Se ha demostrado que el estrés oxidante, y nos centraremos en aquel generado por las oxLDL por su relevancia para la EAC, puede modificar la respuesta celular por interacción con algunas cascadas de señalización intracelular. Por ejemplo, el proceso de transcripción de las células del entorno vascular puede modificarse a través de las especies reactivas de oxígeno y su acción sobre sus factores de transcripción⁴⁰. Un ejemplo se presenta con las proteínas AP1 que se unen al elemento de respuesta TPA⁴¹;

la actividad de AP1 como factor de transcripción responde principalmente a los cambios en el microambiente celular como son estímulos por citocinas, factores de crecimiento, infecciones y señales de estrés oxidante. Se ha demostrado que la actividad de AP1 se ve estimulada en células de músculo liso vascular (VSMC) ante la presencia de oxLDL, este efecto es evitado por antioxidantes demostrando la importancia de las ERO⁴².

Entre los factores de transcripción que son modulados por oxLDL se encuentran AP1, NF-κB, STA1/3, Sp1, PPARα, Nrfα y p53, todos los cuales, están presentes en músculo liso vascular⁴³. Los factores nucleares κ de células B (NF-κB) se encuentran en el citoplasma unidos a un inhibidor, sus inductores lo liberan y se transloca al núcleo para estimular la transcripción⁴⁴; las oxLDL funcionan como activadores de esta vía, aumentando la concentración de NF-κB libre en VSMC, posiblemente como respuesta a componentes oxidados de las lipoproteínas tales como el ácido 13-hidroperoxioctadecanoico⁴⁵. Otro ejemplo, es la familia de factores de transcripción SP con 3 motivos de dedos de zinc que al unirse a motivos ricos en CG en promotores favorecen la transcripción de los genes ríos abajo⁴⁶. En células de músculo liso vascular estimuladas con oxLDL se modifica la cantidad de ARNm de genes con secuencias de unión a Sp1 en el promotor⁴⁷. En el caso de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), son factores de transcripción activados por ligando, tienen una distribución de expresión ubicua en el organismo compuestos de 3 dominios con funciones de transactivación, débil aunque independiente de ligando AF-1, unión a DNA y unión a ligando para transactivación^{48,49}. Los PPAR funcionan en combinación con los receptores de retinoide X (RXR)⁵⁰ y requieren de la unión específica a elementos de respuesta⁵¹; PPAR y RXR se unen a los extremos 5' y 3' del elemento de respuesta del factor de transcripción⁵². Se ha observado que en células endoteliales la exposición a oxLDL activa al PPARγ por medio de los fosfolípidos oxidados asociados a estas partículas⁵³; la activación de los factores PPARα y PPARγ es proporcional a los niveles de oxLDL y 15-deoxy-(12,14)-prostaglandina J₂⁵⁴.

Así, las lipoproteínas oxidadas son estímulos particulares que pueden desencadenar la modificación de las concentraciones de transcritos y proteínas en un determinado linaje celular. Se ha propuesto que las oxLDL son captadas por receptores como LOX-1, SR-A y SR-B1 estos receptores, a diferencia del receptor de LDL (LDLR) que reconoce a la partícula en condiciones nativas, no responden a la regulación por los niveles intracelulares de colesterol y permiten la captación de lípidos excedentes al interior celular hasta generar a las células espumosas⁵⁵. Además, una vez que las LDL han pasado del flujo sanguíneo al espacio subendotelial y han sido oxidadas^{56,57} también actúan como factores quimiotácticos para monocitos, e inducen modificaciones epigenéticas en ellos que exacerban la producción de citocinas proinflamatorias ante segundos estímulos, favoreciendo la diferenciación a macrófagos por activación de PPAR- γ a través de su exposición a la fracción lipídica oxidada^{58,59}. Los macrófagos estimulados con oxLDL muestran una mayor disposición a la migración a través de un mecanismo dependiente del estrés nitrosativo intracelular y la peroxidación de lípidos favoreciendo su acumulación en la placa ^{60,61}. La presencia de las lipoproteínas oxidadas afecta también a las células del entorno vascular, se ha encontrado que células endoteliales presentan un mayor estrés oxidante intracelular ante la presencia de oxLDL aún sin la internalización de las partículas, debido a la formación de especies oxidantes permeables a la membrana celular⁶². El estímulo de ERO en células de músculo liso promueve la proliferación y migración de las células de músculo liso, se ha propuesto que al favorecer su desplazamiento se ubicarán entorno a los depósitos de oxLDL para confinar a las células espumosas en un cúmulo de tejido fibroso. Este proceso de migración de las células endoteliales ocurre a través de mecanismos dependientes de la señalización por MAPK y NF-KB⁶³, así como de citocinas involucradas en procesos inflamatorios y de calcificación, como la osteopontina. Es así como las ERO y RNS originan condiciones proaterogénicas en el entorno vascular que se agravan en condiciones donde la capacidad oxidante del organismo excede la capacidad reductora del mismo, desbalance definido como estrés oxidante.

Bajo la consideración de que la principal hipótesis en el proceso de la aterogénesis está sustentada en el estrés oxidante y la inflamación como factores críticos en el origen y

desarrollo de la enfermedad⁶⁴. Se ha propuesto que las ERO y ERN producidas en exceso modifican biomoléculas alterando la homeostasis normal de las células como se ha descrito que ocurre en el caso de la oxidación de componentes de lipoproteínas, y éstas a su vez promover la modificación de niveles de ARNm y proteínas, con un consecuente cambio de la fisiología celular. Como respuesta a un estímulo pro-oxidante como el que generan las oxLDL, el músculo liso vascular muestra una expresión elevada de osteopontina, una citocina importante en la calcificación de tejidos con la participación en el proceso inflamatorio⁶² y Egr1, un factor de transcripción asociado a la producción de ERO⁶⁵. Dentro del organismo la capacidad oxidante está mediada principalmente por las ERO y ERN ⁶⁶. La reacción de las ERO y ERN es fisicoquímicamente favorable con prácticamente cualquier biomolécula del entorno celular. No obstante, un oxidante fuerte como el radical hidroxilo reacciona preferentemente con un reductor fuerte como el ácido ascórbico, en comparación las proteína, lípidos y material genético son reductores débiles. Al evitar un proceso no deseado de oxidación se les ha denominado antioxidantes a las moléculas reductoras biodisponibles que podrían prevenir el progreso de enfermedades relacionadas con el estrés oxidante.

4.4 Xantina oxidasa como fuente de estrés oxidante celular.

El catabolismo de las purinas tiene como últimas dos reacciones la oxidación de hipoxantina a xantina y posteriormente a ácido úrico; se ha reportado que la concentración en plasma de ácido úrico no eliminado es elevada en sujetos con enfermedad coronaria⁶⁷, lo cual sugiere una relación entre el metabolismo de las purinas y el desarrollo de la aterosclerosis, que además se presenta con una mayor proporción de mortalidad y morbilidad de los pacientes⁶⁸. Una concentración en plasma ligeramente elevada de ácido úrico se ha asociado con enfermedad cardiovascular, aún en los casos en los que hay ausencia de deposición de microcristales de úrico en los vasos^{69,70}. Se ha demostrado en pacientes con EAC que la concentración de ácido úrico puede actuar como un predictor de morbilidad y mortalidad, independiente de otros

factores de riesgo^{71,72}. Además, la evidencia epidemiológica relaciona la hiperuricemia con procesos crónicos como la diabetes y el síndrome metabólico⁷³⁻⁷⁵, así como con procesos inherentes de la aterosclerosis que contribuyen a la formación de la placa, como la presencia y severidad de la calcificación de las arterias coronarias⁷⁶. Se ha descrito que concentraciones elevadas de ácido úrico abaten la expresión de eNOS y la liberación de NO en células endoteliales, lo cual es parte de un comportamiento característico de la disfunción vascular originada por estrés oxidante de origen mitocondrial⁷⁷. Esto es congruente con la mejora en la función vascular que presenta una población con hiperuricemia y sin otros factores de riesgo cardiovascular tras tratamiento con alopurinol⁷⁸.

La oxidación de hipoxantina y xantina para rendir ácido úrico es catalizada por la enzima Xantina Oxidoreductasa (XOR), enzima que puede presentar dos diferentes actividades de acuerdo a cambios en su estructura, la actividad xantina oxidasa (XO), y la actividad xantina deshidrogenasa (XDH)^{79,80}. Durante su actividad XDH, la enzima utiliza nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada (NAD⁺) como aceptor de electrones y genera la forma reducida (NADH). Debido al ambiente oxidante o por proteólisis directa, la XOR se modifica y actúa con actividad XO debido a que su afinidad por NADH es menor y emplea oxígeno como aceptor de electrones, consecuentemente se producen O₂^{•-} y H₂O₂⁸¹; la presencia de éstas ERO puede producir ERN también, ambos tipos de especies contribuyen a la señalización celular, y se ha sugerido que participan en la fisiopatología y desarrollo de la aterosclerosis⁸².

Es posible que la relación del ácido úrico con la función vascular, la calcificación, entre otras características relacionadas con la aterosclerosis se encuentre en la modificación de niveles de ARN y proteínas inducido por cambios en el balance óxido-reductor del organismo. En células de músculo liso de arterias pulmonares se ha detectado la sobreexpresión del factor de transcripción Egr1 ante un aumento de ERO derivado de la XO⁸³, además la inhibición de la XO ha mostrado una drástica disminución en la extensión de lesiones ateromatosas en modelos animales⁸⁴. Por lo tanto, la actividad XO

podría modular la expresión de diversas proteínas relacionadas con el desarrollo de la aterosclerosis, como es el receptor SR-B1 involucrado en la captura de lipoproteínas.

Estos datos sugieren que durante la hiperuricemia, es posible que se modifique la expresión de proteínas mediada por ERO y, en un proceso crónico, favorezca el desarrollo de la aterosclerosis, lo cual es congruente con la observación de una menor extensión de las lesiones ateromatosas secundarias a la inhibición de la actividad XO en modelos animales⁸⁵. De esta forma el estrés oxidante es importante en el desarrollo de la aterosclerosis no sólo mediante la oxidante de las LDL, sino por la respuesta celular desencadenada en los estratos vasculares ante los oxidantes potenciales presentes en el organismo.

5. OBJETIVOS.

Objetivo general

Establecer y caracterizar dos modelos independientes de elevados ERO y/o ERN intracelulares. En uno, determinar los cambios en los niveles de ARNm para interpretar las posibles implicaciones de las modificaciones de los procesos biológicos sobre la aterosclerosis. En el segundo modelo, determinar el efecto sobre la cantidad de proteína SR-B1.

Objetivos particulares.

- ◆ Analizar con herramientas bioinformáticas los cambios en los niveles de ARNm en células de músculo liso expuestas a LDL oxidadas por sulfato de cobre y por el metabolismo celular con respecto a células en ausencia de LDL.
- ◆ Generar un modelo de ERO y/o ERN elevadas en células hepáticas a partir del aumento en la actividad de la enzima xantina oxidasa endógena.
- ◆ Caracterizar la expresión del receptor de SRB1 en las condiciones de estrés oxidante del modelo de células hepáticas.

6. HIPÓTESIS

Modelos de cultivo celular donde se estimula la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno modificarán la concentración de ARNm y proteínas involucradas en los procesos metabólicos relacionados con el progreso de la aterosclerosis.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 Reactivos

Para el ensayo con células vasculares se emplearon células_T/G HA-VSMC CRL-1999 (ATCC, Virginia EUA), Medio F-12K (Invitrogen, Massachusetts, EUA), ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, Massachusetts, EUA), insulina/transferrina/selenito de sodio (Sigma-Aldrich, Massachusetts, EUA), factor de crecimiento celular endotelial (Sigma-Aldrich, Massachusetts, EUA) Suero fetal bovino (Invitrogen, Massachusetts, EUA), HEPES (Sigma, Massachusetts, EUA), TES (Sigma-Aldrich, Massachusetts, EUA), penicilina/estreptomicina/anfotericina (Invitrogen, Massachusetts, EUA), CuSO₄ (Sigma-Aldrich, Massachusetts, EUA), Trizol (Invitrogen, Massachusetts, EUA), Chip de microarreglo Human Gene 1.0ST (Affymetrix Inc., California, EUA), Taqman Gold RT-PCR kit (Invitrogen, Massachusetts, EUA).

Para el ensayo con células hepáticas se emplearon células HepG2 (ATCC HB 8065) (ATCC, Virginia EUA), medio DMEM (Invitrogen, Massachusetts, EUA), suero fetal bovino (Invitrogen, Massachusetts, EUA), Peróxido de Hidrógeno (Sigma-Aldrich, Massachusetts, EUA), Hipoxantina (Sigma-Aldrich, Massachusetts, EUA), alopurinol (Sigma-Aldrich, Massachusetts, EUA), Trolox (Sigma-Aldrich, Massachusetts, EUA), Metionina (Sigma-Aldrich, Massachusetts, EUA), Kit de ensayo de xantina oxidasa (abcam, Massachusetts, EUA), kit de ensayo xantina/hipoxantina RayBio (RayBiotech, Georgia, EUA), NADH (Sigma-Aldrich, Massachusetts, EUA), Piruvato de sodio (Invitrogen, Massachusetts, EUA), diacetato de diclorofluoresceína (Invitrogen, Massachusetts, EUA), geles SDS-PAGE (GE Life Sciences, Uppsala, Suecia), Anticuerpo contra SRB1 (Santa Cruz, Texas, EUA), Anticuerpo secundario anti IgG de conejo acoplado a Cy3 (GE Life Sciences, Uppsala, Suecia).

7.2 Modelo con células vasculares

7.2.1 Diseño experimental

El experimento comprende 21 microarreglos que corresponden con el triplicado de 7 condiciones experimentales, cada uno a partir de un pool de cDNA proveniente de 3 cajas de cultivos de VSMC. Se empleó como grupo control cultivo confluyente sin exposición a lipoproteínas al inicio del ensayo. Las LDL aisladas de un pool de suero humano y dializadas se dividieron en dos fracciones, a una se le reservó en esas condiciones, la otra fue oxidada con sulfato de cobre. Ambas fracciones de lipoproteínas fueron agregadas a las células en cultivo, las condiciones del experimento se mantuvieron hasta por 24 horas, dentro de las cuales se retiraron células para análisis a 1, 5 y 24 horas de haber iniciado la exposición. De cada muestra de células se extrajo ARNm para los análisis de microarreglos.

Los datos crudos del microarreglo fueron preprocesados y analizados con el software Partek Discovery Suite® desarrollado por Affymetrix. Con las cantidades de ARNm se calcularon las comparaciones entre los grupos de células incubadas con lipoproteínas y el grupo control. A partir de los ARNm con razones de cambio superiores a 4, se seleccionaron 9 con mayor o menor concentración que las condiciones control para validar por q-PCR; los demás se emplearon para calcular los procesos biológicos más representados de acuerdo a este criterio de cambio.

7.2.2 Cultivo celular

Se usaron células T/G HA-VSMC de una línea celular humana obtenida de ATCC (CRL-1999) desarrollada de la aorta de una paciente de sexo femenino sana. Las VSMC se cultivaron en medio F12K conteniendo 0.05 mg/ml ácido ascórbico; 0.01 mg/ml insulina; 0.01 mg/ml transferrina; 10 ng/ml selenito de sodio; 0.03 mg/ml suplemento de crecimiento celular endothelial (ECGS); 10% suero fetal bovino, 10 mM HEPES, 10 mM TES, 100 U/mL penicilina, 100 U/mL estreptomycin y 0.01% anfotericina B. Las condiciones de incubación incluyen un ambiente con humedad controlada a 37 °C y una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂.

7.2.3 Preparación, oxidación e internalización de lipoproteínas

Se aisló la fracción LDL (densidad: 1.019-1.063g/mL) por ultracentrifugación secuencial a partir de plasma de donadores sanos que acudieron al banco de sangre del Centro Médico Nacional 20 de noviembre. Las LDL se oxidaron por exposición a 7.5 μ M CuSO₄ en solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS), sin calcio ni magnesio, por aproximadamente 20 h a 37 °C como se ha descrito previamente⁶². Finalmente, la reacción de oxidación se detuvo por la adición de EDTA y las LDL fueron dializadas en solución de NaCl 150 mM con 100 μ M EDTA, almacenando a 4 °C.

Células VSMC en cultivo se incubaron durante 1 hora en medio sin suplementar, al término de la hora el medio se cambió por medio suplementado únicamente con 7.5 μ g/mL de LDL en sus formas nLDL u oxLDL, la incubación se monitoreó a 1, 5 y 24 horas de exposición. Las monocapa de células se lavó con PBS al término del tiempo de incubación para aislar el RNA total como se detalla más adelante.

7.2.4 Transcripción *in vitro* e hibridación al GeneChip de genoma humano.

Se obtuvo el ARN total de muestras de células VSMC por aislamiento con el reactivo de Trizol (Invitrogen Life Technologies) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La cuantificación de las muestras se realizó con un espectrofotómetro NanoDrop ND-3300 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) y la calidad del ARN fue analizada usando el ensayo RNA 6000 Nano y analizada con el instrumento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc.).

El cDNA fue preparado de acuerdo al protocolo de Affymetrix del kit para marcaje de transcrito completo (Affymetrix Inc). Brevemente, 200 ng de la mezcla de RNA se convirtieron a una primera cadena de cDNA usando la transcriptasa reversa Superscript II con un oligómero de poli-T. La síntesis de la segunda cadena de cDNA fue seguida por una transcripción *in vitro* que genera el cRNA. Se usaron los productos de cRNA como templados para un segundo ciclo de síntesis de cDNA incorporando dUTP a la nueva cadena. El cDNA fue fragmentado usando uracil-DNA glicosilasa y apurina

apirimidina endonucleasa. Los fragmentos generados en esta reacción (40-70 meros) se marcaron por medio de una reacción de adición terminal de deoxinucleótidos unidos a biotina. La hibridación entre el microarreglo Human Gene 1.0 ST (Affymetrix Inc.) y el producto marcado de cDNA se realizó calentando a 95 °C e incubando por 17 horas a 45°C. Las muestras se lavaron con soluciones amortiguadoras de baja (SSPE) y alta (100 mM MES, 0.1 M NaCl) astringencia, y posteriormente fueron teñidas con estreptavidina-ficoeritrina usando la estación de trabajo Affymetrix Fluidics Station 450 FS450_0007 y su respectivo protocolo.

La unidad GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix, Inc) se empleó para recabar las señales fluorescentes y el software Expression Console (Affymetrix, Inc) se empleó para obtener la intensidad de la señal y la calidad de los datos de los microarreglos escaneados. El software proporciona un reporte y medición que incluye el promedio de la señal de fondo, los resultados positivos y negativos, el área bajo la curva y la relación de la expresión para adiciones de controles útiles para la evaluación de control de calidad del microarreglo.

7.2.5 Validación por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (q-PCR).

La validación de la expresión superior o inferior con respecto al control se realizó cuantificando la expresión relativa de los transcritos por técnica de qPCR. La misma mezcla de RNA se empleó tanto en la hibridación al microarreglo como en las validaciones por qPCR.

El cDNA fue sintetizado usando un kit Taqman Gold RT-PCR kit (Life Technologies Corporation) a partir de un RNA de alta calidad (RIN \geq 9.8), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Todas las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado usando la Master Mix y la Taqman Universal, con las sondas indicadas en un sistema ViiA™ 7 real-time PCR (Life Technologies Corporation) en un volumen final de 20 μ l. Las condiciones de temperatura y de los ciclos fueron como sugiere el fabricante. El

análisis cuantitativo de los transcritos se realizó usando el método de comparación de $\Delta\Delta CT$ y la expresión del control endógeno de la expresión de GAPDH.

7.3 Modelo con células hepáticas

7.3.1 Cultivo celular

Se emplearon células de hepatoma humano adquiridas de ATCC identificadas como HepG2 (ATCC HB 8065) crecidas en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, estreptomina 10 µg/mL, anfotericina B 0.25 µg/mL y penicilina 100 U/mL. Los ensayos se realizaron con cultivos entre 80-90 % de confluencia, donde las células se expusieron durante una hora a 80 µM de H₂O₂ diluido en DMEM sin suplementos. Tras el tiempo de exposición, las células fueron lavadas con PBS a 37 °C y posteriormente las células fueron desprendidas con tripsina, para sembrarlas posteriormente en medio DMEM suplementado con hipoxantina. Para realizar los ensayos se sembraron 4.6×10^4 células /cm² en cajas Petri de plástico con tratamiento para células adherentes incubando a 37 °C y con 5% de CO₂; las células alcanzan una confluencia de aproximadamente 90-100% en tres días bajo estas condiciones. La hipoxantina se añadió al medio a partir de una solución stock de 8 mM en NaOH 10 mM para asegurar la solubilidad de la hipoxantina; las concentraciones en el cultivo variaron entre 25-150 µM de hipoxantina, y 156 µM de NaOH. El alopurinol, trolox y metionina fueron agregados al medio a partir de soluciones madre 100 µM, las concentraciones a las que se expuso el cultivo fueron de 5 µM para alopurinol, mientras que para trolox y metionina se probaron las concentraciones 25 y 50 µM.

La concentración intracelular de hipoxantina y la actividad XO se determinaron con estuches disponibles comercialmente (RayBiotech® y abcam® respectivamente) de acuerdo a las instrucciones de uso del fabricante.

7.3.2 Viabilidad celular

Empleamos la integridad de la membrana celular como un marcador de viabilidad celular, donde la determinación se centró en la medición de la actividad lactato deshidrogenasa liberada el medio. La actividad fue medida en el medio de cultivo y lisados celulares, refiriendo la actividad en el medio a la actividad total^{86,87}. Tras los

ensayos se recolectaron muestras del medio y de los lisados celulares y fueron incubadas por 5 minutos con 0.3 mM NADH en Tris/NaCl pH 7.2 en placas de 96 pozos adecuadas para lecturas espectrofotométricas de UV. La reacción fue iniciada con la adición de piruvato de sodio a una concentración final de 10 mM con incubación a 30 °C. Inmediatamente después del inicio de reacción se midió la absorbancia a 340 nm y los cambios fueron registrados cada 30 segundos durante 5 minutos. Los resultados son expresados como el porcentaje de enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio, considerando la suma de la actividad en medio y en el lisado como el 100%.

7.3.3 Niveles de ERO intracelulares

Las condiciones de estudio fueron administradas a las células en placas de 96 pozos por medio de suplementación al medio, tras el tiempo de exposición el medio suplementado se elimina y la monocapa de células es lavada con PBS a 37°C; para evidenciar la presencia de ERO se incuban las células por 45 minutos con diacetato de diclorofluoresceína 10 µM en medio DMEM sin suplementar. Al cabo del tiempo de exposición al marcador fluorescente las células se lavaron con PBS y se incubaron con tripsina EDTA por 8 minutos para separar las células, PBS helado fue agregado al término de la incubación para disminuir la actividad de la tripsina. La suspensión celular se depositó en una placa oscura de 96 pozos negra y se hicieron lecturas de la fluorescencia con un lector multimodal de microplacas Synergy HTTM de Biotek con una longitud de onda de excitación de 485/20 nm y emisión de 528/20 nm. Los resultados son expresados como el porcentaje de ERO con respecto a las células confluentes en ausencia del estímulo.

7.3.4 Determinaciones por Western Blot

Al terminar el tiempo de exposición de las células en cultivo, la monocapa de células fue lavada con PBS frío e incubadas a 4 °C con buffer de lisis (Tris, NaCl, SDS, Tritón X-100, NP-40, Glicerol, mezcla anti-proteasas y PMSF 7 M). Los lisados fueron sonicados en un baño de hielo y posteriormente centrifugados a 18400 g por 30 minutos a 4°C. La concentración de proteína fue determinada por el método de Lowry con ligeras

modificaciones como se ha reportado previamente⁸⁸. Los sobrenadantes resultantes fueron separados por electroforesis desnaturizante.

La separación electroforética y detección por inmunoréplica tipo western blot se realizó en el equipo Amersham Western Blot separando cantidades iguales de lisado celular marcados con el fluorocromo Cy5 incubando por 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras marcadas fueron desnaturizadas incubando 5 minutos en agua hirviendo con solución amortiguadora con DTT. La electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) se realizó en geles listos para uso de 13.5% de poliacrilamida, las proteínas separadas por diferencia de potencial fueron transferidas a una membrana PVDF, la membrana se incubó con 3% ECL prime en TBS (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl) a temperatura ambiente para bloquear los sitios sin unión a proteínas. El anticuerpo primario de conejo contra SRB1 fue incubado por 4 horas empleando una dilución 1:2000 y el anticuerpo secundario contra IgG de conejo acoplado al fluorocromo Cy3 fue incubado por una hora con una dilución de 1:2000. Igualmente, la señal fluorescente fue detectada y se recolectaron imágenes para su posterior análisis con la unidad ElphoScan del equipo. La fluorescencia derivada de Cy5 está relacionada a la cantidad de proteína separada, por lo que su valor es usado como un control de carga tal como se ha descrito previamente⁸⁹.

7.4 Análisis estadístico

7.4.1 Análisis de datos de microarreglos

El chip de microarreglo Human Gene 1.0 ST está diseñado para analizar 28,869 de genes correctamente anotados. La intensidad de las señales de 21 arreglos en formato *.CEL se analizó usando el software Partek Genomic Suite version 6.4 (Partek, Saint Louis MA.) y los datos fueron depositados en el Gene Expression Omnibus (GEO) de NCBI [23], los archivos *.cel están disponibles a través del número de acceso de GEO

GSE10446, GSE10447.

Las intensidades directas de las sondas fueron importadas a través de un análisis del microarreglo con una corrección robusta de las intensidades de fondo. El análisis de los genes diferencialmente expresados, se realizó con una ANOVA de dos colas. A partir de este análisis estadístico los genes con una razón de cambio (FC) de 2.0 y un valor de $p < 0.05$ se identificaron como diferencialmente expresados.

7.4.2 Análisis por redes

El análisis de redes se realizó usando el software Ingenuity Pathways Analysis Suite (IPA, Ingenuity), para la elaboración de rutas y redes de acuerdo a los datos obtenidos. El análisis de enriquecimiento para las diferentes categorías de Gene Ontology (GO).

Analizamos la sobrerrepresentación de procesos biológicos empleando la prueba hipergeométrica corregida por el factor FDR de Benjamini & Hochberg con un nivel de significancia de 0.05 y la base de datos del Gene Ontology Project, con el plugin BiNGO del software Cytoscape 2.8.2^{90,91}. Empleamos las pruebas hipergeométrica y Chi cuadrada, con corrección por FDR, reconociendo un proceso con un mínimo de 5 genes y $p < 0.001$ con la herramienta de análisis en enriquecimiento sencillo y modular de GeneCodis⁹²⁻⁹⁴; así como el cálculo del estadístico Kappa bajo los criterios de la herramienta de anotación funcional en DAVID Bioinformatics Resources 6.7^{59,60}. Se contrastaron los resultados de procesos biológicos significativos y genes implicados en ellos, sólo se analizaron aquellos que fueran representativos de los tres análisis empleados. Los gráficos mostrados corresponden al software de Cytoscape por ser representaciones gráficas más apropiadas; las redes generadas con los datos de cada tiempo fueron sumadas para cada tipo de lipoproteínas a fin de representar los procesos implicados usando como estímulo diferencial la oxidación de las lipoproteínas.

Los genes regulados de cada proceso biológico fueron agrupados de acuerdo a sus valores de cambio empleando una correlación no céntrica como medida de similitud con el software Gene Cluster 3.0 y el Tree View versión 1.6⁹⁵ para generar las expresiones gráficas de los mapas de calor.

7.4.3 Análisis de la validación por qPCR

El análisis cuantitativo de los transcritos se realizó usando el método de comparación de $\Delta\Delta Ct$, empleando la expresión de GAPDH como control endógeno. Los datos se analizaron con la prueba t de Welch de dos muestras, y se consideró como diferencia estadísticamente significativa una $p < 0.05$ en todos los casos.

7.4.4 Comparación en el modelo de células hepáticas

La comparación entre los grupos de células expuestas a diferentes condiciones de estrés oxidante derivado del metabolismo de hipoxantina fue analizada por la prueba t de Student no pareada de dos colas para muestras distribuidas normalmente. La significancia estadística fue fijada a partir de $p < 0.05$. A menos que se indique lo contrario los valores de los resultados son expresados como el promedio \pm la desviación estándar. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a partir de tres experimentos independientes con varias réplicas cada uno, salvo para los ensayos de determinación de ERO donde se realizaron 9 experimentos independientes.

8. RESULTADOS

8.1 Modelo con células vasculares

Nuestro análisis indica, de acuerdo con los genes que presentaron una modificación estadísticamente significativa en respuesta a alguna de las condiciones de estudio, que el estrés oxidante tiende a aumentar la concentración de ARNm y como una respuesta minoritaria a disminuirlos, como se evidencia en el agrupamiento jerárquico por distancia euclidiana (figura 2). Los patrones de expresión transcriptómica en las diferentes condiciones de exposición a las nLDL y oxLDL pueden agruparse por la medida de similitud no paramétrica de correlación de Spearman, donde las incubaciones con nLDL a 24h son similares a las oxLDL a 24 y 5 horas. Esto indica que el estímulo obtenido con nLDL a 24 horas de incubación causa una respuesta celular transcriptómica encaminada a la misma intención biológica que las oxLDL.

Aunque las células muestran patrones similares en la cantidad de ARNm entre aquellas expuestas a nLDL a partir de 5 horas y menos de 5 horas con oxLDL, esto sugiere que oxidación de las LDL por el metabolismo de las células en las exposiciones más prolongadas de nuestro ensayo.

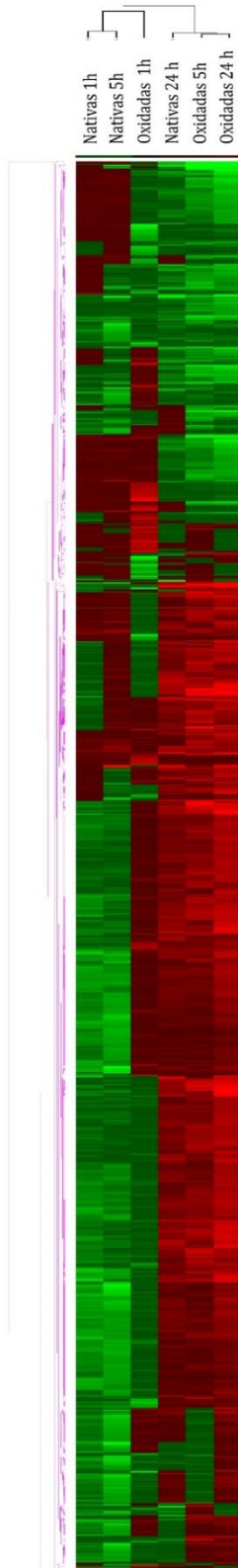


Figura 2. Agrupamiento jerárquico de respuesta transcriptómica de las células VSMC incubadas con nLDL y oxLDL. El dendograma superior muestra que a los mayores tiempos de exposición las células tienen una respuesta transcriptómica similar a las células expuestas a oxLDL por tiempos cortos de exposición. Este resultado es consistente con el concepto de LDL parcialmente oxidadas o de lípidos metabólicamente oxidados.

Algunos estudios que involucran a células del entorno vascular, aunque no particularmente del músculo liso, analizan el efecto de enfrentarlas a oxLDL por diversos medios; no obstante, monitorear en un ensayo agudo la oxidación debida al metabolismo de las mismas células vasculares ante la ausencia de antioxidantes es un modelo que no se ha explorado previamente. En nuestro trabajo demostramos que el cultivo de células VSMC oxida a las LDL cuando no hay antioxidantes en el medio, y una vez oxidadas se modifica la concentración de 236, 586 y 208 ARNm a 1, 5 y 24 horas respectivamente, mientras que en células expuestas a las oxLDL por CuSO_4 los genes con ARNm significativamente modificados corresponden a 231, 425 y 799 bajo los mismos tiempos de incubación. Los datos muestran que el estrés oxidante inducido por las lipoproteínas cuando son oxidadas *in vitro* con sulfato de cobre y cuando la oxidación se desarrolla paulatinamente por la incubación con cultivo celular debido al metabolismo de las células llevan a una modificación en las concentraciones del ARNm derivado de múltiples genes. El aumento en la expresión de los genes fue más dramático que la disminución, ambos estímulos generan tiempos críticos de cambios celulares como la reparación del daño o el inicio de eventos apoptóticos.

Es posible identificar al menos 7 fenómenos moleculares relacionados con la fisiología de las VSMC que fueron modificados en menor o mayor medida y en diferentes sentidos de acuerdo al estímulo enfrentado: ciclo celular, unión al ADN, respuesta inmune, metabolismo de colesterol, respuesta a estrés, señalización intracelular, y organización estructural de las células. En la figura 3 se muestra el análisis bioinformático que describe los procesos biológicos que se consideran modificados con respecto al control derivado de la oxidación por sulfato de cobre (A) o derivada de la exposición al cultivo (B). Nuestro análisis se enfoca en resaltar el impacto en los ARNm de los diferentes genes a ambos tipos de oxidación, en orden de entender los fenómenos moleculares del estrés oxidante. Identificar los genes regulados en el modelo de las VSMC por el estímulo de las nLDL y oxLDL ofrece la oportunidad de emplearlos como marcadores del desarrollo de la aterosclerosis, intentar emplearlos como puntos para la intervención terapéutica, e incluso avanzar en el entendimiento de estos fenómenos

moleculares en un contexto clínico, y su relación con las etapas tempranas de la aterosclerosis.

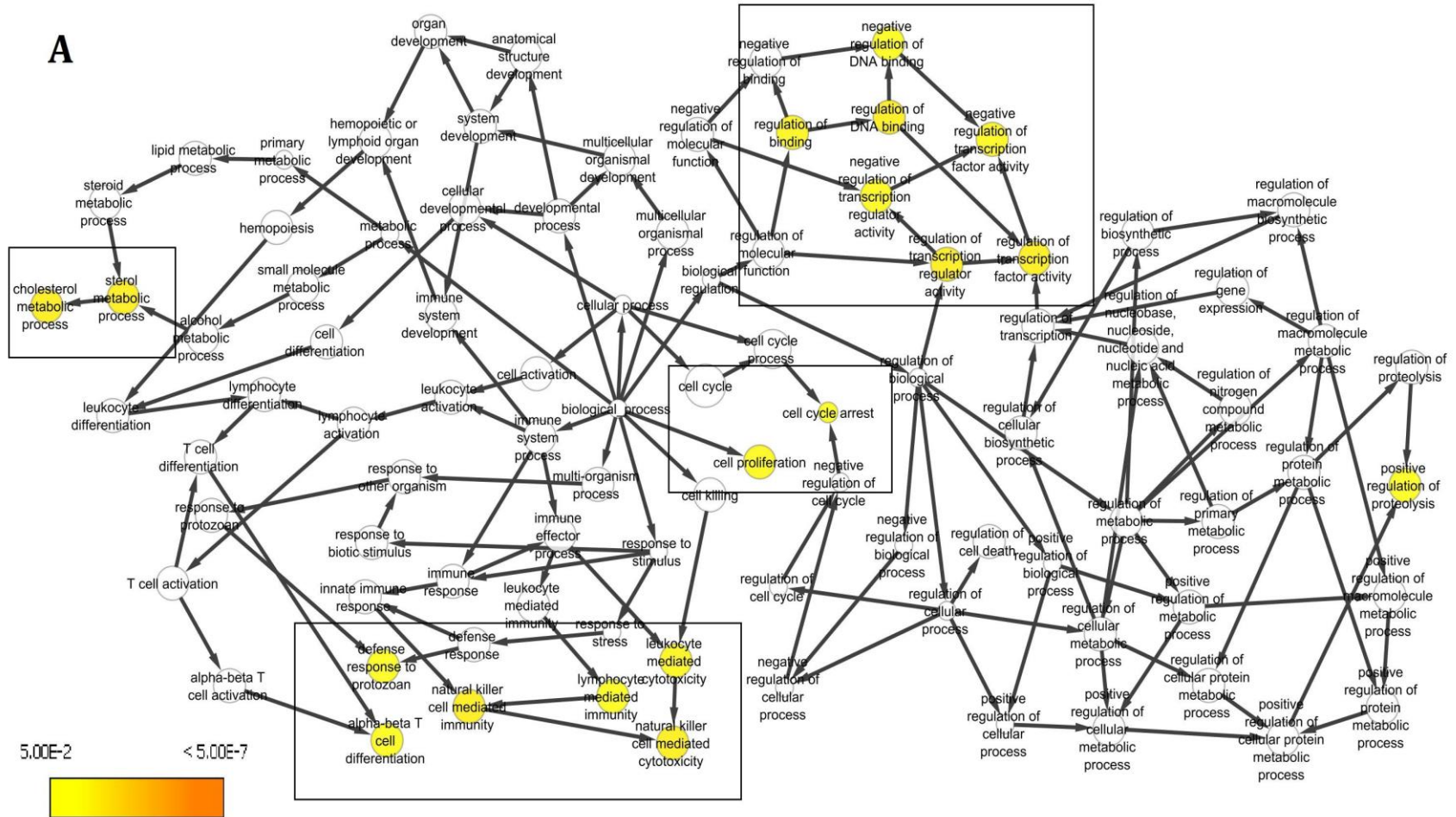
8.2 Determinación de procesos biológicos regulados.

Considerando los genes con una expresión 4 veces mayor o menor que las células en condiciones basales, el estímulo con nLDL modificó los niveles de ARNm de 255 ± 89 genes mientras que ante la exposición a oxLDL se modificaron 361 ± 79 genes, es decir aproximadamente un 40% más que los genes regulados por la presencia de nLDL, lo cual sugiere una respuesta celular más extensa y posiblemente con un mayor impacto biológico, y que no necesariamente refleje lo que ocurre en el organismo. Los principales procesos biológicos regulados por oxLDL y por nLDL se muestran en la Figura 3. Las redes muestran grupos de nodos con funciones biológicas afines que destacamos con un recuadro, las cuales serían el metabolismo de colesterol, la regulación del ciclo celular, unión al DNA, procesos inmunes y señalización por proteínas morfogenéticas óseas, los cuales analizaremos posteriormente en las diferentes condiciones.

Sobre el metabolismo de colesterol se detectaron dos nodos de procesos biológicos modificados; debido a su la ampliamente documentada relación con la enfermedad, la descripción de su regulación en la respuesta celular temprana es importante. Mientras que los procesos de control del ciclo celular, procesos de unión al DNA y procesos inmunes presentan una mayor proporción de genes cuyos ARNm fueron modificados, con respecto a gran número de nodos con altos valores de significancia estadística, lo que indica que son procesos regulados fuertemente en diversos niveles de intervención, por lo que son de interés dentro del inicio de la EAC. El control sobre ciclo celular mostró una importancia esencial en la regulación generada por la exposición a las oxLDL.

Los resultados indican que las nLDL modifican procesos de inmunidad innata y comunicación con otras células de este sistema (Figura 3A), no así las oxLDL (Figura 3B) a pesar de que el sistema inmune reconoce sólo a estas últimas como un estímulo antigénico y que su concentración está directamente asociada a las complicaciones inflamatorias de la EAC. Sin embargo, al analizar los procesos biológicos asociados a los genes con cambios en expresión más drásticos detectamos la regulación por parte de las oxLDL sobre procesos inmunes, donde la regulación se centra hacia respuestas de hipersensibilidad e inflamación. Lo anterior sugiere que las complicaciones por inflamación a nivel vascular que se observan en la EAC podrían comenzar su alteración desde etapas muy tempranas de la aterogénesis, por lo que determinamos que este proceso es crucial para su posterior análisis.

Aunque la señalización debida a proteínas óseas morfogenéticas es un proceso con poca representación, su relación con la biomineralización en diversos tejidos es de especial interés en el caso de la EAC; las VSMC no expresan naturalmente proteínas relacionadas con la calcificación. No obstante, nuestro grupo de estudio ha encontrado que ante situaciones aterogénicas son capaces de expresar SPP1⁶², una proteína que regula la formación de cristales de hidroxapatita. A nuestro conocimiento este es el primer reporte sobre la señalización osteogénica por proteínas morfogenéticas óseas (BMP) en exposiciones tempranas de oxLDL.



El parámetro de cambio empleado por excelencia en el análisis bioinformático emplea los genes con una razón de cambio de 2, es decir 2 veces la concentración o la mitad de ella con respecto a las condiciones control; no obstante debido al importante número de nodos y genes involucrados en este proceso empleamos un análisis adicional con genes cuyos ARNm tuvieron razones de cambio mayores o iguales a 8 veces. El análisis contó con 49.3 ± 18.7 genes regulados por la exposición a oxLDL, mientras que con nLDL únicamente fueron significativos ante este criterio 16 genes de la exposición por 24 horas. El análisis realizado para agrupar a los genes (figura 4) de acuerdo al proceso biológico con el que están relacionados mostró 3 grupos con funciones asociadas al sistema inmune, además de la proliferación celular, particularmente por organización del huso mitótico. Así, bajo ambos análisis estadísticos seleccionamos la organización de los microtúbulos por su relación con la estructuración del huso mitótico como el proceso de mayor interés bajo las directrices estadísticas.

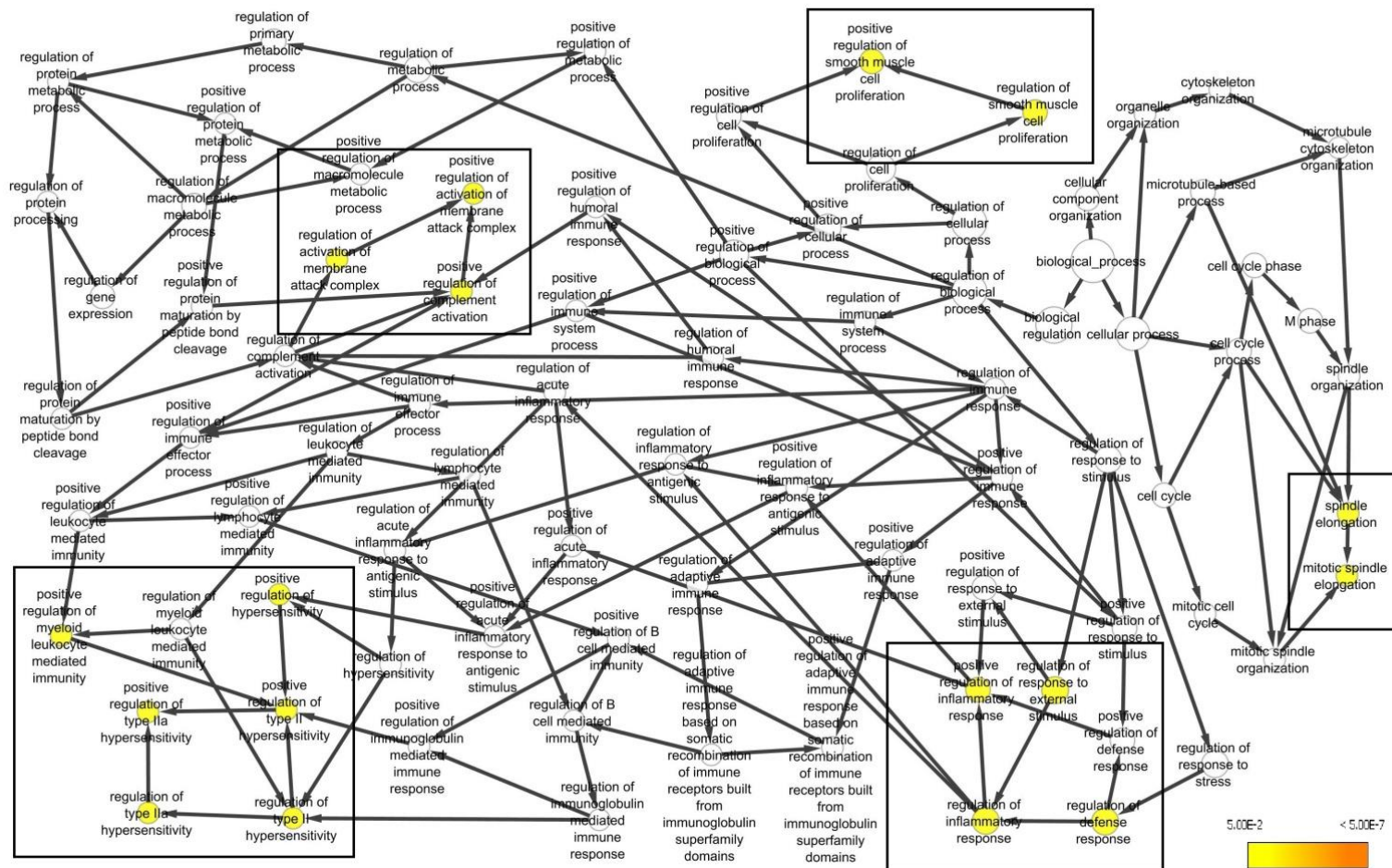


Figura 4. Procesos biológicos regulados por los genes con cambio de 8 veces los niveles de ARNm del control. Identificación de los procesos celulares con mayores cambios en las concentraciones de ARNm.

Con respecto a los procesos modificados, empleamos los genes contenidos en el análisis con razones de cambio superiores a 8 y de acuerdo a la actividad de las proteínas para las que codifican se postulan posibles efectos fisiológicos relevantes para la aterosclerosis los cuales se ilustran en la figura 5; es importante mencionar que a nuestro conocimiento para algunas de estas proteínas codificadas no se ha reportado una relación con la enfermedad hasta el momento. Se observó que el control sobre el ciclo celular era esencial en la regulación por la exposición a LDL de las VSMC. El análisis de las vías y redes celulares muestra una fuerte representación de los genes asociados con el ciclo celular en virtualmente todas las condiciones experimentales. Bajo tiempo cortos de exposición tanto las nLDL como las oxLDL activaron la expresión de genes como FOS y EGR1, los cuales son indicadores de la proliferación celular, diferenciación y transformación, eventos que han sido previamente reportados para las VSMC en las etapas tempranas de la formación del ateroma⁹⁶. La expresión de dichos genes disminuyó drásticamente a tiempos más largos como 5 y 24 horas, indicando que sólo ante exposiciones breves las células responden con una activación que parece necesaria para controlar el estímulo.

En células quiescentes se ha reportado que los niveles de expresión de FOS son muy bajos; no obstante, cuando las células son estimuladas usando suero fetal bovino entran en una etapa de crecimiento que involucra dos oleadas de incremento en la expresión, la primera a 7.5 minutos, cuando la proteína se encuentra en el retículo endoplásmico, y la segunda a los 20 minutos con un pico máximo a 1 hora, cuando la proteína se transloca al núcleo⁹⁷.

Las lipoproteínas muestran dos genes preferentes de regulación en cuanto al control del ciclo celular, el aumento en la expresión de ATC y la reducción de PLK1. Este patrón indica el arresto del ciclo celular así como cambios en mitosis, citocinesis, y la respuesta al daño del DNA⁹⁸.

Bajo estas condiciones experimentales, a tiempos más largos (5 y 24 horas), el control de la proliferación celular con ambos tipos de lipoproteínas parece depender de MYC, el cual aumenta por sí mismo (razón de cambio 3.17 y 2.89). Estas observaciones son

congruentes con lo esperado ya que se ha reportado previamente que c-Myc está fuertemente regulado a través del ciclo celular y que alteraciones en su regulación llevan a alteraciones en el ciclo, acortando la fase G1 y facilitando el paso de G1/S⁹⁹.

Por otra parte, el aumento en la expresión de varios genes como DLX5, un factor de transcripción involucrado en el desarrollo de hueso, esencial para la diferenciación de osteoblastos y promotor de la proliferación celular va de la mano con el aumento en la expresión de MYC. Se ha reportado que DLX5 aumenta la actividad del promotor de MYC¹⁰⁰, el cual es un fuerte represor de la expresión de genes asociados al arresto del ciclo celular, tal como gas1, p15, p21, p27, gadd34, -45, y -153¹⁰¹. Los niveles de expresión observados en los genes ya mencionados indican que el sistema intenta evitar el arresto celular. Adicionalmente genes como CYR61, que favorece la proliferación celular, se han identificado como componentes importantes relacionados con la reparación por regulación en la expresión de genes involucrados en la angiogénesis, inflamación y remodelación de la matriz extracelular¹⁰².

Los genes como APC se relacionan con promover la apoptosis, activación transcripcional y la migración celular; este gen parece actuar en conjunto con DDIT3, asociado a la apoptosis activada por estrés en el retículo endoplásmico. Ambos regulan la respuesta inflamatoria inducida por la activación de la caspasa 1 y la activación de la interleucina-1 beta (IL1B). Por ello, se afecta la dinámica con respecto a las señales mitogénicas, arresto del ciclo celular, apoptosis, migración, reparación del DNA y otras funciones celulares y moleculares, de acuerdo a los estímulos recibidos y al tiempo de exposición.

Asimismo, la remodelación de la matriz extracelular es un fenómeno regulado que muestra diversos genes cuya expresión modificada sugiere la importancia del proceso. El gen MMP16 uno de las cuatro metaloproteasas transmembranales de tipo-I es sobre-expresada cuando las células se exponen a las oxLDL con un mayor efecto a las 24 horas. Es posible que este patrón de expresión esté relacionado con la endocitosis, fenómeno previamente reportado que se asocia a la ruta de fagocitosis de proteínas intracelulares y degradación de matriz extracelular¹⁰³.

En el mismo contexto, genes como ICAM1 (CD54) involucrados en la adhesión celular se encuentran regulados a la baja, indicando un aumento en la migración celular y la deslocalización, fenómenos que se han observado in vivo en la placa aterosclerosa.

Nuestro análisis muestra que genes como TIMP1, inhibidor natural de las metaloproteasas, es regulado a la baja cuando el estrés oxidante aumenta, siendo congruente con los mecanismos de remodelación de la matriz extracelular, en donde el movimiento debe ser facilitado para degradar la matriz¹⁰⁴. Mientras las integrinas 3 y 5 (ITGA3 ITGA5) disminuyen su expresión cuando reciben señales asociadas a la producción de mayores cantidades de ERO, que actúan como moléculas de adhesión mediando la unión de las células y sus alrededores, regulando el ciclo celular, la forma y la movilidad a través de transducción de señales. Así que la sinergia entre la pérdida de estructura tisular y la degradación de la matriz extracelular son fenómenos directamente relacionados entre sí.

Las fuentes de generación continua de ERO son agentes potenciales de daño al DNA, por lo que la célula requiere tener disponibles los mecanismos de reparación del DNA que requieren la expresión de una amplia cantidad de genes relacionados. La base de datos de IPA reconoce a 330 genes con una relación documentada con la reparación de daños al DNA; las células incubadas en presencia de oxLDL regularon la expresión de 300 genes de dicha lista, es decir el modelo induce la regulación de un 90% de los genes que se reporta tienen influencia en la reparación del DNA. A las 24 horas, algunas de las respuestas más representativas están guiadas por genes como KIT, XRCC4, ERCC4 y ERCC6, indicando que las estructuras celulares mantienen su integridad incluso a nivel de daño al material genético inducido por exposiciones breves a oxLDL, que afectan procesos celulares mutuamente excluyentes como el inicio de la apoptosis y el mantenimiento de la integridad celular.

A partir de los procesos biológicos identificados por el análisis estadístico empleamos algunos genes fuertemente documentados en cuanto a la regulación del proceso. Con esta información desarrollamos un esquema que detalla el paisaje de una posible respuesta celular.

El patrón de expresión sobre los genes involucrados en el ciclo celular tiene dos tendencias de acuerdo al tipo de oxidación que hayan tenido las lipoproteínas a las que se exponga el cultivo. Ante la incubación con nLDL la expresión de los genes ATM y PLK1 es menor que el control, mientras que DLX5 es superior al mismo. Estos niveles de expresión son congruentes con un sistema que reprime el arresto celular; adicionalmente Cyr61 y DLX5 (genes que favorecen la proliferación) tienen valores de expresión superiores al control. Ante la incubación de oxLDL la regulación de los genes ATM, APC, DDIT3, KIF4A y PRC1 muestra una fuerte tendencia al arresto celular, que es apoyada por la elevada expresión de INHBA y CALCRL que reprimen el proceso de proliferación; adicionalmente observamos la expresión elevada de APBB2 y baja de KIF4A, ambas generando un efecto antiapoptótico.

Adicionalmente, observamos que la incubación en presencia de oxLDL disminuye la expresión de TAGLN y ACTA2, dos marcadores génicos del fenotipo de las VSMC. Ante el mismo estímulo y aún con nLDL aumenta la expresión de genes como SPP1, BMP6 y CALCRL que están involucrados en favorecer la diferenciación y maduración de células osteogénicas, cuya actividad puede generar la biomineralización patológica en entornos vasculares. CALCRL y SPP1 también son capaces de regular procesos inflamatorios, CALCRL puede coordinar su actividad con genes como ILR1 y PTGS1 generando un efecto antiinflamatorio, sin descartar la posibilidad de un cuadro proinflamatorio.

Aunado a estos procesos, es necesario destacar que la exposición crónica a un estímulo puede resultar en cambios opuestos entre los primeros tiempos y los últimos, y esto puede alterar el desarrollo de placas ateromatosas en modelos crónicos de la patología. Por ejemplo, la inducción de una respuesta proaterogénica tipo Th1 por parte de SPP1 al exponerse a las nLDL, mientras que las oxLDL generan un efecto contrario en Th1 de acuerdo al cambio que presenta IL33. Asimismo, se ha reportado la disminución de estas lesiones ante una expresión elevada de CALCRL a raíz de su interacción con ADM y la elevada expresión de C3 en condiciones propicias para el desarrollo de la lesión aterosclerosa.

Por lo que respecta al metabolismo de colesterol se observaron cambios estadísticamente significativos en la concentración de ARNm de diversos genes. Con nuestros datos del transcriptoma demostramos que aumenta la expresión del transportador ABCA1, el cual se ha descrito vastamente que realiza la función primordial de dar salida al colesterol celular. Nuestros resultados también detectaron la modificación en la expresión de transportadores de la familia C como son ABCA6, ABCA8, ABCA9 y ABCC9, con valores de razón de cambio de hasta 3, significando un aumento total de hasta 6 veces la expresión del control. Sobre estos transportadores solamente ABCA9 y ABCC9 han sido previamente identificados como proteínas con aumento de expresión dentro de procesos de diferenciación de monocitos a macrófagos y expresión disminuida en procesos de internalización de colesterol, lo cual indica que juegan un papel importante en la homeostasis de lípidos de los macrófagos^{105,106}.

Existe una regulación sobre los receptores asociados a la internalización de LDL que se encuentran en estado nativo y oxidado, principalmente el receptor de oxLDL (LOX1) y el receptor CD36 (SRB3), además de regular un aumento en la expresión de los receptores SRB1 y SBR2 cuando la fuente del tratamiento son oxLDL. Por otra parte, la exposición a nLDL disminuye al menos 8 veces la expresión del receptor de LDL (LDLR) con respecto al control a los tiempos más prolongados de exposición. Esto indica que existe una relación entre la dinámica de internalización que está regulada por el tiempo, tipo y grado de oxidación de las LDL¹⁰⁷. Los datos son consistentes a este respecto a pesar incluso de la conocida variabilidad en el efecto que generan las oxLDL de acuerdo a la literatura y que es normalmente atribuido a la heterogeneidad inherente a la preparación de la muestra.

Las células incubadas con nLDL por más de 5 horas presentan patrones similares a los que tienen las oxLDL en menores tiempos de incubación, lo cual es indicativo de una respuesta común por la oxidación aunque su formación se diferente. No obstante, hay diferencias entre el comportamiento de estos grupos que sugieren que la oxidación con CuSO₄ no representa de forma fiel los procesos que ocurran en los eventos iniciales de formación del ateroma. La oxidación por CuSO₄ ha sido un modelo ampliamente

documentado que ha generado resultados congruentes con los hallazgos clínicos y con modelos animales de la aterosclerosis, por lo que es posible suponer que la oxidación de las LDL por el cultivo nos brinde información útil sobre primeras etapas de la formación de lesiones ateroscleróticas, y complemente los hallazgos obtenidos con LDL oxidadas por CuSO₄, los cuales parecen representar la respuesta ante estímulos crónicos. De ser así, la exposición a oxLDL es un modelo que emula apropiadamente la respuesta celular a las interacciones que las lipoproteínas nativas con un bajo grado de oxidación pueden desencadenar en el metabolismo celular tras una exposición prolongada. Por ello, el presente podría considerarse como un buen modelo sobre las condiciones aterogénicas a las cuales están expuestas las células ante procesos crónicos.

8.3 Validación de los datos del microarreglo por cuantificación de mRNA

En la figura 6 se muestran los genes empleados para validar los resultados de la expresión transcriptómica, todos se relacionan con diferentes funciones que en algunos casos se han descrito previamente en condiciones de estrés oxidante o el desarrollo de la EAC. Los cambios en la expresión fueron determinados por qPCR, y las razones de cambio contrastadas con los valores reportados en el microarreglo. Los genes seleccionados para la validación fueron 8 (5 con regulación a la alta: ABCA1, SPP1, ZNF292, IL33 y CALCRL, así como 3 con regulación a la baja: PRC1, KIF4A and C3).

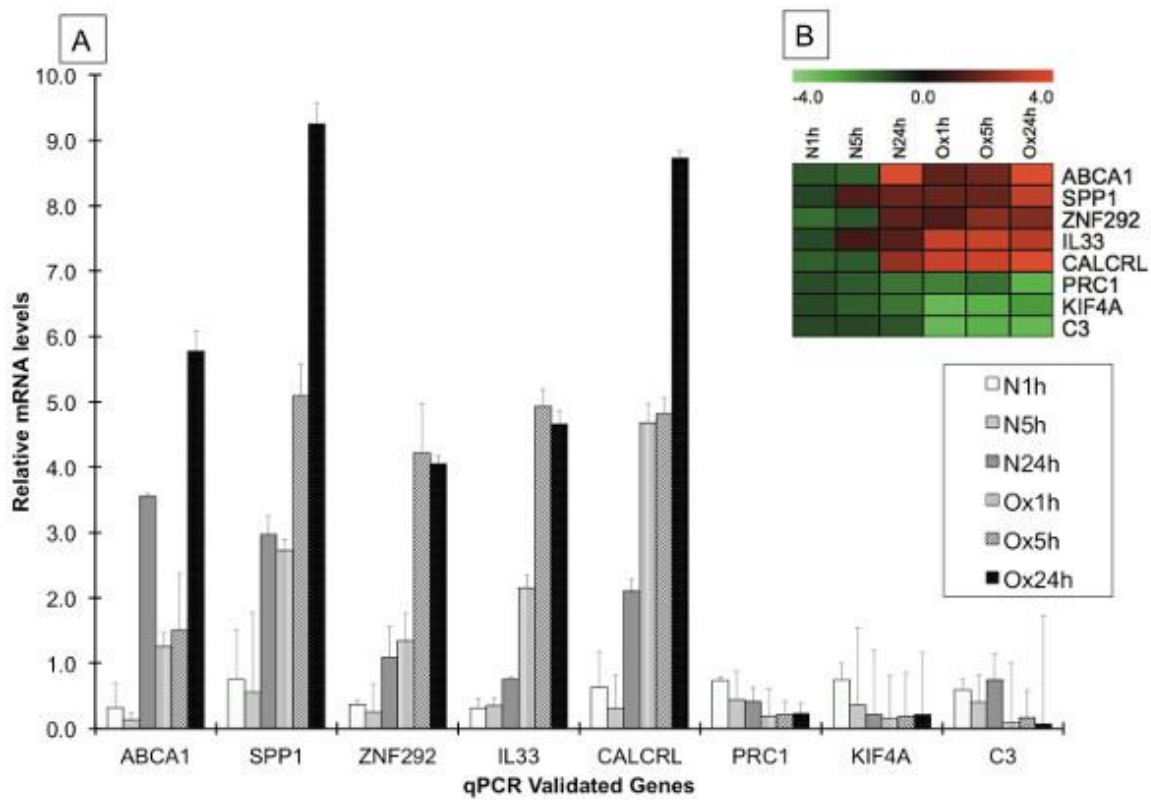


Figura 6. Comprobación por qPCR para validar las cuantificaciones del microarreglo. En el panel A la cuantificación del ARNm por qPCR, en contraste con las expresiones de su cambio con respecto al control analizadas en los ensayos de microarreglos en el panel B.

8.4 Modelo de células hepáticas incubadas con Hipoxantina

La figura 7 muestra la caracterización de la respuesta del cultivo de células HepG2 con una confluencia aproximada del 90%, al ser incubadas con H₂O₂ por una hora, emulando un estímulo agudo de estrés, en donde se observó un aumento en la producción de ERO intracelular con respecto a las células cultivadas en condiciones ideales. El estímulo no generó un cambio significativo en la viabilidad celular hasta concentraciones de 100 μM, ante mayores incrementos en la concentración de H₂O₂ sí disminuye la viabilidad celular, los siguientes ensayos fueron realizados con 80 μM, concentración en la que se obtiene el máximo cambio en ERO sin afectar la viabilidad del cultivo. La incubación con 80 μM de H₂O₂ generó un aumento de aproximadamente 10% en las ERO intracelulares con respecto al control.

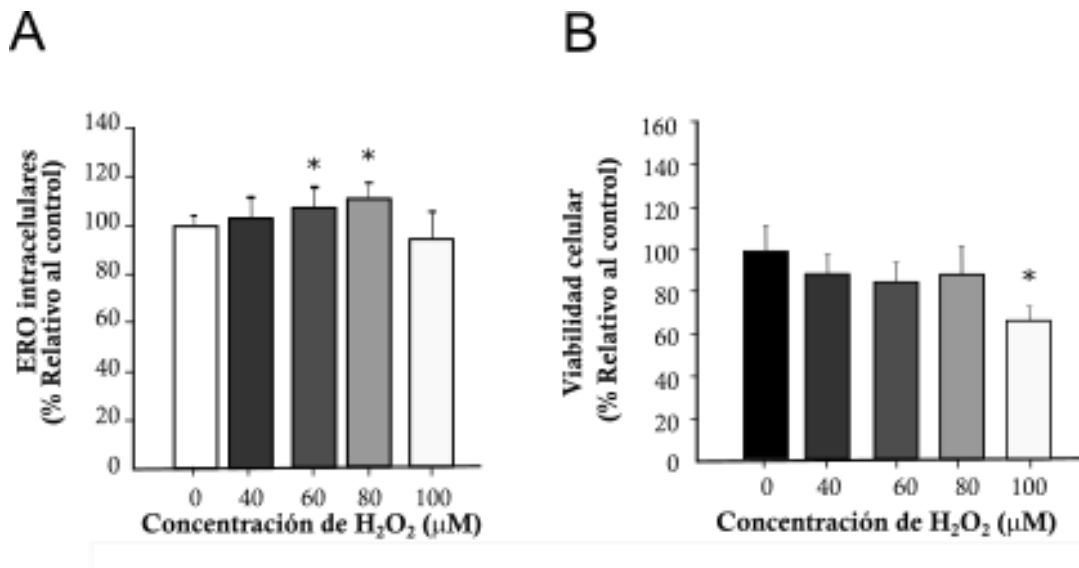


Figura 7. Comparación de ERO intracelular y viabilidad en las células HepG2 estimuladas con H₂O₂. El panel A muestra el incremento de las ERO intracelulares dependiente de concentración de H₂O₂, mientras que el panel B muestra el mantenimiento de la viabilidad celular hasta concentraciones menores a 100 μM, con respecto a células crecidas en condiciones ideales sin estímulo oxidante.

Para identificar si las especies reactivas de oxígeno asociadas a la producción de ácido úrico, a partir de hipoxantina metabolizada por la XO, modifican la expresión proteica se expuso al cultivo a diferentes concentraciones de hipoxantina. En nuestras

condiciones experimentales, y tras el estímulo inicial con H₂O₂, las HepG2 son sembradas para permitirles crecer por 72 horas en presencia de hipoxantina. El estímulo inicial de H₂O₂ promueve un aumento en la concentración de ERO intracelular de 8%, y cuando posteriormente las células proliferaron en medio suplementado con hipoxantina la actividad XO aumentó casi al doble (figura 7A). En este modelo, la actividad XO resultante corresponde aproximadamente a 1.2 mU/g de tejido hepático ya que se tiene la consideración de que un gramo de tejido hepático contiene 120x10⁶ hepatocitos¹⁰⁸. Adicionalmente se determinó la concentración intracelular de hipoxantina la cual no muestra un aumento significativo con respecto al control, por lo que los cambios encontrados en el modelo de estudio deben derivarse de su proceso metabólico (7B). Adicionalmente se observó un aumento en la concentración de ERO que corresponde a las concentraciones de hipoxantina sin que dichas concentraciones afecten la viabilidad de las células (7C y 7D).

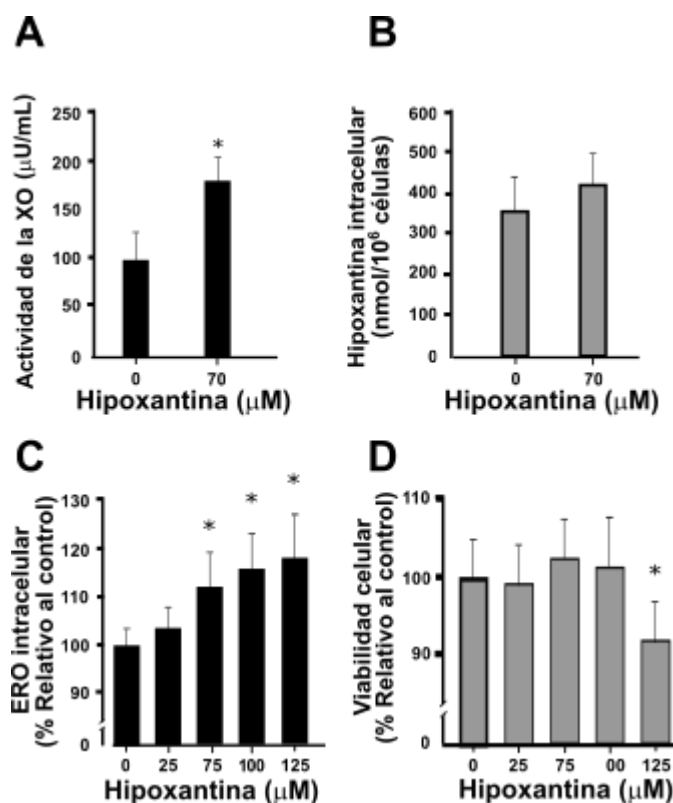


Figura 8. Las células estresadas al ser incubadas en presencia de concentraciones elevadas de hipoxantina aumentan su actividad de XO (panel A), la hipoxantina no se acumula en el interior celular (panel B). En presencia de la hipoxantina hay un aumento de las ERO intracelulares (panel C) sin efecto en la viabilidad celular (panel D).

Para determinar que el aumento de ERO se debe a la transformación metabólica de la hipoxantina por XO se incubó a las células en presencia de alopurinol, un inhibidor competitivo de la XOR. El cultivo confluyente fue incubado por 12 horas en presencia de alopurinol (10 μ M) para permitir su internalización y metabolización para generar oxipurinol, que es la forma activa del compuesto activo. Posteriormente las células se estimularon con H₂O₂, se sembraron e incubaron en presencia de hipoxantina. No se observaron diferencias en los niveles de ERO entre las células sin hipoxantina y aquellas incubadas con alopurinol (Figura 8A). Adicionalmente, se analizó la adición de moléculas antioxidantes al cultivo tales como trolox y metionina, que se ha demostrado en otros casos que protegen a las células del establecimiento del estado de estrés oxidante^{109,110}, logró prevenir la producción de ERO (Figura 8B).

El modelo de estrés oxidante elevado como respuesta del metabolismo de la hipoxantina se empleó para evaluar la expresión de la proteína SRB1 (figura 8C); el análisis de Western Blot con anticuerpos marcados fluorescentemente aumenta la sensibilidad de la detección, bajo estas condiciones se observó una reducción de 42% en la expresión del receptor de membrana SRB1 (Figura 8D).

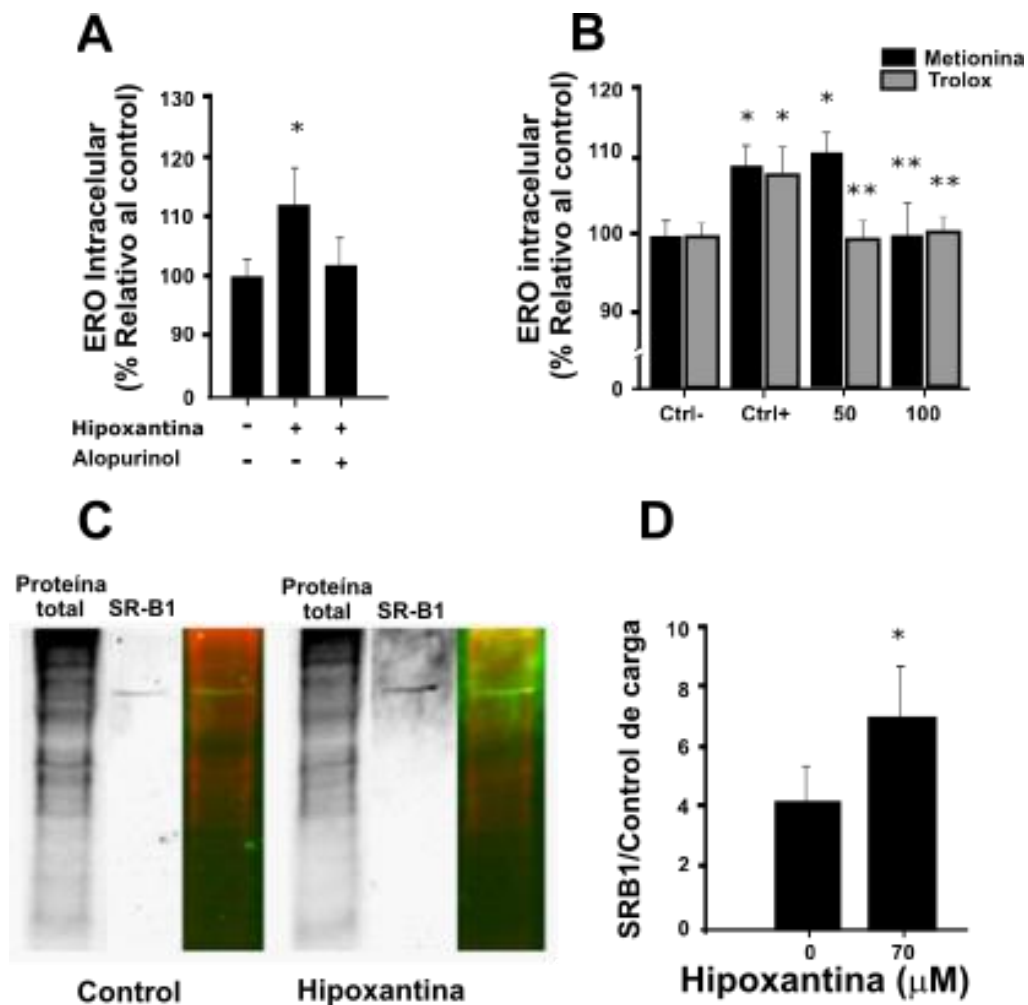


Figura 9. Células HepG2 expuestas a H_2O_2 , cultivadas con hipoxantina y alopurinol $10 \mu M$ tienen menos ERO intracelular con respecto a cultivos que fueron estimulados con H_2O_2 e hipoxantina, y no muestran diferencia con respecto a aquellos que proliferaron sin hipoxantina suplementada al medio (A), asimismo las ERO intracelulares del cultivo en presencia de antioxidantes metionina y trolox no difieren significativamente de aquellas que proliferan en medio sin hipoxantina suplementada (Control-) y son menores a las que presenta el cultivo en presencia de hipoxantina (Control+) (B). El efecto en la expresión del receptor SRB1 se evaluó por inmunodetección en Western Blot (C) y cuantificó por los niveles de fluorescencia relativa a la proteína total (D).

9. DISCUSIÓN

Con respecto al modelo de células vasculares retadas con la presencia de LDL, los datos de nuestros ensayos muestran que existe un patrón de expresión transcriptómica diferencial de acuerdo a la naturaleza de la modificación por oxidación que tengan las lipoproteínas, favoreciendo el entendimiento de la respuesta celular a estímulos oxidantes.

La respuesta transcriptómica ante el estímulo con oxLDL muestra un mayor número de genes como se puede observar en el diagrama de BiNGO, donde la dimensión de los nodos esquematiza la cantidad de genes con cambios significativos asociados al proceso. En su mayoría los genes regulados tienen valores de expresión mayores al control, y este tipo de comportamiento se extiende también a la exposición por 24 horas a nLDL. De acuerdo al patrón de expresión transcriptómica, las células expuestas a oxLDL durante 1 y 5 horas, así como a nLDL a 24 horas, inician una respuesta similar, que además es congruente con un estímulo oxidante. Bajo la consideración de que las LDL en el medio de cultivo no fueron adicionadas concomitantemente con antioxidante alguno y que diversos reportes han planteado que en los experimentos *in vitro* el metabolismo celular genera suficientes ERO para lograr oxidar a las LDL con modificaciones mínimas¹¹¹ es posible considerar que la respuesta corresponde a la oxidación natural de las lipoproteínas. La respuesta celular tras una hora con nLDL y oxLDL muestra una marcada diferencia de acuerdo al agrupamiento jerárquico de los valores de expresión; únicamente tras horas 5 y 24 de exposición a las nLDL el cultivo presenta patrones transcriptómicos similares a los que generan las LDL previamente oxidadas con sulfato de cobre, lo cual sugiere que la respuesta es desencadenada por la oxidación de las lipoproteínas que sólo se genera gradualmente en el cultivo. Es posible que la oxidación natural de las LDL no propicie un aumento de las ERO intracelulares en la misma magnitud que las oxLDL, o bien las especies químicas oxidadas sean diferentes, y sea por ello que dentro de las primeras 5 horas de exposición a nLDL la respuesta sea parecida a la exposición con oxLDL a sólo una hora, mientras que las nLDL

a 24 horas muestran comportamientos similares al mayor tiempo de incubación con oxLDL.

Los genes regulados por las nLDL están involucrados en una mayor cantidad de procesos biológicos según su identificación por algoritmos estadísticos, lo cual sugiere que el objetivo de gran parte de los múltiples genes regulados por oxLDL es redundante y se enfoca en procesos prioritarios: i) aumentar la transcripción de proteínas que favorezcan la adaptación al entorno, ii) proteger al DNA de posibles daños por ERO, iii) controlar el ciclo celular ante este nuevo y hostil medio de cultivo, iv) y la señalización por proteínas morfogenéticas. Con el objetivo de centrarse en procesos con mayor probabilidad de regulación con importancia biológica empleamos los genes con cambios iguales o superiores a 2 FC, que por expresarse en valores logarítmicos corresponde a 4 veces la expresión basal. Sin embargo, la rigidez estadística aún podría limitar nuestra capacidad de detección sobre procesos biológicos relevantes; como hemos mostrado los programas no lograron detectar la regulación sobre procesos inmunes en los genes con cambios superiores al 2FC para oxLDL (figura 1B), mismos que fueron evidentes sólo al analizar el grupo con cambios superiores al 3 FC (figura 2). Esta diferencia en detección de procesos por análisis estadístico advierte que hay procesos que podríamos no identificar; no obstante, los procesos detectados por las diferentes pruebas conducen a una baja probabilidad de obtener falsos positivos.

Uno de los procesos con mayor interés de acuerdo a nuestro análisis estadístico es el ciclo celular, el cual muestra una fuerte regulación debida tanto a las oxLDL como a las nLDL. Como se observa en la figura 4, las nLDL generan un perfil génico que parcialmente favorece la proliferación e impide el arresto celular, lo cual es congruente con otros modelos de estrés oxidante moderado¹¹². Por otra parte, el patrón transcriptómico ante las oxLDL parece predisponer a las células a detener la proliferación, arrestarse y evitar la apoptosis, aunque algunos reportes han descrito la proliferación celular por exposición a oxLDL similares tanto en el tipo de oxidación, como en la concentración empleada y tiempo de exposición del cultivo¹¹³. Probablemente la diferencia radica en que nuestro estudio no determina la

proliferación sino la respuesta transcriptómica que no se refleja inmediatamente en la respuesta fisiológica. Esta diferencia de comportamiento apoya las observaciones de que las oxLDL no son modelos fidedignos de la oxidación fisiológica y sus consecuencias⁵. Nuestros resultados demuestran que la respuesta celular varía drásticamente ante el tipo de oxidación; sin embargo, el uso de las LDL oxidadas *in vitro* ha permitido dar explicación a numerosos procesos observados sobre la aterosclerosis en el humano. Es posible que esta sutil diferencia en el tipo de oxidación genere una respuesta con mayor similitud al comportamiento de células constantemente expuestas a estrés oxidante que son propensas a arrestarse¹¹¹, mientras que las nLDL promueven la proliferación como, ocurre en modelos con incrementos de aproximadamente 20% en las ERO intracelulares¹¹⁴.

El análisis por redes también muestra que diversos genes involucrados en el proceso biológico de la inflamación modificaron significativamente su expresión, lo que indica una regulación activa sobre la inflamación, cuyo desarrollo es de gran importancia en cuanto al contexto fisiológico a partir de la génesis de las estrías grasas hasta etapas avanzadas de la aterosclerosis^{115,116}. La expresión de genes relacionados con la inflamación en las células de músculo liso VSMC, sugiere que podría establecerse un cuadro inflamatorio, o evitarse el mismo, en modelos más complejos que involucren otras células del entorno vascular, o incluso *in vivo*. Los genes que ante el análisis estadístico cobraron mayor importancia tienen la capacidad de orientar a la célula tanto a un proceso inflamatorio como a suprimir tal respuesta. Así, al menos en una exposición fisiológica relativamente breve, las células de músculo liso no tienen una expresión resolutoria para la inflamación, y el efecto neto sobre este proceso podría ser determinado en un modelo más complejo que implique otros linajes celulares presentes en el entorno vascular.

También es necesario considerar que algunas de las moléculas involucradas en la inflamación tienen funciones de gran importancia sobre otros procesos biológicos, como lo son CALCRL y SPP1 que se ha demostrado están íntimamente involucradas en la diferenciación de células osteogénicas. La presencia de células con un fenotipo que

favorece los depósitos de calcio es de gran relevancia en la patología, afectando incluso la sobrevivencia ante un infarto^{117,118}. Se ha descrito que la localización de la calcificación determina el nivel de riesgo cardiovascular, donde la calcificación de la capa fibrosa conduce a una mayor probabilidad de ruptura de la placa¹¹⁹, por lo que prevenir la generación de cristales de hidroxapatita es un factor que puede restringir el desarrollo de la calcificación de vasos, disminuyendo una de las principales complicaciones de la EAC. Estudios recientes de nuestro grupo de investigación han descrito un modelo *in vitro* que permite observar claramente la inhibición de la formación de hidroxapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ como consecuencia de la presencia de SPP1¹²⁰. A diferencia de su papel en la inflamación, la actividad de SPP1 ante la biomineralización es ateroprotectora, aunque en modelos con mayor tiempo de evolución su expresión elevada no es suficiente para atenuar el progreso de la calcificación. Una gran cantidad de dicha proteína ha sido detectada en estudios previos donde empleamos conejos con una dieta rica en colesterol que desarrollan lesiones ateroscleróticas, este modelo animal presenta depósitos de calcio, a pesar de la SPP1 que proviene de la sobresíntesis por parte de las VSMC que responden a estímulos de estrés oxidante como lo son las oxLDL⁶². Adicionalmente en modelos *in vivo* de calcificación en miocardio y aorta se ha observado que el mRNA tanto de adrenomedulina como de CALCRL y RAMP2 aumenta con respecto a los controles, por lo que se ha propuesto que este sistema tiene un papel activo en el proceso de calcificación¹²¹. La presencia tanto de SPP1 y CALCRL indica que la calcificación patológica en vasos no es un proceso arbitrario y sin regulación, sino que responde a la ruptura de un delicado equilibrio como respuesta a múltiples estímulos patológicos. Los resultados del presente trabajo son congruentes con las observaciones de nuestro trabajo previo, además de demostrar que la regulación sobre este proceso es prácticamente inmediata y sensible a niveles de estrés oxidante.

No sólo la expresión de SPP1 y CALCRL indican la posibilidad de que las células de músculo liso favorezcan la biomineralización del tejido vascular, se ha reportado que BMP6 aumenta la expresión de factores de transcripción (Msx) que inducen la desdiferenciación de VSMC¹²². Tal es el caso de la baja expresión de TAGLN y ACTA2, marcadores característicos del fenotipo de las células de músculo liso, la pérdida de

estos genes permite el cambio entre las células de músculo liso a células con una diferenciación poco definida que permita la calcificación patológica de la vasculatura. Estos datos indican que el estrés oxidante de las oxLDL puede generar un fenotipo de baja especificidad en su diferenciación que favorece la calcificación y es por tanto sumamente patológico para el entorno vascular

Asimismo, el análisis estadístico muestra que las células expuestas a las nLDL y oxLDL modifican el control sobre la transcripción de genes, posiblemente en aras de obtener la respuesta metabólica necesaria para confrontar las condiciones impuestas. Uno de los motivos más frecuente entre las proteínas que tienen afinidad por el DNA es el de dedos de zinc clásico o C2H2, y una mayor expresión de algunos miembros de la subfamilia tipo Krüppel (Sp1, YY1, KLF5 y KLF4) se ha relacionado con la pérdida del fenotipo característico de las VSMC^{123,124} como es posible suponer ocurra en exposiciones crónicas a las reportadas en nuestro estudio. A este respecto pudimos detectar también la expresión de BMP6 y CALCRL, que son proteínas asociadas a la disminución en la expresión de marcadores de fenotipo VSMC^{125,126} y que actúan también como factores esenciales en la expresión de proteínas que dirigen la diferenciación hacia osteoclastos. En este estudio detectamos una elevada expresión del gen ZNF292, tanto en los datos del microarreglo como en la comprobación por qPCR, la proteína pertenece a la familia de factores de transcripción C2H2, de la cual no se ha descrito que responda ante estímulos que propicien condiciones de estrés oxidante. Se ha descrito que esta proteína induce la transcripción de la hormona de crecimiento (GH1), y a través del IGF-I favorece una respuesta antioxidante, antiinflamatoria, y la regulación del tono vascular¹²⁷. Además, se ha reportado que la deficiencia de la GH1 aumenta la propensión a desarrollar aterosclerosis, e incluso la administración de la misma con fines terapéuticos disminuye transitoriamente el grosor de las tunicas íntima y media^{128,129}. Aunque difícilmente la ZNF292 ocasionará la síntesis de la hormona del crecimiento en VSMC, podemos considerar en términos generales que su actividad favorece la transcripción de una proteína con potenciales efectos ateroprotectores. Existen pocos reportes que procuren una descripción de la función del factor de transcripción, por lo que es posible que su actividad tenga alcance

sobre otros genes que pudieran ser de relevancia para el contexto cardiovascular. Nuestros datos podrían ayudar a dilucidar la relación de la ZNF292 con otros genes, en posteriores trabajos enfocados sobre este tema. A nuestro conocimiento este trabajo es el primero en identificar la inducción de esta proteína C2H2 como respuesta al estrés oxidante, posiblemente como mecanismo de defensa celular para favorecer la adaptación de la célula al entorno impuesto ya que además es proporcional al tiempo de exposición a oxLDL.

Aunque nuestro modelo de estudio se enfoca a encontrar la importancia de la respuesta temprana de las células ante el estrés oxidante que puede provenir de las nLDL u oxLDL, también es necesario mencionar que la expresión sostenida de algunos de los genes regulados puede modificar drásticamente el desarrollo de la aterosclerosis. Algunos modelos de aterosclerosis han mostrado una disminución en el desarrollo de la placa aterosclerosa al tener una mayor expresión de CALCRL, es posible que esto sea debido principalmente a la acción antioxidante de ADM a través de CALCRL y RAMP2, donde la administración de adrenomedulina en animales *knock out* para apo E, incluso disminuye el crecimiento de los ateromas¹²¹. De modo similar la administración parenteral de IL33 reduce la extensión de las lesiones aterosclerosas en modelos *in vivo* de EAC, lo cual se ha sugerido es debido al cambio de la respuesta proaterogénica Th1 a Th2, posiblemente porque promueve una mayor producción de anticuerpos anti-oxLDL que limitan el desarrollo del ateroma¹³⁰. Adicionalmente se ha reportado que la placa aterosclerosa contiene proteínas del complemento así como sus derivados activos, y algunos de estos factores como el C5a-9 correlacionan con la acumulación de otros componentes en la lesión¹³¹. Estas y otras observaciones han impulsado la idea de que el sistema del complemento está fuertemente relacionado al desarrollo de la lesión ateromatosa, acentuando el daño celular tanto de forma directa, como por la atracción y activación de otras células del sistema inmune. La extensión de las lesiones aterosclerosas inducida por la deficiencia de apo E y una dieta rica en grasa, fue menor en grupos que no expresaban C6¹³², lo cual indica que el equilibrio por el cual el complemento interactúa en el desarrollo de la lesión es fuerte y puede incluso detener el progreso de la patología. Curiosamente el modelo de aterosclerosis combinado con

la ausencia de expresión de CD55, inhibidor de la C3 convertasa, demostró que la activación de C3 acentúa la extensión de la lesión¹³³. Shields y colaboradores han propuesto que si bien las proteínas del complejo C3 y C4 tienen un papel activo, su origen no es necesariamente las células endoteliales puesto que existen depósitos en la adventicia¹³⁴. El presente trabajo indica que una de las posibles contribuciones para la acumulación de estas proteínas en el ateroma es la síntesis por parte de las células de músculo liso, adyacentes al espacio subendotelial y a la adventicia, así como componentes de esta última, lo cual es una evidencia de la importancia de la respuesta celular en capas media y adventicia. Esta información indica que la expresión de algunos genes descritos en el presente trabajo tiene efectos ateroprotectores en modelos crónicos. Aunque el presente estudio no evalúa la respuesta crónica, estos patrones de expresión pueden ser un indicio de que la respuesta ante las nLDL y oxLDL que en tiempos cortos corresponde a una defensa funcional ateroprotectora, aunque *in vivo* y ante la exposición crónica esté relacionada con el progreso de la aterogénesis.

Las fuentes de estrés oxidante celular que puedan modificar a las lipoproteínas por una mayor presencia de ERO que sean permeables a la membrana son diversas. Uno de los principales orígenes de ERO en el organismo es la enzima XO, una isoforma de la XDH que cataliza la conversión de hipoxantina a xantina y finalmente a ácido úrico^{79,135}. Por ello cobra especial interés identificar un modelo de estudio *in vitro* que permita entender los cambios que existen en el metabolismo celular derivadas de la actividad preferente de la isoforma XO.

Condiciones fisiopatológicas como la hipertensión esencial y daño renal severo tratado con diálisis pueden incrementar la actividad XO en plasma de un tercio la actividad XOR plasmática hasta 50%¹³⁶. En modelos murinos la actividad XO hepática es cercana a 10 $\mu\text{U}/\text{mL}$, aunque incrementos de estrés oxidante como modelos de isquemia-reperfusión pueden incrementar establemente aproximadamente 100 veces la actividad normal¹³⁷. De hecho, procesos crónicos como el mismo envejecimiento, aún en condiciones óptimas y controladas, muestran aumentos del triple de la actividad XO^{138,139}. Nuestros resultados muestran que células HepG2 estimuladas con H_2O_2 tienen

actividades XO de aproximadamente 10 U/10⁶ células, que equivale aproximadamente a 1.2 mU/g tejido hepático considerando que en un miligramo de hígado sano hay aproximadamente 10⁶ células¹⁰⁸. De esta forma, el aumento del doble de actividad de XO inducido por la incubación con 60 μM de H₂O₂ e hipoxantina es similar al descrito por procesos crónicos como el envejecimiento, sin llegar a asemejar el aumento drástico ocasionado por intervenciones mayores como los modelos de isquemia-reperfusión. Las células HepG2 son poco sensibles al H₂O₂ como fuente de estrés oxidante¹⁴⁰, y bajo nuestras condiciones de trabajo las células alcanzaron apenas un aumento de 10% de los valores basales de ERO intracelulares, mientras que modelos de condiciones fisiopatológicas como el consumo excesivo de grasas o fructosa generan aumentos en los índices de estrés oxidante de hasta un 50%¹⁴¹. De esta forma, las condiciones generadas en el cultivo celular no están relacionadas con modificaciones excesivas en el metabolismo, sino con condiciones probables dentro del organismo de modo rutinario.

La hipoxantina es capaz de internalizarse en células humanas por transportadores de nucleósidos ENT que son capaces de movilizar metabolitos a favor del gradiente de concentración¹⁴². En el hígado, la internalización de elementos similares a nucleósidos, como la hipoxantina, corresponde a la presencia de ENT1 y ENT2^{143,144}. Nuestros resultados muestran que la hipoxantina suplementada al medio fue metabolizada intracelularmente, generando simultáneamente ERO intracelulares debido a la presencia de XO. Los cambios en estrés oxidante mostraron una relación dependiente de la concentración de hipoxantina en el medio, donde los cambios más drásticos fueron obtenidos desde 50 μM de hipoxantina. Estas concentraciones son cercanas a aquellas encontradas normalmente en plasma, donde se ha reportado que la hipoxantina se encuentra en concentraciones de aproximadamente 25 μM en sujetos sanos. Por otra parte, en desarrollos patológicos puede alcanzar valores cercanos a 35 μM, y aún más en crisis y pacientes con daño renal severo la hipoxantina se eleva hasta 50 μM^{145,146}. La exposición sostenida a concentraciones elevadas, pero asequibles en plasma humano, puede generar cambios significativos que sean similares a lo que se esperaría en pacientes.

Las células hepáticas cultivadas durante 72 horas en un medio con hipoxantina mostraron una mayor actividad XO, más allá del pequeño incremento detectado ante el estímulo inicial de H₂O₂. La actividad XO no solo libera ERO sino que puede provenir del daño oxidante a la XDH, de tal suerte que pequeñas cantidades de ERO son causa y consecuencia de la XO y esto contribuye a su vez a la generación de una mayor actividad de XO. En nuestro estudio encontramos que la exposición a concentraciones elevadas de hipoxantina durante 72 horas de cultivo no generó ningún impacto en el estrés oxidante intracelular cuando la actividad de XO es inferior a 0.05 mU/mL. No obstante al incrementar apenas 10% el estrés oxidante intracelular y el consecuente aumento en la actividad de la XO, la oxidación de la hipoxantina por la XO se convierte en un proceso activo que genera ERO intracelulares debido a la hipoxantina en una forma dosis dependiente.

La actividad XO tiene una estrecha relación con el pronóstico clínico de EAC, tanto directamente como por sus productos de reacción^{147,148}; indicando que uno de los posibles mecanismos involucrados es la generación de estrés oxidante. La generación de estrés oxidante ha mostrado previamente relación con la regulación en la expresión génica¹⁴⁹ y con la expresión proteica¹⁵⁰. De tal suerte, que es de esperar que alteraciones en la cantidad de ERO intracelulares, como las generadas en el presente modelo de estudio, sean capaces de modificar la expresión de algunas proteínas. Aunque el desarrollo de la EAC se ve influenciado por diversas causas, se ha observado que tanto el estrés oxidante y el metabolismo de lípidos juegan papeles cruciales en el desarrollo de la misma. Dentro del metabolismo de lípidos se puede identificar la función de SRB1, una proteína transmembranal que funge como una de las principales salidas de colesterol del torrente sanguíneo, como en las HDL que acumulan en su estructura colesterol de tejidos periféricos^{151,152}. Bajo situaciones metabólicas asociadas a estrés oxidante elevado, el metabolismo de lípidos se altera por medio de la regulación en expresión proteica¹⁵³⁻¹⁵⁵ de modo tal que el balance de lipoproteínas puede verse afectado y alterar así el desarrollo de la aterosclerosis. Bajo exposiciones breves a estímulos pro-oxidantes la cantidad de SRB1 disminuyó por su modificación y consecuente degradación¹⁵⁶; mientras que la inducción de estrés oxidante por factores

químicos, en modelos animales con un par de semanas de tratamiento, mostró un aumento en la expresión del receptor SRB1¹⁵⁷. En comparación, nuestros resultados son generados por estímulos oxidantes similares a los que pueden ser previstos en la fisiología normal, y con metabolitos endógenos a concentraciones fisiopatológicas. Nuestros análisis por Western Blot muestra que el estrés derivado de la actividad de la XO por 3 días conduce a un aumento de 34% en la expresión de SRB1, similar a las observaciones obtenidas en un par de semanas de insulto con cisplatino en modelos animales. Trabajos previos de nuestro grupo de investigación han mostrado que la cantidad y duración de estímulos pro-oxidantes pueden generar cambios opuestos en la expresión celular de una amplia gama de genes¹⁴⁹. De este modo, el aumento que reportamos en el presente trabajo sobre la expresión de SRB1 en células hepáticas, si bien pueda facilitar la salida de colesterol del torrente sanguíneo, podría mostrar una tendencia opuesta ante la exposición prolongada a estas condiciones. No obstante, nuestro diseño experimental nos permite suponer que algunos de los cambios reflejados en el riesgo cardiovascular observado en pacientes con gota e hiperuricemia pueden provenir de los efectos que el metabolismo exacerbado por la xantina oxidasa genere sobre el metabolismo de colesterol, aportando así un nuevo enfoque sobre este marcador del metabolismo que será necesario revisar en modelos fisiológicos más complejos. Asimismo, nuestro trabajo es una de las primeras evidencias sobre la regulación del SR-B1 por niveles de especies reactivas que pueden relacionarse con eventos que se presentan fisiológicamente y que tienen impacto en el metabolismo del colesterol y consecuentemente en la aterosclerosis.

10. CONCLUSIONES

Dentro de los primeros modelos descritos para entender el proceso de la formación de la placa ateromatosa se encuentra la oxidación de las LDL por exposición a CuSO_4 , y durante años fue el modelo por excelencia para comprender los cambios fisicoquímicos de la estructura y en la respuesta de diversas líneas celulares. Algunos grupos de investigación detectaron oxidación en LDL por la exposición a células como macrófagos y endoteliales, y a partir de ellas se registró información congruente con el modelo de oxidación por cobre. No obstante, a la fecha no se había realizado un seguimiento sobre el cambio en la respuesta de las células con LDL que van adquiriendo modificaciones por oxidación debido al metabolismo mismo de las células presentes en el ensayo. Nuestro modelo, aporta ahora información sobre la respuesta de las células cuando su propio metabolismo produce la oxidación de las lipoproteínas y nos permite generar nuevas hipótesis sobre los efectos en la célula y sus posibles implicaciones en el organismo. Un ejemplo claro es que se considera la exposición a las oxLDL como un factor que detona la propagación del desarrollo de la aterosclerosis, principalmente por sus efectos tóxicos hacia células endoteliales y macrófagos; nuestro trabajo demuestra que la capa media compuesta de VSMC tiene una respuesta sumamente rica y versátil en la modificación de los ARNm, esto refuerza la idea de que la EAC es una enfermedad que se resuelve y consolida por la respuesta integral de la íntima, media y adventicia. Aunque una de las principales respuestas de VSMC ante oxLDL fomenta la inflamación, que es uno de los factores más dañinos de la patología y es congruente con las observaciones de numerosos trabajos de otros grupos de investigación, también observamos la modificación de ARNm cuyas proteínas codificadas tienen actividades antiaterogénicas. Aunque ambas respuestas parecen antagónicas, la diferencia pudiese radicar en que la mayoría de las respuestas celulares obtenidas ante la presencia de oxLDL son congruentes con modelos crónicos de placas ateromatosas consolidadas, y las nLDL recién se oxidan en las primeras horas del cultivo, la respuesta celular posiblemente comienza como un mecanismo de defensa funcional que difiere significativamente del desencadenado por las oxLDL. La defensa celular observada implica al control del ciclo celular que puede modificarse dirigiéndose hacia el arresto

o la proliferación de acuerdo al estímulo y posiblemente a su persistencia, así como el control sobre la biomineralización, que influye en la sobrevivencia de la célula y la contención de las complicaciones de consolidar una lesión ateromatosa. Esta información sugiere que la respuesta inicial de las células ante las proaterogénicas oxLDL es una defensa funcional que pretende evitar el desarrollo de las principales complicaciones cardiovasculares; por ello, el verdadero potencial aterogénico puede radicar en la agresión persistente que sobrepasa a la defensa celular.

Si bien la hipótesis del estrés oxidante como factor primordial en el desarrollo de la aterosclerosis contempla a las oxLDL como blanco y fuente de oxidación en el entorno vascular, existen diversos mecanismos que generan estrés oxidante, por ello establecer y caracterizar nuevos modelos que ayuden a conocer las características de la respuesta a diferentes fuentes de oxidación relacionadas con la aterosclerosis es primordial. Debido a que la hiperuricemia es una de las enfermedades relacionadas con un mayor riesgo de desarrollar aterosclerosis, y que la enzima implicada en los últimos pasos de la síntesis de ácido úrico también puede generar ERO, un modelo que considere la actividad de la XO en el marco de la aterosclerosis podrá ser de utilidad al estado del arte. Nuestro trabajo ha establecido las bases de un nuevo modelo del estrés oxidante causado por la enzima endógena XO y estimulado con concentraciones de hipoxantina que se han observado en plasma. Estos datos permiten realizar análisis sencillos de los posibles vínculos que se han descrito entre el ácido úrico, producto de degradación de la hipoxantina por XO, y la EAC que hasta el momento cuentan con un fuerte respaldo estadístico.

Algunas observaciones realizadas con poblaciones con hiperuricemia sin otras complicaciones clínicas nos llevaron a postular que el metabolismo de las lipoproteínas podría verse modificado por medio de la XO, por ello tras la caracterización del modelo se analizó la cantidad del receptor SR-B1 que es un punto crucial en el metabolismo de las lipoproteínas tanto HDL como de la familia apoB incluyendo a las LDL. No existen reportes previos a nuestro conocimiento de una modificación en la expresión del receptor SR-B1 por elevadas concentraciones de ERO y/o ERN, nuestro hallazgo

muestra por primera vez una dependencia de este receptor a las condiciones redox intracelulares. Tal como se observó en el modelo de las células vasculares, concentraciones de ERO y/o ERN superiores a las del grupo control aumentaron la cantidad del SR-B1 en las células hepáticas, lo cual podría significar una mayor salida de las lipoproteínas del torrente sanguíneo, y un menor riesgo de que éstas lleguen al espacio subendotelial donde promuevan el desarrollo del ateroma. Aunque esta respuesta ayudaría a evitar el desarrollo de la lesión, es necesario explorar su desarrollo considerando su interacción en el organismo completo, así como la respuesta que puede presentarse cuando el estímulo sea crónico. La relación entre el estrés oxidante y la concentración de hipoxantina demuestra que alteraciones modestas de los niveles plasmáticos pueden impactar diferencialmente el comportamiento celular y que una elevación importante, aunque relativamente transitoria, en la concentración plasmática de hipoxantina es capaz de modificar un factor determinante en el metabolismo de colesterol y por tanto de la EAC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud. Cardiovascular diseases (CVDs). Published June 11, 2021. Accessed September 1, 2021. [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
2. Mendis S, Puska P NB. *Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control*. (Mendis S, Puska P NB, ed.). World Health Organization; 2011.
3. Moeyra E, Lorenzatti D, Moreyra C, et al. Comparison of risk scores to predict subclinical atherosclerosis. *Medicina (B Aires)*. 2019;79(5):373-383.
4. Suarna C, Dean RT, May J, Stocker R. Human atherosclerotic plaque contains both oxidized lipids and relatively large amounts of alpha-tocopherol and ascorbate. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1995;15(10):1616-1624. doi:10.1161/01.ATV.15.10.1616
5. Levitan I, Volkov S, Subbaiah P V. Oxidized LDL: Diversity, Patterns of Recognition, and Pathophysiology. *Antioxidants and redox Signaling*. 2010;13(1):39-75.
6. Stocker R, Keaney JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological Reviews*. 2004;84(4):1381-1478.
7. Gimbrone MAJ, García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation research*. 2016;118(4):636. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306301
8. Katsuda S, Boyd HC, Ross R, Gown AM. Human Atherosclerosis III. Immunocytochemical Analysis of the Cell Composition of Lesions of Young Adults. *American Journal of Pathology*. 1992;140(4):907-914.
9. Stary H, Chandler A, Glagov S, et al. AHA Medical / Scientific Statement Special Report A Definition of Initial , Fatty Streak , and Intermediate Lesions of Atherosclerosis. *Circulation*. 1994;89(5):2462-2478.
10. Schwenke DC, Carew TE. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. II. Selective retention of LDL vs. selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries. *Arteriosclerosis*. 1989;9(6):908-918. doi:10.1161/01.ATV.9.6.908
11. Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Dashti N. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *Journal of Lipid Research*. 2001;42(9):1346-1367. doi:10.1016/S0022-2275(20)30267-4
12. Rutledge AC, Su Q, Adeli K. Apolipoprotein B100 biogenesis: a complex array of intracellular mechanisms regulating folding, stability, and lipoprotein assembly. *Biochemistry and cell biology Biochimie et biologie cellulaire*. 2010;88(2):251-267. doi:10.1139/o09-168

13. Jiang X, Zhou H. Plasma lipid transfer proteins. *Current opinion in lipidology*. 2006;17(3):302-308. doi:10.1097/01.MOL.0000226124.94757.EE
14. Mitchell D, Zhou M, Pariyarath R, et al. Apoprotein B100 has a prolonged interaction with the translocon during which its lipidation and translocation change from dependence on the microsomal triglyceride transfer protein to independence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(25):14733-14738. doi:10.1073/PNAS.95.25.14733
15. Rava P, Athar H, Johnson C, Hussain M. Transfer of cholesteryl esters and phospholipids as well as net deposition by microsomal triglyceride transfer protein. *Journal of lipid research*. 2005;46(8):1779-1785. doi:10.1194/JLR.D400043-JLR200
16. Pariyarath R, Wang H, Aitchison J, et al. Co-translational interactions of apoprotein B with the ribosome and translocon during lipoprotein assembly or targeting to the proteasome. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(1):541-550. doi:10.1074/JBC.M007944200
17. Ramasamy I. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2014;52(12):1695-1727. doi:10.1515/CCLM-2013-0358
18. Björnson E, Packard C, Adiels M, et al. Apolipoprotein B48 metabolism in chylomicrons and very low-density lipoproteins and its role in triglyceride transport in normo- and hypertriglyceridemic human subjects. *Journal of internal medicine*. 2020;288(4):422-438. doi:10.1111/JOIM.13017
19. Broedl U, Maugeais C, Millar J, et al. Endothelial lipase promotes the catabolism of ApoB-containing lipoproteins. *Circulation research*. 2004;94(12):1554-1561. doi:10.1161/01.RES.0000130657.00222.39
20. Nestel P, Billington T, Tada N, Nugent P, Fidge N. Heterogeneity of very-low-density lipoprotein metabolism in hyperlipidemic subjects. *Metabolism: clinical and experimental*. 1983;32(8):810-817. doi:10.1016/0026-0495(83)90112-9
21. Fruchart JC. Lipoprotein Heterogeneity and its Effect on Apolipoprotein Assays. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 1990;50(s198):51-57. doi:10.1080/00365519009091086
22. Morita S. Metabolism and Modification of Apolipoprotein B-Containing Lipoproteins Involved in Dyslipidemia and Atherosclerosis. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2016;39(1):1-24. doi:10.1248/BPB.B15-00716
23. Khosravi M, Poursaleh A, Ghasempour G, Farhad S, Najafi M. The effects of oxidative stress on the development of atherosclerosis. *Biological chemistry*. 2019;400(6):711-732. doi:10.1515/HSZ-2018-0397

24. Di Pietro N, Formoso G, Pandolfi A. Physiology and pathophysiology of oxLDL uptake by vascular wall cells in atherosclerosis. *Vascular pharmacology*. 2016;84:1-7. doi:10.1016/J.VPH.2016.05.013
25. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76(1):333-337.
26. Steinberg D. Oxidative Modification of LDL and Atherogenesis. *Circulation*. 1997;95:1062-1071.
27. Steinberg D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. *Journal of Lipid Research*. 2009;50 Suppl(Supplement):S376-S381. doi:10.1194/jlr.R800087-JLR200
28. Kühn H, Heydeck D, Hugou I, Gniwotta C. In vivo action of 15-lipoxygenase in early stages of human atherogenesis. *Journal of Clinical Investigation*. 1997;99(5):888-893.
29. Pfanzagl B. LDL oxidized with iron in the presence of homocysteine/cystine at acidic pH has low cytotoxicity despite high lipid peroxidation. *Atherosclerosis*. 2006;187(2):292-300. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.09.024
30. Navab M, Imes SS, Hama SY, et al. Monocyte Transmigration. *The Journal of Clinical Investigation*. 1991;88(16):2039-2046.
31. Vora D, Fang Z, Liva S, et al. Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins. Separate effects on synthesis and surface expression. *Circulation research*. 1997;80(6):810-818. doi:10.1161/01.RES.80.6.810
32. Brand K, Page S, Rogler G, et al. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *The Journal of clinical investigation*. 1996;97(7):1715-1722. doi:10.1172/JCI118598
33. Schlondorff D. Cellular mechanisms of lipid injury in the glomerulus. *American journal of kidney diseases*. 1993;22(1):72-82. doi:10.1016/S0272-6386(12)70171-3
34. Rader D, Hovingh G. HDL and cardiovascular disease. *Lancet (London, England)*. 2014;384(9943):618-625. doi:10.1016/S0140-6736(14)61217-4
35. Desrumaux C, Deckert V, Lemaire-Ewing S, et al. Plasma phospholipid transfer protein deficiency in mice is associated with a reduced thrombotic response to acute intravascular oxidative stress. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(12):2452-2457. doi:10.1161/ATVBAHA.110.207654
36. Stein O, Stein Y. Lipid transfer proteins (LTP) and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2005;178(2):217-230. doi:10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2004.10.008

37. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, et al. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease : Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet*. 1996;347(9004):781-786.
38. Sundell CL, Somers PK, Meng CQ, et al. AGI-1067: a multifunctional phenolic antioxidant, lipid modulator, anti-inflammatory and antiatherosclerotic agent. *The journal of Pharmacology and experimental therapeutics*. 2003;305(3):1116-1123. doi:10.1124/jpet.102.048132.within
39. Hansen-Hagge TE, Baumeister E, Bauer T, et al. Transmission of oxLDL-derived lipid peroxide radicals into membranes of vascular cells is the main inducer of oxLDL-mediated oxidative stress. *Atherosclerosis*. 2008;197(2):602-611. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.08.029
40. Marinho H, Real C, Cyrne L, Soares H, Antunes F. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox biology*. 2014;2(1):535-562. doi:10.1016/J.REDOX.2014.02.006
41. Weidenfeld-Baranboim K, Bitton-Worms K, Aronheim A. TRE-dependent transcription activation by JDP2-CHOP10 association. *Nucleic acids research*. 2008;36(11):3608-3619. doi:10.1093/NAR/GKN268
42. Mazière C, Djavaheri-Mergny M, Frey-Fressart V, Delattre J, Mazière J. Copper and cell-oxidized low-density lipoprotein induces activator protein 1 in fibroblasts, endothelial and smooth muscle cells. *FEBS letters*. 1997;409(3):351-356. doi:10.1016/S0014-5793(97)00545-0
43. Mazière C, Mazière JC. Activation of transcription factors and gene expression by oxidized low-density lipoprotein. *Free radical biology & medicine*. 2009;46(2):127-137. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.024
44. Bowie A, Neill LAJO. Oxidative Stress and Nuclear Factor- B Activation. 2000;59(99):13-23.
45. Natarajan R, Reddy M, Malik K, Fatima S, Khan B. Signaling mechanisms of nuclear factor-kappab-mediated activation of inflammatory genes by 13-hydroperoxyoctadecadienoic acid in cultured vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2001;21(9):1408-1413. doi:10.1161/HQ0901.095278
46. Li L, He S, Sun J, Davie J. Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 2004;82(4):460-471. doi:10.1139/O04-045
47. Cui M, Penn M, Chisolm G. Native and oxidized low density lipoprotein induction of tissue factor gene expression in smooth muscle cells is mediated by both Egr-1 and Sp1. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(46):32795-32802. doi:10.1074/JBC.274.46.32795

48. Nolte R, Wisely G, Westin S, et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*. 1998;395(6698):137-143. doi:10.1038/25931
49. Togashi M, Borngraeber S, Sandler B, Fletterick R, Webb P, Baxter J. Conformational adaptation of nuclear receptor ligand binding domains to agonists: potential for novel approaches to ligand design. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2005;93(2-5):127-137. doi:10.1016/J.JSBMB.2005.01.004
50. Keller H, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi A, Ozato K, Wahli W. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(6):2160-2164. doi:10.1073/PNAS.90.6.2160
51. Palmer C, Hsu M, Griffin H, Johnson E. Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(27):16114-16121. doi:10.1074/JBC.270.27.16114
52. Juge-Aubry C, Pernin A, Favez T, et al. DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(40):25252-25259. doi:10.1074/JBC.272.40.25252
53. Delerive P, Furman C, Teissier E, Fruchart J, Duriez P, Staels B. Oxidized phospholipids activate PPARalpha in a phospholipase A2-dependent manner. *FEBS letters*. 2000;471(1):34-38. doi:10.1016/S0014-5793(00)01364-8
54. Taketa K, Matsumura T, Yano M, et al. Oxidized low density lipoprotein activates peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) and PPARgamma through MAPK-dependent COX-2 expression in macrophages. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(15):9852-9862. doi:10.1074/JBC.M703318200
55. Steinbrecher UP, Zhang H, Lougheed M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free radical biology & medicine*. 1990;9(2):155-168.
56. Manzano-León N, Mas-Oliva J, Sevilla-Tapia L, et al. Particulate matter promotes in vitro receptor-recognizable low-density lipoprotein oxidation and dysfunction of lipid receptors. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 2013;27(1):69-76. doi:10.1002/jbt.21452
57. Radhika A, Jacob SS, Sudhakaran PR. Influence of oxidatively modified LDL on monocyte-macrophage differentiation. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2007;305(1-2):133-143. doi:10.1007/s11010-007-9536-0
58. Bekkering S, Quintin J, Joosten LAB, van der Meer JWM, Netea MG, Riksen NP. Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and

- foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34(8):1731-1738. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303887
59. Huang H, Koelle P, Fendler M, et al. Induction of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by oxLDL inhibits macrophage derived foam cell migration. *Atherosclerosis*. 2014;235(1):213-222. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.04.020
 60. Huang H, Koelle P, Fendler M, et al. Niacin Reverses Migratory Macrophage Foam Cell Arrest Mediated by oxLDL In Vitro. *PLoS ONE*. 2014;9(12):e114643. doi:10.1371/journal.pone.0114643
 61. Weigert A, von Knethen A, Fuhrmann D, Dehne N, Brüne B. Redox-signals and macrophage biology. *Molecular aspects of medicine*. 2018;63:70-87. doi:10.1016/J.MAM.2018.01.003
 62. Jimenez-Corona a E, Damian-Zamacona S, Perez-Torres A, Moreno A, Mas-Oliva J. Osteopontin upregulation in atherogenesis is associated with cellular oxidative stress triggered by the activation of scavenger receptors. *Archives of Medical Research*. 2012;43(2):102-111. doi:10.1016/j.arcmed.2012.03.001
 63. Liu J, Ren Y, Kang L, Zhang L. Oxidized low-density lipoprotein increases the proliferation and migration of human coronary artery smooth muscle cells through the upregulation of osteopontin. *International Journal of Molecular Medicine*. 2014;33(5):1341-1347. doi:10.3892/ijmm.2014.1681
 64. Kim Y, Ryu H, Choi J, et al. Hypoxanthine causes endothelial dysfunction through oxidative stress-induced apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2017;482(4):821-827. doi:10.1016/J.BBRC.2016.11.119
 65. Stoyanova E, Tesch A, Armstrong V, Wieland E. Enzymatically degraded low density lipoproteins are more potent inducers of egr-1 mRNA than oxidized or native low density lipoproteins. *Clinical biochemistry*. 2001;34(6):483-490. doi:10.1016/S0009-9120(01)00258-2
 66. Buettner GR. The Pecking order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, α -Tocopherol, and Ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993;300(2):535-543.
 67. Martínez-Quintana E, Tugores A, Rodríguez-González F. Serum uric acid levels and cardiovascular disease: the Gordian knot. *Journal of Thoracic Disease*. 2016;8(11):1462-1466. doi:10.21037/jtd.2016.11.39
 68. Fang J, Alderman MH. Serum uric acid and cardiovascular Mortality the NHANES I epidemiologic follow-up study, 1971-1992. National Helth and Nutrition Examination Survey. *Jama*. 2000;283(5):2404. doi:10.1001/jama.283.18.2404

69. Culleton B, Larson M, Kannel W, Levy D. Serum uric acid and risk for cardiovascular disease and death: the Framingham Heart Study. *Annals of internal medicine*. 1999;131(1):7-13. doi:10.7326/0003-4819-131-1-199907060-00003
70. Lippi G, Montagnana M, Franchini M, Favaloro EJ, Targher G. The paradoxical relationship between serum uric acid and cardiovascular disease. *Clinica chimica acta*. 2008;392(1-2):1-7. doi:10.1016/j.cca.2008.02.024
71. Madsen TE, Muhlestein JB, Carlquist JF, et al. Serum uric acid independently predicts mortality in patients with significant, angiographically defined coronary disease. *American journal of nephrology*. 2005;25(1):45-49. doi:10.1159/000084085
72. Wang R, Song Y, Yan Y, Ding Z. Elevated serum uric acid and risk of cardiovascular or all-cause mortality in people with suspected or definite coronary artery disease: A meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2016;254:193-199. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.10.006
73. Silbernagel G, Hoffmann MM, Grammer TB, Boehm BO, März W. Uric acid is predictive of cardiovascular mortality and sudden cardiac death in subjects referred for coronary angiography. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2013;23(1):46-52. doi:10.1016/j.numecd.2011.02.008
74. Rodrigues TC, Maahs DM, Johnson RJ, et al. Serum uric acid predicts progression of subclinical coronary atherosclerosis in individuals without renal disease. *Diabetes Care*. 2010;33(11):2471-2473. doi:10.2337/dc10-1007
75. Ndrepepa G, Braun S, King L, et al. Uric acid and prognosis in angiography-proven coronary artery disease. *European Journal of Clinical Investigation*. 2013;43(3):256-266. doi:10.1111/eci.12039
76. Krishnan E, Pandya BJ, Chung L, Dabbous O. Hyperuricemia and the risk for subclinical coronary atherosclerosis - data from a prospective observational cohort study. *Arthritis research & therapy*. 2011;13(2):R66. doi:10.1186/ar3322
77. Hong Q, Qi K, Feng Z, et al. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction via mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger-mediated mitochondrial calcium overload. *Cell calcium*. 2012;51(5):402-410. doi:10.1016/j.ceca.2012.01.003
78. Meléndez-Ramírez G, Pérez-Méndez O, López-Osorio C, Kuri-Alfaro J, Espinola-Zavaleta N. Effect of the Treatment with Allopurinol on the Endothelial Function in Patients with Hyperuricemia. *Enocrine Research*. 2012;7(2):1-6. doi:10.3109/07435800.2011.566235
79. Hassoun P, Yu F, Shedd A, et al. Regulation of endothelial cell xanthine dehydrogenase xanthine oxidase gene expression by oxygen tension xanthine oxidase gene expression by oxygen tension. *American Journal of physiology- Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1994;266:L163-L171.

80. Hille R, Nishino T. Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB Journal*. 1995;9(11):995-1003.
81. Wakabayashi Y, Fujita H, Morita I, Kawaguchi H, Murota S. Conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in bovine carotid artery endothelial cells induced by activated neutrophils: involvement of adhesion molecules. *Biochimica et biophysica acta*. 1995;1265(2-3):103-109.
82. Maruhashi T, Hisatome I, Kihara Y, Higashi Y. Hyperuricemia and endothelial function: From molecular background to clinical perspectives. *Atherosclerosis*. 2018;278:226-231. doi:10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2018.10.007
83. Hartney T, Birari R, Venkataraman S, et al. Xanthine oxidase-derived ROS upregulate Egr-1 via ERK1/2 in PA smooth muscle cells; model to test impact of extracellular ROS in chronic hypoxia. *PLoS ONE*. 2011;6(11):e27531. doi:10.1371/journal.pone.0027531
84. Schröder K, Vecchione C, Jung O, et al. Xanthine oxidase inhibitor tungsten prevents the development of atherosclerosis in ApoE knockout mice fed a Western-type diet. *Free Radical Biology & Medicine*. 2006;41(9):1353-1360. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.03.026
85. Nomura J, Busso N, Ives A, et al. Xanthine oxidase inhibition by febuxostat attenuates experimental atherosclerosis in mice. *Scientific reports*. 2014;4:4554. doi:10.1038/srep04554
86. Kachadourian R, Pugazhenti S, Velmurugan K, et al. 2',5'-Dihydroxychalcone-induced glutathione is mediated by oxidative stress and kinase signaling pathways. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011;51(6):1146-1154. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.041
87. Diamantino TC, Almeida E, Soares a M, Guilhermino L. Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* straus. *Chemosphere*. 2001;45(4-5):553-560.
88. Toledo-Ibelle P, Franco M, Carreón-Torres E, et al. Normal HDL-apolipoprotein AI turnover and cholesterol enrichment of HDL subclasses in New Zealand rabbits with partial nephrectomy. *Metabolism: clinical and experimental*. 2013;62(4):492-498. doi:10.1016/j.metabol.2012.09.010
89. Hagner-McWhirter Å, Laurin Y, Larsson A, Bjerneld E, Rönn O. Cy5 total protein normalization in Western blot analysis. *Analytical Biochemistry*. 2015;486:54-61. doi:10.1016/j.ab.2015.06.017
90. Maere S, Heymans K, Kuiper M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2005;21(16):3448-3449. doi:10.1093/bioinformatics/bti551

91. Smoot M, Ono K, Ruscheinski J, Wang P, Ideker T. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics*. 2011;27(3):431-432. doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTQ675
92. Tabas-Madrid D, Nogales-Cadenas R, Pascual-Montano A. GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic acids research*. 2012;40(Web Server issue):478-483. doi:10.1093/NAR/GKS402
93. Carmona-Saez P, Chagoyen M, Tirado F, Carazo J, Pascual-Montano A. GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome biology*. 2007;8(1). doi:10.1186/GB-2007-8-1-R3
94. Nogales-Cadenas R, Carmona-Saez P, Vazquez M, et al. GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic acids research*. 2009;37(Web Server issue):W317-W322. doi:10.1093/NAR/GKP416
95. de Hoon M, Imoto S, Nolan J, Miyano S. Open source clustering software. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2004;20(9):1453-1454. doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTH078
96. Tchivilev I, Madamanchi N, Vendrov A, Niu X, Runge M. Identification of a protective role for protein phosphatase 1c γ 1 against oxidative stress-induced vascular smooth muscle cell apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(32):22193-22205. doi:10.1074/JBC.M803452200
97. Portal M, Ferrero G, Caputto B. N-Terminal c-Fos tyrosine phosphorylation regulates c-Fos/ER association and c-Fos-dependent phospholipid synthesis activation. *Oncogene*. 2007;26(24):3551-3558. doi:10.1038/SJ.ONC.1210137
98. Pezuk J, Brassesco M, Morales A, et al. Inhibition of polo-like kinase 1 induces cell cycle arrest and sensitizes glioblastoma cells to ionizing radiation. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*. 2013;28(7):516-522. doi:10.1089/CBR.2012.1415
99. Blackwood E, Lüscher B, Kretzner L, Eisenman R. The Myc:Max protein complex and cell growth regulation. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 1991;56:109-117. doi:10.1101/SQB.1991.056.01.015
100. Xu J, Testa J. DLX5 (distal-less homeobox 5) promotes tumor cell proliferation by transcriptionally regulating MYC. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(31):20593-20601. doi:10.1074/JBC.M109.021477
101. Gartel A, Shchors K. Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. *Experimental cell research*. 2003;283(1):17-21. doi:10.1016/S0014-4827(02)00020-4
102. Kular L, Pakradouni J, Kitabgi P, Laurent M, Martinerie C. The CCN family: a new class of inflammation modulators? *Biochimie*. 2011;93(3):377-388. doi:10.1016/J.BIOCHI.2010.11.010

103. Doherty G, McMahon H. Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry*. 2009;78:857-902. doi:10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.78.081307.110540
104. Gerthoffer W. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. *Circulation research*. 2007;100(5):607-621. doi:10.1161/01.RES.0000258492.96097.47
105. Piehler A, Kaminski W, Wenzel J, Langmann T, Schmitz G. Molecular structure of a novel cholesterol-responsive A subclass ABC transporter, ABCA9. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;295(2):408-416. doi:10.1016/S0006-291X(02)00659-9
106. Schumacher T, Benndorf R. ABC Transport Proteins in Cardiovascular Disease-A Brief Summary. *Molecules*. 2017;22(4):589. doi:10.3390/MOLECULES22040589
107. Gerry A, Satchell L, Leake D. A novel method for production of lipid hydroperoxide- or oxysterol-rich low-density lipoprotein. *Atherosclerosis*. 2008;197(2):579-587. doi:10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2007.08.026
108. Naritomi Y, Terashita S, Kagayama A, Sugiyama Y. Utility of hepatocytes in predicting drug metabolism: comparison of hepatic clearance in rats and humans in vivo and in vitro. *Drug Metabolism and Disposition*. 2003;31(5):580-588.
109. Castellano R, Perruchot MH, Tesseraud S, et al. Methionine and cysteine deficiencies altered proliferation rate and time-course differentiation of porcine preadipose cells. *Amino Acids*. Published online 2016:1-12. doi:10.1007/s00726-016-2369-y
110. Vorobjeva N, Pinegin B. Effects of the antioxidants Trolox, Tiron and Tempol on neutrophil extracellular trap formation. *Immunobiology*. 2016;221(2):208-219. doi:10.1016/J.IMBIO.2015.09.005
111. Arai H. Oxidative modification of lipoproteins. *Sub-cellular biochemistry*. 2014;77:103-114. doi:10.1007/978-94-007-7920-4_9
112. Roy D, Cai Q, Felty Q, Narayan S. Estrogen-induced generation of reactive oxygen and nitrogen species, gene damage, and estrogen-dependent cancers. *Journal of toxicology and environmental health Part B, Critical reviews*. 2007;10(4):235-257. doi:10.1080/15287390600974924
113. Chatterjee S. Role of oxidized human plasma low density lipoproteins in atherosclerosis: effects on smooth muscle cell proliferation. *Molecular and cellular biochemistry*. 1992;111(1-2):143-147. doi:10.1007/BF00229586
114. Mesquita F, Dyer S, Heinrich D, Bulun S, Marsh E, Nowak R. Reactive oxygen species mediate mitogenic growth factor signaling pathways in human leiomyoma smooth muscle cells. *Biology of reproduction*. 2010;82(2):341-351. doi:10.1095/BIOLREPROD.108.075887

115. Ross R. Atherosclerosis- An inflammatory Disease. *The New England journal of medicine*. 1999;340(2):115-126.
116. Galkina E, Ley K. Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis. *Annual review of immunology*. 2009;27:197. doi:10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.021908.132620
117. Libby P. Current Concepts of the Pathogenesis of the Acute Coronary Syndromes. *Circulation*. 2001;104(3):365-372. doi:10.1161/01.CIR.104.3.365
118. Kinlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease. *Current opinion in lipidology*. 2001;12(4):383-389.
119. Li Z, Howarth S, Tang T, Graves M, U-King-Im J, Gillard J. Does calcium deposition play a role in the stability of atheroma? Location may be the key. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)*. 2007;24(5):452-459. doi:10.1159/000108436
120. Jimenez-Corona A, Perez-Torres A, Mas-Oliva J, Moreno A. Effect of Osteopontin, Chondroitin Sulfates (B, C), and Human Serum Albumin on the Crystallization Behavior of Hydroxyapatite in Agarose and Silica Hydrogels. *Crystal Growth and Design*. 2008;8(4):1335-1339.
121. Pan CS, Zhang J, Yu F, et al. Adrenomedullin ameliorates the development of atherosclerosis in apoE^{-/-} mice. *Peptides*. 2010;31(6):1150-1158. doi:10.1016/j.peptides.2010.03.005
122. Hayashi K, Nakamura S, Nishida W, Sobue K. Bone morphogenetic protein-induced MSX1 and MSX2 inhibit myocardin-dependent smooth muscle gene transcription. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(24):9456-9470. doi:10.1128/MCB.00759-06
123. Kawai-Kowase K, Owens GK. Multiple repressor pathways contribute to phenotypic switching of vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology Cell physiology*. 2007;292(1):C59-C69. doi:10.1152/ajpcell.00394.2006
124. Santiago F, Lowe H, Bobryshev Y, Khachigian L. Induction of the transcriptional repressor Yin Yang-1 by vascular cell injury. Autocrine/paracrine role of endogenous fibroblast growth factor-2. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(44):41143-41149. doi:10.1074/JBC.M104913200
125. Granholm S, Lundberg P, Lerner UH. Expression of the calcitonin receptor, calcitonin receptor-like receptor, and receptor activity modifying proteins during osteoclast differentiation. *Journal of cellular biochemistry*. 2008;104(3):920-933. doi:10.1002/jcb.21674
126. Hayashi K, Nakamura S, Nishida W, Sobue K. Bone morphogenetic protein-induced MSX1 and MSX2 inhibit myocardin-dependent smooth muscle gene transcription. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(24):9456-9470. doi:10.1128/MCB.00759-06

127. Titterington J, Sukhanov S, Higashi Y, Vaughn C, Bowers C, Delafontaine P. Growth hormone-releasing peptide-2 suppresses vascular oxidative stress in ApoE^{-/-} mice but does not reduce atherosclerosis. *Endocrinology*. 2009;150(12):5478-5487. doi:10.1210/EN.2009-0283
128. Bosevski M, Tosev S, Sadikario S. Premature atherosclerosis in patients with growth hormone deficiency and diabetes mellitus. *Bratislavské lekarske listy*. 2008;109(6):279-280.
129. Araujo VP, Aguiar-Oliveira MH, Oliveira JLM, et al. Arrest of atherosclerosis progression after interruption of GH replacement in adults with congenital isolated GH deficiency. *European Journal of Endocrinology*. 2012;166(6):977-982. doi:10.1530/EJE-12-0062
130. Miller A, Xu D, Asquith D, et al. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(2):339-346. doi:10.1084/JEM.20071868
131. Oksjoki R, Kovanen P, Meri S, Pentikainen M. Function and regulation of the complement system in cardiovascular diseases. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2007;12(12):4696-4708. doi:10.2741/2419
132. Lewis R, Jackson C, Morgan B, Hughes T. The membrane attack complex of complement drives the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Molecular immunology*. 2010;47(5):1098-1105. doi:10.1016/J.MOLIMM.2009.10.035
133. Lewis R, Perry M, Guschina I, Jackson C, Morgan B, Hughes T. CD55 deficiency protects against atherosclerosis in ApoE-deficient mice via C3a modulation of lipid metabolism. *The American journal of pathology*. 2011;179(4):1601-1607. doi:10.1016/J.AJP.2011.06.015
134. Shields K, Stolz D, Watkins S, Ahearn J. Complement proteins C3 and C4 bind to collagen and elastin in the vascular wall: a potential role in vascular stiffness and atherosclerosis. *Clinical and translational science*. 2011;4(3):146-152. doi:10.1111/J.1752-8062.2011.00304.X
135. Okamoto K, Kusano T, Nishino T. Chemical nature and reaction mechanisms of the molybdenum cofactor of xanthine oxidoreductase. *Current pharmaceutical design*. 2013;19(14):2606-2614. doi:10.2174/1381612811319140010
136. Boban M, Kocic G, Radenkovic S, et al. Circulating purine compounds, uric acid, and xanthine oxidase/dehydrogenase relationship in essential hypertension and end stage renal disease. *Renal failure*. 2014;36(4):613-618. doi:10.3109/0886022X.2014.882240
137. Weinbroum A, Nielsen VG, Tan S, et al. Liver ischemia-reperfusion increases pulmonary permeability in rat: role of circulating xanthine oxidase. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1995;268(6):G988-G996.

138. Aranda R, Doménech E, Rus AD, et al. Age-related increase in xanthine oxidase activity in human plasma and rat tissues. *Free radical research*. 2007;41(11):1195-1200. doi:782740962 [pii] 10.1080/10715760701481461
139. Vida C, Rodríguez-Terés S, Heras V, Corpas I, De La Fuente M, González E. The aged-related increase in xanthine oxidase expression and activity in several tissues from mice is not shown in long-lived animals. *Biogerontology*. 2011;12(6):551-564. doi:10.1007/s10522-011-9351-6
140. Navarro M, Amigo-Benavent M, Mesias M, et al. An aqueous pomegranate seed extract ameliorates oxidative stress of human hepatoma HepG2 cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014;94(8):1622-1627. doi:10.1002/jsfa.6469
141. Maithili Karpaga Selvi N, Sridhar MG, Swaminathan RP, Sripradha R. Curcumin attenuates oxidative stress and activation of redox-sensitive kinases in high fructose- and high-fat-fed male wistar rats. *Scientia Pharmaceutica*. 2015;83(1):159-175. doi:10.3797/scipharm.1408-16
142. Robillard KR, Bone DBJ, Hammond JR. Hypoxanthine uptake and release by equilibrative nucleoside transporter 2 (ENT2) of rat microvascular endothelial cells. *Microvascular research*. 2008;75(3):351-357. doi:10.1016/j.mvr.2007.10.002
143. Shimada T, Nakanishi T, Tajima H, et al. Saturable Hepatic Extraction of Gemcitabine Involves Biphasic Uptake Mediated by Nucleoside Transporters Equilibrative Nucleoside Transporter 1 and 2. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;104(9):3162-3169. doi:10.1002/jps.24498
144. Zimmerman M, Kam I, Eltzhig H, Grenz A. Biologic implications of extracellular adenosine in hepatic ischemia and reperfusion injury. *American Journal of Transplantation*. 2013;13(10):2524-2529. doi:10.1111/ajt.12398
145. Felici C, Ciari I, Terzuoli L, et al. Purine catabolism in advanced carotid artery plaque. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*. 2006;25(9-11):1291-1294. doi:10.1080/15257770600890772
146. Caussé E, Pradelles A, Dirat B, Negre-Salvayre A, Salvayre R, Couderc F. Simultaneous determination of allantoin, hypoxanthine, xanthine, and uric acid in serum/plasma by CE. *Electrophoresis*. 2007;28(3):381-387. doi:10.1002/elps.200600205
147. Gondouin B, Jourde-Chiche N, Sallee M, et al. Plasma Xanthine Oxidase Activity Is Predictive of Cardiovascular Disease in Patients with Chronic Kidney Disease, Independently of Uric Acid Levels. *Nephron*. 2015;131(3):167-174. doi:10.1159/000441091
148. Mangge H, Zelzer S, Puerstner P, et al. Uric acid best predicts metabolically unhealthy obesity with increased cardiovascular risk in youth and adults. *Obesity (Silver Spring, Md)*. 2013;21(1):E71-77. doi:10.1002/oby.20061

149. Damián-Zamacona S, Toledo-Ibelles P, Ibarra-Abundis M, et al. Early Transcriptomic Response to LDL and oxLDL in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *PloS one*. 2016;11(10). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0163924
150. Pecorelli A, Belmonte G, Meloni I, et al. Alteration of serum lipid profile, SRB1 loss, and impaired Nrf2 activation in CDKL5 disorder. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015;86:156-165. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.010
151. Silver DL, Wang N, Xiao X, Tall a R. High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(27):25287-25293. doi:10.1074/jbc.M101726200
152. Tang SL, Chen WJ, Yin K, et al. PAPP-A negatively regulates ABCA1, ABCG1 and SR-B1 expression by inhibiting LXR α through the IGF-I-mediated signaling pathway. *Atherosclerosis*. 2012;222(2):344-354. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.03.005
153. Hauck AK, Bernlohr DA. Oxidative stress and lipotoxicity. *Journal of Lipid Research*. 2016;57(11):1976-1986. doi:10.1194/jlr.R066597
154. Leoni V, Nury T, Vejux A, et al. Mitochondrial dysfunctions in 7-ketocholesterol-treated 158N oligodendrocytes without or with α -tocopherol: Impacts on the cellular profil of tricarboxylic cycle-associated organic acids, long chain saturated and unsaturated fatty acids, oxysterols, chole. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2017;169:96-110. doi:10.1016/J.JSBMB.2016.03.029
155. Cao R, Zhao X, Li S, et al. Hypoxia Induces Dysregulation of Lipid Metabolism in HepG2 Cells via Activation of HIF-2a. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2014;34(5):1427-1441. doi:10.1159/000366348
156. Sticozzi C, Belmonte G, Cervellati F, et al. Resveratrol protects SR-B1 levels in keratinocytes exposed to cigarette smoke. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014;69:50-57. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.01.007
157. Li D, Chen Y, Qi L, Ju X, Liu H, Wang G. Differentially expressed genes in cisplatin-induced premature ovarian failure in rats. *Animal Reproduction Science*. 2013;137(3-4):205-213. doi:10.1016/j.anireprosci.2012.11.011

ANEXO I

PUBLICACIONES DERIVADAS DEL PROYECTO

RESEARCH ARTICLE

Early Transcriptomic Response to LDL and oxLDL in Human Vascular Smooth Muscle Cells

Salvador Damián-Zamacona¹, Paola Toledo-Ibelle¹, Mabel Z. Ibarra-Abundis², Laura Uribe-Figueroa^{2*}, Enrique Hernández-Lemus², Karla Paola Macedo-Alcibia², Blanca Delgado-Coello¹, Jaime Mas-Oliva^{1*}, Juan Pablo Reyes-Grajeda^{2*}

1 Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México,

2 Instituto Nacional de Medicina Genómica, México City, México

✉ Current address: Affymetrix, Santa Clara, CA, United States of America

* jreyes@inmegen.gob.mx (JPRG); jmas@ifc.unam.mx (JMO)



OPEN ACCESS

Citation: Damián-Zamacona S, Toledo-Ibelle P, Ibarra-Abundis MZ, Uribe-Figueroa L, Hernández-Lemus E, Macedo-Alcibia KP, et al. (2016) Early Transcriptomic Response to LDL and oxLDL in Human Vascular Smooth Muscle Cells. PLoS ONE 11(10): e0163924. doi:10.1371/journal.pone.0163924

Editor: Gianfranco Pintus, University of Sassari, ITALY

Received: January 19, 2016

Accepted: September 17, 2016

Published: October 11, 2016

Copyright: © 2016 Damián-Zamacona et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus3 and are accessible through GEO Series accession number GSE68021 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE68021>).

Funding: This study was supported by grants from CONACYT -Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (180726 granted to JMO); Dirección General de Asuntos del Personal Académico/ Universidad Nacional Autónoma de México

Abstract

Background

Although nowadays it is well known that the human transcriptome can importantly vary according to external or environmental condition, the reflection of this concept when studying oxidative stress and its direct relationship with gene expression profiling during the process of atherogenesis has not been thoroughly achieved.

Objective

The ability to analyze genome-wide gene expression through transcriptomics has shown that the genome responds dynamically to diverse stimuli. Here, we describe the transcriptome of human vascular smooth muscle cells (hVSMC) stimulated by native and oxidized low-density lipoprotein (nLDL and oxLDL respectively), with the aim of assessing the early molecular changes that induce a response in this cell type resulting in a transcriptomic transformation. This expression has been demonstrated in atherosclerotic plaques *in vivo* and *in vitro*, particularly in the light of the oxidative modification hypothesis of atherosclerosis.

Approach and Results

Total RNA was isolated with TRIzol reagent (Life Technologies) and quality estimated using an Agilent 2100 bioanalyzer. The transcriptome of hVSMC under different experimental conditions (1, 5 and 24 hours for nLDL and oxLDL) was obtained using the Gene-Chip Human Gene 1.0 ST (Affymetrix) designed to measure gene expression of 28,869 well-annotated genes. A fixed fold-change cut-off corresponding to ± 2 was used to identify genes exhibiting the most significant variation and statistical significance ($P < 0.05$), and 8 genes validated by qPCR using Taqman probes.

(DGAPA/UNAM) (IN205814-3 granted to JMO); and Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN - 25/2011/I) granted to JPRG).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Conclusions

10 molecular processes were significantly affected in hVSMC: Apoptosis and cell cycle, extracellular matrix remodeling, DNA repair, cholesterol efflux, cGMP biosynthesis, endocytic mechanisms, calcium homeostasis, redox balance, membrane trafficking and finally, the immune response to inflammation. The evidence we present supporting the hypothesis for the involvement of oxidative modification of several processes and metabolic pathways in atherosclerosis is strengthened by the fact that gene expression patterns obtained when hVSMC are incubated for a long period of time in the presence of nLDL, correspond very much the same as when cells are incubated for a short period of time in the presence of chemically modified oxLDL. Our results indicate that under physiological conditions and directly related to specific environmental conditions, LDL particles most probably suffer chemical modifications that initially serve as an alert signal to overcome a harmful stimulus that with time might get transformed to a pathological pattern and therefore consolidate a pathological condition.

Introduction

Atherosclerosis is a multifactorial chronic disease characterized by the accumulation of lipids and fibrous tissue in a lesion known as atheromatous plaque; which together with myocardial infarction, one of its most frequent complications, corresponds to the first cause of death globally [1]. Likewise, a similar increase in the prevalence of hypercholesterolemia, one of the main known risk factors [2], has been well documented globally. The presence of prone to rupture plaques, thrombi formation, and ischemic processes in both coronary atherosclerotic disease (CAD) and cerebrovascular disease (CVD) can be clinically identified [3]. In the later stages of the disease, it is possible to detect foam cells along with an aberrant production of proinflammatory cytokines and growth factors which promote a phenotype active in proliferation and migration of vascular smooth muscle cells (VSMC), suggesting a transdifferentiation process [4–7].

To date, it is considered that plaque formation originates within a process involving the three layers of arteries. One of the main hypotheses about the genesis of atherosclerosis points to the process of oxidative stress as a cause of the early lesion known as a fatty streak [8], where foam cells covered by endothelial cells and VSMC of heterogeneous morphology coexist [9]. Before foam cells appear, the accumulation of low-density lipoproteins (LDL) in the subendothelial space with a high degree of oxidation is a factor accelerating the progress of the disease [10, 11], as well as the modification of the characteristics of lipoproteins altering their capacity to be normally metabolized [12–15]. The intravascular transport of these lipoproteins is a dynamic process based on conformational changes of proteins and temporary interactions within the surface of lipoproteins, both sensitive to oxidative stress [16, 17]. Lipoprotein oxidation due to exposure to reactive oxygen species (ROS) [18, 19] promotes the production of foam cells and therefore phagocytosis [20, 21]. Oxidized LDL (oxLDL), their lipoperoxides and free radicals are moved towards the cytoplasm, propagating more ROS inside the cell and perpetuating a chronic effect [22]. It seems that oxLDL also aggravate the growth of lesions by inducing the expression of adhesion molecules, synthesis of chemokines by monocytes and, in the long term, apoptosis of endothelial cells [23–25]. Employing several *in vivo* models of atherosclerosis, it has been proved that an appropriate balance of circulating antioxidant chemical species limits the progress of the disease, thus supporting the role of oxidative stress in the development of CAD [26, 27]. Although the effect of oxLDL upon endothelial cells and vessel

function is well-known, little is known about the phenomena taking place in vascular layers other than the endothelium. Recently, it has been shown that the adventitia, considered a cell layer showing a low level of organization and therefore neutral regarding the development of CAD, also contributes to the repair of the vessel wall by establishing communication between endothelial and smooth muscle cells[28].

Here, we assessed the transcriptomic response of hVSMC to the exposition to both native and oxidized LDL using microarrays of the full transcriptome. We found that the *in vitro* exposure to oxidized LDL modifies the expression of an important number of genes. Remarkable changes were observed in genes related to CAD, such as those regulating inflammation, cell cycle, transcription regulation and calcium homeostasis. Our results show that at short periods of time oxLDL promotes an antiatherogenic cellular response, in contrast to results obtained under a chronic exposure to these stimuli, where cells respond with alarm signals leading towards an atherogenic phenotype.

For the first time a series of transcriptomic shifts are presented in association to the metabolism of hVSMC when exposed to oxLDL particles. Changes found in molecular nodes such as phenotype transdifferentiation, lipid metabolism regulation, and extracellular matrix remodeling among others, provide new evidence regarding the importance of vascular smooth muscle cells in the process of atherogenesis.

Results

Transcriptomic Data

While 236, 586 and 208 genes were differentially expressed by hVSMC exposed to nLDL at 1, 5, and 24 h respectively; in the presence of oxLDL genes showing a ± 2 fold change correspond to 231, 425 and 799 under similar incubation times. These data show that oxidative stress induced by chemically oxidized LDL and the “natural” oxidation of nLDL along time, lead to an increased activity in gene expression while the process of transcription is apparently less affected. In all conditions assessed, gene upregulation apparently is more dramatic than downregulation (Table 1). Using a bioinformatics analysis of Hierarchical clustering (Fig 1) it is evident that VSMC incubated for long periods of time with nLDL present a transcriptomic response similar to the one seen at shorter times when oxLDL are employed. Since under expressed genes are also important in the regulation of cell metabolism, we suggest that along with harm stimuli, cells initially make an effort to maintain cell homeostasis and only with time eventually make the critical decision addressed to repair damage or, for example, start an apoptotic event.

Our data show at least 9 well-differentiated molecular phenomena related to the physiology of vascular smooth muscle cells where the intensity and fate of cell responses depend on the exposure time to the stimulus (Table 2). Hence, primarily our analysis is focused on highlighting the contribution of those genes showing significant changes in order to integrate the molecular phenomena involved in vascular smooth muscle cells during a short and a long-term oxidative stimuli.

Redox Balance. It is well-known that an oxidative stress condition generated by reactive oxygen species (ROS) promotes cardiovascular disease by damaging molecules such as DNA, RNA, carbohydrates, lipids and proteins. Nevertheless, the precise mechanism by which they deteriorate vascular function and promote vascular remodeling *in vivo* has yet to be elucidated. To date, it is known that during early stages of atherosclerosis, cell proliferation is stimulated, while at late stages, VSMC promote apoptosis and therefore plaque instability[29].

On the other hand, the best identified enzymatic pathways exclusive to eliminate ROS are mediated by catalases and a variety of peroxidases, transferases, reductases, oxidoreductases,

Table 1. Top molecular and cellular functions significantly affected by the internalization of nLDL or oxLDL carried out at different times correlated with the top canonical pathways involved.

TX	Molecular and cellular functions	Enrichment (P value)*, Molecule counts	Top canonical pathways	p-value (Molecule counts)
nLDL 1h	Cell cycle	2.81E-05–4.57E-02 (19)	CNTF signaling	8.03E-05 (5)
	DNA replication, recombination and repair	3.38E-04–4.21E-02 (11)	EGF signaling	1.97E-03 (4)
	Gene expression	3.99E-04–2.13E-02 (5)	VEGF signaling	9.31E-04 (4)
	Cellular growth and proliferation	4.93E-04–4.83E-02 (19)	Thrombopoietin signaling	1.38E-03 (5)
	Cellular assembly and organization	1.11E-03–4.21E-02 (20)	IL-2 signaling	1.69E-03 (4)
nLDL 5h	Cell cycle	2.10E-06–4.89E-02 (32)	PPARα/RXRα	8.83E-05 (13)
	Cellular development	1.98E-04–4.45E-02 (28)	Activation TGF-β signaling	1.34E-04 (9)
	Cellular movement	6.91E-04–4.35E-02 (19)	Molecular mechanisms of cancer	2.58E-04 (20)
	Cell-To-Cell signaling and interaction	9.18E-04–2.63E-02 (10)	Regulation of IL-2 expression in activated and anergic T	7.06E-04 (8)
	Cellular growth and proliferation	1.34E-03–4.76E-02 (34)	Lymphocytes, VEGF signaling	9.2E-04 (8)
nLDL 24h	Cellular movement	7.09E-05–4.16E-02 (8)	LXR/RXR activation	2.33E-03 (4)
	Gene expression	9.24E-05–4.97E-02 (21)	Polyamine regulation in colon cancer	6.93E-03 (2)
	Cell-To-Cell signaling and interaction	1.37E-04–5.00E-02 (21)	Oncostatin M signaling	2.81E-02 (2)
	Cell cycle	1.45E-04–4.97E-02 (14)	Germ Cell-Sertoli cell junction signaling	3.02E-02 (4)
	Cellular growth and proliferation	2.31E-04–4.97E-02 (31)	Production of nitric oxide and reactive oxygen species in macrophages	23E-02 (4)
oxLDL 1h	Cellular growth and proliferation	5.69E-07–4.74E-02 (34)	Corticotropin releasing hormone signaling	2.68E-03 (5)
	Cell cycle	1.00E-06–4.74E-02 (15)	Antiproliferative role of somatostatin receptor	2.82E-03 (4)
	Cellular assembly and organization	9.25E-05–4.74E-02 (11)	Tight junction signaling	2.89E-03 (7)
	Cellular movement	1.53E-04–3.81E-02 (22)	Endothelin-1 signaling	4.14E-03 (6)
	DNA replication, recombination and repair	2.76E-04–4.74E-02 (14)	Nitric oxide signaling in the cardiovascular system	4.88E-03 (4)
oxLDL 5h	Cell cycle	2.96E-06–4.46E-02 (32)	Endothelin-1 signaling	1.96E-03 (10)
	Cellular growth and proliferation	1.42E-05–4.22E-02 (57)	ILK signaling	2.36E-03 (10)
	Cellular movement	1.20E-04–4.66E-02 (48)	Relaxin signaling	3.01E-03 (8)
	DNA replication, recombination and repair	1.24E-04–4.46E-02 (11)	Role of macrophages, fibroblasts and endothelial cells in rheumatoid arthritis	3.11E-03 (14)
	Cellular assembly and organization	4.52E-04–4.22E-02 (18)	Mitotic roles of Polo-like kinase	5.27E-03 (5)
oxLDL 24h	Cell Cycle	1.04E-04–3.81E-02 (56)	RhoA signaling	1.22E-02 (9)
	Cellular movement	1.55E-04–3.81E-02 (56)	Mitotic roles of Polo-like kinase	1.49E-02 (6)
	Cellular development	5.43E-04–3.81E-02 (58)	Germ cell-Sertoli cell Junction signaling	1.71E-02 (12)
	Cellular growth and proliferation	6.93E-04–3.81E-02 (92)	Polyamine regulation in colon cancer	1.77E-02 (3)
	Gene Expression	8.45E-04–3.81E-02 (26)	Leukocyte extravasation signaling	2.59E-02 (12)

Both lists were based on the Ingenuity Pathway Analysis (IPA).

*P values correspond to a range between the highest and the lowest significant result.

doi:10.1371/journal.pone.0163924.t001

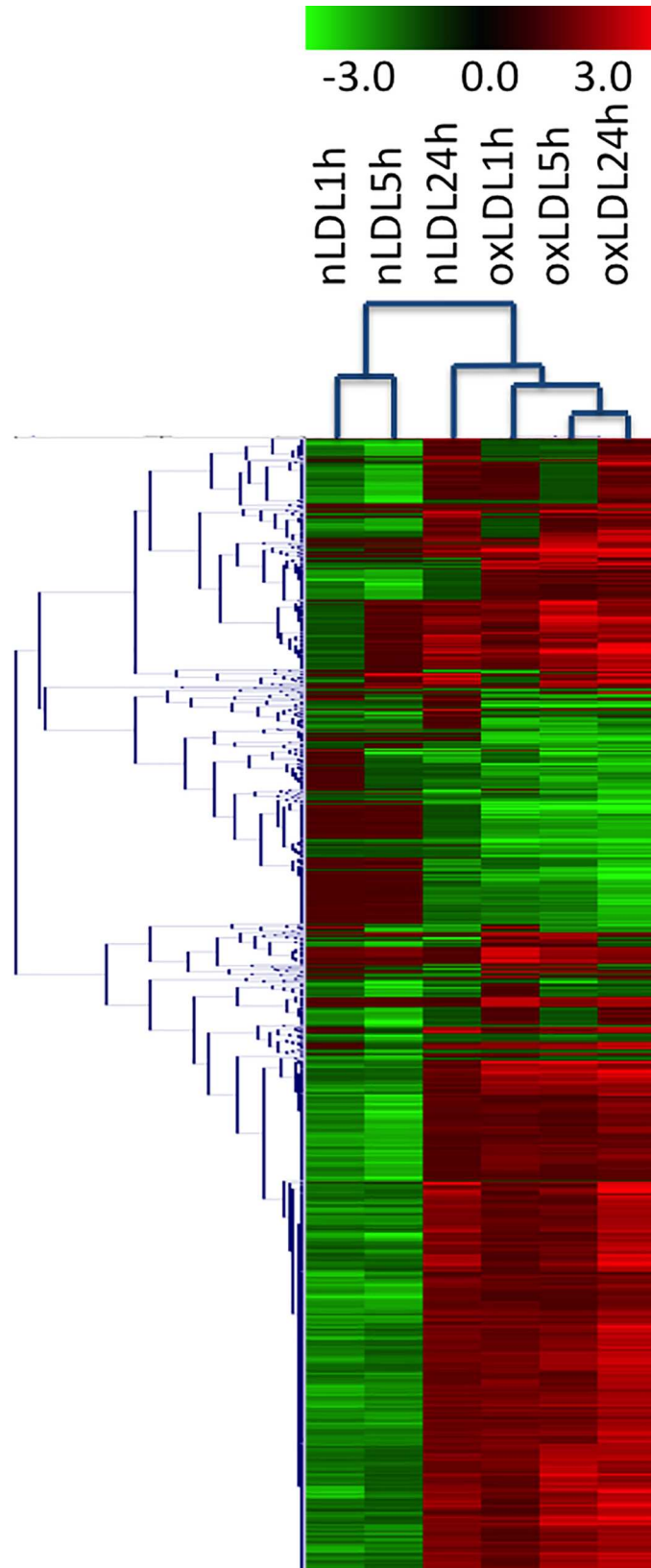


Fig 1. Hierarchical cluster analysis of the differentially expressed genes with more than 2-fold changed expression in one out of six groups (nLDL 1h, nLDL 5h, nLDL 24h, oxLDL 1h, oxLDL 5h and oxLDL 24h) compared to parental hVSMC cells. The dendrogram on the left indicates correlation between gene expression profiles. The columns in the middle show the normalized expression of each gene in pseudocolor scale (key in the upper).

doi:10.1371/journal.pone.0163924.g001

peroxiredoxins and superoxide dismutases (SOD) [8, 30]. From our list of genes and proteins considered by the Ingenuity Pathways Analysis (IPA) associated with an oxidative stress response and the maintaining of a redox state, we found that catalase (CAT) seems to carry out the main role in detoxification, and therefore proposed as a therapeutic target against the adverse effects of ROS associated to cell dysfunction and damage over molecules such as lipids, DNA, RNA, carbohydrates and proteins.

It is evident that VSMC incubated for long periods of time with nLDL present a transcriptional response similar to the one seen at shorter times when oxLDL are employed. This series of experiments are consistent with the concept that metabolically oxidized lipids and modified proteins evolve with time, where short time incubation of cells in the presence of artificially modified oxLDL seem to emulate the cellular response carried out by hVSMC when incubated for longer periods of time in the presence of non treated nLDL. Therefore, we believe this approach might be a good model to reproduce and study the molecular events that might be happening *in vivo* with time during the process of atherogenesis.

Apoptosis and Cell Cycle Related Genes. The control of the cell cycle proved to be an essential regulation process when hVSMC were exposed to LDL (Table 2). For gene ontology (GO) categories enriched in the IPA analysis, we observe an over-representation of genes associated with the cell cycle in virtually all our experimental conditions. At early exposure times employing nLDL or oxLDL, genes FOS and EGR1 (Early Growth Response 1) are upregulated with a fold change above or below the threshold of ± 2 (4.1 and 2.9, respectively). These genes are indicators that the regulation of cell proliferation, differentiation and transformation is taking place, and agree with previous observations reported during early stages of atherosclerosis, where ROS stimulate VSMC growth [30]. However, at exposure times of 5h onward, both FOS and EGR1 drastically decrease their expression, thus indicating that it is only at short periods of lipoprotein exposure that their activity seems to be regulated.

During the regulation of the cell cycle, two main trends seem to be present; nLDL exposure increases ATM expression and decreases PLK1, a member of the Polo-like kinases (PLKs) family. Since these genes regulate changes in mitosis, cytokinesis and the response to DNA damage [31, 32], it seems they determine the onset for the cell cycle arrest. At this very early condition, FOS expression is increased at 1 h exposure with both native and oxidized lipoproteins (4.1 and 2.9 respectively), while at late periods of time (24 h) MYC increases with both stimuli (3.18 and 2.89). Studies where cells were stimulated using fetal bovine serum show two waves of an increased expression of FOS. The first one at 7.5 minutes, when protein is found in the endoplasmic reticulum; and the second at 20 min with a maximal peak at 1h, when the protein is found in the nucleus. These observations are supported by findings showing that c-Myc expression is strongly regulated through cell cycle control and that dysregulation can explain the shortening of G1 and the progression of G1/S [33, 34].

On the other hand, the increase in the expression of several genes such as DLX5, a transcription factor involved in bone development and essential for the differentiation of osteoblasts promoting cell proliferation, perfectly correlates with the increase in MYC expression. It has been reported that DLX5 upregulates the activity of the MYC promoter [35], which presents a strong transcriptional repression effect for genes associated with cell cycle arrest, like GAS1, p15, p21, p27, and GADD34, -45, and -153 [36].

Table 2. hVSMC showing differential time dependent (1 to 24h) gene expression when exposed to nLDL or oxLDL.

Gene symbol	Gene description	Fold change*						Location
		nLDL 1h	nLDL5h	nLDL 24h	oxLDL 1h	oxLDL 5h	oxLDL 24h	
FOS	FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog	4.147	1.154	1.714	1.346	1.119	1.176	Nuclear, transcription factor
EGR1	Early Growth Response 1	2.938	-1.667	-1.118	-1.044	-1.814	-1.638	Nuclear, transcriptional regulator
DUSP1	Dual Specificity Phosphatase 1	2.157	1.359	2.102	-1.055	-1.055	-1.009	Nuclear
MIR21	MicroRNA 21	2.073	1.254	2.191	-1.475	1.326	1.903	Cytoplasm
MMP16	Matrix Metalloproteinase 16	-3.670	-3.716	1.779	1.044	1.264	1.856	Cell membrane, Extracellular side
PHF3	PHD finger protein 3	-3.109	-1.458	1.788	-1.088	2.043	2.428	Nucleus
EXOC5	Exocyst Complex Component 5	-3.094	-1.203	-1.086	1.153	-1.025	-1.034	Cytoplasm
RB1CC1	RB1-Inducible Coiled-Coil 1	-2.775	-1.888	1.863	1.048	1.824	2.499	Nucleus, Cytoplasm, Cytosol
DST	Dystonin	-2.771	-2.370	1.355	-1.029	1.722	2.180	Cytoplasm, cytoskeleton
PPP1R10	Protein Phosphatase 1, Regulatory Subunit 10	1.032	3.601	2.723	-1.080	1.579	2.996	Nucleus
HIST1H2BF	Histone Cluster 1, H2bf	1.365	2.348	1.009	1.079	-1.114	-1.102	Nucleus, Chromosome
DLX5	Distal-Less Homeobox 5	1.273	2.070	2.490	1.054	2.216	1.887	Nucleus (by similarity) Membrane; Multi-pass membrane protein
SLC7A11	Solute Carrier Family 7 Member 11	-2.692	-4.549	1.872	1.040	1.572	3.214	Plasma membrane
TIPARP	TCDD-Inducible Poly (ADP-Ribose) Polymerase	-1.186	-3.888	-3.101	-1.521	-2.713	-2.868	Nucleus
ROCK2	Rho-Associated, Coiled-Coil Containing Protein Kinase 2	-2.495	-3.635	1.388	1.053	1.177	1.910	Cytoplasm, cytoskeleton, Cell membrane, nucleus
GLS	Glutaminase	-2.001	-3.522	-1.155	1.018	-1.289	1.024	
DDIT3	DNA-Damage-Inducible Transcript 3	1.090	1.384	4.856	-1.277	2.378	2.370	Cytoplasm, Nucleus
ABCA1	ATP-Binding Cassette, Sub-Family A (ABC1), Member 1	-1.346	-1.550	4.367	-1.195	1.909	4.867	Membrane
OGN	Osteoglycin	-1.741	-1.166	3.228	-1.026	1.354	2.438	Secreted, extracellular space, ECM
MYC	V-Myc Myelocytomatosis Viral Oncogene hom	1.044	1.620	3.180	1.037	2.286	2.891	Nucleus
HSD17B6	Hydroxysteroid (17-Beta) Dehydrogenase 6	1.042	-1.293	3.033	-1.068	2.525	3.773	Microsome membrane, Lumenal side, Early endosome membrane
INSIG1	Insulin Induced Gene 1	-1.677	-1.381	-4.189	1.520	1.487	-1.456	Endoplasmic reticulum membrane
LDLR	Low Density Lipoprotein Receptor	1.124	-1.100	-4.103	-1.017	1.387	-1.375	Cell membrane
KIAA1199	KIAA1199: Colon Cancer Secreted Protein 1	-1.115	-1.318	-3.627	-1.152	-1.368	-3.831	Cytoplasm
ID3	Inhibitor of DNA Binding 3, Dominant Negative HLH-P	1.078	-3.113	-3.244	-1.227	-3.767	-3.848	Nucleus
IL1R1	Interleukin 1 Receptor, Type I	-1.434	-3.118	-3.232	-1.144	-1.660	-1.849	Membrane
CALCRL	Calcitonin Receptor-Like	-1.459	-1.361	2.506	3.426	3.510	5.036	Cell membrane
MYOZ2	Myozenin 2	1.001	-1.134	1.067	3.125	2.142	3.038	Cytoplasm, myofibril, sarcomere
GUCY1A2	Guanylate Cyclase 1, Soluble, Alpha 2	-1.037	-1.101	1.499	3.031	2.964	3.819	Cytoplasm
TNFSF4	TNF (Ligand) Superfamily, Member 4	-1.195	1.032	1.757	2.930	4.342	3.800	Secreted
TFPI2	Tissue Factor Pathway Inhibitor 2	-1.382	-1.329	1.109	-4.308	-2.831	-3.133	Nucleus, Cytoplasm
KIAA0101	PCNA-binding protein	-1.385	-1.059	-1.438	-4.219	-4.671	-5.105	Nucleus, cytoplasm, perinuclear region
PTGS1	Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 1	1.045	1.052	-1.131	-4.067	-3.884	-3.130	Endoplasmic reticulum and Microsome membrane

(Continued)

Table 2. (Continued)

Gene symbol	Gene description	Fold change*						Location
		nLDL 1h	nLDL5h	nLDL 24h	oxLDL 1h	oxLDL 5h	oxLDL 24h	
BEX1	Brain Expressed, X-Linked 1	1.107	-1.051	-1.126	-3.743	-4.095	-3.258	Nucleus, Cytoplasm
ACTG2	Actin, Gamma 2, Smooth Muscle, Enteric	1.261	1.274	-2.802	-3.727	-3.614	-7.261	Cytoplasm
IL33	Interleukin 33	-1.110	1.142	1.467	2.685	4.110	3.141	Nucleus, cytoplasmic vesicle
PPM1K	Protein Phosphatase, Mg2+/Mn2+ Dependent, 1K	-1.409	-1.579	1.441	1.005	3.570	3.080	Mitochondrion matrix
RASSF9	Ras Association (RalGDS/AF-6) Domain Family (N-terminal) Member 9	-1.008	1.462	2.080	-1.085	3.546	2.991	Accumulates on perinuclear endosomes
TEK	Tyrosine Kinase, Endothelial	-1.268	-1.047	2.220	1.072	2.154	4.193	Cell membrane, cytoplasm, secreted
CMAHP	CytidineMonophospho-N-Acetylneuraminic Acid Hydroxylase, Pseudogene	-1.512	-1.242	2.440	1.285	1.917	3.892	Cytoplasm (inferred)
OCLN	Occludin	-1.030	1.006	1.412	-1.181	2.889	-4.671	Membrane; Multi-pass membrane protein

* Genes showing a significant expression change are indicated with bold numbers (P<0.05, FC>2.0).

TNF, Tumor Necrosis Factor; HLH-P, Helix-Loop-Helix Protein; ECM, extracellular matrix

doi:10.1371/journal.pone.0163924.t002

In the presence of oxLDL, genes like APC are upregulated (2.2 and 2.3 oxLDL 5h and oxLDL 24h, respectively), showing a tendency to promote the process of apoptosis, transcriptional activation and cell migration. APC seems to act along with DDIT3 (4.8 and 2.3 nLDL 24h, oxLDL 24h), also associated with stress-activated apoptosis in the endoplasmic reticulum. Both regulate the inflammatory response induced by activation of caspase 1 (CASP1) and interleukin-1 beta (IL1B). Thus, the dynamics among mitogenic signals, cell cycle arrest, migration, apoptosis, DNA repair, and other cell and molecular functions is affected depending on the stimulus received and the time of exposure as seen in Table 2.

The levels of expression observed in all formerly mentioned genes are congruent with a system trying to avoid cell arrest. Moreover, we observed regulation of genes such as CYR61, which favors cell proliferation and play an important role in repair by regulating the expression of genes involved in angiogenesis, inflammation and remodeling of extracellular matrix[37]. To date, it is known that during the early stages of atherosclerosis, cell proliferation is stimulated, while at late stages, VSMC promote apoptosis and therefore plaque instability[30]. Our results suggest that hVSMC proliferate well after 24 hours exposure with nLDL, while exposures to oxLDL seems to trigger cell migration and cycle arrest. Together, these last effects could constitute a rather dangerous response in the formation of an atheroma. Although a low oxidative stress level due to naturally modified LDL might eventually start or increase the size of incipient atheromatous plaques, a chronic exposure to these modified lipoproteins that could with time be extensively oxidized will promote cell migration, cell-cycle arrest and would lead to a full developed atherogenic event.

Remodeling of the extracellular matrix. Cell exposure to oxLDL remodels the extracellular matrix as indicated by the overexpression of the metalloprotease MMP16 (MT3-MMP), with the largest effect found at 24 h (Fold change 3.1), and the associated downregulation of TIMP1, a natural inhibitor of metalloproteases. In close relationship to this remodeling event, endocytosis associated with the phagocytic route for proteins, extracellular matrix degradation [38]and cell movement has been reported[39]. In the same context, genes like ICAM1 (CD54) involved in cell adhesion are downregulated, indicating an increase in cellular migration and

delocalization, phenomenon that has been observed *in vivo* in the atherosclerotic plaque. Likewise, integrins 3 and 5 (ITGA3 and ITGA5) also decrease their expression when they receive signals associated to a large generation of ROS.

DNA Repair. The IPA database reports 330 genes associated with DNA repair. In the presence of oxLDL we found a significant representation of several of these genes within the top 5 overexpressed molecular and cellular functions. For example, 3, 5 and 11 genes were overexpressed above the +2 threshold at 1, 5 and 24 hours, respectively. The overexpression observed at 24 hours of genes such as KIT (2.6), XRCC4 (2.05), ERCC4 (2.14) and ERCC6 (2.06), among others, suggest a response attempting to maintain cellular integrity, even when damage caused from early incubation times with oxLDL had started. Together, these changes affect the final equilibrium state between an increase in apoptotic or cell maintenance signals.

Cholesterol Efflux. In general, under our experimental conditions we observed that only a few genes related to the metabolism of cholesterol were significantly regulated. Nevertheless, it is important to stress the remarkable overexpression of the cassette transporter ABCA1 (fold change 4.8), a critical transporter contributing to cell cholesterol efflux. We also observed other members of the A and C families importantly upregulated, such as ABCA6, ABCA8, ABCA9 and ABCC9 with fold changes 2.9, 2.05, 3.37 and 3.33, respectively. Among these transporters, only ABCA9 and ABCA6 have been reported to be upregulated in the process of differentiation from monocytes to macrophages and downregulated in the process of cholesterol internalization [40, 41].

Endocytic Mechanisms. The behavior shown by the expression of receptors associated with the internalization of both types of LDL (native and oxidized) corresponded as expected. The oxLDL receptor (OLR1) and the CD36 receptor (SCARB3) were overexpressed when cells were treated with oxLDL, and considerably downregulated the expression of the LDL receptor (LDLR) at long periods of time when exposed to nLDL (-4.1). Meanwhile, the expression of the scavenger B1 and B2 receptors was turned on at short periods of incubation with oxLDL (Fig 2), indicating the dynamics associated with the type and degree of oxidation, data that strongly agree with the known variability effect of oxLDL reported in literature [42].

Calcium homeostasis. In a similar fashion to the pattern observed with other genes, hVSMC treated for a short time with oxLDL or for longer periods of time using nLDL, increase the expression of SPP1, BMP6 and CALCRL corresponding to genes that promote the

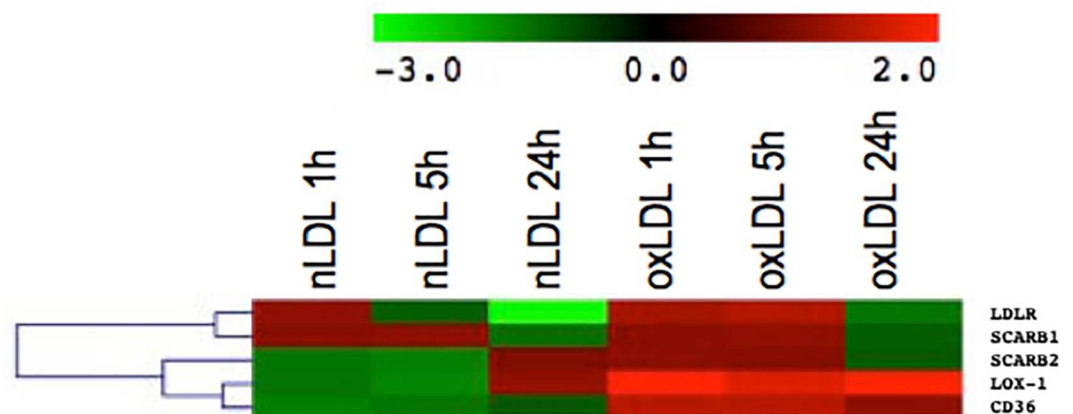


Fig 2. Hierarchical cluster analysis of several receptors and their expression when the six experimental conditions used (nLDL 1h, nLDL 5h, nLDL 24h, oxLDL 1h, oxLDL 5h and oxLDL 24h) are compared to parental hVSMC cells.

doi:10.1371/journal.pone.0163924.g002

differentiation and maturation of osteogenic cells and whose activity may produce pathologic biomineralization in vascular tissues. Additionally, we observed that oxLDL decreases TAGLN and ACTA2 expression, two gene markers for the VSMC phenotype. Taken together, these data suggest a transdifferentiation step similar to that observed in VSMC exposed to high glucose concentrations, showing these cells an interesting plasticity depending on the stimulus they receive [8].

On the other hand, although VSMC do not naturally express proteins related to calcification, our group has found that under an atherogenic condition they are capable of expressing SPP1[43], a protein that regulates the formation of hydroxyapatite crystals. To our knowledge, this is the first report related to osteogenic signaling by bone morphogenetic proteins (BMP) when exposed to oxLDL.

Membrane Trafficking and Exosome. As a consequence of ROS increase, genes like KIF4A and PRC1 associated with the movement of membranous organelles, intracellular transport and cytokinesis are downregulated. This finding is in agreement with the tendency towards cell cycle arrest and the increase in the expression of INHBA and CALCRL, suppressants of the proliferation process. Likewise, genes such as RAB33B which is overexpressed, might be important in defining the steps of vesicular transport along several endocytic routes, and suggests how the dynamics of cargo systems and the formation of the autophagosome may work[44]. It has been suggested that this mechanism involves the degradation of cytoplasmic components in response to the initiation of macro-autophagia [45].

Immune Response and Inflammation. The inflammatory process shows important changes in hVSMC marker genes during exposure to oxLDL, strengthening their relationship with the process of oxidative stress. SPP1, which is recognized as a proinflammatory cytokine is upregulated along with CALCRL, regulation that shows not only to be significant at all incubation times when exposed to oxLDL, but also to be important when cells were incubated for a long period of time with nLDL (Fig 3). In this context, it is noteworthy the overexpression of

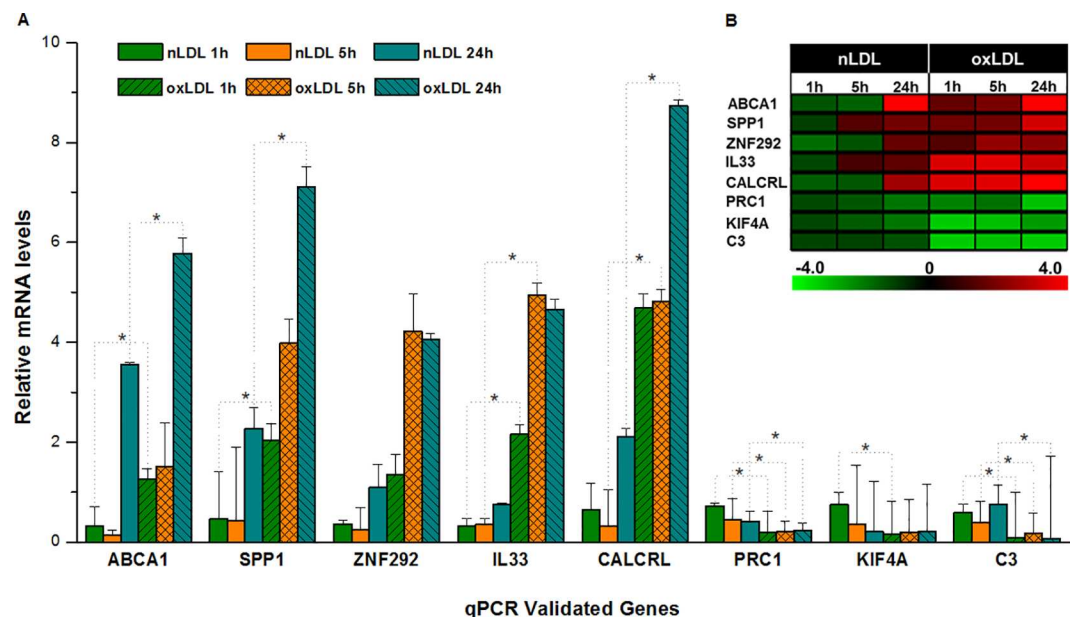


Fig 3. Validation of microarray results by quantitative RT-PCR (A) Gene expression of ABCA1, SPP1, ZNF292, IL33, CALCRL, PRC1, KIF4A and C3 determined by quantitative real-time RT-PCR. Bars represent means \pm SD (n = 3). Relative gene expression levels, normalized to GAPDH expression. Values superscribed by asterisks (*) are significantly different from nLDL and oxLDL groups (B) Heatmap Expression profile (microarray data).

doi:10.1371/journal.pone.0163924.g003

IL33 when cells are exposed to oxLDL since this molecule has been shown to present a protective effect during the inflammation process of adipose tissue in mice by inducing the production of Th2 cytokines such as IL-5, IL-13, IL-10 [46].

On the other hand, cells exposed for 24 h with nLDL show a significant regulation upon defense and communication processes associated to the immune system, suggesting that CAD and complications due to an inflammatory process start from the exposure at short times with nLDL. Since the regulation of these processes by key molecules such as IL33 permits the restitution of a normal expression, this modulating process might also become a potential therapeutic target.

On the other hand, we have observed that nLDL unlike oxLDL regulate innate immunity processes and the communication between cells, even though the immune system only recognizes the latter as an antigenic stimulus. Therefore, it is possible to think that complications due to inflammation at the vascular level seen in CAD might start at the early stages of the atherogenic process. Therefore, modulation of these inflammatory processes by key molecules such as IL33, permits the restitution of gene expression close to a normal stage and in consequence considered as a protective molecule.

Validation of Microarray Data by Quantitative PCR. The validation of our transcriptomic expression analysis represent genes involved in the control of the diverse functions carried out by hVSMC. Five of the clearly upregulated genes in response to an oxidative stress condition included ABCA1, SPP1, ZNF292, IL33 and CALCRL, while PRC1, KIF4A and C3 were downregulated. Fig 3 shows the correlation data between data obtained from the microarray and changes in gene expression determined by qPCR using Taqman probes.

Identification of transcriptional regulation

Exposure to native LDL for 1 hour (nLDL 1h). Using the tools for the identification of transcriptional regulation cascades implemented IPA Upstream Analysis, it is predicted that receptor CD24 is inhibited. This prediction is based on 11 genes reported to be regulated by this receptor (VPS13C, USO1, TTC3, TPR, SCAF11, RANBP2, NRIP1, NIPBL, JMJD1C, EDEM3 y DNAJC13) with fold changes > 2 defined as the cut-off value. These genes are mainly associated with signaling routes like RAN, protein degradation by ubiquitination and vesicle transport, indicating as expected, that LDL turn on the processes of nucleus-cytoplasm transport and membrane recycling. The role of CD24 should be noticed since this receptor is generally found on the surface of endothelial cells, where it recognizes among other ligands, P-selectin which is associated to the process of rolling and tethering, essential steps in leukocyte recruitment and diapedesis [47].

Exposure to native LDL for 5 hours (nLDL 5h). The upstream analysis at 5h with nLDL shows the predicted inhibition of 6 genes (CD24, SYVN1, MYC, PDGF BB, IFNA2 and EIF2AK2) and their associated signaling cascades involving 53 genes. From these, seven downregulated genes stand out since they show a consistent inhibition of MYC expression which, on the other hand, at larger incubation times would increase their expression at similar levels between native and oxidized LDL. Likewise, the regulation of the importin- exportin-mediated nucleus-cytoplasm transport systems, like XPO1 (Fold change-2.9) are downregulated. While 12 genes associated with SYVN1 inhibition, some of them belonging to different protein carrier families such as SLC7A5, SLC39A10, SLC30A1, are downregulated along with genes such as RAB10 from the RAS family. The predicted inhibition of platelet-derived growth factor BB (PDGF BB) could be related to VSMC proliferation and migration inhibition through AKT phosphorylation mechanisms[48]. Only one transcriptional regulation cascade is affected with 6 downregulated genes, predicting the activation of collagen 18A1 (COL18A1).

Exposure to native LDL for 24 hours (nLDL24h). Along this condition, 12 genes predict the inhibition of signaling cascades associated with NFkB and IL13, congruent with ROS formation considering that 24h incubation produces a moderately oxidized LDL (MM-LDL). ROS lead to a possible inhibition of the NFkB route, which would generate an anti-inflammatory process as previously associated with the oxidation state of LDL[49, 50].

Exposure to oxidized LDL for 1 hour (oxLDL 1h). The downregulated expression of SEMA7A, PTGS1, MT2A and HLA-B genes predict the inhibition of the signaling cascade associated with TGM2 and the activation of the methylation processes. Five downregulated genes (TOP2A, PBK, FJX1, DLGAP5 and BUB1B) associated with KDM5B predict their activation, being DLGAP5 a regulator of integrity of tight junctions, and BUB1B an essential component of the mitotic checkpoint.

Exposure to oxidized LDL for 5 hour (oxLDL5h). 10 genes with upregulated and downregulated expression at fold changes between ± 2 support the inhibitory prediction carried out by ROS of IL13 and ERK, as an indicator of anti-inflammatory signaling control and of transcriptional control. These results are consistent with the levels of expression of genes induced by nLDL at 24 hours.

Exposure to oxidized LDL for 24 hour (oxLDL24h). Here, 43 genes predict the inhibition of 4 genes and the activation of 2 more along with their associated signaling cascades. Fig 4 depicts a representation based on the cellular location according to Gene Ontology (GO) and the known interactions with other biomolecules for each one of the affected genes, showing a mechanistic representation of possible actions performed by these 6 genes. Hence, we can conclude that at longer exposure times and greater oxidative stress, cellular controls are mainly affected in relation to the inhibition predicted for NANOG, as an indicator of the regulation for cellular pluripotentiality, supporting the idea of transdifferentiation. Additionally, the inhibition of Claudin 7 (CLDN7) as a protein forming part of tight junctions would correlate with the loss of cell architecture. This inhibition correlates with the expression of MUC1, MT1X, LGALS3 and DKK1 genes.

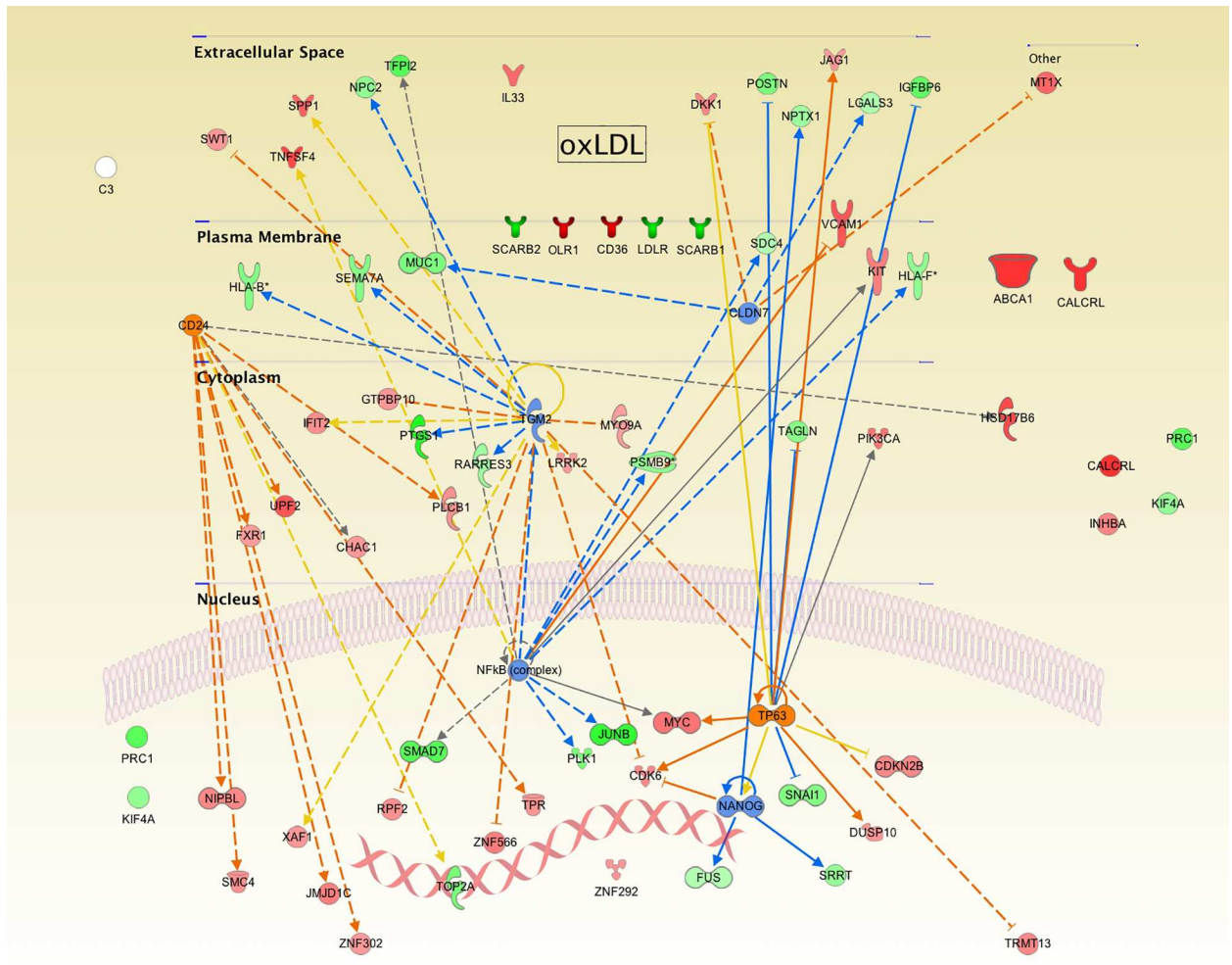
Under these conditions, eight genes predict the activation of CD24, a phenomenon opposite to what we observed with nLDL at early periods of time, where its inhibition was predicted. This phenomenon not previously reported for this cellular system could modulate activities such as cell migration. Interestingly, the activation of TP63 and the translated protein p63, member of the p53 transcription factor family, would be an indicator for the preservation of the proliferative potential of these cells as seen in the auto-renewal of limbal stem cells regulating their mitogenic rate, phenomenon also observed during corneal repair[50].

Finally, in order to support our finding correlating effects observed with cells between long incubation times employing nLDL particles and short incubation times using oxLDL, the degree of oxidation present in the culture media at the different conditions employed was directly measured.

Fig 5 clearly shows that while culture media containing oxLDL present important malondialdehyde values that tend to decrease with time in parallel to the process of lipoprotein internalization through scavenger receptors, along with time, nLDL show a modest tendency to be mildly oxidized and therefore probably still being recognized and internalized through the LDL receptor as previously suggested.

Discussion

Since oxygen is known to be the key element in the preservation of life as we know it, the presence of free oxygen radicals in circulation is a reality due to the many oxidative reactions of the cell. Along the respiratory metabolism and under specific conditions, cells convert oxygen



© 2000-2015 QIAGEN. All rights reserved.

Fig 4. Summary of main changes observed in gene expression and functions of hVSMC as a result of exposition to oxLDLs. Genes found over- or under-expressed in comparison to a control condition are shown (red and green respectively), and the predicted activation or inhibition in orange and blue.

doi:10.1371/journal.pone.0163924.g004

molecules to highly reactive oxygen species by losing electrons and becoming highly efficient radicals that affect nucleic acids, carbohydrates, lipids and proteins. For years now, these reactive oxygen species have been associated with the process of atherogenesis, where a vascular inflammatory condition together with the chemical modification of lipoproteins and endothelial damage, develop atherosclerosis and ultimately cardiovascular disease.

Taking into account the complicated mechanisms and signals involved in this process, many laboratories have focused their research not only trying to find a way to overcome the deleterious effects of free oxygen radicals, but also working in the search for gene-based markers through transcriptomics and metabolomics that might help to recognize when oxidative stress has reached a dangerous level. Although there is a published microarray that presents the response of oxLDL upon human coronary artery smooth cells employing incubation times starting at 3h[51], according to our study using a starting incubation time of 1h, important differences between the two studies are found. A period as short as 1h permitted us to observe changes among others associated to the expression of microRNAs and matrix metalloproteinases. Another relevant difference between the two studies is related to the intrinsic properties

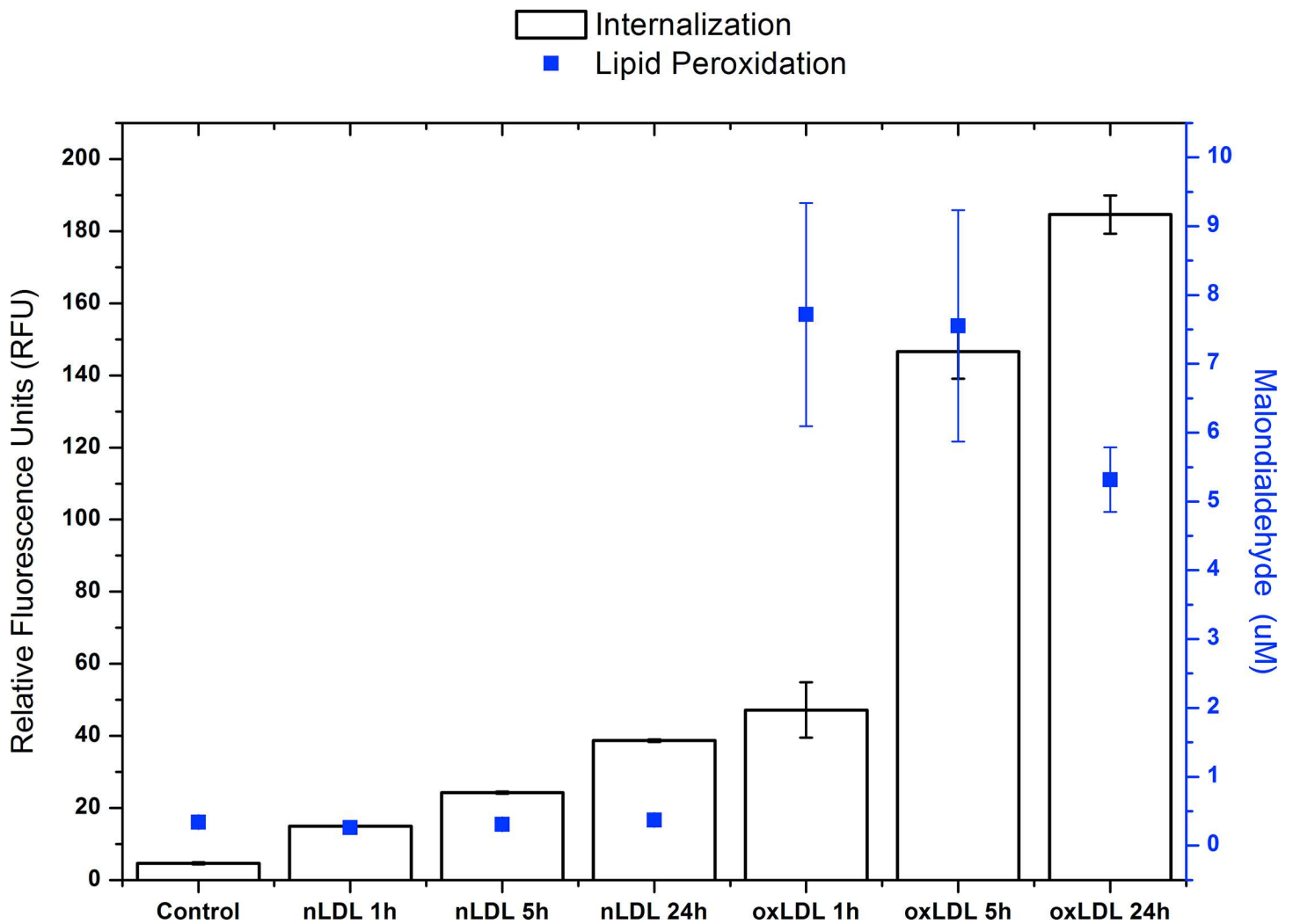


Fig 5. Internalization Assays and lipid peroxidation in VSMC cells. White boxes corresponding at internalization in VSMC cells of 7.5 μg/mL of nLDLs or oxLDLs Dil label for 0 (Control), 1, 5, and 24 h under medium minimal culture conditions. The magnitude of internalization shown on the left side in the y-axis as relative fluorescence units (RFU) at 530/590 nm (excitation/emission). The blue squares correspond to the level of peroxidation of media supernatant after the same conditions. The lipid peroxidation level is shown in the y-axis on the right side expressed as [μM] of malondialdehyde.

doi:10.1371/journal.pone.0163924.g005

associated to the phenotypes of cells used as experimental model. Coronary smooth cells show a highly differentiated phenotype even after been cultured with growth factors added. This cell type seems to be less responsive when exposed to different stimuli and also exhibits a lower synthesis activity[52, 53]. In contrast, hVSMC used in this study are not terminally differentiated and therefore plastic enough to respond showing a contractile phenotype after a physiological stress, or a synthetic phenotype when physical (mechanical) stimulation is used[54, 55]. In this sense, VSMC isolated from hypertensive individuals show a significant increase in ploidy and hypertrophy[56]. Also, Angiotensin II involved in the development of cell contraction and eventually of hypertension, regulates polyploidization in this cell type as well as the hepatocyte through the Akt1 pathway[57]. Moreover, since both smooth muscle cell types express different sets of genes that are down or up-regulated in response to oxidative stress, it is not difficult to think that accordingly to their position in the media layer of the artery wall, these cells might respond differently to different kinds of stimuli, phenomena most surely important in the progression of the atherosclerotic plaque *in vivo*.

Our work contributes with the exploration of such gene-based markers when human VSMC have been exposed to different levels of oxidated LDL particles, employing both native LDL that naturally become oxidized with time during incubation, and chemically oxidized LDL.

Data obtained from our assays searching for differential expression patterns caused by nLDL and oxLDL contribute to understand how cell systems such as hVSMC respond to harmful stimuli aiming at achieving cell survival within a favorable energetic landscape.

Genes regulated by nLDL are involved in a wide spectrum of biological processes suggesting redundancy of genes regulated by oxLDL that in turn are mainly focused prioritizing the reestablishment of key cell survival functions. Among these functions, it can be mentioned gene transcription and its involvement in promoting adaptation into the environment; DNA protection from possible damage carried out by ROS, and cell cycle control as a response to a hostile environment.

Therefore, according to our analysis, cell cycle control is one of the most important processes affected, showing a strong regulation by oxLDL and nLDL. Interestingly, several reports have described a close relationship with cell growth arrest between the up-regulation of ATM, APC, DLX5 and DDIT3 and down-regulation of PLK1, PRC1 and KIF4A. These genes have shown similar changes at short exposure times with oxLDL to those observed at long-term exposure times with nLDL. Although several reports suggest that oxLDL exposure might stimulate proliferation[56], our results show that under high oxidative stress levels and the presence of oxLDL, a transcriptomic pattern seems to predispose cells to arrest growth, stop proliferation and prevent apoptosis. Moreover, when cells are briefly exposed to nLDL, cell growth arrest is avoided and proliferation seems to be stimulated, results congruent with studies where a moderate oxidative stress level was used[58]. Therefore, the type of response shown by cells drastically varies according to the kind and degree of oxidation LDL particles might present. In this sense, the extent of the natural process of lipoprotein modification found in an *in vivo* situation as an example as to what it might be occurring in the atheroma, could be determinant in the progression of the lesion.

For some time now, there has been controversy as to the meaning of minimally modified LDL. It has been established that lipoprotein particles need to be sufficiently modified in order to be differentiated from unmodified LDL that maintain their ability to bind to the LDL receptor and therefore still not recognizable by scavenger receptors. In this sense, as shown in the present study a modification of nLDL achieved with time that corresponds to the mildest exposure condition observed with oxLDL might be sufficient for an important induction of a series of gene responses. The transcriptional behavior of hVSMC in culture at 24 hours exposition with nLDL corresponds to the response observed at initial times in the presence of oxLDL. It is likely that slight differences between moderately and extensively oxidized LDL particles lead to opposite transcriptional responses. A modest oxidative stress due to long term naturally oxidized LDL particles seem to promote cell proliferation as expected on the first stages of atherogenesis, while a greater oxidative stress from a short term exposure with chemically treated particles apparently promote cell growth arrest[58, 59]. Since it is commonly accepted that the process of LDL oxidation in plasma is not a common reaction due to the presence of antioxidant molecules such ascorbate and tocopherol, oxidation mainly takes place in the subendothelial space where the presence of antioxidant molecules is much less abundant[60]. Therefore, this phenomenon most probably is associated to the possibility that naturally modified LDL particles presenting different degrees of oxidation at the different stages of the atherosclerotic lesion, might be sending differentiated defense signals through the LDL receptor before such particles are recognized by the scavenger receptors in an advanced type of lesion.

Our analysis also shows a tight regulation of inflammation related processes, whose development has been shown to be of paramount importance from the genesis of fatty streaks up to

the advanced stages of atherosclerosis[61, 62]. Cells exposed to nLDL and oxLDL overexpress characteristic cytokines of a proinflammatory process such as IL33 and SPP1. This cellular response generates an inflammatory process within the vessel through communication with the different cell lines of the immune system. It is also interesting to consider that several molecules involved in inflammation have been shown to present important functions in other biological processes, such as CALCRL and SPP1, which have been demonstrated to be intimately involved in osteogenic cell differentiation. The presence of cells with a phenotype favoring calcium deposits is of great relevance in the vessel physiopathology, affecting long term cell survival[7]. Our group has described an *in vitro* model investigating the inhibition of hydroxyapatite formation $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ as a consequence of the presence of SPP1[43]. Unlike its role in inflammation, SPP1 activity has been shown to be atheroprotective since an increased concentration of SPP1 was detected in the arteries of rabbits exposed to high cholesterol diets and developing atherosclerotic lesions. Employing this experimental animal model and in spite of the presence of calcium deposits, the presence of SPP1 and its overexpression by VSMC corresponds to an oxidative stress stimuli, for instance, caused by oxLDL. On the other hand, downregulation of TAGLN and ACTA2, markers for a smooth muscle phenotype, would promote a poorly defined differentiation that in turn could allow a calcification-promoting phenotype.

The present work shows that the compound media layer of hVSMC produces a highly rich and versatile transcriptomic response triggered by the presence of chemically modified lipoproteins, supporting the concept that CAD is a condition consolidated by the integral response of the intima, media and the adventitia. This information shows that the initial response of cells towards a proatherogenic stimulus can be considered a functional defense against the process of atherogenesis, suggesting that the true atherogenic potential lies in a persistent aggression that exceeds cell defenses.

Gene expression of hVSMC in the presence of nLDL for less than 5 hours seems to promote the development of this functional defense metabolism; however, during longer incubation times, cells in the presence of nLDL might render these particles prone to oxidative modifications and the promotion of a proper oxidative stress condition. Although under these initial mild conditions, cell defense mechanisms respond mainly through proliferation, a long exposure to these conditions can be converted into a potentially proatherogenic stimulus. As a whole, from our results it is possible to propose that the presence of a low oxidative stress level can be considered a functional defense process. When a low oxidative stress level changes to an extreme one over time, the true atherogenic potential emerges.

Methods

Human plasma samples were obtained from Blood Bank healthy donors at the National Medical Center “20 de Noviembre” that signed an informed consent. All protocols were performed according to the Declaration of Helsinki. To isolate LDL, plasma density was adjusted to a 1.019–1.063 g/ml by adding KBr and then, centrifuged at $360,000 \times g$ for 8 h at 4°C. The top layer containing VLDL and IDL was discarded. LDL preparation was recovered and dialyzed against 150 mM NaCl, filtered through 0.45 μ m filter and stored under nitrogen atmosphere at 4°C to reduce oxidation. LDL concentration was measured with the Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce; Rockford, IL). Part of the concentrated LDL was reserved to use as native LDL (nLDL)[63–67].

To prepare oxLDL, 1 ml of nLDL (100 mg/ml) was incubated in a 10 μ M CuSO₄ solution in PBS without calcium, magnesium nor antioxidants at 37 Celsius degree for 20 h. The reaction was stopped with 100 μ M EDTA and the preparation was dialyzed against 150 mM NaCl

containing 240 μM EDTA (pH 8) and stored at 4°C until use[43, 64]. The oxLDL concentration was estimated reading in the UV range (215 nm) in a spectrophotometer UV/VIS Lambda 2S (Perkin-Elmer).

Cell culture

The human vascular smooth muscle cells (VSMC) were originally obtained from the aorta of a healthy female patient. T/G HA-VSMC from ATCC (Cat. CRL-1999) were grown in 10 cm culture dishes with F12K medium containing 0.05 mg/ml ascorbic acid; 0.01 mg/ml insulin; 0.01 mg/ml transferrin; 10 ng/ml sodium selenite; 0.03 mg/ml Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS); 10% fetal bovine serum (FBS), 10 mM HEPES, 10 mM TES, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ penicillin/streptomycin and 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fungizone. Cells were incubated in a humidified environment at 37 Celsius degree in an atmosphere of 95% air / 5% CO₂.

Internalization assays

VSMC in their fifth passage were starved for 1 h and internalization assays started by adding to the culture dish fresh medium containing 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of nLDLs or oxLDLs for 1, 5, and 24 h under standard culture conditions. For each experimental condition, 9 culture dishes were used and pooled dishes containing three biological replicates examined. For internalization assays, lipoproteins were labeled with 1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) [67], and cells incubated in the presence of DiI-labeled lipoproteins employing 96-well plates containing 20 x 10³ cells/well. After the internalization assay, cells were washed 5x with 0.2 mg/ml BSA (in PBS) and 2x with PBS, and fluorescence read in a Synergy HT Microplate Reader (Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT) at 530/590 nm (excitation/emission). The oxidation level of supernatants obtained from the different pooled culture media in the presence of oxLDL or nLDL was estimated using the NWLSS Malondialdehyde assay according to the instructions provided by the manufacturer (Northwest Life Science Specialties, LLC, Vancouver, WA; Cat. NWK-MDA01), and read at 532 nm in a Lambda 2S spectrophotometer.

In vitro transcription and hybridization to Affymetrix HumanGeneChip

Total RNA from 9 samples of VSMC in 3 different time courses (1, 5 and 24 hours) and two different treatments (nLDL = native LDL or oxLDL = oxidized LDL) were isolated with Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies).

Samples were quantified using a NanoDrop ND-3300 spectrophotometer (NanoDrop Technologies) and RNA quality assessed using the RNA 6000 Nano Assay and analyzed using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

Total RNA was obtained from three culture plates exposed to the same treatment pooled with a yield of 200 ng of single pooled sample. Three technical replicates were prepared for each condition.

Target cDNA was prepared according to the Whole-Transcript (WT) Sense Target Labeling Protocol (Affymetrix). Briefly, 200 ng of pooled RNA was converted to one-strand cDNA using a Superscript II reverse transcriptase primed by a poly(T) oligomer. The second strand cDNA synthesis was followed by an in vitro transcription to generate cRNA.

cRNA products were used as a template for a second cycle of cDNA synthesis where dUTPs incorporate to the new strand. cDNA was fragmented using uracil-DNA glycosylase and apurinic/apyrimidinic endonuclease. Fragments (40–70 mers) were then labeled by means of a biotin-labeled deoxynucleotide terminal addition reaction. The labeled cDNA product was heated to 95°C and hybridized to the Human Gene 1.0 ST microarray (Affymetrix) for 17 + 1 hr at 45°C.

Samples were washed with low (SSPE) and high (100 mM MES, 0.1 M NaCl) stringency buffers and stained with streptavidin-phycoerythrin using the Affymetrix Fluidics Station 450 FS450_0007 protocol.

The GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix) was used to collect fluorescent signals and the Expression Console software (Affymetrix) used to obtain intensity signal and quality data from scanned arrays. The software provides summary reports and metrics including average background, positive versus negative areas under the curve and expression ratios for the presence of spikes in controls, useful for array QC evaluation.

q-PCR validation

To validate changes of down or up-regulated genes, transcript expression was analyzed by qPCR using the same RNA pools used in the Affymetrix arrays.

The cDNA was synthesized using the Taqman Gold RT-PCR kit (Life Technologies) from high quality RNA (RIN \geq 9.8), according to the instructions provided by the manufacturer. All qPCR reactions were performed in triplicate using the Taqman Universal Master Mix and the indicated Taqman probes on a ViiA™ 7 real-time PCR system (Life Technologies) in a final volume of 20 μ l. Temperature conditions and number of cycles were set as recommended by the provider. The quantitative analysis of transcripts was carried out using the comparative $\Delta\Delta$ Ct method and GAPDH expression used as an endogenous control. A Welch Two Sample t-test was used and a P-value of <0.05 was considered statistically significant in all cases.

Microarray Data Analysis

The Human Gene 1.0 ST is designed to investigate 28,869 well-annotated genes. Signal intensity from 21 arrays in CEL format were analyzed using the Partek Genomic Suite version 6.4 (Partek). Raw intensity probes values were imported by setting up a robust multiarray analysis background correction. To identify differentially expressed genes, a two way ANOVA was performed. From the results of these analyses, genes with $P < 0.05$ and 2.0- fold change (FC) in either direction were identified as being differentially expressed.

Data presented and discussed in this study have been deposited in the NCBI's Gene Expression Omnibus3 and accessible through the GEO Series accession number GSE68021 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE68021>).

Network analysis

Network analysis, including the enrichment and upstream analysis was performed using the Pathway Analysis Suite (Ingenuity), where elaboration of pathways and networks was carried out.

Acknowledgments

We thank the Expression Analysis Unit at INMEGEN for expert technical assistance and Dr. José Gutiérrez Salinas from the National Medical Center “20 de Noviembre” for plasma sample donation and management.

Sources of Funding: This study was supported by grants from CONACyT (180726 granted to JM-O) DGAPA/UNAM (IN205814-3 granted to JM-O) and INMEGEN (25/2011/I) granted to JPR-G).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SDZ JMO JPRG.

Performed the experiments: SDZ MZIA LUF BDC KPMA.

Analyzed the data: SDZ EHL JMO BDC LUF PTI JPRG.

Contributed reagents/materials/analysis tools: SDZ EHL JMO BDC LUF PTI JPRG.

Wrote the paper: SDZ EHL JMO BDC LUF PTI JPRG.

References

1. The top 10 causes of death. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.
2. INEGI (National Institute of Statistics and Geography) from: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/>
3. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000; 407(6801):233–41. doi: [10.1038/35025203](https://doi.org/10.1038/35025203) PMID: [11001066](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11001066/); PubMed Central PMCID: [PMC2826222](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2826222/).
4. Libby P, Egan D, Skarlatos S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation*. 1997; 96(11):4095–103. doi: [10.1161/01.cir.96.11.4095](https://doi.org/10.1161/01.cir.96.11.4095) PMID: [9403635](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9403635/).
5. Qi X, Zhang Y, Li J, Hou D, Xiang Y. Effect of PGC-1alpha on proliferation, migration, and transdifferentiation of rat vascular smooth muscle cells induced by high glucose. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2012; 2012:756426. doi: [10.1155/2012/756426](https://doi.org/10.1155/2012/756426) PMID: [22461724](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22461724/); PubMed Central PMCID: [PMC3303719](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3303719/).
6. Schachter M. Vascular smooth muscle cell migration, atherosclerosis, and calcium channel blockers. *International journal of cardiology*. 1997; 62 Suppl 2:S85–90. doi: [10.1016/s0167-5273\(97\)00245-3](https://doi.org/10.1016/s0167-5273(97)00245-3) PMID: [9488199](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9488199/).
7. Schwartz SM. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *Journal of Clinical Investigation*. 1997; 99(12):2814–6. doi: [10.1172/JCI119472](https://doi.org/10.1172/JCI119472) PMID: [9185501](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9185501/); PubMed Central PMCID: [PMC508129](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC508129/).
8. Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological reviews*. 2004; 84(4):1381–478. Epub 2004/09/24. doi: [10.1152/physrev.00047.2003](https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2003) PMID: [15383655](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15383655/).
9. Katsuda S, Boyd HC, Fligner C, Ross R, Gown AM. Human atherosclerosis. III. Immunocytochemical analysis of the cell composition of lesions of young adults. *Am J Pathol*. 1992; 140(4):907–14. PMID: [1562051](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1562051/); PubMed Central PMCID: [PMC51886367](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC51886367/).
10. Strydom HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr., et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15(9):1512–31. doi: [10.1161/01.atv.15.9.1512](https://doi.org/10.1161/01.atv.15.9.1512) PMID: [7670967](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7670967/).
11. Schwenke DC, Carew TE. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. II. Selective retention of LDL vs. selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries. *Arteriosclerosis*. 1989; 9(6):908–18. doi: [10.1161/01.atv.9.6.908](https://doi.org/10.1161/01.atv.9.6.908) PMID: [2590068](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2590068/).
12. Berneis KK. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *The Journal of Lipid Research*. 2002; 43(9):1363–79. doi: [10.1194/jlr.R200004-JLR200](https://doi.org/10.1194/jlr.R200004-JLR200) PMID: [12235168](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12235168/)
13. Garcia-Sanchez C, Torres-Tamayo M, Juarez-Meavepena M, Lopez-Osorio C, Toledo-Ibelle P, Monter-Garrido M, et al. Lipid plasma concentrations of HDL subclasses determined by enzymatic staining on polyacrylamide electrophoresis gels in children with metabolic syndrome. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2011; 412(3–4):292–8. doi: [10.1016/j.cca.2010.10.021](https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.10.021) PMID: [21036160](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21036160/).
14. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979; 76(1):333–7. doi: [10.1073/pnas.76.1.333](https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.333) PMID: [218198](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/218198/); PubMed Central PMCID: [PMC382933](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC382933/).
15. Rizzo M, Berneis K. Low-density lipoprotein size and cardiovascular risk assessment. *QJM: monthly journal of the Association of Physicians*. 2006; 99(1):1–14. Epub 2005/12/24. doi: [10.1093/qjmed/hci154](https://doi.org/10.1093/qjmed/hci154) PMID: [16371404](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16371404/).
16. Bolanos-Garcia VM, Soriano-Garcia M, Mas-Oliva J. Stability of the C-terminal peptide of CETP mediated through an (i, i + 4) array. *Biochimica et biophysica acta*. 1998; 1384(1):7–15. doi: [10.1016/s0167-4838\(97\)00156-8](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(97)00156-8) PMID: [9602025](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9602025/).
17. Mendoza-Espinosa P, Moreno A, Castillo R, Mas-Oliva J. Lipid dependant disorder-to-order conformational transitions in apolipoprotein CI derived peptides. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008; 365(1):8–15. Epub 2007/10/31. doi: [10.1016/j.bbrc.2007.10.112](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.10.112) PMID: [17967413](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17967413/).

18. Pfanzagl B. LDL oxidized with iron in the presence of homocysteine/cystine at acidic pH has low cytotoxicity despite high lipid peroxidation. *Atherosclerosis*. 2006; 187(2):292–300. Epub 2005/11/01. doi: [10.1016/j.atherosclerosis.2005.09.024](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.09.024) PMID: [16256999](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16256999/).
19. Kuhn H, Heydeck D, Hugou I, Gniwotta C. In vivo action of 15-lipoxygenase in early stages of human atherogenesis. *Journal of Clinical Investigation*. 1997; 99(5):888–93. doi: [10.1172/JCI119253](https://doi.org/10.1172/JCI119253) PMID: [9062346](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9062346/); PubMed Central PMCID: PMC507896.
20. Manzano-Leon N, Mas-Oliva J, Sevilla-Tapia L, Morales-Barcenas R, Serrano J, MS ON, et al. Particulate matter promotes in vitro receptor-recognizable low-density lipoprotein oxidation and dysfunction of lipid receptors. *J Biochem Mol Toxicol*. 2013; 27(1):69–76. doi: [10.1002/jbt.21452](https://doi.org/10.1002/jbt.21452) PMID: [23297186](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23297186/); PubMed Central PMCID: PMC4345123.
21. Steinberg D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. *Journal of lipid research*. 2009; 50 Suppl:S376–81. Epub 2008/11/18. doi: [10.1194/jlr.R800087-JLR200](https://doi.org/10.1194/jlr.R800087-JLR200) PMID: [19011257](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19011257/); PubMed Central PMCID: PMC2674707.
22. Hansen-Hagge TE, Baumeister E, Bauer T, Schmiedeke D, Renne T, Wannner C, et al. Transmission of oxLDL-derived lipid peroxide radicals into membranes of vascular cells is the main inducer of oxLDL-mediated oxidative stress. *Atherosclerosis*. 2008; 197(2):602–11. Epub 2007/10/24. doi: [10.1016/j.atherosclerosis.2007.08.029](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.08.029) PMID: [17950298](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17950298/).
23. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, et al. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *Journal of Clinical Investigation*. 1996; 97(7):1715–22. doi: [10.1172/JCI118598](https://doi.org/10.1172/JCI118598) PMID: [8601637](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8601637/); PubMed Central PMCID: PMC507236.
24. Navab M, Imes SS, Hama SY, Hough GP, Ross LA, Bork RW, et al. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *Journal of Clinical Investigation*. 1991; 88(6):2039–46. doi: [10.1172/JCI115532](https://doi.org/10.1172/JCI115532) PMID: [1752961](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1752961/); PubMed Central PMCID: PMC295797.
25. Vora DK, Fang ZT, Liva SM, Tyner TR, Parhami F, Watson AD, et al. Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins. Separate effects on synthesis and surface expression. *Circ Res*. 1997; 80(6):810–8. doi: [10.1161/01.res.80.6.810](https://doi.org/10.1161/01.res.80.6.810) PMID: [9168783](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9168783/).
26. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet*. 1996; 347(9004):781–6. doi: [10.1016/s0140-6736\(96\)90866-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)90866-1) PMID: [8622332](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8622332/).
27. Sundell CL, Somers PK, Meng CQ, Hoong LK, Suen KL, Hill RR, et al. AGI-1067: a multifunctional phenolic antioxidant, lipid modulator, anti-inflammatory and antiatherosclerotic agent. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2003; 305(3):1116–23. Epub 2003/03/11. doi: [10.1124/jpet.102.048132](https://doi.org/10.1124/jpet.102.048132) PMID: [12626663](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12626663/).
28. Majesky MW, Dong XR, Høglund V, Mahoney WM, Jr., Daum G. The adventitia: a dynamic interface containing resident progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; 31(7):1530–9. Epub 2011/06/17. doi: [10.1161/ATVBAHA.110.221549](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.221549) PMID: [21677296](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21677296/); PubMed Central PMCID: PMC3382115.
29. Satoh K, Nigro P, Berk BC. Oxidative stress and vascular smooth muscle cell growth: a mechanistic linkage by cyclophilin A. *Antioxid Redox Signal*. 2010; 12(5):675–82. doi: [10.1089/ars.2009.2875](https://doi.org/10.1089/ars.2009.2875) PMID: [19747062](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19747062/); PubMed Central PMCID: PMC2861539.
30. Tchivilev I, Madamanchi NR, Vendrov AE, Niu XL, Runge MS. Identification of a protective role for protein phosphatase 1gamma1 against oxidative stress-induced vascular smooth muscle cell apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2008; 283(32):22193–205. Epub 2008/06/10. doi: [10.1074/jbc.M803452200](https://doi.org/10.1074/jbc.M803452200) PMID: [18540044](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18540044/); PubMed Central PMCID: PMC2494915.
31. Charles RL, Eaton P. Redox signalling in cardiovascular disease. *Proteomics Clinical applications*. 2008; 2(6):823–36. doi: [10.1002/prca.200780104](https://doi.org/10.1002/prca.200780104) PMID: [21136882](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21136882/).
32. Pezuk JA, Brassesco MS, Morales AG, de Oliveira JC, de Oliveira HF, Scrideli CA, et al. Inhibition of polo-like kinase 1 induces cell cycle arrest and sensitizes glioblastoma cells to ionizing radiation. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*. 2013; 28(7):516–22. Epub 2013/05/30. doi: [10.1089/cbr.2012.1415](https://doi.org/10.1089/cbr.2012.1415) PMID: [23713868](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23713868/); PubMed Central PMCID: PMC3741430.
33. Blackwood EM, Luscher B, Kretzner L, Eisenman RN. The Myc:Max protein complex and cell growth regulation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1991; 56:109–17. doi: [10.1101/SQB.1991.056.01.015](https://doi.org/10.1101/SQB.1991.056.01.015) PMID: [1819481](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1819481/).
34. Portal MM, Ferrero GO, Caputto BL. N-Terminal c-Fos tyrosine phosphorylation regulates c-Fos/ER association and c-Fos-dependent phospholipid synthesis activation. *Oncogene*. 2007; 26(24):3551–8. doi: [10.1038/sj.onc.1210137](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210137) PMID: [17160021](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17160021/).

35. Xu J, Testa JR. DLX5 (distal-less homeobox 5) promotes tumor cell proliferation by transcriptionally regulating MYC. *The Journal of biological chemistry*. 2009; 284(31):20593–601. doi: [10.1074/jbc.M109.021477](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.021477) PMID: [19497851](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19497851/); PubMed Central PMCID: [PMC2742824](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC/PMC2742824/).
36. Gartel AL, Shchors K. Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. *Exp Cell Res*. 2003; 283(1):17–21. doi: [10.1016/s0014-4827\(02\)00020-4](https://doi.org/10.1016/s0014-4827(02)00020-4) PMID: [12565816](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12565816/).
37. Kular L, Pakradouni J, Kitabgi P, Laurent M, Martinerie C. The CCN family: a new class of inflammation modulators? *Biochimie*. 2011; 93(3):377–88. doi: [10.1016/j.biochi.2010.11.010](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.11.010) PMID: [21130134](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21130134/).
38. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993; 4(2):197–250. Epub 1993/01/01. PMID: [8435466](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8435466/).
39. Gerthoffer WT. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res*. 2007; 100(5):607–21. doi: [10.1161/01.RES.0000258492.96097.47](https://doi.org/10.1161/01.RES.0000258492.96097.47) PMID: [17363707](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17363707/).
40. Kaminski WE, Wenzel JJ, Piehler A, Langmann T, Schmitz G. ABCA6, a novel subclass ABC transporter. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001; 285(5):1295–301. doi: [10.1006/bbrc.2001.5326](https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5326) PMID: [11478798](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11478798/).
41. Piehler A, Kaminski WE, Wenzel JJ, Langmann T, Schmitz G. Molecular structure of a novel cholesterol-responsive A subclass ABC transporter, ABCA9. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002; 295(2):408–16. doi: [10.1016/s0006-291x\(02\)00659-9](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)00659-9) PMID: [12150964](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12150964/).
42. Levitan I, Volkov S, Subbaiah PV. Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal*. 2010; 13(1):39–75. doi: [10.1089/ars.2009.2733](https://doi.org/10.1089/ars.2009.2733) PMID: [19888833](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19888833/); PubMed Central PMCID: [PMC2877120](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC/PMC2877120/).
43. Jimenez-Corona AE, Damian-Zamacona S, Perez-Torres A, Moreno A, Mas-Oliva J. Osteopontin upregulation in atherogenesis is associated with cellular oxidative stress triggered by the activation of scavenger receptors. *Archives of medical research*. 2012; 43(2):102–11. Epub 2012/03/14. doi: [10.1016/j.arcmed.2012.03.001](https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2012.03.001) PMID: [22410136](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22410136/).
44. Zheng JY, Koda T, Fujiwara T, Kishi M, Ikehara Y, Kakinuma M. A novel Rab GTPase, Rab33B, is ubiquitously expressed and localized to the medial Golgi cisternae. *J Cell Sci*. 1998; 111 (Pt 8):1061–9. PMID: [9512502](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9512502/).
45. Itoh T, Fujita N, Kanno E, Yamamoto A, Yoshimori T, Fukuda M. Golgi-resident small GTPase Rab33B interacts with Atg16L and modulates autophagosome formation. *Molecular biology of the cell*. 2008; 19(7):2916–25. Epub 2008/05/02. doi: [10.1091/mbc.E07-12-1231](https://doi.org/10.1091/mbc.E07-12-1231) PMID: [18448665](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18448665/); PubMed Central PMCID: [PMC2441679](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC/PMC2441679/).
46. Miller AM, Asquith DL, Hueber AJ, Anderson LA, Holmes WM, McKenzie AN, et al. Interleukin-33 induces protective effects in adipose tissue inflammation during obesity in mice. *Circ Res*. 2010; 107(5):650–8. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.110.218867](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.218867) PMID: [20634488](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20634488/); PubMed Central PMCID: [PMC4254700](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC/PMC4254700/).
47. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nature medicine*. 2011; 17(11):1410–22. Epub 2011/11/09. doi: [10.1038/nm.2538](https://doi.org/10.1038/nm.2538) PMID: [22064431](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22064431/).
48. Guo J, Li L, Wu YJ, Yan Y, Xu XN, Wang SB, et al. Inhibitory effects of Brazilin on the vascular smooth muscle cell proliferation and migration induced by PDGF-BB. *Am J Chin Med*. 2013; 41(6):1283–96. doi: [10.1142/S0192415X13500869](https://doi.org/10.1142/S0192415X13500869) PMID: [24228601](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24228601/).
49. Bochkov VN, Leitinger N. Anti-inflammatory properties of lipid oxidation products. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2003; 81(10):613–26. doi: [10.1007/s00109-003-0467-2](https://doi.org/10.1007/s00109-003-0467-2) PMID: [13679995](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13679995/).
50. Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *The New England journal of medicine*. 2010; 363(2):147–55. doi: [10.1056/NEJMoa0905955](https://doi.org/10.1056/NEJMoa0905955) PMID: [20573916](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20573916/).
51. Minta J, Jungwon Yun J, St Bernard R. Microarray analysis of ox-LDL (oxidized low-density lipoprotein)-regulated genes in human coronary artery smooth muscle cells. *Cell Biol Int Rep (2010)*. 2010; 17(2):e00007. doi: [10.1042/CFR20100006](https://doi.org/10.1042/CFR20100006) PMID: [23119143](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23119143/); PubMed Central PMCID: [PMC3475437](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC/PMC3475437/).
52. Christen T, Bochaton-Piallat ML, Neuville P, Rensen S, Redard M, van Eys G, et al. Cultured porcine coronary artery smooth muscle cells. A new model with advanced differentiation. *Circ Res*. 1999; 85(1):99–107. doi: [10.1161/01.res.85.1.99](https://doi.org/10.1161/01.res.85.1.99) PMID: [10400915](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10400915/).
53. Patel S, Shi Y, Niculescu R, Chung EH, Martin JL, Zalewski A. Characteristics of coronary smooth muscle cells and adventitial fibroblasts. *Circulation*. 2000; 101(5):524–32. doi: [10.1161/01.cir.101.5.524](https://doi.org/10.1161/01.cir.101.5.524) PMID: [10662750](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10662750/).
54. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015; 214(1):33–50. doi: [10.1111/apha.12466](https://doi.org/10.1111/apha.12466) PMID: [25677529](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25677529/).

55. Rensen SS, Doevendans PA, van Eys GJ. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J*. 2007; 15(3):100–8. doi: [10.1007/bf03085963](https://doi.org/10.1007/bf03085963) PMID: [17612668](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17612668/); PubMed Central PMCID: [PMCPMC1847757](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1847757/).
56. Chatterjee S. Role of oxidized human plasma low density lipoproteins in atherosclerosis: effects on smooth muscle cell proliferation. *Molecular and cellular biochemistry*. 1992; 111(1–2):143–7. doi: [10.1007/bf00229586](https://doi.org/10.1007/bf00229586) PMID: [1588938](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1588938/).
57. Felty Q, Xiong WC, Sun D, Sarkar S, Singh KP, Parkash J, et al. Estrogen-induced mitochondrial reactive oxygen species as signal-transducing messengers. *Biochemistry*. 2005; 44(18):6900–9. doi: [10.1021/bi047629p](https://doi.org/10.1021/bi047629p) PMID: [15865435](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15865435/).
58. Morrissey JJ, Klahr S. Agmatine activation of nitric oxide synthase in endothelial cells. *Proc Assoc Am Physicians*. 1997; 109(1):51–7. PMID: [9010916](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9010916/).
59. Mesquita FS, Dyer SN, Heinrich DA, Bulun SE, Marsh EE, Nowak RA. Reactive oxygen species mediate mitogenic growth factor signaling pathways in human leiomyoma smooth muscle cells. *Biol Reprod*. 2010; 82(2):341–51. doi: [10.1095/biolreprod.108.075887](https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.075887) PMID: [19741209](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19741209/); PubMed Central PMCID: [PMCPMC2809225](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2809225/).
60. Tsimikas S. Oxidative biomarkers in the diagnosis and prognosis of cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2006; 98(11A):9P–17P. doi: [10.1016/j.amjcard.2006.09.015](https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2006.09.015) PMID: [17126679](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17126679/).
61. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annu Rev Immunol*. 2009; 27:165–97. doi: [10.1146/annurev.immunol.021908.132620](https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132620) PMID: [19302038](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19302038/); PubMed Central PMCID: [PMCPMC2734407](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2734407/).
62. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. 1999; 138(5 Pt 2):S419–20. doi: [10.1016/S0002-8703\(99\)70266-8](https://doi.org/10.1016/S0002-8703(99)70266-8) PMID: [10539839](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10539839/).
63. Aguilar-Gaytan R, Mas-Oliva J. Oxidative stress impairs endocytosis of the scavenger receptor class A. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003; 305(3):510–7. doi: [10.1016/S0006-291x\(03\)00796-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291x(03)00796-4) PMID: [WOS:000183355500011](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/WOS:000183355500011/).
64. Innerarity TL, Pitas RE, Mahley RW. Lipoprotein-receptor interactions. *Methods Enzymol*. 1986; 129:542–65. doi: [10.1016/0076-6879\(86\)29091-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)29091-6) PMID: [2425225](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2425225/).
65. Mahley RW, Innerarity TL, Weisgraber KH, Fry DL. Canine hyperlipoproteinemia and atherosclerosis. Accumulation of lipid by aortic medial cells in vivo and in vitro. *Am J Pathol*. 1977; 87(1):205–26. PMID: [192082](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/192082/); PubMed Central PMCID: [PMCPMC2032077](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2032077/).
66. Pitas RE, Innerarity TL, Mahley RW. Cell surface receptor binding of phospholipid. protein complexes containing different ratios of receptor-active and -inactive E apoprotein. *The Journal of biological chemistry*. 1980; 255(11):5454–60. PMID: [7372644](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7372644/).
67. Pitas RE, Innerarity TL, Weinstein JN, Mahley RW. Acetoacetylated lipoproteins used to distinguish fibroblasts from macrophages in vitro by fluorescence microscopy. *Arteriosclerosis*. 1981; 1(3):177–85. doi: [10.1161/01.atv.1.3.177](https://doi.org/10.1161/01.atv.1.3.177) PMID: [6895305](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6895305/).



Antioxidants in the Fight Against Atherosclerosis: Is This a Dead End?

Paola Toledo-Ibelles¹ · Jaime Mas-Oliva¹

Published online: 21 May 2018
© The Author(s) 2018

Abstract

Purpose of Review The purpose of this review is to focus on the outcome of recent antioxidant interventions using synthetic and naturally occurring molecules established as adjuvant strategies to lipid-lowering or anti-inflammatory therapies designed to reduce the risk of cardiovascular disease.

Recent Findings To date, accumulated evidence regarding oxidation as a pro-atherogenic factor indicates that redox biochemical events involved in atherogenesis are indeed a very attractive target for the management of cardiovascular disease in the clinic. Nevertheless, although evidence indicates that redox reactions are important in the initiation and progression of atherosclerosis, oxidation with a pro-atherogenic context does not eliminate the fact that oxidation participates in many cases as an essential messenger of important cellular signaling pathways. Therefore, disease management and therapeutic goals require not only high-precision and high-sensitivity methods to detect in plasma very low amounts of reducing and oxidizing molecules but also a much better understanding of the normal processes and metabolic pathways influenced and/or controlled by oxidative stress. As several methodologies have been specifically described for the quantification of the total antioxidant capacity and the oxidation state of diverse biological systems, a successful way to carefully study how redox reactions influence atherosclerosis can be achieved.

Summary Since there is still a lack of standardization with many of these methods, clinical trials studying antioxidant capacity have been difficult to compare and therefore difficult to use in order to reach a conclusion. We believe a comprehensive analysis of new knowledge and its relationship with the presence of plasma antioxidants and their reducing capacity will undoubtedly open new ways to understand and develop new therapeutic pathways in the fight not only against atherosclerosis but also against other degenerative diseases.

Keywords Atherosclerosis · Cardiovascular disease · Antioxidant therapy · Redox reactions · Standardization factors

Oxidative Stress and Atherosclerosis

Cardiovascular diseases (CVDs) are nowadays considered the clinical complications with the greatest impact on mortality in the western world. According to WHO's most recent records, CVDs were responsible for a total of 46% of deaths due to non-communicable diseases in 2012 [1]. Among CVDs, coronary heart disease and stroke are the ones with the greatest impact since in addition to causing a high frequency of deaths, they occur at ages that are still far from the maximum life expectancy as rated by WHO [2, 3]. These diseases are the clinical

manifestation of the pathophysiological process known as atherosclerosis, related to inflammation and the accumulation in the blood vessels of the ketone and hydroxide forms of lipids derived from the non-enzymatic oxidation of cholesterol and polyunsaturated fatty acids (PUFA) [4, 5]. It has been proposed that these lipids originate from low-density lipoproteins (LDLs), which in their oxidized form (oxLDL) are taken up by receptors such as LOX-1, SR-A, and SR-B. Unlike the receptor that recognizes native low-density particles (LDLR), these are not regulated by intracellular cholesterol levels and allow an excessive increase of cholesterol inside the cell generating the so-called macrophage-derived foam cells [5].

Following pioneer studies carried out by Goldstein and Brown who first proposed a binding site on macrophages for chemically modified LDL uptake such as acetylated and maleylated LDL [6]; in the 1980s and the 1990s, classical studies by J.L. Witztum defined that an important LDL modification is associated with the oxidation of LDL particles [7]. By incubating LDL with cultured endothelial cells or smooth

This article is part of the Topical Collection on *Nonstatin Drugs*

✉ Jaime Mas-Oliva
jmas@ifc.unam.mx

¹ Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

muscle cells, they showed that the newly created oxidized forms are rapidly internalized in a saturable manner.

Currently, the most widely accepted hypothesis regarding atherogenesis proposes that atherosclerosis initiates its development with LDL entrance from the bloodstream into the subendothelial space, between the tunica intima and media, where cellular metabolism fosters its oxidation, phagocytosis by macrophages and their consequent overloading of intracellular lipids [8, 9]. Moreover, oxLDLs act as a chemotactic factor for monocytes and induces epigenetic modifications that exacerbate proinflammatory cytokine production [10, 11]. Also, PPAR- γ activation by the oxidized lipid fraction leads to differentiation into macrophages where oxLDL-stimulated macrophages are prone to migrate through a mechanism dependent on intracellular nitrosative stress and lipid peroxidation favoring their accumulation in the plaque [12, 13]. Moreover, since modified lipoproteins affect vascular cells as well, it has been found that endothelial cells increase their level of intracellular oxidative stress without oxLDL internalization due to the formation of reactive oxygen species (ROS) that permeate through the cell membrane [14]. Additionally, proinflammatory cytokines stimulate the proliferation and migration of smooth muscle cells, confining foam cells within fibrous tissue through mechanisms dependent on MAPK and NF-KB signaling [15], where a cytokine such as osteopontin involved in inflammatory and calcification processes promotes atheroma growth [16, 17]. In this way, ROS and reactive nitrogen species (RNS) present in the vascular environment create a pro-atherogenic condition exacerbated by the presence of an impaired equilibrium between the oxidizing and reducing capacity of the cell, a state known as oxidative stress.

Thus, the importance of oxidative stress in the development of atherosclerosis also relies on cellular responses triggered by an inadequate equilibrium between oxidants and reductants at different layers of the vascular tissue [18]. The diverse oxidation-reduction reactions that take place in this tissue consist of a strict exchange of electrons between molecules generating specific electric potentials (E°) that can be modified by diverse tissue conditions. The electric potential will be greater for compounds prone to be reduced, where the most favorable reaction occurs between the strongest oxidant and the strongest reductant present in the reaction mixture [19], mostly mediated by ROS and RNS [20]. Although ROS and RNS present the capacity to oxidize many biomolecules, reductant molecules present in the microenvironment present the property to counteract the process. A strong oxidant such as the hydroxyl-radical might react with a strong reductant such as ascorbic acid, preventing an unwanted oxidation process and therefore becoming an “antioxidant,” a bioavailable reductant molecule that could prevent the progress of oxidative stress [21].

While the difference in potential provides information about the physicochemical characteristics of the reaction, it is still dependent on the concentration of reactants as well as

on cellular location. Although ascorbic acid ($E^\circ = 282$ mV) is a stronger reductant than α -tocopherol ($E^\circ = 500$ mV), the hydrophobic nature of tocopherol increases its antioxidant capacity, for instance against LDL-lipoperoxide formation, reason why tocopherol has attracted so much attention as an antioxidant in clinical research [22]. Since oxidation of lipids in plasma only occurs when ascorbic acid and α -tocopherol are, in turn, also oxidized [23], in a biological context, redox reactions depend on factors such as affinity of these molecules for lipoproteins, membranes, and/or diverse cellular compartments [24] (Fig. 1). Although the clinical approach for the use of antioxidant treatment is well supported and in some cases effective, this kind of supplementation still presents too many variables that require extensive analysis to conclusively prove its effect upon the process of atherogenesis in order to be thoroughly used in a clinical setting.

In this sense, it is interesting to mention that several years ago, Tsimikas et al. reported levels of oxidized LDL and Lp(a) lipoprotein in a total of 504 patients immediately before coronary angiography was carried out [27]. Interestingly, in the entire group of patients studied, the association between obstructive coronary artery disease and the ratio between oxidized phospholipid/apoB was independent of all lipid measurements and clinical condition except for Lp(a) lipoprotein. With these results in hand, they were able to conclude that circulating levels of oxidized LDL are strongly correlated in patients who present the diagnosis of coronary artery disease angiographically supported [27]. Overall, this kind of clinical data in great measure support observations and the early proposal made by JL Witztum focusing on the role oxidized LDL particles play during the process of atherogenesis [7].

Vitamins and Antioxidant Molecules

The oxidative balance of the endothelial cell is highly related to the metabolism of lipoproteins and therefore to the development of atheroma lesions. In this regard, patients hospitalized for an acute myocardial infarction and, in general, populations at high cardiovascular risk tend to present a low non-enzymatic antioxidant capacity [28] and therefore a low plasma concentration of antioxidants [29, 30]. Epidemiological evidence suggests that plasma concentrations of different antioxidant compounds show an inverse relationship between the seriousness of the atherosclerotic process and its clinical manifestations, supporting the atheroprotective properties of several antioxidants [29].

Carotenoids correspond to a series of compounds synthesized by plants with redox potentials ranging from 980 to 1060 mV [30] and considered as weak reductants. Interestingly, populations showing high plasma concentrations of carotenoids, including cryptoxanthin, lycopene, and α -carotene, present a lower intima-media thickness than subjects with low plasma concentrations of these compounds [31]. In addition, α - and β -carotene

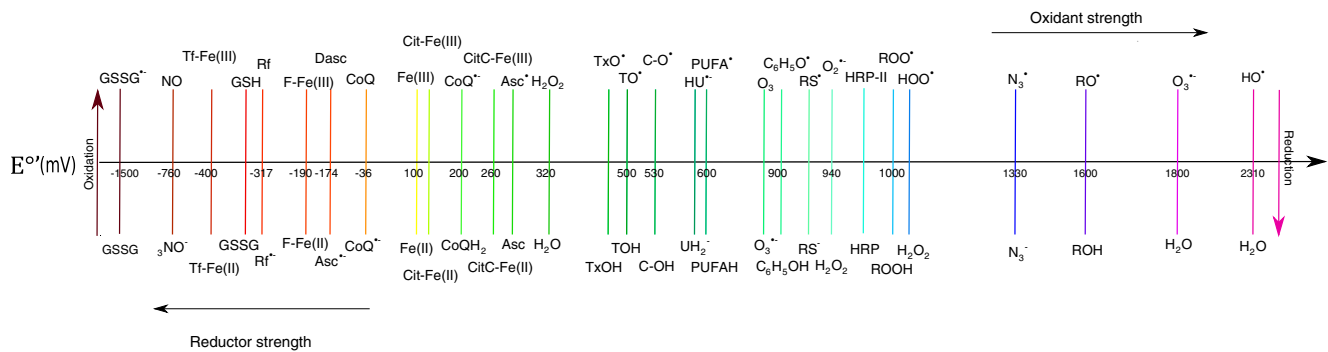


Fig. 1 Redox potentials of biochemically relevant chemical species. Glutathione (GSSG), transferrin (Tf), riboflavin (Rf), ferritin (F), coenzyme Q (CoQ), citrate (Cit), cytochrome C (CitC), ascorbate (Asc),

trolox (TxOH), tocopherol (TOH), catechol (C), uric acid(UH₂⁻), polyunsaturated fatty acid (PUFA H₂), free cysteine from protein (RS), horseradish peroxidase (HRP) [18, 25, 26]

concentrations have shown an inverse association with atherosclerosis when the presence of plaque in the carotid and femoral arteries was evaluated by ultrasound [32]. Also, when β -carotene negatively correlates with interleukin-6, the inflammatory process is favored [33]. Nevertheless, despite the evidence regarding the correlation between the protective effect of carotenoids and the presence of a lower cardiovascular risk, statistical significance of most results has not been maintained after correction for the presence of risk factors such as high blood pressure and high cholesterol levels [34]. Similarly, no statistically significant results were found in a population of 22,000 men receiving for 12 years an oral administration of β -carotene [35]. Among carotenoids, lycopene has been identified to be the compound with the highest reducing capacity tested in reactions involving a singlet oxygen (650 mV) [36]. This reducing capacity has aroused interest related to atherosclerosis; however, its activity has only shown to reduce LDL oxidation in vitro [37], but not lipid peroxidation or LDL oxidation in vivo [38].

According to ultrasonic evidence, asymptomatic patients that show the presence of plaque in the carotid arteries in comparison to patients with normal arteries present low plasma concentrations of lycopene [39]. These results are supported by the fact that lycopene administration along with other antioxidants drastically reduces atherosclerotic plaque in transgenic mice models [40] and in healthy volunteers improves endothelial function [41, 42]. Among these properties, lycopene promoted the metabolism of lipids through changes in protein expression in both in vitro and in vivo models [43]. Although these results suggest that lycopene presents a strong atheroprotective capacity due to its diverse biological activities, it is still necessary to understand the specific metabolic pathways that become modified in order to fully explain its molecular effects [44–46].

Since strong reductants are expected to generate better clinical outcomes, new research employing tocopherol, presenting a protective role for LDL oxidation, has been launched with its natural source, vitamin E, together with several

chemically derived molecules [23, 47–51]. In this respect, although the presence of vitamin E in plasma shows an inverse correlation with the development of ischemic heart disease [49] and its consumption is associated with a lower incidence of CAD [50], it has been observed that the molecule is oxidized in plasma before LDL particles are affected when synthetically oxidizing systems are employed [23]. The administration of α -tocopherol produced a dramatic decrease (77%) in the risk of non-fatal myocardial infarction in a population with a clinical history and angiographic evidence of coronary atherosclerosis [45]. Nevertheless, according to the α -tocopherol, β -carotene supplementation on coronary heart disease (ATBC) study, the molecule marginally decreased the incidence of major coronary events and fatal coronary heart disease (4 and 8%, respectively) [51]. The ATBC cohort monitored for 6 years showed that at the end of the clinical trial, the incidence of a first-ever major coronary event non-fatal myocardial infarction, or fatal coronary artery disease, did not decrease. Nevertheless, the follow up of patients 2 years after the completion of this study showed a significant decrease in incidence rates but was not further analyzed [52]. Several other trials have shown results that were not equally encouraging since treatment with vitamin E in a population with high cardiovascular risk and a history of cardiovascular disease, diabetes, and other risk factors did not reduce the prevalence of cardiovascular-associated deaths [53] even in combination with vitamin C, β -carotene, or both [54–59].

Ascorbic acid can be considered a reductant of average strength with respect to the range of chemical species present in plasma. Induced atherosclerosis in animal models, either by promoting changes in cholesterol metabolism or by oxidative stress, showed up to half the size of plaque in a vitamin C-administered group [55, 56]. Although it is hydrophilic in nature, ascorbic acid reduced up to 60% the oxidation of LDL by myeloperoxidase in contrast to the lack of effects produced by tocopherol [54] at plasma concentrations [58, 59]. On the other hand, co-administration of vitamins in experimental atherosclerosis produced superior positive changes

in the size of the atherosclerotic plaque and in the presence of oxidation markers in comparison to treatment with each of the antioxidants separately [55]. Diverse clinical trials performed in different populations presenting a high ascorbic acid plasma concentration showed a low prevalence of angina [58]. Moreover, the administration of large doses was associated with a reduced cardiovascular risk [60] in support of studies showing that low plasma ascorbic acid concentrations are associated with a higher incidence of myocardial infarction [61]. A meta-analysis of 44 clinical trials showed a relationship between the administration of doses over 500 mg/day of vitamin C and an improvement in endothelial function for patients with diabetes, atherosclerosis, and heart failure, despite the fact that no improvement was found in healthy volunteers [62]. However, in a more ambitious approach, administration of ascorbic acid to 70-year-old patients did not diminish the incidence of deaths due to cardiovascular disease [54] nor did modify the conventional parameters of cardiovascular risk, such as markers for oxidative stress [63].

The sum of these results thus far, although not conclusive regarding the potential benefits of antioxidant therapies, might be related to the fact that the methodology employed is not the same in every trial, a situation that will have to be further investigated in the near future. Several of these studies do not allow detecting the level of protection because specific concentrations of antioxidants in plasma were not reported. Additionally, several epidemiological studies lack the analysis of the initial conditions of the total antioxidant capacity of plasmas, since the same benefit is not necessarily provided to all individuals with the same antioxidant dose when the benefit due to the administration of antioxidants was recorded only when there was a prior deficiency [64]. It is feasible to suppose that not all people are subjected to the same oxidative stress, that not all people have the same antioxidant defenses, and that they all do not have the same response to the same treatment. Since as shown in several studies these variables have not been considered in the design and analysis of the clinical trials, this may be one of the reasons why results range from a 77% reduction to a lack of effectiveness when studying the incidence of myocardial infarction. In addition, an important premise in several of these trials has been forgotten as oxidative stress seems to be a crucial factor during atherogenesis and less critical when lesions are well established. Studies employing experimental atherosclerosis show that although the administration of antioxidants simultaneously to an atherogenic stimulus reduces the number of atherosclerotic lesions, in the clinic, the use of antioxidants has been mostly limited to populations of advanced age, omitting that the process of atherogenesis in humans may start before birth [65].

Due to the significant uncertainty surrounding the use of antioxidants, treatment with stronger reductant molecules chemically derived from tocopherol has been attempted with promising results. The case of probucol is extremely

interesting since its antioxidant capacity has been shown to be superior to that of the parent compound, reducing the atherosclerotic plaque from 54 to 7% and considerably reducing the ex vivo oxidation of LDL in animal models [66, 67]. High-cardiovascular-risk populations with atherosclerotic plaque confirmed by angiography showed a drastic reduction in high-density lipoprotein-associated cholesterol (HDL-C), an increase in the QTc interval, and a reduction in lumen volume from the start of a 3-year treatment with probucol and cholestyramine [68]. In consideration that lumen volume is not a clear reflection of the presence or severity of the atherosclerotic plaque, a study was conducted in hypercholesterolemic patients focusing on the thickness of the intima-media layer which was reduced by 14% in 2 years under probucol treatment [69]. Nevertheless, due to the importance attributed to maintaining the proper cholesterol metabolism during treatment, a decrease in HDL-C was a relevant factor against the use of probucol, which led to the search for other chemically synthesized antioxidants that would not adversely impact the normal lipid profile. The substitution of functional groups in one of probucol phenolic rings yielded the synthesis of succinobucol, an antioxidant compound that is not susceptible to modification by metabolism, thus preventing the formation of the hepatotoxic molecule spiroquinone and showing an anti-inflammatory action through binding to VCAM-1 [70]. Although succinobucol inhibited the development of atherosclerosis in different animal models and selectively decreased LDL-C and increased HDL-C [71], healthy subjects treated with succinobucol showed a decrease in HDL-C and apo AI concentrations, changes associated with an increase in LDL-C mainly through changes in the LDL3 subclass. These changes were also significantly correlated with an increase in plasma CETP mass. Moreover, administration of succinobucol to patients subjected to a percutaneous coronary intervention did not produce changes in the volume of plaque measured by intravascular ultrasound compared to placebo [72], while patients with prior acute coronary syndromes showed a lower incidence of myocardial infarction or cerebrovascular events [73]. Interestingly, a prolonged release of succinobucol studied in pigs using a metallic stent induced inflammation and tissue deterioration interfering with the healing process of blood vessels [74]. These disorders may be largely due to the inhibition of smooth muscle cell proliferation and also by an induced cell apoptosis allowing an increment in mitochondrial ROS through cytochrome c peroxidase activity, all of which prevent revascularization [75].

On the other hand, the hydrophobic antioxidant BO-653 inhibited LDL oxidation and the development of atherosclerotic lesions in different animal models compared to the effect of probucol [76]. Rabbits with vascular damage induced by denudation of the iliac artery under a cholesterol-enriched diet presented an effect upon c-myc, one of the cell cycle main controls, suggesting that the clinical use of probucol may

compromise re-endothelialization [77]. By comparison, administration of elsibucol to rabbits fed with a cholesterol-rich diet improved significantly IM thickness even in comparison with probucol. Unlike succinobucol, elsibucol-inhibited VSMC proliferation evens at concentrations four-times higher than those found in plasma, demonstrating also a level of re-endothelialization comparable to controls. Nevertheless, cholesterol metabolism showed some impairment since HDL-C was decreased with no apparent effect upon LDL-C. Although this could be considered a negative effect, it is necessary to assess the mechanisms of modification of lipoproteins in order to know whether this result corresponds to a retention of particles or to a more efficient elimination of excess lipids that could lead to a metabolic improvement [78, 79].

There have been some other attempts to control atherosclerosis with antioxidants from natural sources, like the study from Shen et al. showing that treatment of atherosclerotic mice with quercetin induces the expression of heme-oxygenase-1 and promotes a reduction in oxidative stress markers attenuating endothelial dysfunction induced by a lipid-rich diet or even strong oxidants [80, 81]. Surprisingly, all these benefits were obtained with a dosage close to the average daily intake reaching a concentration level well below its detection limit in plasma when employing highly sensitive techniques such as HPLC coupled with mass spectrometry [80]. Furthermore, the administration of quercetin in LDLR^{-/-} mice fed with an atherogenic diet and subjected to an exercise routine showed an enhancement of LDL resistance to oxidative modification and a reduction of plaque [81]. Quercetin administration associated with exercise showed an important increase in the hepatic expression of ABCA-1, apo A-4, and PPAR- α . However, concomitantly, there was a decrease in apo AI gene expression, the main protein component of the widely considered anti-atherogenic high-density lipoproteins, which resulted in a point against a daily use of quercetin [82]. Associated with the effects shown by quercetin, polyphenolic extracts obtained from grape seeds containing compounds such as hydroxycinnamic acid, flavonols, and stilbenes reduced intracellular oxidative stress through a lower expression of VCAM-1, ICAM-1, E-Selectin, MCP-1, and M-CSF that inhibited the binding of macrophages to endothelial cells activated by exposure to lipopolysaccharides [83]. Changes in protein expression were primarily due to the activation of the transcription factors NF- κ B and AP-1 by stimulation with lipopolysaccharides. Both factors are characteristic of systems presenting oxidative stress associated with several inflammatory responses and their activation [84–86].

Therefore, the statistical correlation between plasma concentrations and the atherosclerotic status of patients together with the existing evidence for the potential antioxidant atheroprotective role of several molecules represents a very encouraging scenario to search for new molecules. We do believe it is important to highlight that natural

extracts, containing low concentrations of active molecules and therefore difficult to measure since they are present below their detection range, by exerting a synergistic action might modify atherogenic patterns. This approach can give a new direction to the search of potential antioxidant therapies that might modify the process of atherogenesis, not as single molecules but as a synergistically protective natural mixture.

Although oxidation-reduction reactions play a crucial role in atherogenesis, analyzing antioxidants only with regard to their reduction potential might be a too narrow perspective. For instance, *Perilla frutescens* extracts and one of its components, α -asarone, showing a strong antioxidant capacity prevent the oxidation of LDL in vitro and in vivo [87]. α -Asarone potentiated the macrophage response to LXR and PPAR- γ agonists, diminishing SR-B1 and increasing the expression of ABCA-1 and ABCG-1 and therefore explaining its effect through an antioxidant activity and the modulation of lipid metabolism [88]. Another example is sesame oil, a mixture rich in lignans and other antioxidants that, when tested in LDLR^{-/-} mice fed with an atherogenic diet, significantly inhibited atherosclerotic plaque development, mediated partially by a favorable impact on lipid profiles [89]. A sesame oil aqueous extract increased the lag time in conjugated diene formation during LDL and HDL oxidation by exposure to Cu²⁺ and MPO activity [90]. Employing macrophages stimulated with lipopolysaccharides and endothelial cells treated with TNF- α and moderately oxidized LDL, the extract inhibited transcription and synthesis of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-1 α , TNF- α , chemokines, adhesins MCP-1, and VCAM1, in addition to inhibiting SR-A1 and inducing ABCA-1 involved with cholesterol exchange between cells and lipoproteins. This type of gene expression is triggered by oxidative stress-sensitive transcription factors and ligands affecting LXRs activation and NF- κ B inhibition and translocation [91]. Such biochemical responses could result from just one single multifunctional antioxidant, or rather due to advantages from several antioxidant compounds within the extract that might have been potentiated among them.

Although it can be said that there is important evidence for the potential use of antioxidants as atheroprotective molecules in the clinic, the only way to fully support this statement will be to importantly improve the way to standardize their effects directly correlating their physiological effects with their concentration in plasma. Moreover, in the case of studying as a source for antioxidants the use of natural extracts, the way to standardize their anti-atherogenic effects will be only achieved by also investigating their synergistically active components and the way these components when present in plasma below a detection value can provide a positive atheroprotective effect.

Regulation of Protein Expression

Compounds and molecules with a reducing ability not only prevent physiological deterioration of vascular cells and lipid peroxidation of LDL but can also promote or inhibit the expression of proteins that present an atheroprotective effect. High-density lipoproteins exhibit atheroprotective characteristics that include mobilization of excess cholesterol to the liver and an antioxidant activity associated with paraoxonase-1 (PON1) [92–94]. PON1 hydrolyzes lipid oxidation products, prevents their formation reducing intracellular stress of macrophages *in vivo* [94], and presents a reduction capacity that has been shown to be diminished in plasma from patients with a recent myocardial infarction and those at high cardiovascular risk [95]. Another characteristic of this enzyme involves the improvement of cholesterol efflux by macrophage ABCA-1 expression promoting binding through its amphipathic helices with membrane cholesterol lipid rafts [96] and a catalytic core composed of glutamic acid, asparagine, and aspartic acid with activity dependent on free thiols [97, 98].

On the other hand, it has been described that after delipidation, HDL particles show an antioxidant capacity independent from PON1 [99]. In this respect, Kotosai et al. showed that apo AI reacts selectively with free fatty acid hydroperoxides in a mechanism dependent on methionines, reducing these compounds to stable oxidation products such as fatty acid hydroxyls [100]. Other apolipoproteins associated preferentially with HDL effectively bind oxidized LDL phospholipids, reducing their rate of oxidation and increasing the lag time for the process to take place [101]. In general, cellular responses to modified protein structures could be an essential step to understand pathogenesis and therefore the atherogenic processes [102].

Since proteins account for approximately 70% of the dry cell mass, assays conducted on cells under constant generation of hydroxyl radicals ($E^{\circ} = 2310$ mV) show protein peroxides as the main oxidized product with almost nonexistent lipid and nucleic acids oxidation products [103] and where the generation of protein peroxy radicals weakens intracellular antioxidant defenses [104]. In this regard, the efficient defense system shown by ascorbic acid seems to reside in both preventing the formation of peroxy radicals and the acceleration of the decay process of these radicals to stable hydroxide species [105, 106]. Ascorbate also protects the intracellular levels of glutathione, where both antioxidants combined prevent further intracellular protein peroxide formation [107]. Considering glutathione as a strong reductant ($E^{\circ} = -1500$ mV), it is to be expected that its presence in plasma attenuates early vascular lesion development as observed in a hyperlipidemic mice model [108, 109]. It has been observed that glutathione plasma concentration seems to be a critical factor in the development of the atherosclerotic plaque since

an 80% decrease in its intracellular concentration promotes the development of complex vascular lesions [103, 109]. This information is further supported by experiments where bone marrow transplantation in experimental animals capable of synthesizing up to three-times more glutathione than normal, reduced the progression rate of vascular lesions by approximately 35% [103].

Several models for atherosclerosis such as transgenic mice with humanized and pro-atherogenic lipid metabolism have shown by the administration of ribose-cysteine an increased glutathione and glutathione peroxidase activity in liver tissue and plasma. This modification appears to be responsible for a reduced content of oxidized biomolecules in the liver, plasma, and aorta, in addition to a reduction in LDL-C, apoB, Lp(a), and total cholesterol plasma concentration associated with an increase in LDLR expression [110].

Both the concentration and activity of proteins are altered through oxidative modification, regulation of expression, and post-transcriptional silencing of non-coding RNA fragments (micro RNA or miRNA) paired to the 3' untranslated regions from target genes [105]. The human genome encodes approximately 1800 miRNAs capable of regulating protein function through direct binding to their 3'UTR [106] and by several indirect mechanisms through regulation of repressors or transcription factors [111]. Therefore, miRNAs have proven to impact the development of atherosclerosis, for instance, inhibiting LDLR and ABCA1 expression in hepatic cells [112]. Overexpression of miRNA-223 down-regulated SRBI and HMGCS limiting cholesterol synthesis and indirectly increasing ABCA1 due to the modulation of transcription factor Sp1 [113]. In hepatocyte cell cultures, miRNA-27a decreased by 40% the levels of LDLR increasing the concentration of PCSK9, which enhances LDLR degradation and regulates LRP6 and LDLRAP1 [114]. Results from *in vivo* models provide an even more exciting scenario since stable atherosclerotic lesions show different patterns for miRNAs in comparison to complex lesions prone to rupture, where inhibition of miRNA-494 led to a decrease of plaque size and the presence of more stable lesions [115].

However, the inhibition of specific miRNAs in cell culture cannot be easily extrapolated to a therapeutic approach since the presence of miRNAs in circulation might affect not only the vascular tissue but also other organs and cell systems while being transported by HDL [116, 117]. Proteins such as PON1 with intrinsic antioxidant capacity are also regulated by specific miRNAs [118]. On the other hand, several antioxidant compounds such as resveratrol modulate the expression patterns of several miRNAs involved in both cancerogenic and inflammatory processes [119]. A clinical trial involving male patients suffering from hypertension with associated diabetes mellitus type2 and coronary artery disease, after 1 year of an 8-mg daily intake of resveratrol, revealed a decrease in the expression of proinflammatory cytokines

modifying the level of several miRNAs [120]. Orally administered polyphenols to hyperlipidemic mice also prevents fatty liver disease through the action of miRNA103 and miRNA122 [121], whereas catechins are capable of changing the expression of hepatic miRNAs in apoE-deficient mice and HepG2 cells [122].

All this evidence lead us to further evaluate the potential effects of miRNAs as key regulators of many antioxidant proteins involved in the defense mechanisms against ROS generation. Among all miRNAs that might be modulated by antioxidant compounds, we need to keep in mind that exogenous miRNAs can be absorbed from the diet, and therefore, found in plasma where they could also modify gene expression [123]. Zhang et al. have proven that miRNAs derived from plants can be absorbed in the gastrointestinal tract reaching the plasma in stable microvesicles showing an effect upon LDLRAP1 [124].

Perspectives for Antioxidant Therapy

To date, accumulated evidence regarding oxidation as a pro-atherogenic factor indicates that biochemical events involved

in this process are indeed a very attractive target for the management of cardiovascular disease in the clinic. Nevertheless, although evidence indicates that redox reactions are important in the initiation and progression of atherosclerosis, oxidation with a pro-atherogenic context does not eliminate the fact that oxidation participates in many cases as an essential messenger of cellular signaling pathways [125]. Therefore, disease management and therapeutic goals require not only high-precision and high-sensitivity methods to detect in plasma very low amounts of reducing and oxidizing molecules but also a much better understanding of the normal processes and metabolic pathways influenced and/or controlled by oxidative stress. As several methodologies have been specifically described for the quantitation of the total antioxidant capacity and the oxidation state of diverse biological systems [25, 26], a successful way to carefully study how redox reactions influence atherosclerosis can be achieved. Nevertheless, since there is still a lack of standardization in many of these methods, clinical trials studying antioxidant capacity have been difficult to compare and therefore difficult to use in order to reach a conclusion. On the other hand, there is also a problem to consider related to the possibility that in many of the studies discussed in

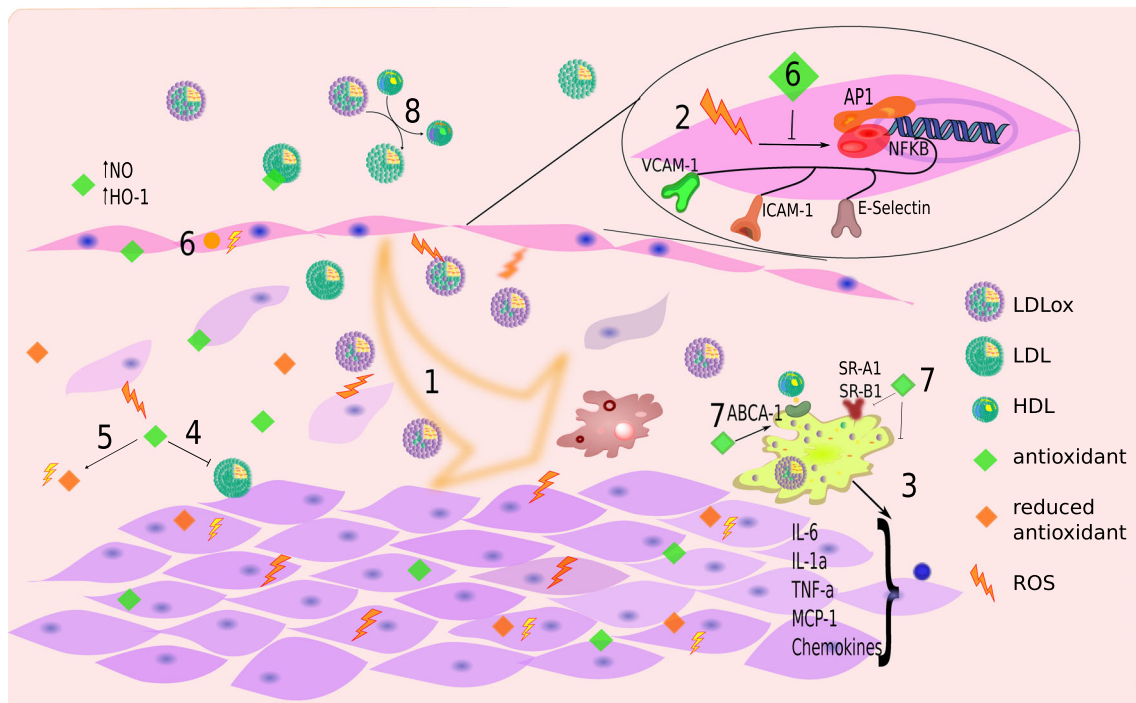


Fig. 2 Interaction between ROS and antioxidants. Since LDL particles present in the subendothelial space constantly remain exposed to ROS, lipoproteins gradually become transformed into oxidized particles (oxLDL) (1). Cells exposed to oxLDL activate transcriptional factors and several receptor expression patterns leading to cell metabolism changes (2). Phagocytosis of oxLDL carried out by macrophages promotes their transformation into foam cells prone to release intercellular signaling molecules that favor inflammation (3).

Nevertheless, the presence of antioxidant molecules in the subendothelial space may avoid LDL oxidation (4). Antioxidants react with reactive oxygen species (ROS) (5), exerting a protective role against cellular damage due to oxLDL formation (6). Antioxidants might enhance or diminish the presence of specific receptors and intracellular enzymes that in general promote the presence of an anti-atherogenic metabolic status (7). Despite oxidation, interaction with HDL can regenerate LDL from oxLDL (8)

this review, the concentration of the specific antioxidant did not reach the critical active concentration at key sites known to be important in the development of atherosclerosis, for instance the intima of blood vessels or the hepatocyte. This is an important point that will have to be technically solved in order to have the certainty that future clinical trials will present the possibility to directly correlate specific tissue concentration of antioxidants and prevention with the development of the disease.

Since we have recently found a direct relationship between the exposure of not only chemically modified LDL but also normal LDL going through a “normal” process of oxidation with specific transcriptomic changes in vascular smooth muscle cells [126], several antioxidant molecules support their activity by creating a proteomic or even a miRNA pattern that leads cell expression to what can be recognized as an antioxidant metabolism pattern (Fig. 2). Nowadays, a broad spectrum of tools including proteomic, metabolomic, and transcriptomic approaches have been developed to render detailed information related to the many changes found in the metabolism of cells due to a specific antioxidant treatment [127–130]. Therefore, challenging research providing brand new data and more importantly brand new concepts is ahead of us. For instance, to find an efficient way to target antioxidants to specific intracellular organelles such as lysosomes and mitochondria, or to study subtle changes that might occur in the epigenetic control of gene expression secondary to antioxidant therapy, could be considered as two interesting approaches. We believe a comprehensive analysis of this new knowledge and its relationship with the presence of plasma antioxidants and their reducing capacity will undoubtedly open new ways to understand and develop new therapeutic pathways in the fight not only against atherosclerosis but also against other degenerative diseases.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest Paola Toledo-Ibelles and Jaime Mas-Oliva declare no conflict of interest. Studies by J.M-O research group described in this review were supported by CONACYT (Grants 180726 and 255778) and DGAPA-UNAM (Grant IN-205814-3). P.T-I received a scholarship from CONACYT during her graduate studies (Posgrado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México).

Human and Animal Rights and Informed Consent This article does not contain any studies with human or animal subjects performed by any of the authors.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

1. Global Health Observatory Data Repository. <http://apps.who.int/gho/data/node.main.CODWORLD?lang=en>. Accessed 3 October 2016.
2. Mendis S, Puska P. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. 1st ed: WHO: World Heart Federation; World Stroke Organization; 2011.
3. Global Health Observatory (GHO) data. http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2014. Accessed 6 October 2016.
4. Suarna C, Dean RT, May J, Stocker R. Human atherosclerotic plaque contains both oxidized lipids and relatively large amounts of alpha-tocopherol and ascorbate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:1616–24.
5. Levitan I, Volkov S, Subbiah PV. Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal.* 2010;13:39–75.
6. Goldstein JL, Ho YK, Basu CK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76:333–7.
7. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein atherogenesis. *J Clin Invest.* 1991;88:1785–92.
8. Steinbrecher UP, Zhang H, Loughheed M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* 1990;9:155–68.
9. Manzano-León N, Mas-Oliva J, Sevilla-Tapia L, Morales-Bárceñas R, Serrano J, Neill MS O, et al. Particulate matter promotes in vitro receptor-recognizable low-density lipoprotein oxidation and dysfunction of lipid receptors. *J Biochem Mol Toxicol.* 2013;27:69–76.
10. Radhika A, Jacob SS, Sudhakaran PR. Influence of oxidatively modified LDL on monocyte-macrophage differentiation. *Mol Cell Biochem.* 2007;305:133–43.
11. Bekkering S, Quintin J, Joosten LAB, van der Meer JWM, Netea MG, Riksen NP. Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:1731–8.
12. Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald ML, Randow F, Andersson LP, Altshuler D, et al. The role of PPAR- γ in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nat Med.* 2001;7:41–7.
13. Huang H, Koelle P, Fendler M, Schröttle A, Czihal M, Hoffmann U, et al. Induction of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by oxLDL inhibits macrophage derived foam cell migration. *Atherosclerosis.* 2014;235:213–22.
14. Hansen-Hagge TE, Baumeister E, Bauer T, Schmiedecke D, Renné T, Wanner C, et al. Transmission of oxLDL-derived lipid peroxide radicals into membranes of vascular cells is the main inducer of oxLDL-mediated oxidative stress. *Atherosclerosis.* 2008;197:602–11.
15. Cheng G, Wei L, Xiurong W, Xiangzhen L, Shiguang Z, Songbin F. IL-17 stimulates migration of carotid artery vascular smooth muscle cells in an MMP-9 dependent manner via p38 MAPK and ERK1/2-dependent NF- κ B and AP-1 activation. *Cell Mol Neurobiol.* 2009;29:1161–8.
16. Jimenez-Corona AE, Damian-Zamacona S, Perez-Torres A, Moreno A, Mas-Oliva J. Osteopontin upregulation in atherogenesis is associated with cellular oxidative stress triggered by the activation of scavenger receptors. *Arch Med Res.* 2012;43:102–11.
17. Liu J, Ren Y, Kang L, Zhang L. Oxidized low-density lipoprotein increases the proliferation and migration of human coronary artery smooth muscle cells through the upregulation of osteopontin. *Int J Mol Med.* 2014;33:1341–7.

18. Moraes JA, Barcellos-de-Souza P, Rodrigues G, Nascimento-Silva V, Silva SV, Assreuy J, et al. Heme modulates smooth muscle cell proliferation and migration via NADPH oxidase: a counter-regulatory role for heme oxygenase system. *Atherosclerosis*. 2012;224:394–400.
19. Fonseca HAR, Bittencourt CR, Fonseca FA, Monteiro AM, Santos PR, Camargo L, et al. Non-linear optical responses of low-density lipoprotein are associated with intima-media thickness of carotid artery in athletes. *Cell Biochem Biophys*. 2016;74:253–62.
20. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. *Fundamentos de Química Analítica*. 9th ed: Cengage Learning; 2014.
21. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys*. 1993;300:535–43.
22. Massaeli H, Sobrattee S, Pierce GN. The importance of lipid solubility in antioxidants and free radical generating systems for determining lipoprotein peroxidation. *Free Radic Biol Med*. 1999;26:1524–30.
23. Yoshida Y, Ito N, Shimakawa S, Niki E. Susceptibility of plasma lipids to peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;305:747–53.
24. Pinchuk I, Shoval H, Dotan Y, Lichtenberg D. Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays. *Chem Phys Lipids*. 2012;165:638–47.
25. Ener K, Keske M, Aldemir M, Özcan MF, Okulu E, Özayar A, et al. Evaluation of oxidative stress status and antioxidant capacity in patients with painful bladder syndrome/interstitial cystitis: preliminary results of a randomised study. *Int Urol Nephrol*. 2015;47:1297–302.
26. Wei D, Zhang XL, Wang YZ, Yang CX, Chen G. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. *Aust Dent J*. 2010;55:70–8.
27. Tsimikas S, Brilakis ES, Miller ER, McConnell JP, Lennon RJ, Kornman KS, et al. Oxidized phospholipids, Lp(a) lipoprotein, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;353:46–57.
28. Rossi M, Praud D, Monzio Compagnoni M, Bellocco R, Serafini M, Parpinel M, et al. Dietary non-enzymatic antioxidant capacity and the risk of myocardial infarction: a case-control study in Italy. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014;24:1246–51.
29. Leermakers ET, Darweesh SK, Baena CP, Moreira EM, Melo van Lent D, Tielemans MJ, et al. The effects of lutein on cardiometabolic health across the life course: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 2016;103:481–94.
30. Burke M, Edge R, Land EJ, McGarvey DJ, Truscott TG. One-electron reduction potentials of dietary carotenoid radical cations in aqueous micellar environments. *FEBS Lett*. 2001;500:132–6.
31. Karppi J, Kurl S, Laukkanen JA, Rissanen TH, Kauhanen J. Plasma carotenoids are related to intima—media thickness of the carotid artery wall in men from eastern Finland. *J Intern Med*. 2011;270:478–85.
32. D'Odorico A, Martinez D, Kiechl S, Egger G, Oberhollenzer F, Bonvicini P, et al. High plasma levels of alpha- and beta-carotene are associated with a lower risk of atherosclerosis: results from the Bruneck study. *Atherosclerosis*. 2000;153:231–9.
33. Muzáková V, Kand'ár R, Meloun M, Skalický J, Královce K, Záková P, et al. Inverse correlation between plasma Beta-carotene and interleukin-6 in patients with advanced coronary artery disease. *Int J Vitam Nutr Res*. 2010;80:369–77.
34. Shardell MD, Alley DE, Hicks GE, El-Kamary SS, Miller RR, Semba RD, et al. Low-serum carotenoid concentrations and carotenoid interactions predict mortality in US adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Nutr Res*. 2011;31:178–89.
35. Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, Stampfer M, Rosner B, Cook NR, et al. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 1996;334:1145–9.
36. Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys*. 1989;274:532–8.
37. Palozza P, Parrone N, Simone RE, Catalano A. Lycopene in atherosclerosis prevention: an integrated scheme of the potential mechanisms of action from cell culture studies. *Arch Biochem Biophys*. 2010;504:26–33.
38. Dugas TR, Morel DW, Harrison EH. Dietary supplementation with β -carotene, but not with lycopene, inhibits endothelial cell-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Free Radic Biol Med*. 1999;26:1238–44.
39. Riccioni G, Scotty L, Di Ilio E, Bucciarelli V, Ballone E, de Girolamo M, et al. Lycopene and preclinical carotid atherosclerosis. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2011;25:435–41.
40. Verschuren L, Wielinga PY, van Duyvenvoorde W, Tijani S, Toet K, van Ommen B, et al. A dietary mixture containing fish oil, resveratrol, lycopene, catechins, and vitamins E and C reduces atherosclerosis in transgenic mice. *J Nutr*. 2011;141:863–9.
41. Devaraj S, Mathur S, Basu A, Aung H, Vasu V, Meyers S, et al. A dose-response study on the effects of purified lycopene supplementation on biomarkers of oxidative stress. *J Am Coll Nutr*. 2008;27:267–73.
42. Kim JY, Paik JK, Kim OY, Park HW, Lee JH, Jang Y, et al. Effects of lycopene supplementation on oxidative stress and markers of endothelial function in healthy men. *Atherosclerosis*. 2011;215:189–95.
43. Palozza P, Catalano A, Simone RE, Mele MC, Cittadini A. Effect of lycopene and tomato products on cholesterol metabolism. *Ann Nutr Metab*. 2012;61:126–34.
44. Frederiksen H, Rasmussen SE, Schröder M, Bysted A, Jakobsen J, Frandsen H, et al. Dietary supplementation with an extract of lycopene-rich tomatoes does not reduce atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Br J Nutr*. 2007;97:6–10.
45. Stephens NG, Parsons A, Peter M, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ, et al. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet*. 1996;347:781–6.
46. Loffredo L, Perri L, Di Castelnuovo A, Iacoviello L, De Gaetano G, Violi F. Supplementation with vitamin E alone is associated with reduced myocardial infarction: a meta-analysis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2015;25:354–63.
47. Ko YG, Choi SH, Chol KW, Kwon LB, Wook KS, Shim WH. Effects of combination therapy with cilostazol and probucol versus monotherapy with cilostazol on coronary plaque, lipid and biomarkers: SECURE study, a double-blind randomized controlled clinical trial. *J Atheroscler Thromb*. 2014;21:816–30.
48. Davidson MH, Smith J, Scott R, Small R, Choi J, Ishida BY, et al. Assessment of lipoprotein profiles study (ALPS) and antioxidant activity in healthy subjects treated with AGI-1067. *J Clin Lipidol*. 2007;1:271–9.
49. Gey KF, Puska P. Plasma vitamins E and A inversely correlated to mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Ann N Y Acad Sci*. 1989;570:268–82.
50. Losonczy KG, Harris TB, Havlik RJ. Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of all-cause and coronary heart disease mortality in older persons: the Established Populations for Epidemiologic Studies of the Elderly. *Am J Clin Nutr*. 1996;64:190–6.
51. Virtamo J, Rapola JM, Ripatti S, Heinonen OP, Taylor PR, Albanes D, et al. Effect of vitamin E and beta carotene on the

- incidence of primary nonfatal myocardial infarction and fatal coronary heart disease. *Arch Intern Med.* 1998;158:668.
52. Törnwall ME, Virtamo J, Korhonen PA, Virtanen MJ, Taylor PR, Albanes D, et al. Effect of α -tocopherol and β -carotene supplementation on coronary heart disease during the 6-year post-trial follow-up in the ATBC study. *Eur Heart J.* 2004;25:1171–8.
 53. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators, Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med.* 2000;342:154–60.
 54. Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF heart protection study of antioxidant vitamin supplementation in 20 536 high risk individuals: a randomised placebo controlled trial. *Lancet.* 2002;360:23–33.
 55. Babaev VR, Li L, Shah S, Fazio S, Linton MF, May JM. Combined vitamin C and vitamin E deficiency worsens early atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:1751–7.
 56. Ray T, Maity PC, Banerjee S, Deb S, Dasgupta AK, Sarkar S, et al. Vitamin C prevents cigarette smoke induced atherosclerosis in guinea pig model. *J Atheroscler Thromb.* 2010;17:817–27.
 57. Samsam Shariat SZA, Mostafavi SA, Khakpour F. Antioxidant effects of vitamins C and E on the low-density lipoprotein oxidation mediated by myeloperoxidase. *Iran Biomed J.* 2013;17:22–8.
 58. Simon J, Hudes ES. Serum ascorbic acid and cardiovascular disease prevalence in U.S. adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Ann Epidemiol.* 1999;9:358–65.
 59. Riccioni G, Bucciarelli T, D’Orazio N, Palumbo N, di Ilio E, Corradi F, et al. Plasma antioxidants and asymptomatic carotid atherosclerotic disease. *Ann Nutr Metab.* 2008;53:86–90.
 60. Osganian SK, Stampfer MJ, Rimm E, Spiegelman D, Hu FB, Manson JE, et al. Vitamin C and risk of coronary heart disease in women. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:246–52.
 61. Nyyssonen K, Parviainen MT, Salonen R, Tuomilehto J, Salonen JT. Vitamin C deficiency and risk of myocardial infarction: prospective population study of men from eastern Finland. *BMJ.* 1997;314:634.
 62. Ashor AW, Lara J, Mathers JC, Siervo M. Effect of vitamin C on endothelial function in health and disease: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Atherosclerosis.* 2014;235:9–20.
 63. Gutierrez AD, Duran-Valdez E, Robinson I, de Serna DG, Schade DS. Does short-term vitamin C reduce cardiovascular risk in type 2 diabetes? *Endocr Pract.* 2013;19:785–91.
 64. Suarna C, Wu BJ, Choy K, Mori T, Croft K, Cynshi O, et al. Protective effect of vitamin E supplements on experimental atherosclerosis is modest and depends on preexisting vitamin E deficiency. *Free Radic Biol Med.* 2006;41:722–30.
 65. Gomez-Roig MD, Mazarico E, Valladares E, Guirado L, Fernandez-Arias M, Vela A. Aortic intima-media thickness and aortic diameter in small for gestational age and growth restricted fetuses. *PLoS One.* 2015;10:e0126842.
 66. Kita T, Nagano Y, Yokode M, Ishii K, Kume N, Ooshima A, et al. Probucool prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, an animal model for familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:5928–31.
 67. Sasahara M, Raines EW, Chait A, Carew TE, Steinberg D, Wahl PW, et al. Inhibition of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in the nonhuman primate by probucool. I. Is the extent of atherosclerosis related to resistance of LDL to oxidation? *J Clin Invest.* 1994;94:155–64.
 68. Johansson J, Olsson AG, Bergstrand L, Elinder LS, Nilsson S, Erikson U, et al. Lowering of HDL2b by probucool partly explains the failure of the drug to affect femoral atherosclerosis in subjects with hypercholesterolemia: a Robucool Quantitative Regression Swedish Trial (PQRST) Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:1049–56.
 69. Sawayama Y, Shimizu C, Maeda N, Tatsukawa M, Kinukawa N, Koyanagi S, et al. Effects of probucool and pravastatin on common carotid atherosclerosis in patients with asymptomatic hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:610–6.
 70. Meng CQ, Somers PK, Rachita CL, Holt LA, Hoong LK, Zheng XS, et al. Novel phenolic antioxidants as multifunctional inhibitors of inducible VCAM-1 expression for use in atherosclerosis. *Bioorg Med Chem Lett.* 2002;12:2545–8.
 71. Sundell CL, Somers PK, Meng CQ, Hoong LEEK, Suen K, Hill RR, et al. AGI-1067: a multifunctional phenolic antioxidant, lipid modulator, anti-inflammatory and antiatherosclerotic agent. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;305:1116–23.
 72. Tardif JC, Grégoire J, L’Allier PL, Ibrahim R, Anderson TJ, Reeves F, et al. Effects of the antioxidant succinobucol (AGI-1067) on human atherosclerosis in a randomized clinical trial. *Atherosclerosis.* 2008;197:480–6.
 73. Tardif J-C, McMurray JJV, Klug E, Small R, Schumi J, Choi J, et al. Effects of succinobucol (AGI-1067) after an acute coronary syndrome: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2008;371:1761–8.
 74. Watt J, Kennedy S, McCormick C, Agbani EO, McPhaden A, Mullen A, et al. Succinobucol-eluting stents increase neointimal thickening and peri-strut inflammation in a porcine coronary model. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2013;81:698–708.
 75. Midwinter RG, Maghzal GJ, Dennis JM, Wu BJ, Cai H, Kapralov AA, et al. Succinobucol induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med.* 2012;52:871–9.
 76. Cynshi O, Kawabe Y, Suzuki T, Takashima Y, Kaise H, Nakamura M, et al. Antiatherogenic effects of the antioxidant BO-653 in three different animal models. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:10123–8.
 77. Inoue K, Cynshi O, Kawabe Y, Nakamura M, Miyauchi K, Kimura T, et al. Effect of BO-653 and probucool on c-MYC and PDGF-A messenger RNA of the iliac artery after balloon denudation in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis.* 2002;161:353–63.
 78. Dussault S, Dhahri W, Desjarlais M, Mathieu R, Rivard A. Elsibucol inhibits atherosclerosis following arterial injury: multifunctional effects on cholesterol levels, oxidative stress and inflammation. *Atherosclerosis.* 2014;237:194–9.
 79. Carreón-Torres E, Juárez-Meavepeña M, Cardoso-Saldaña G, Gómez CH, Franco M, Fievet C, et al. Pioglitazone increases the fractional catabolic and production rates of high-density lipoproteins apo AI in the New Zealand white rabbit. *Atherosclerosis.* 2005;181:233–40.
 80. Shen Y, Ward NC, Hodgson JM, Puddey IB, Wang Y, Zhang D, et al. Dietary quercetin attenuates oxidant-induced endothelial dysfunction and atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice fed a high-fat diet: a critical role for heme oxygenase-1. *Free Radic Biol Med.* 2013;65:908–15.
 81. Enkhmaa B, Shiwaku K, Katsube T, Kitajima K, Anurad E, Yamasaki M, et al. Mulberry (*Morus alba* L.) leaves and their major flavonol quercetin 3-(6-malonylglucoside) attenuate atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *J Nutr.* 2005;135:729–34.
 82. Garelnabi M, Mahini H, Wilson T. Quercetin intake with exercise modulates lipoprotein metabolism and reduces atherosclerosis plaque formation. *J Int Soc Sports Nutr.* 2014;11:22.
 83. Calabriso N, Scoditti E, Massaro M, Pellegrino M, Storelli C, Ingresso I, et al. Multiple anti-inflammatory and anti-atherosclerotic properties of red wine polyphenolic extracts: differential role of hydroxycinnamic acids, flavonols and stilbenes on endothelial inflammatory gene expression. *Eur J Nutr.* 2016 Mar;55:477–89.

84. Pires KMP, Lanzetti M, Rueff-Barroso CR, Castro P, Abrahão A, Koatz VLG, et al. Oxidative damage in alveolar macrophages exposed to cigarette smoke extract and participation of nitric oxide in redox balance. *Toxicol In Vitro*. 2012;26:791–8.
85. Karabulut AB, Karadag N, Gurocak S, Kiran T, Tuzcu M, Sahin K. Apricot attenuates oxidative stress and modulates of Bax, Bcl-2, caspases, NFκ-B, AP-1, CREB expression of rats bearing DMBA-induced liver damage and treated with a combination of radiotherapy. *Food Chem Toxicol*. 2014;70:128–33.
86. Saita E, Kishimoto Y, Tani M, Iizuka M, Toyozaki M, Sugihara N, et al. Antioxidant activities of *Perilla frutescens* against low-density lipoprotein oxidation in vitro and in human subjects. *J Oleo Sci*. 2012;61:113–20.
87. Park S-H, Paek J, Shin D, Lee J-Y, Lim S, Kang Y-H. Purple perilla extracts with α-asarone enhance cholesterol efflux from oxidized LDL-exposed macrophages. *Int J Mol Med*. 2015;35:957–65.
88. Manikandan S, Devi RS. Antioxidant property of α-asarone against noise-stress-induced changes in different regions of rat brain. *Pharmacol Res*. 2005;52:467–74.
89. Bhaskaran S, Santanam N, Penumetcha M, Parthasarathy S. Inhibition of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-negative mice by sesame oil. *J Med Food*. 2006;9:487–90.
90. Selvarajan K, Narasimhulu CA, Bapputty R, Parthasarathy S. Anti-inflammatory and antioxidant activities of the nonlipid (aqueous) components of sesame oil: potential use in atherosclerosis. *J Med Food*. 2015;18:393–402.
91. Pérez-Méndez O, Carreón-Torres JE, Juárez-Oropeza MA. HDL physicochemical characteristics as determinants of their plasma concentrations: what we have learned from thiazolidinediones. *New York: Nova Science Publishers, Inc.; 2009*. p. 1–26.
92. Gugliucci A, Caccavello R, Kotani K, Sakane N, Kimura S. Enzymatic assessment of paraoxonase 1 activity on HDL subclasses: a practical zymogram method to assess HDL function. *Clin Chim Acta*. 2013;415:162–8.
93. Rozenberg O, Shih DM, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) attenuates macrophage oxidative status: studies in PON1 transfected cells and in PON1 transgenic mice. *Atherosclerosis*. 2005;181:9–18.
94. Gamboa R, Regalado JC, Huesca-Gómez C, Posadas-Romero C, Verdejo Paris J, Vargas-Alarcón G, et al. Low paraoxonase and arylesterase plasma activities in Mexican patients with coronary artery disease. *Arch Cardiol Méx*. 2008;78:360–8.
95. Yunoki K, Naruko T, Inaba M, Inoue T, Nakagawa M, Sugioka K, et al. Gender-specific correlation between plasma myeloperoxidase levels and serum high-density lipoprotein-associated paraoxonase-1 levels in patients with stable and unstable coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2013;231:308–14.
96. Berrougui H, Loued S, Khalil A. Purified human paraoxonase-1 interacts with plasma membrane lipid rafts and mediates cholesterol efflux from macrophages. *Free Radic Biol Med*. 2012;52:1372–81.
97. Nishio E, Watanabe Y. Cigarette smoke extract inhibits plasma paraoxonase activity by modification of the enzyme's free thiols. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;236:289–93.
98. Tavori H, Khatib S, Aviram M, Vaya J. Characterization of the PON1 active site using modeling simulation, in relation to PON1 lactonase activity. *Bioorg Med Chem*. 2008;16:7504–9.
99. Graham A, Hassall DG, Rafique S, Owen JS. Evidence for a paraoxonase-independent inhibition of low-density lipoprotein oxidation by high-density lipoprotein. *Atherosclerosis*. 1997;135:193–204.
100. Kotosai M, Shimada S, Kanda M, Matsuda N, Sekido K, Shimizu Y, et al. Plasma HDL reduces nonesterified fatty acid hydroperoxides originating from oxidized LDL: a mechanism for its antioxidant ability. *Lipids*. 2013;48:569–78.
101. Elsåe S, Ahnström J, Christoffersen C, Hoofnagle AN, Plomgaard P, Heinecke JW, et al. Apolipoprotein M binds oxidized phospholipids and increases the antioxidant effect of HDL. *Atherosclerosis*. 2012;221:91–7.
102. Du J, Gebicki JM. Proteins are major initial cell targets of hydroxyl free radicals. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36:2334–43.
103. Callegari A, Liu Y, White CC, Chait A, Gough P, Raines EW, et al. Gain and loss of function for glutathione synthesis: impact on advanced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:2473–82.
104. Nauser T, Koppenol WH, Gebicki JM. The kinetics of oxidation of GSH by protein radicals. *Biochem J*. 2005;392:693–701.
105. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136:215–33.
106. Kozomara A, Hunt S, Ninova M, Griffiths-Jones S, Ronshaugen M. Target repression induced by endogenous microRNAs: large differences, small effects. *PLoS One*. 2014;9:e104286.
107. Liu C-C, Gebicki JM. Intracellular GSH and ascorbate inhibit radical-induced protein chain peroxidation in HL-60 cells. *Free Radic Biol Med*. 2012;52:420–6.
108. Rosenblat M, Coleman R, Aviram M. Increased macrophage glutathione content reduces cell-mediated oxidation of LDL and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2002;163:17–28.
109. Rosenblat M, Volkova N, Coleman R, Aviram M. Anti-oxidant and anti-atherogenic properties of liposomal glutathione: studies in vitro, and in the atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2007;195:61–8.
110. Kader T, Porteous CM, Williams MJA, Giese SP, McCormick SPA. Ribose-cysteine increases glutathione-based antioxidant status and reduces LDL in human lipoprotein(a) mice. *Atherosclerosis*. 2014;237:725–33.
111. Wang J-J, Guo H-S. Cleavage of indole-3-acetic acid inducible28 mRNA by microRNA847 upregulates auxin signaling to modulate cell proliferation and lateral organ growth in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2015;27:574–90.
112. Goedeke L, Rotllan N, Canfrán-duque A, Aranda JF, Ramírez CM, Araldi E, et al. MicroRNA-148a regulates LDL receptor and ABCA1 expression to control circulating lipoprotein levels. *Nat Med*. 2015;21:1280–9.
113. Vickers KC, Landstreet SR, Levin MG, Shoucri BM, Toth CL, Taylor RC, et al. MicroRNA-223 coordinates cholesterol homeostasis. 2014;111:14518–23.
114. Alvarez ML, Khosroheidari M, Eddy E, Done SC. MicroRNA-27a decreases the level and efficiency of the LDL receptor and contributes to the dysregulation of cholesterol homeostasis. *Atherosclerosis*. 2015;242:595–604.
115. Wezel A, Welten SMJ, Razawy W, Lagrauw HM, de Vries MR, Goossens EAC, et al. Inhibition of microRNA-494 reduces carotid artery atherosclerotic lesion development and increases plaque stability. *Ann Surg*. 2015;262:841–7.
116. Santovito D, Egea V, Weber C. Small but smart: microRNAs orchestrate atherosclerosis development and progression. *Biochim Biophys Acta*. 1861;2016:2075–86.
117. Michell DL, Vickers KC. Lipoprotein carriers of microRNAs. *Biochim Biophys Acta*. 1861;2016:2069–74.
118. Liu ME, Liao YC, Lin RT, Wang YS, Hsi E, Lin HF, et al. A functional polymorphism of PON1 interferes with microRNA binding to increase the risk of ischemic stroke and carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2013;228:161–7.
119. Tili E, Michaille J, Adair B, Alder H, Limagne E, Taccioli C, et al. Resveratrol decreases the levels of miR-155 by upregulating miR-663, a microRNA targeting JunB and JunD. *Carcinogenesis*. 2010;31:1561–6.
120. Tomé-Carneiro J, Larrosa M, Yá MJ, Dávalos A, Gil-Zamorano J, González M, et al. One-year supplementation with a grape

- extract containing resveratrol modulates inflammatory-related microRNAs and cytokines expression in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetes and hypertensive patients with coronary artery disease. *Pharmacol Res.* 2013;72:69–82.
121. Joven J, Espinel E, Rull A, Aragonès G, Rodríguez-Gallego E, Camps J, et al. Plant-derived polyphenols regulate expression of miRNA paralogs miR-103/107 and miR-122 and prevent diet-induced fatty liver disease in hyperlipidemic mice. *Biochim Biophys Acta.* 1820;2012:894–9.
122. Milenkovic D, Deval C, Gouranton E. Modulation of miRNA expression by dietary polyphenols in apoE deficient mice: a new mechanism of the action of polyphenols. *PLoS One.* 2012;7: e29837.
123. Baier SR, Nguyen C, Xie F, Wood JR, Zemleni J. MicroRNAs are absorbed in biologically meaningful amounts from nutritionally relevant doses of cow milk and affect gene expression in peripheral blood mononuclear cells, HEK-293 kidney cell cultures, and mouse livers. *J Nutr.* 2014;144:1495–500.
124. Zhang L, Hou D, Chen X, Li D, Zhu L, Zhang Y, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res.* 2012;22:107–26.
125. Méndez I, Vázquez-Martínez O, Hernández-Muñoz R, Valente-Godínez H, Díaz-Muñoz M. Redox regulation and pro-oxidant reactions in the physiology of circadian systems. *Biochimie.* 2016;124:178–86.
126. Damián-Zamacona S, Toledo-Ibelle P, Ibarra-Abundis MZ, Uribe-Figueroa L, Hernández-Lemus E, Macedo-Alcibia KP, et al. Early transcriptomic response to LDL and oxidized-LDL in human vascular smooth muscle cells. *PlosOne.* 2016; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163924>.
127. Bartberger MD, Liu W, Ford E, Miranda KM, Switzer C, Fukuto JM, et al. The reduction potential of nitric oxide (NO) and its importance to NO biochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:10958–63.
128. Djekic D, Nicoll R, Novo M, Henein M. Metabolomics in atherosclerosis. *IJC Metab Endocrine.* 2015;8:26–30.
129. Bagchi D, Swaroop A, Bagchi M. Genomics, proteomics and metabolomics in nutraceuticals and functional foods. 2nd ed: Wiley Online Library; 2015.
130. Wong M, Lodge JK. A metabolomic investigation of the effects of vitamin E supplementation in humans. *Nutr Metab (Lond).* 2012;9:110.

Hepatic Accumulation of Hypoxanthine: A Link Between Hyperuricemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease

Paola Toledo-Ibelles,^a Roxana Gutiérrez-Vidal,^b Sandra Calixto-Tlacomulco,^a Blanca Delgado-Coello,^a and Jaime Mas-Oliva^a

^aDepartamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

^bCentro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Monterrey, Apodaca, Nuevo León, México

Received for publication December 22, 2020; accepted April 14, 2021 (ARCMED_2020_00120).

Background. An elevated level of plasma uric acid has been widely recognized as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), where oxidative stress and inflammation play an important role in the pathophysiology of the disease. Although the complete molecular mechanisms involved remain unknown, while under physiological conditions uric acid presents antioxidant properties, hyperuricemia has been linked to oxidative stress, chronic low-grade inflammation, and insulin resistance, basic signs of NAFLD.

Aim of study. Employing *in vivo* experimentation, we aim to investigate whether a high-fat diet rich in cholesterol (HFD), modifies the metabolism of purines in close relationship to molecular events associated with the development of NAFLD. *In vitro* experiments employing HepG2 cells are also carried out to study the phenomenon of oxidative stress.

Methods. Adult male rabbits were fed for 8 weeks an HFD to induce NAFLD. At the beginning of the experiment and every 15 d until the completion of the study, plasma levels of lipids, lipoproteins, and uric acid were measured. Liver tissue was isolated, and histology performed followed by the biochemical determination of hypoxanthine, protein expression of xanthine oxidoreductase (XOR) by western blot analysis, and xanthine oxidase (XO) activity using an enzymatic kinetic assay. Furthermore, we employed *in vitro* experimentation studying HepG2 cells to measure the effect of hypoxanthine and H₂O₂ upon the production of radical oxygen species (ROS), XO activity, and cell viability.

Results and Conclusion. Hepatic tissue from rabbits fed the HFD diet showed signs of NAFLD associated with an increased ROS concentration and an altered purine metabolism characterized by the increase in hypoxanthine, together with an apparent equilibrium displacement of XOR towards the xanthine dehydrogenase (XDH) isoform of the enzyme. This protein shift visualized by a western blot analysis, associated with an increase in plasma uric acid and hepatocyte hypoxanthine could be understood as a compensatory series of events secondary to the establishment of oxidative stress associated with the chronic establishment of fatty liver disease. © 2021 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Key Words: NAFLD, NASH, Hypoxanthine, Xanthine oxidoreductase, Xanthine oxidase, Oxidative stress.

Address reprint requests to: Jaime Mas-Oliva, Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-243, 04510 Ciudad de México, México; Phone: (+52) (55) 56225584; FAX: (+52) (55) 56225611; E-mail: jmas@ifc.unam.mx

Introduction

According to the World Health Organization, cardiovascular disease (CVD) is the leading worldwide cause of death in the general population (1). This pathology has been extensively associated with multiple factors such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), including hepatic steatosis and non-alcoholic steatohepatitis (NASH), known to contribute to the development of cirrhosis and type 2 diabetes (2,3). Several epidemiological studies have shown a positive relationship between the level of uric acid in plasma and the incidence of NAFLD in CVD (4–8), where uric acid has been proposed as a predictor of morbidity and mortality (9–12). Although the relationship between hyperuricemia and NASH may not be a direct one, there is the possibility that both might be associated because of the establishment of metabolic syndrome (13–14).

In the human, the catabolism of purines generates uric acid as an oxidative product of hypoxanthine and xanthine due to the enzyme xanthine oxidoreductase (XOR), mainly expressed in the liver, intestine, and vascular endothelial cells (15). In physiological conditions, this enzyme presents two interconvertible forms by a disulfide bond formation. The first one corresponds to xanthine dehydrogenase (XDH), the most common isoform found in cells, that uses NAD^+ as an electron acceptor to produce NADH. While xanthine oxidase (XO) transfers electrons directly to molecular oxygen with the concomitant generation of reactive oxygen species (ROS) and particularly H_2O_2 , and therefore, considered an essential source of reactive peroxides, superoxide, hydroxyl radical, singlet oxygen, and α -oxygen (16,17). While to date oxidative stress is a key factor in the development of NASH and CVD (18), in the hepatocyte, the molecular mechanisms that correlate the metabolism of purines with a state of oxidative stress following a lipid overload, are still a matter of intensive study. Although uric acid is a risk factor for fatty liver disease and CVD (14,19), the molecular mechanisms involved in the way hepatocytes respond to uric acid also remain to be studied, together with the question if oxidative stress potentiates the effects of hyperuricemia.

Our data indicate that liver cells from experimental animals fed a high cholesterol/triglyceride diet show an increase in hypoxanthine that promotes an equilibrium displacement of XOR activity towards the XDH form of the enzyme. This phenomenon is most probably associated with the process of activation/inactivation of diverse enzymes involved in the proteolysis of XDH, under an increased hypoxanthine concentration. Considering that it has been shown that under acute cellular oxidative conditions the proteolytic induction of XO is favored, the compensatory mechanisms activated during established chronic metabolic conditions are still a matter of controversy. Therefore, we believe the study of this enzyme in the hepatocyte under conditions of oxidative stress and hy-

poxanthine accumulation associated with fatty liver disease acquires special relevance in the understanding of how NAFLD and NASH are established as important participants of CVD.

Methods

Experimental Animal Procedures

All animal procedures were performed following the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH), and approved by the Animal Ethics Committee, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (protocol JMO90-16). Male New Zealand white rabbits ($n=6$) weighing between 2.2–2.9 kg was divided into two groups.

Animals were housed at 20°C on a 12:12 h light/dark cycle, fed *ad libitum*, and allowed free access to water. Rabbits from the control group (CT) ($n=3$) were fed a standard diet (Laboratory Rabbit Diet, Brentwood, MO, USA). The second group was fed a high-fat diet (HFD) ($n=3$) composed of the standard diet supplemented with 10% corn oil and 1% cholesterol (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA). At the beginning of the experiment and every 2 weeks, blood was collected from the marginal ear vein after 14 h of overnight fasting. At the end of the study on an anesthetized animal, blood was obtained by cardiac puncture. Serum and plasma-EDTA samples were used for biochemical and enzymatic measurements using standardized methods, and carried out at Departamento de Patología, Facultad de Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Employing the same experimental animal model and a similar dietary regime that we use in the present study; pathological signs of well-defined fatty liver disease have been identified by us in both the rabbit and the pig (20–23).

Histological Analysis

At the time of euthanasia, liver samples from the right lobe were collected and a portion of these samples fixed in 10% formaldehyde. Samples were embedded in paraffin and stained with classical hematoxylin-eosin (H&E) to study cell morphology and Masson's trichrome stain that highlights the deposition of collagen fibers characteristic of fibrosis. The remaining tissue was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analysis. Liver sections were evaluated considering histopathological characteristics for NAFLD: steatosis, inflammation, ballooning, and the presence of fibrosis (24). Preparations were analyzed using conventional light microscopy and multiphoton microscopy. Briefly, multiphoton microscopy images from all liver samples were acquired using water immersion objectives: C-Apochromat 10x and W Plan-Apochromat 20x, with a 40x optical zoom. Second-harmonic generation

analysis was performed using a galvanometer-based scanning system LSM 710Zeiss and a Ti: sapphire laser (coherent) employing a wavelength of 900 nm wavelength (12% of laser power) and a BP 420–480 nm filter (Zeiss).

Hypoxanthine and Xanthine Oxidase Activity Measurements

Hypoxanthine levels and XO activity in hepatic tissue were measured with the Amplex Red Xanthine/Xanthine Oxidase Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). This kit provides a sensitive method for detecting xanthine/hypoxanthine, or for monitoring xanthine oxidase activity in the supernatant of homogenized liver tissue samples. Hepatic tissue is homogenized employing saline cold buffer and clarified by centrifugation. A further dilution of the supernatant with the reaction buffer is employed to determine the endpoint fluorescent signal. In the assay, xanthine oxidase catalyzes the oxidation of xanthine/hypoxanthine, to uric acid and superoxide (H_2O_2), and the H_2O_2 in the presence of horseradish peroxidase reacts stoichiometrically with the Amplex Red reagent to generate the red-fluorescent oxidation product, resorufin. This compound presents absorption and fluorescence emission maxima of approximately 571 nm and 585, respectively. On the other hand, intracellular hypoxanthine concentrations and XO activity of HepG2 cells were measured with kits from Ray Biotech (Norcross, GA, USA), and Abcam (Cambridge, MA, USA), respectively. The Ray-Bio xanthine/hypoxanthine assay employs a xanthine enzyme mix that specifically oxidizes xanthine/hypoxanthine to form an intermediate, which reacts with Developer and Probe to form a product that can be measured fluorometrically with absorption and fluorescence maxima at 525/587 nm. The Abcam xanthine oxidase activity assay also employs the oxidation of xanthine/hypoxanthine to H_2O_2 which reacts stoichiometrically with a probe to generate fluorescence showing an absorption and fluorescence maxima at 535/587 nm. With both kits, standard curves are prepared according to the manufacturer's instructions and employed in the determination of values from experimental samples. Independently of the kit employed, after different treatments had taken place, culture medium was removed from Petri dishes, and cell monolayers washed three times with PBS at room temperature. Immediately after, cells are detached by using trypsin incubating for 5 min at 37°C, followed by trypsin inactivation using FBS supplemented DMEM, cells are washed once more, centrifuged, and supernatants discarded. For the determination of hypoxanthine concentration and XO activity, the number of cells employed are first standardized, to be further lysed, clarified by centrifugation, and supernatants used for both measurements.

Xdh Gene Expression by qPCR

Total liver RNA was isolated with Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific); 1 μ g was used to synthesize cDNA using the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad). The expression of *xanthine dehydrogenase* (*XDH*: 5'-CCATCTACGCTTCCAAGGCT-3' and 5'-CAGTGACACACAGGGTGGTGA-3') and *glyceraldehyde dehydrogenase* (*GAPDH*: 5'-TCGGAGTGAACGGATTTGGC-3' and 5'-CCAGCATCACCCCACTTGAT-3') transcripts were determined by qPCR using the PowerUp Sybr Green Master Mix 2X (Applied Biosystems, CA, USA) on an ABI PRISM 7000 Sequence Detection cyler. All samples were analyzed in triplicates and the results are relative levels of mRNA calculated as $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

XOR Protein Expression by Western Blot Analysis

Liver samples were homogenized in cold RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific) supplemented with protease inhibitors (Roche). Protein concentration was determined using the DC Protein Assay (Bio-Rad, CA, USA), and 100 μ g of liver lysates were separated in 8 or 10% polyacrylamide gels (SDS-PAGE) and transferred to PVDF membranes (MilliporeMerck, Burlington, MA, USA). Blots were incubated with specific antibodies from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) recognizing XOR (*XDH/XO*) (sc-398548) and *GAPDH* (sc-47724).

Cell Culture

HepG2 cells (ATCC HB-8065) were grown following ATCC instructions, employing Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% fetal bovine serum, 10 μ g/mL streptomycin, 0.25 μ g/mL amphotericin, and 100 U/mL penicillin at 37°C and 5% CO_2 . Usually after 72 h of incubation with cells reaching 80–90% confluency, cells are rinsed with PBS and exposed to 80 mmol H_2O_2 diluted in DMEM. After 1h exposure, cells were trypsinized and reseeded in a proportion of 4.6×10^4 cells/cm² in DMEM supplemented medium, with the addition of hypoxanthine from a 1M stock solution solubilized in NaOH. Final concentrations ranged from 25–150 mmol hypoxanthine and 156 mmol NaOH, for all conditions including negative controls. Under these conditions, no significant changes on medium pH were observed. When indicated, allopurinol 10 mmol (25), methionine 25 or 50 mmol (26), or Trolox at 25 or 50 μ M (27), were added to DMEM, and cells incubated in this medium for 12 h before the oxidative stimulus with H_2O_2 (28), and exposure to hypoxanthine takes place.

Cell Viability

The integrity of the plasma membrane was used as a marker of cell viability, measuring lactic dehydrogenase activity released to the medium. In lysates, results were expressed as a percentage of lactic dehydrogenase activity released to the medium (29). Collected samples were incubated for 5 min in a Tris/NaCl buffer (pH 7.2) with NADH 0.3 mmol, on 96 well plates for UV spectrophotometric readings to follow NADH consumption. The reaction was initiated by adding sodium pyruvate (10 mmol, final concentration) and performed at 30°C. Immediately after starting the reaction, absorbance at 340 nm was measured and changes registered every 30 s for 5 min.

Intracellular Reactive Oxygen Species

Cells grown in 96 well plates, at the different study conditions, supplemented and washed with PBS at 37°C were further incubated for 45 min in DMEM and 10 mmol dichlorofluorescein diacetate. Cell suspensions were obtained and transferred to a 96 well dark plate to measure fluorescence at 485/528 nm (excitation/emission). Results were expressed as the percentage of ROS with respect to confluent cells in the absence of the stimulus.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was determined by a two-tailed Student's *t*-test or *U* Mann Whitney, depending on variables' distribution; *p* < 0.05 was considered statistically significant (**p* < 0.05). Analysis of the data was performed with the SPSS v20 program (Chicago, USA).

Results

Hepatic Tissue Examination

At the end of the 60 d of the experiment, animals were sacrificed, and liver samples prepared from both experimental groups (control and HFD). To ensure that tissue damage associated with NAFLD had been established, samples were examined by conventional light microscopy and second-harmonic generation microscopy. Figure 1 shows representative images of samples belonging to each one of the two experimental groups studied, displaying the central vein surrounded by layers of hepatocytes. In contrast to rabbits fed the standard diet showing a normal tissue structure and a normal collagen distribution (Figure 1A, C), rabbits fed an HFD show microvesicular steatosis, cellular ballooning, and inflammation, as characteristic signs of NASH (Figure 1B). Moreover, using Masson's trichrome stain, it was possible to visualize the presence of extensive collagen fiber deposition, denoting the presence of fibrosis and progressive hepatic disease (Figure 1D). The

use of second-harmonic generation microscopy, useful in the evaluation of tissue areas with increased deposition of protein shows an extensive network of collagen fibril/fiber structures, supporting the fibrotic feature of livers in the HFD experimental group (Figure 1E, F).

Plasma Metabolite Profiles

To address whether the metabolism of lipid and purines are simultaneously altered during the process of NASH consolidation, the following plasma parameters were measured at the start of the experiment and every two weeks before sacrifice; total cholesterol, triglycerides, C-LDL, C-HDL, and uric acid. As expected, values for lipids such as total cholesterol, triglycerides and C-LDL were increased by the HFD (Figure 2A-C), while the C-HDL levels were to remain close to values observed with control animals (Figure 2D). Interestingly, immediately after the start of the HFD, plasma levels for uric acid dramatically increased in correlation to the plasma levels of cholesterol (Figure 2E).

Hypoxanthine and XOR in NASH

In contrast to the control group, the plasma concentration of hypoxanthine in the HFD group showed a significant elevation (Figure 3A). Surprisingly, XO activity that did not show changes between groups fed or not with the HFD (Figure 3B), also, did not present differences in transcript expression of *Xdh* (Figure 3C).

Nevertheless, a western blot analysis using an anti-XOR antibody that recognizes both isoforms of the enzyme (XDH and XO), shows that liver lysates from control animals present two bands very close to each other at the expected molecular weight region for XOR, a result that most probably corresponds to the presence of the two enzyme isoforms. An upper band containing the molecular form XDH, and a lower molecular weight band reported to be exclusively associated with XO, and normally related to changes in the oxido/reduction equilibrium of cysteines 535 and 992. Although under normal conditions this equilibrium is maintained, it is found that under an adverse cell metabolic condition due to an HFD, a potential oxidative environment promotes an equilibrium shift towards the XDH form of the enzyme (Figure 3D).

Hypoxanthine Effect on Hepatocytes

To further explore if the increase in cell hypoxanthine established in the HFD group is associated to an oxidative environment, we performed a series of *in vitro* experiments employing 72 h hypoxanthine treated HepG2 cells. Under these conditions, we found the concomitant increase in intracellular hypoxanthine associated to an increment in XO activity (Figure 4A). When the concentration of hypoxanthine is increased up to 125 mmol, treated cells show a

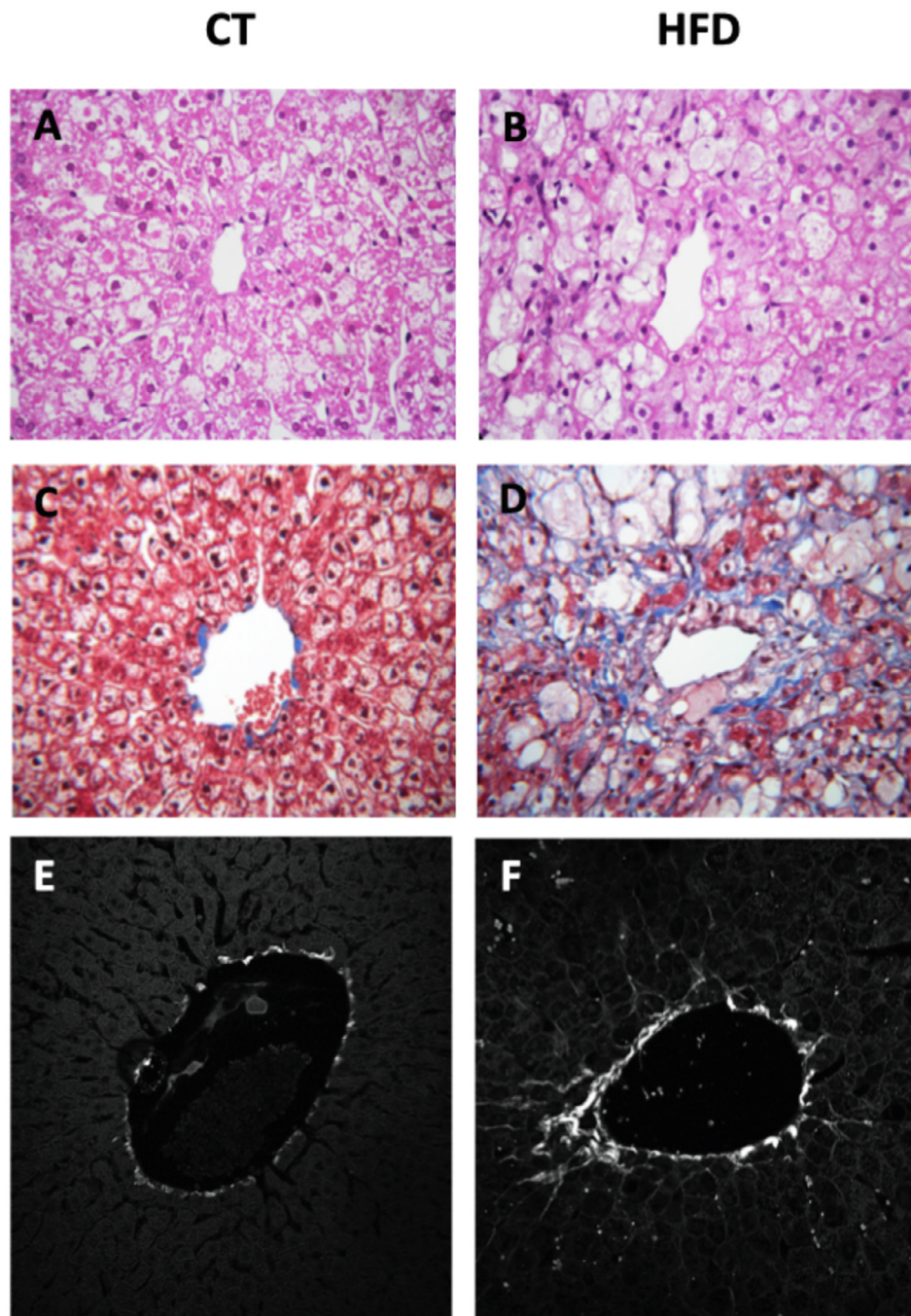


Figure 1. The high-fat diet induces NAFLD in rabbits. Representative images showing the central vein surrounded by hepatocytes of a representative rabbit from each experimental group. (A,C,E) Images from hepatic tissue from the control group fed a normal diet. (B,D,F) Hepatic tissue from animals fed the HFD. (A,B) Hematoxylin-eosin stain (light microscopy). (C,D) Masson's trichrome stain (light microscopy). (E,F) Multiphotonic microscopy with second-harmonic generation images.

marked ROS production, with no apparent affectation in cell viability up to 100 μmol (Figure 4B). Since during these experiments designed to have acute exposure and response to hypoxanthine, a rise in XO activity has been established, and the potential generation of H_2O_2 might be occurring, HepG2 cells were also treated with increasing

concentrations of H_2O_2 . Under these conditions, a further increase in the intracellular concentration of ROS was observed, associated with a negligible impact on cell viability, again up to 100 μmol (Figure 4C).

To further explore if hypoxanthine by itself contributes to the state of oxidative stress, HepG2 cells

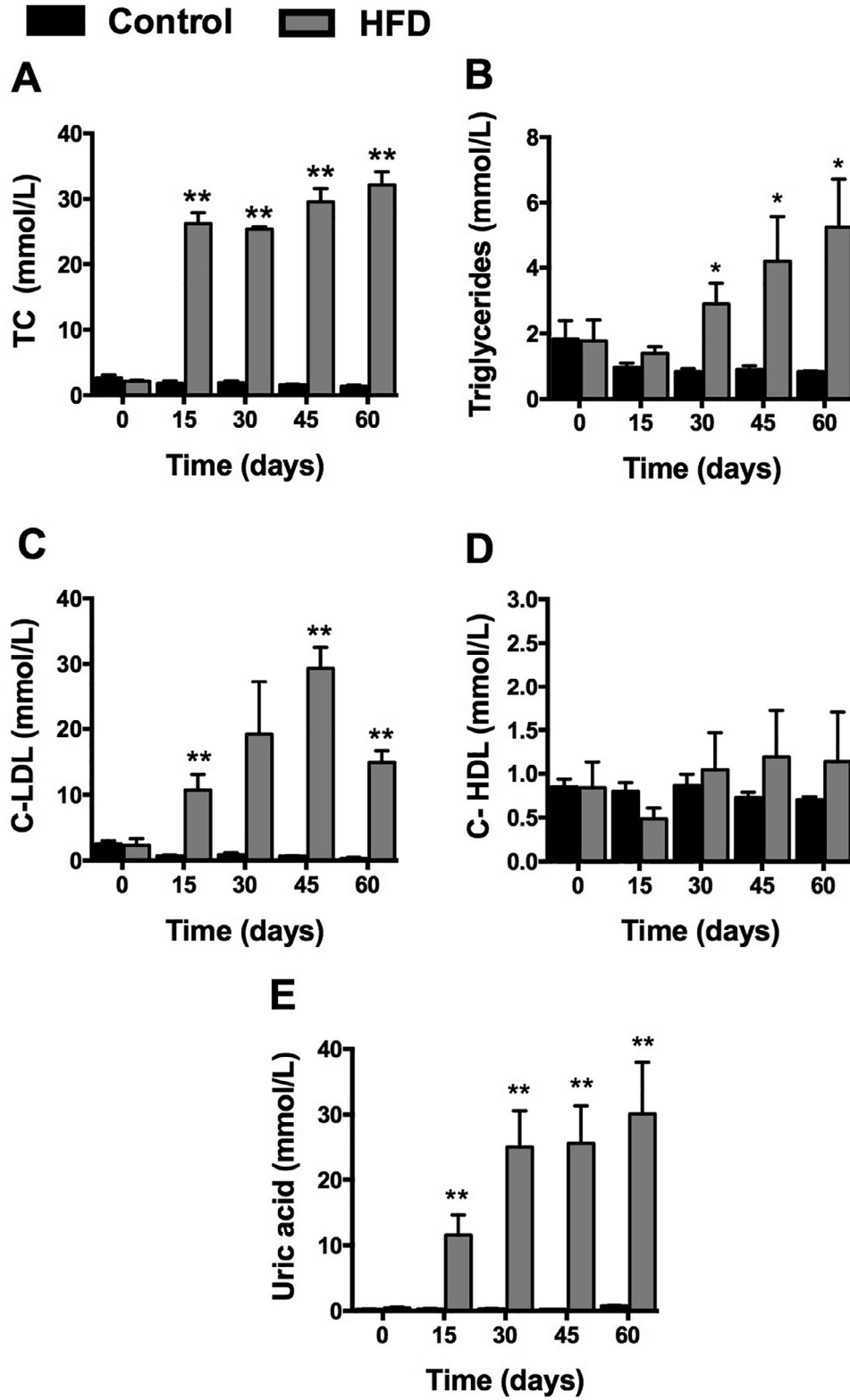


Figure 2. Biochemical parameters in plasma. Plasma samples from rabbits fed a standard diet (CT, $n=3$) or a high-fat diet that include cholesterol (HFD, $n=3$) were analyzed for: (A) Total cholesterol; (B) Triglycerides. (C) C-LDL; (D) C-HDL. (E) Uric acid. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

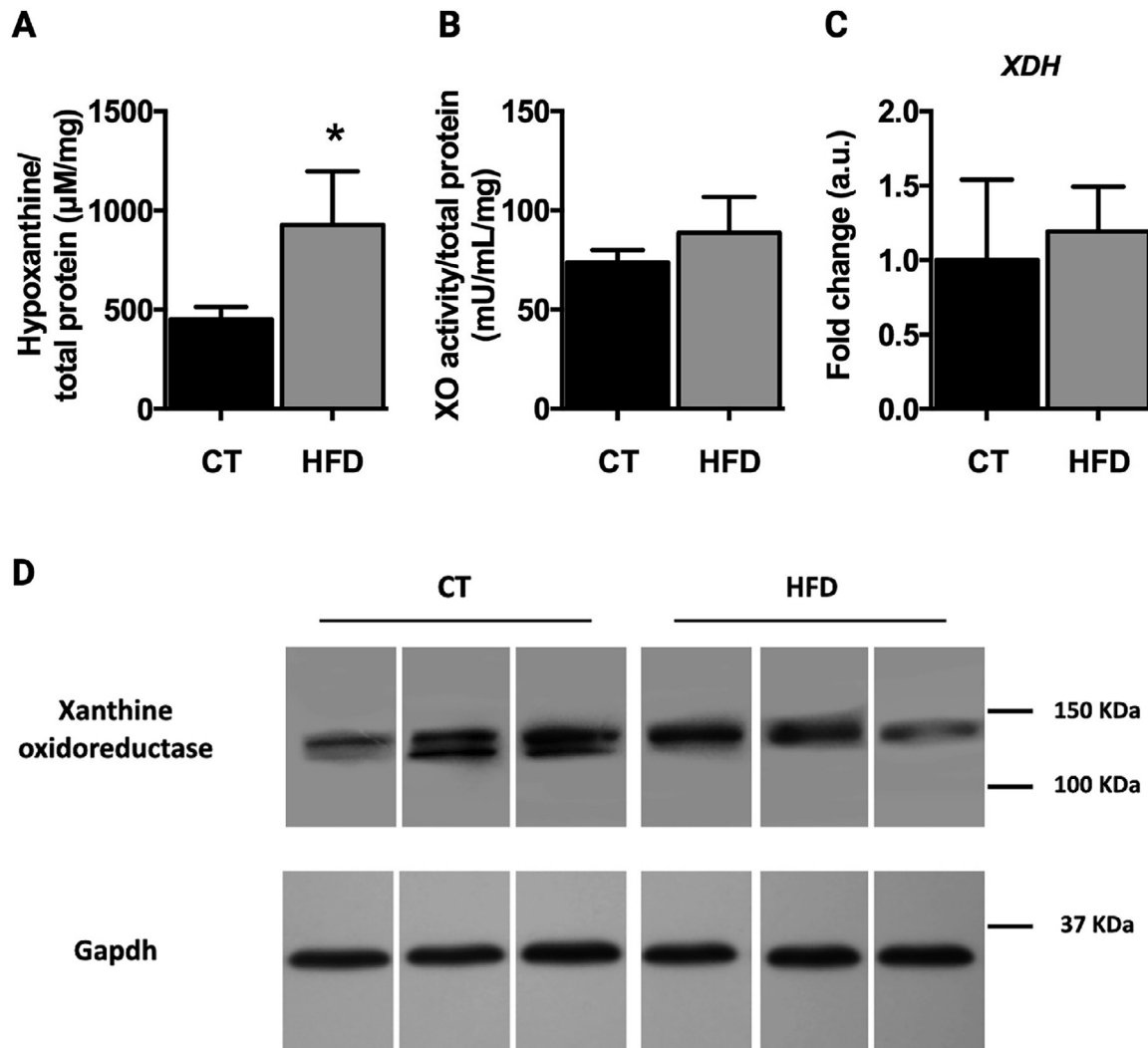


Figure 3. Analysis of purine metabolites and XO activity in liver lysates. (A) Hypoxanthine ($n=5$); (B) XO activity ($n=5$). (C) *XDH* transcripts ($n=5$) ($*p < 0.05$). (D) Western blot analysis of *XDH/XO*. Samples from the three experimental animals fed a standard diet (CT), or a high-fat diet (HFD).

were incubated with the XO inhibitor allopurinol (25) before treatment with 50 mmol hypoxanthine. Under these experimental conditions, oxidative stress was reduced by allopurinol, showing ROS values similar to levels found in control cell cultures (Figure 4D).

Furthermore, the addition of Trolox (25 mmol) a water-soluble antioxidant molecule analog of vitamin E (27), and methionine known to have an antioxidant effect through induction of the antioxidant protein heme oxygenase-1 (26), prevented the induction of oxidative stress derived from cell exposure to hypoxanthine (Figure 4E).

Discussion

Nowadays it has been well established that a high-fat diet that includes cholesterol induces hyperlipidemia associated with metabolic complications such as NASH, hyperglycemia, insulin resistance, dyslipidemia, and even

metabolic syndrome (30). Our study shows that such a diet leads to a significant elevation of plasma triglycerides and cholesterol, simultaneously increasing the concentration of uric acid, suggesting that hyperlipidemia alters the metabolism of purines together with the development of liver steatosis and fibrosis as described in NASH (31).

Hyperuricemia as a common condition in patients with fatty liver disease and other metabolic complications, is currently considered as a biomarker of metabolic dysfunction (32), consistent with the observation that the metabolism of purines is modified by an increased lipid content of cells in association with steatohepatitis (33). The present study employing a NAFLD model developed in the rabbit identifies a high plasma uric acid concentration and an increased level of hypoxanthine in the liver, associated to the development of a state of oxidative stress that seems to affect the equilibrium between *XDH* and *XO*, as the two catalytic forms of *XOR* (Figure 5). Since

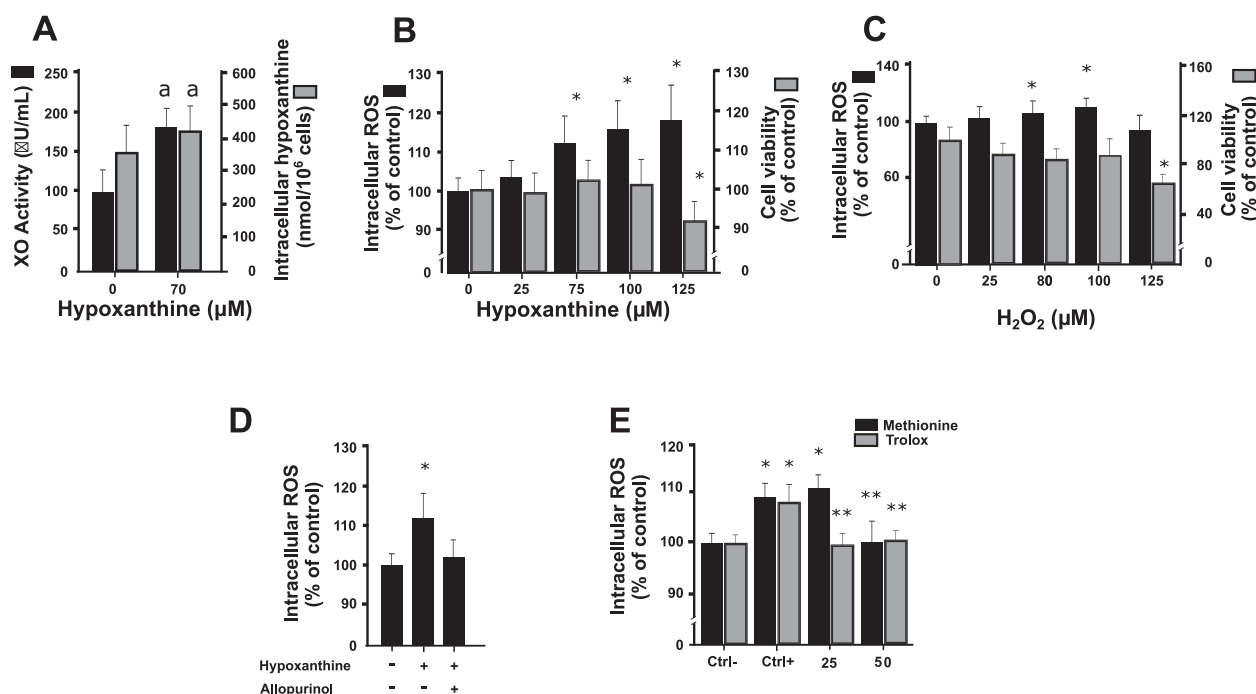


Figure 4. Hypoxanthine effect upon oxidative stress employing HepG2 cells. Cells were grown for 72 h in the presence of hypoxanthine and the following parameters measured. (A) XO activity and corresponding cell viability ($n=5$). (B) Intracellular ROS concentration and cell viability ($n=5$). (C) Intracellular ROS concentration and viability of cells exposed to H_2O_2 ($n=5$). (D) Intracellular ROS concentration in HepG2 cells incubated with 10 mmol allopurinol and 50 mmol hypoxanthine ($n=5$). (E) Intracellular ROS concentration of cells incubated with Trolox and methionine (25 mmol and 50 mmol) ($n=5$). In all experiments, samples were compared against negative controls employing the Student's t -test ($*p < 0.05$), except in (E) compared with positive control as well. Significance was defined as $*p < 0.05$ vs. negative control and $**p < 0.01$ vs. positive control.

endothelial cells have shown such an activity transition for XOR induced by H_2O_2 and calcium (18), we shall have to further investigate if in the hepatocyte, associated to oxidative stress, the intracellular concentration of calcium might also present such a modulatory role. This could be particularly important, since it is well known that calcium regulates the activity of a series of proteolytic enzymes (34–36) that might affect not only the catabolism of lipids, but also the catabolism of nucleotides.

Since rabbits soon after the start of the hyperlipidemic diet show signs of development of an oxidative stress state, the study of new metabolic pathways thought out as compensatory mechanisms to counteract the presence of a highly oxidative environment, become important to be investigated (37). Studies performed with patients showing a well-established process of fatty liver disease and atherosclerosis, present an increase in plasma uric acid, considered to be an antioxidant molecule (38). It has been also established, that the catabolism of purines is accelerated before zygote genomic activation, when the activation of transcription by the embryonic genome and the destruction of much of the pre-existing maternal mRNA takes place (39). At this time, secondary to the generation of ROS, the enzyme hypoxanthine/guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT), well known to be implicated in

salvaging purines, apparently becomes inhibited allowing the cell concentration of hypoxanthine to increase (40).

Supported by these findings, under our experimental conditions, we believe the increase in plasma uric acid, and cellular hypoxanthine, in association to the equilibrium displacement between XDH and XO might be working in parallel as part of a series of compensatory mechanisms triggered in response to a highly oxidative environment found in the hepatocyte because of lipid overload (Figure 5). Moreover, it is interesting to mention that experimentation employing HepG2 cells in culture has shown that uric acid induces the accumulation of lipids (41). This accumulation of lipids dependent upon the intracellular concentration of hypoxanthine and uric acid, and the presence of oxidative stress associated with the establishment of fatty liver disease, seem to contribute to set the stage for the development of fibrosis and eventually to cirrhosis (15,42). On the other hand, while the excretion of uric acid from the hepatocyte is carried out through a concentration-dependent mechanism by urate transporters (UAT), mainly OAT3 (43), an increased intracellular concentration of uric acid activates the enzyme nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX) in cell membranes, producing endoplasmic reticulum stress and further ROS production (44).

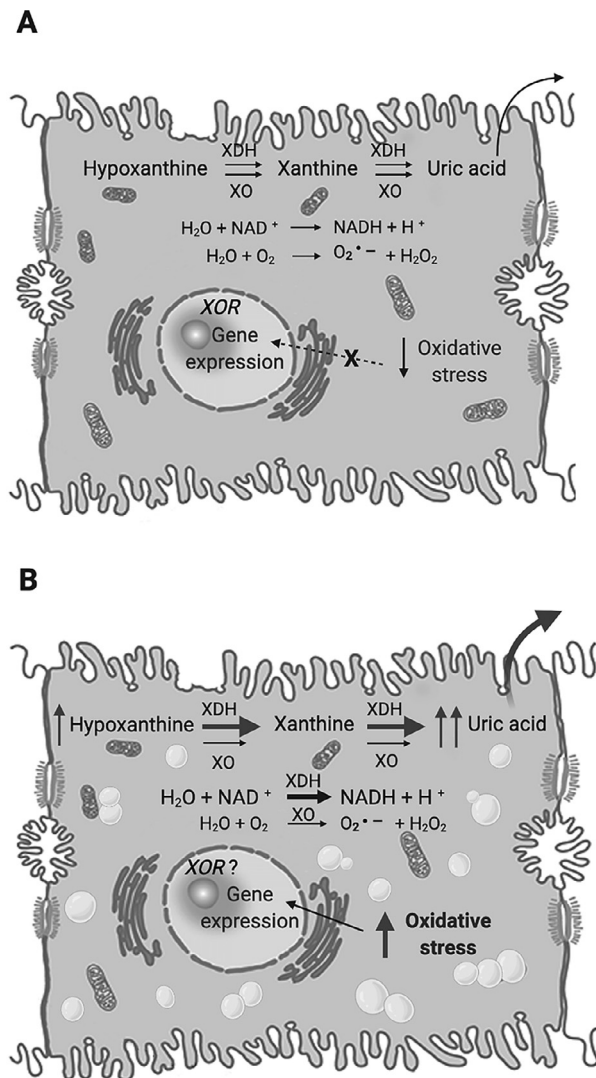


Figure 5. Schematic diagram of the hepatocyte main molecular changes involved in the equilibrium displacement between the molecular forms of XOR under a well-established lipid overload. (A) Normal hepatocyte. (B) Diseased hepatocyte showing oxidative stress and NASH features. Arrows in red show the increase in hypoxanthine, the final pathway molecule uric acid, and the presence of an important oxidative environment. Under our experimental conditions, although lipid overload and oxidative stress apparently did not affect *XDH* transcripts, and the equilibrium changes observed between *XDH* and *XO* might be exclusively explained by post-translational modifications, the possibility to have gene expression changes must be further explored.

In contrast to the *in vivo* results employing liver tissue, *in vitro* experimentation employing HepG2 cells cultured under a state of acute oxidative stress, show an increased *XO* activity. These results support the possibility that cells during a short exposure to an oxidative environment, maintain a high *XO* activity contributing to set the well-established state of oxidative stress. In support of this possibility, cell cultures exposed to a high concentration of lipids or fructose have been shown to importantly

increase the intracellular concentration of ROS (45). Moreover, studies using HepG2 cells clearly show H_2O_2 as a source of oxidative stress (46). These results support the fact that in our study, H_2O_2 treated cells contribute to the state of oxidative stress above basal values given by the formation of intracellular ROS.

For some time, it has been known that during specific metabolic states associated with elevated oxidative stress, the metabolism of lipids can be modulated through changes in protein expression in such a way that the balance for key proteins can be affected contributing to the development of fatty liver disease and atherosclerosis (47,48). Since as shown by our group, the generation of oxidative stress has been also linked with gene processing as well as protein expression (49,50), the present study supports the possibility that regulation of nucleotide catabolism in the hepatocyte, might also contribute to modulate the deleterious effects of lipid accumulation in fatty liver disease. Therefore, it will be of special interest employing conditions similar to the ones used in the present study, to directly assay not only *XDH* and *XO* activities, but also *HGPRT*, and seek the specific molecular mechanisms behind the regulation of these enzymes in the hepatocyte during a state of oxidative stress, in an attempt to better understand the development of fatty liver disease associated with CVD.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by grants from DGAPA, UNAM (IN-205717; IN-206619), and CONACYT (255778) awarded to J. Mas-Oliva. P. Toledo-Ibelles is a PhD. student, and S. Calixto-Tlacomulco an M. Phil. student of Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Both students have received a scholarship from CONACYT for the development of their graduate program. We thank Santa Cruz Biotechnology for the donation of the anti-xanthine oxidase monoclonal antibody employed in this study. We also thank members of the Molecular Biology Unit at IFC-UNAM, Héctor Malagón for expert animal handling, and Jorge Bravo-Martínez for valuable discussions and graphical art support.

References

1. The World Health Organization. Hearts. Technical Package for Cardiovascular Disease Management in Primary Health Care (2016) ISBN 978 92 4 151137. Available at: www.who.int/cardiovascular_diseases/hearts/Hearts_package.pdf.
2. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* 2016;65:1038–1048. doi:10.1016/j.metabol.2015.12.012.

3. Gupte P, Amaraúrkar D, Agal S, et al. Non-alcoholic steatohepatitis in type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterology Hepat* 2004;19:854–858. doi:10.1111/j.1440-1746.2004.03312.x.
4. Kohn P, Prozan G. Hyperuricemia; relationship to hypercholesterolemia and acute myocardial infarction. *JAMA* 1959;170:1909–1912. doi:10.1001/jama.1959.03010160025007.
5. Martínez-Quintana E, Tugores A, Rodríguez-González F. Serum uric acid levels and cardiovascular disease: The Gordian knot. *J Thorac Dis* 2016;8:E1462–E1466. doi:10.21037/jtd.2016.11.39.
6. Zhou Y, Wei F, Fan Y. High serum uric acid and risk of nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Clin Biochem* 2016;49:636–642. doi:10.1016/j.clinbiochem.2015.12.010.
7. Culleton BF, Larson MG, Kannel WB, et al. Serum uric acid and risk for cardiovascular disease and death: The Framingham Heart Study. *Ann Intern Med* 1999;131:7–13. doi:10.7326/0003-4819-131-1-199907060-00003.
8. Lonardo A, Bellentani S, Argo CK, et al. Epidemiological modifiers of non-alcoholic fatty liver disease: Focus on high-risk groups. *Dig Liver Dis* 2015;47:997–1006. doi:10.1016/j.dld.2015.08.004.
9. Madsen TE, Muhlestein JB, Carlquist JF, et al. Serum uric acid independently predicts mortality in patients with significant angiographically defined coronary disease. *Am J Nephrol* 2005;25:45–49. doi:10.1159/000084085.
10. Wang R, Song Y, Yan Y, et al. Elevated serum uric acid and risk of cardiovascular or all-cause mortality in people with suspected or definite coronary artery disease: A metaanalysis. *Atherosclerosis* 2016;254:193–199. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.10.006.
11. Silbernagel G, Hoffmann MM, Grammer TB, et al. Uric acid is predictive of cardiovascular mortality and sudden cardiac death in subjects referred for coronary angiography. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013;23:46–52. doi:10.1016/j.numecd.2011.02.008.
12. Fang J, Alderman MH. Serum uric acid and cardiovascular mortality the NHANES I epidemiologic follow-up study, 1971–1992. *National Health and Nutrition Examination Survey. JAMA* 2000;283:2404–2410. doi:10.1001/jama.283.18.2404.
13. Batelli MG, Bartolotti M, Polito L, et al. The role of xanthine oxidoreductase and uric acid in metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2018;1864:2557–2565. doi:10.1016/j.bbadis.2018.05.003.
14. Kushiyama A, Nakatsu Y, Matsunaga Y, et al. Role of uric acid metabolism-related inflammation in the pathogenesis of metabolic syndrome components such as atherosclerosis and nonalcoholic steatohepatitis. *Mediators Inflamm* 2016;2016:8603164. doi:10.1155/2016/8603164.
15. Stirpe F, Ravaioli M, Battelli MG, et al. Xanthine oxidoreductase activity in human liver disease. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2079–2085. doi:10.1111/j.1572-0241.2002.05925.x.
16. Wakabayashi Y, Fujita H, Morita I, et al. Conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in bovine carotid artery endothelial cells induced by activated neutrophils: involvement of adhesion molecules. *Biochim Biophys Acta* 1995;1265:103–109. doi:10.1016/0167-4889(94)00202-p.
17. Sumida Y, Niki E, Naito Y, et al. Involvement of free radicals and oxidative stress in NAFLD/NASH. *Free Radical Res* 2013;47:869–880. doi:10.3109/10715762.2013.837577.
18. McNally JS, Saxena A, Cai H, et al. Regulation of xanthine oxidoreductase protein expression by hydrogen peroxide and calcium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1623–1628. doi:10.1161/01.ATV.0000170827.16296.6e.
19. Masarone M, Rosato V, Dallio M, et al. Role of oxidative stress in the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. *Oxid Med Cell Longev* 2018 ID 9547613. doi:10.1155/2018/9547613.
20. García-González V, Delgado-Coello B, Pérez-Torres A, et al. Reality of a vaccine in the prevention and treatment of atherosclerosis. *Arch Med Res* 2015;46:427–437. doi:10.1016/j.arcmed.2015.06.004.
21. Mas-Oliva J, Delgado-Coello B, Méndez-Acevedo K. Novel intranasal anti-CETP vaccine against the development of atherosclerosis and fatty liver disease. *Atherosclerosis* 2016;252:e238. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.07.020.
22. Mas-Oliva J, Delgado-Coello B, Méndez-Acevedo KM, et al. Pre-clinical evidence studying intranasal HB-ATV-8 vaccines in a porcine model of atherosclerosis shows high efficiency in the prevention of atherogenesis and fatty liver disease. *Atherosclerosis* 2017;263:e52. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.06.177.
23. Gutiérrez-Vidal R, Delgado-Coello B, Méndez-Acevedo KM, et al. Therapeutic intranasal vaccine HB-ATV-8 prevents atherogenesis and non-alcoholic fatty liver disease in a pig model of atherosclerosis. *Arch Med Res* 2018;49:456–470. doi:10.1016/j.arcmed.2019.01.007.
24. Brown GT, Kleiner DE. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism* 2016;65:1080–1086. doi:10.1016/j.metabol.2015.11.008.
25. Ramos de Andrade D Jr, Ramos de Andrade D, Alves do Santos S. Study of rat hepatocytes in primary culture submitted to hypoxia and reoxygenation: action of the cytoprotectors prostaglandin E1, superoxide dismutase, allopurinol and verapamil. *Arq. Gastroenterol.* 2009;46:333–340. doi:10.1590/S0004-2803200900040001.
26. Luo S, Levine RL. Methionine in proteins defends against oxidative stress. *FASEB J* 2009;23:464–472. doi:10.1096/fj.08-118414.
27. Black D, Lyman S, Qian T, et al. Transforming growth factor beta mediates hepatocyte apoptosis through Smad3 generation of reactive oxygen species. *Biochimie* 2007;89:1464–1473. doi:10.1016/j.biochi.2007.09.001.
28. Ye TJ, Lu YL, Yan XF, et al. High mobility group box-1 release from H2O2-injured hepatocytes due to sirt1 functional inhibition. *World J Gastroenterol* 2019;25:5434–5450 PMID: 31576091. doi:10.3748/wjg.v25.i36.5434.
29. Diamantino TC, Almeida E, Soares AM, Guilhermino L. Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* traus. *Chemosphere* 2001;45:553–560. doi:10.1016/s0045-6535(01)00029-7.
30. Morelli A, Comeglio P, Filippi S, et al. Mechanism of action of phosphodiesterase type 5 inhibition in metabolic syndrome-associated prostate alterations: an experimental study in the rabbit. *Prostate* 2013;73:428–441. doi:10.1002/pros.22584.
31. Taylor E, Huang N, Bodde J, et al. MRI of atherosclerosis and fatty liver disease in cholesterol fed rabbits. *J Transl Med* 2018;215. doi:10.1186/s12967-018-1587-3.
32. Yang C, Yang S, Xu W, et al. Association between the hyperuricemia and nonalcoholic fatty liver disease risk in a Chinese population: A retrospective cohort study. *PLoS One* 2017:e0177249. doi:10.1371/journal.pone.0177249.
33. Nishikawa T, Nagata N, Shimakami T, et al. Xanthine oxidase inhibition attenuates insulin resistance and diet-induced steatohepatitis in mice. *Sci Rep* 2020;10:815. doi:10.1038/s41598-020-57784-3.
34. Lopez D. PCSK9: An enigmatic protease. *Biochim Biophys Acta* 2008;1781:184–191. doi:10.1016/j.bbailip.2008.01.003.
35. Lebeau P, Al-Hashimi A, Sood S, et al. Endoplasmic reticulum stress and Ca²⁺-depletion differentially modulate the sterol regulatory protein PCSK9 to control lipid metabolism. *J Biol Chem* 2017;292:1510–1523. doi:10.1074/jbc.M116.744235.
36. Miyazaki T, Miyazaki A. Emerging roles of calpain proteolytic systems in macrophage cholesterol handling. *Cell Mol Life Sci* 2017;74:3011–3021. doi:10.1007/s00018-0172528-7.
37. Lippi G, Montagnana M, Franchini M, et al. The paradoxical relationship between serum uric acid and cardiovascular disease. *Clin Chim Acta* 2008;392:1–7. doi:10.1016/j.cca.2008.02.024.
38. Huang Q, Yu J, Zhang X, et al. Association of the serum uric acid level with liver histology in biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease. *Biomed Rep* 2016;1:188–192. doi:10.3892/br.2016.698.
39. Losenkova K, Zuccarini M, Helenius M, et al. Epithelial cells cope

- with hypoxia-induced depletion of ATP via activation of cellular purine turnover and phosphotransfer networks. *Biochim Biophys Acta - Molecular Basis of Disease* 2018;1864:1804–1815. doi:[10.1016/j.bbadis.2018.03.001](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.03.001).
40. Guérin P, El Moutassim S, Ménéz Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Repro Update* 2001;7:175–18doi.org/. doi:[10.1093/humupd/7.2.175](https://doi.org/10.1093/humupd/7.2.175).
41. Choi YJ, Shin HS, Choi H, et al. Uric acid induces fat accumulation via generation of endoplasmic reticulum stress and SREBP-1c activation in hepatocytes. *Lab Invest* 2014;94:1114–1125. doi:[10.1038/labinvest.2014.98](https://doi.org/10.1038/labinvest.2014.98).
42. Taylor RS, Taylor RJ, Bayliss S, et al. Association Between Fibrosis Stage and Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* 2020;158:1611–1625 e12doi.org/. doi:[10.1053/j.gastro.2020.01.043](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.01.043).
43. Bush KT, Wu W, Lun C, et al. The drug transporter OAT3 (SLC22A8) and endogenous metabolite communication via the gut-liver-kidney axis. *J Biol Chem* 2017;292:15789–15803. doi:[10.1074/jbc.M117.796516](https://doi.org/10.1074/jbc.M117.796516).
44. Xu L, Shi Y, Zhuang S, et al. Recent advances on uric acid transporters. *Oncotarget* 2017;8:100852–100862. doi:[10.18632/oncotarget.20135](https://doi.org/10.18632/oncotarget.20135).
45. Maithili Karpaga Selvi N, Sridhar MG, Swaminathan RP, et al. Curcumin attenuates oxidative stress and activation of redox-sensitive kinases in high fructose-and high-fat-fed male Wistar rats. *Sci Pharm* 2015;83:159–175. doi:[10.3797/scipharm.1408-16](https://doi.org/10.3797/scipharm.1408-16).
46. Alía M, Ramos S, Mateos R, et al. Response of the antioxidant defense system to tertbutyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). *J Biochem Mol Toxicol* 2005;19:119–128. doi:[10.1002/jbt.20061](https://doi.org/10.1002/jbt.20061).
47. Renaud HJ, Cui JY, Lu H, et al. Effect of diet on expression of genes involved in lipid metabolism, oxidative stress, and inflammation in mouse liver—insights into mechanisms of hepatic steatosis. *PLoS One* 2014;9:e88584. doi:[10.1371/journal.pone.0088584](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088584).
48. Zhang Y, Cui Y, Wang X-L, et al. PPAR α/γ agonists and antagonists differently affect hepatic lipid metabolism, oxidative stress and inflammatory cytokine production in steatohepatic rats. *Cytokine* 2015;75:127–135. doi:[10.1016/j.cyto.2015.05.031](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.031).
49. Damián-Zamacona S, Toledo-Ibelles P, Ibarra-Abundis MZ, et al. Early transcriptomic response to LDL and oxLDL in human vascular smooth muscle cells. *PLoS One* 2016;11:e0163924. doi:[10.1371/journal.pone.0163924](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163924).
50. Jiménez-Corona AE, Damián-Zamacona S, Pérez-Torres A, et al. Osteopontin upregulation in atherogenesis is associated with cellular oxidative stress triggered by the activation of scavenger receptors. *Arch Med Res* 2012;43:102–111. doi:[10.1016/j.arcmed.2012.03.001](https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2012.03.001).