



**Universidad**  
Zaragoza



Facultad de Veterinaria  
**Universidad** Zaragoza

## Trabajo Fin de Grado

Caracterización del estrés oxidativo en función del tipo de proteína dietética en ratones carentes de apoE

Characterization of oxidative stress depending on the type of dietary protein in mice lacking apoE

Autor

**Gonzalo Lázaro Bermejo**

Directores

**Jesús Osada García**

**Javier Sánchez Marco**

Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular  
Curso 2019-2020 – Grado en Biotecnología

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT.....</b>	<b>1</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
3.1. LIPOPROTEÍNAS Y TRANSPORTE DE LÍPIDOS EN PLASMA.....	2
3.1.1. Metabolismo integrado de las lipoproteínas .....	2
3.2. APOLIPOPROTEÍNA E .....	3
3.2.1. Aterosclerosis y apoE .....	3
3.3. EL RATÓN CARENTE DE APOE COMO MODELO EXPERIMENTAL .....	4
3.3.1. Influencia de la dieta en el desarrollo de la aterosclerosis .....	5
3.4. ESTRÉS OXIDATIVO Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	5
3.4.1. Hipótesis lipídica: desarrollo de la placa aterosclerótica .....	5
3.4.2. Protección vascular por HDL .....	6
3.4.3. Paraoxonasa 1 .....	6
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>8</b>
5.1. MATERIAL BIOLÓGICO .....	8
5.2. SEPARACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS DEL PLASMA POR FPLC.....	9
5.3. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL EN PLASMA .....	9
5.4. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL EN FRACCIONES DE FPLC .....	10
5.4.1. Colesterol total .....	10
5.4.2. Colesterol libre y esterificado.....	10
5.5. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD PARAOXONASA .....	11
5.6. ENSAYO DE OXIDACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS.....	11
5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	12

<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>13</b>
6.1. SEPARACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS DEL PLASMA POR FPLC.....	13
6.2. RATONES HEMBRA .....	14
6.2.1. Determinación de colesterol total en plasma .....	14
6.2.2. Determinación de colesterol en fracciones de FPLC.....	14
6.2.3. Cuantificación de la actividad paraoxonasa .....	16
6.2.4. Ensayo de oxidación de lipoproteínas plasmáticas .....	17
6.3. RATONES MACHO.....	18
6.3.1. Determinación de colesterol total en plasma .....	18
6.3.2. Determinación de colesterol en fracciones de FPLC.....	18
6.3.3. Cuantificación de la actividad paraoxonasa .....	20
6.3.4. Ensayo de oxidación de lipoproteínas plasmáticas .....	21
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>22</b>
<b>8. CONCLUSIONS .....</b>	<b>22</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>23</b>

## ABREVIATURAS

**ADDE:** agua destilada y desionizada

**ApoAI:** apolipoproteína AI

**ApoB100:** apolipoproteína B100

**ApoE:** apolipoproteína E

**Arg:** arginina

**CETP:** proteína transferidora de ésteres de colesterol

**DCFH-DA:** diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**FPLC:** cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad

**Gln:** glutamina

**HDL:** lipoproteína de alta densidad

**HRP:** peroxidasa de rábano

**KO:** *knock-out*

**LCAT:** lecitina colesterol acil transferasa

**LDL:** lipoproteína de baja densidad

**LDL-MM:** lipoproteína de baja densidad mínimamente modificada

**Leu:** leucina

**LPL:** lipoproteína lipasa

**MCP-1:** proteína quimiotáctica de monocitos 1

**Met:** metionina

**PON:** paraoxonasa

**PPAR:** receptor activado por proliferador de peroxisoma

**PAF-AH:** factor activador de plaquetas en plasma acetilhidrolasa

**SNP:** polimorfismo de nucleótido único

**SR-BI:** receptor *scavenger* clase B tipo I

**VLDL:** lipoproteína de muy baja densidad

## 1. RESUMEN

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica de etiología multifactorial, que constituye el mecanismo fisiopatológico subyacente de las enfermedades cardiovasculares. Al ser una de las principales causas de muerte en el primer mundo, es fundamental el desarrollo de estudios epidemiológicos para el análisis de factores de riesgo y prevención. No obstante, el desarrollo de esta patología es complejo y lento en el ser humano, de forma que se utiliza el ratón carente de la apolipoproteína E como modelo experimental. Este animal desarrolla una aterosclerosis espontánea al impedirse el aclaramiento hepático de quilomicrones remanentes, siendo un modelo animal fundamental para el estudio del efecto de las dietas sobre el metabolismo lipídico.

En este proyecto, ratones *ApoE* KO machos y hembras fueron alimentados con cuatro dietas que diferían únicamente en la fuente proteica. Se evaluó la influencia de la caseína y de las proteínas de soja, pollo y pavo sobre la lipemia y estatus oxidativo en plasma sanguíneo. Para ello, los distintos grupos de animales se sometieron a determinaciones de colesterol plasmático y de actividad paraoxonasa. Las lipoproteínas plasmáticas fueron separadas por cromatografía para estimar su estado oxidativo y evaluar la capacidad protectora de las HDL sobre las LDL.

En los resultados se observó que las LDL de estos ratones no estaban muy oxidadas, lo que impidió ver el efecto protector de las HDL, a excepción del grupo de soja. Se le atribuye un efecto antiaterogénico a la proteína de pavo en ambos sexos, ya que implica niveles más bajos de colesterol plasmático y mayor actividad paraoxonasa 1 en suero, que actúa como antioxidante.

## 2. ABSTRACT

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease with a multifactorial aetiology, which constitutes the underlying pathophysiological mechanism of cardiovascular diseases. Being one of the main causes of death in the first world, the development of epidemiological studies is essential for the analysis of risk factors and prevention. Nevertheless, the development of this pathology is complex and slow in humans, so the mouse lacking apolipoprotein E is used as an experimental model. This animal develops spontaneous atherosclerosis by preventing hepatic clearance of remaining chylomicrons, being an essential animal model for studying the effect of diets on lipid metabolism.

In this project, male and female *ApoE* KO mice were fed with four diets that differed only in the protein source. The influence of casein and soy, chicken and turkey proteins on lipemia and oxidative status in plasma was evaluated. The different groups of animals were subjected to determinations of plasma cholesterol and paraoxonase activity. Plasma lipoproteins were separated by chromatography to estimate their oxidative state and to evaluate the protective ability of HDL over LDL.

In the results, it was observed that the LDL of these mice were not very oxidized, which made it impossible to see the protective effect of HDL, except for the soy group. An antiatherogenic effect is attributed to turkey protein in both sexes since it implies lower levels of plasma cholesterol and higher serum paraoxonase 1 activity, which acts as an antioxidant.

## 3. INTRODUCCIÓN

### 3.1. LIPOPROTEÍNAS Y TRANSPORTE DE LÍPIDOS EN PLASMA

Las diversas funciones que cumplen los lípidos en el organismo hacen necesario que cantidades considerables de los mismos sean transportados a los diferentes tejidos. No obstante, su carácter lipofílico y escasa solubilidad en medios acuosos desfavorece su transporte en la sangre, por lo que necesitan ser acoplados a ciertas estructuras proteicas, de forma no covalente y reversible. La albúmina, proteína mayoritaria en el plasma sanguíneo, es el principal transportador de ácidos grasos libres. No obstante, la mayor parte de los lípidos son transportados en forma de **lipoproteínas**. Las lipoproteínas son complejos de lípidos y proteínas específicas llamadas apolipoproteínas, cuya función es solubilizar los lípidos en la sangre. Estos complejos transportan colesterol esterificado y triglicéridos, que debido a su mayor hidrofobicidad constituyen el núcleo lipoproteico, y el colesterol no esterificado y los fosfolípidos, constituyentes de la corteza dada su mayor polaridad (1). Las lipoproteínas se clasifican según su creciente densidad en quilomicrones, VLDL, IDL, LDL y HDL, de forma que una mayor densidad implica un mayor contenido proteico y un menor contenido lipídico (1,2).

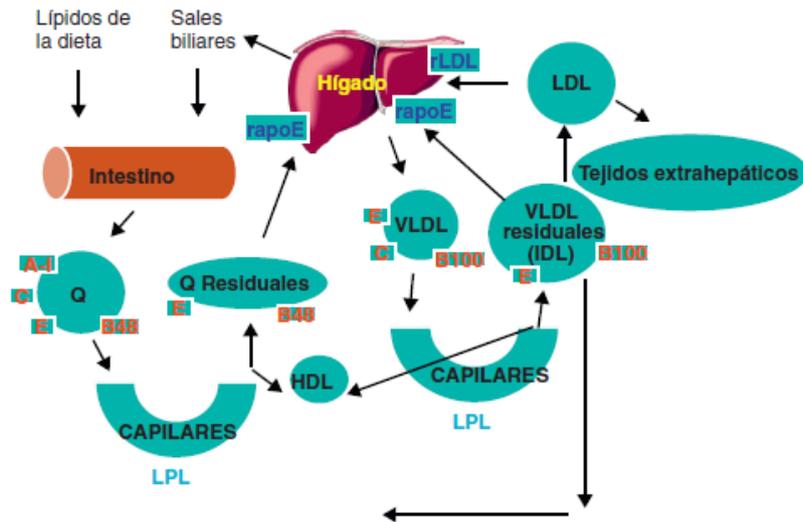
#### 3.1.1. Metabolismo integrado de las lipoproteínas

Los **quilomicrones**, sintetizados en los enterocitos, se encargan fundamentalmente de aportar a los diferentes tejidos los lípidos obtenidos en la ingesta, principalmente triglicéridos. Estos últimos se hidrolizan por la lipoproteína lipasa (LPL) de los capilares de los tejidos para poder ser absorbidos en forma de ácidos grasos no esterificados. Como consecuencia, los quilomicrones van reduciendo su tamaño y se convierten en quilomicrones remanentes (3), que son captados por receptores hepáticos que reconocen apoE, una de las apolipoproteínas de estos complejos. En el catabolismo de los quilomicrones, se liberan apolipoproteínas, lo que constituye una vía de síntesis de HDL (1).

Las **lipoproteínas de muy baja densidad** (VLDL) cumplen una función similar a los quilomicrones y se sintetizan tras la captación y catabolismo de quilomicrones residuales por el hígado. Las VLDL pierden volumen, ganan densidad y se convierten en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), que pueden reciclarse en el hígado o ser transformadas en LDL por el ataque de la LPL. El catabolismo de las VLDL también es una vía de síntesis de HDL (1).

Las **lipoproteínas de baja densidad** (LDL) se encargan de transportar y suministrar colesterol a las células, debido al reconocimiento de éstas por los receptores transmembrana de LDL, que reconocen sus apoB100 y apoE y las incorporan por endocitosis. La expresión y la funcionalidad de este receptor son claves para determinar la concentración de LDL (1).

La síntesis de **lipoproteínas de alta densidad** (HDL) depende tanto del catabolismo de quilomicrones y VLDL, como de la síntesis de apoAI, su principal constituyente. Las HDL inhiben la oxidación de las LDL y participan en el transporte reverso de colesterol. En su biosíntesis, adquieren dos monocapas de fosfolípidos con cuatro moléculas de apoAI en la zona intermedia. Las células periféricas les transfieren colesterol a través de transportadores *ATP-binding cassette* (ABCA1 y ABCG1), que es esterificado por la enzima LCAT y transportado al hígado tras la interacción de las HDL con el receptor hepático SR-BI. En primates, el colesterol HDL se puede reciclar gracias a su transferencia a las VLDL, las cuales le ceden triglicéridos (4), proceso catalizado por la enzima CETP, cuya menor actividad parece estar relacionada con menor riesgo aterosclerótico (1,4).



**Figura 1.** Visión global del metabolismo de las lipoproteínas. Q: quilomicrones; apoE: receptor de apoE; rLDL: receptor de LDL (1).

### 3.2. APOLIPOPROTEÍNA E

La **apolipoproteína E** fue identificada por Shore y cols. (5) en 1973 como el principal constituyente de las VLDL y ha adquirido gran relevancia en el estudio de la aterosclerosis por su papel fundamental en el metabolismo lipídico. Es una proteína de 34 kDa y 299 aminoácidos de longitud, de carácter relativamente básico debido a su abundancia en residuos de arginina. Su síntesis es fundamentalmente hepática y es un componente estructural esencial de los quilomicrones, VLDL y HDL. Su principal función es el aclaramiento hepático de quilomicrones y VLDL remanentes, ricos en triglicéridos, mediante su papel de ligando de los receptores del hígado y la regulación de la biosíntesis y lipólisis de las VLDL por acción de la LPL (6,7). Algunos estudios han determinado la presencia y función de apoE como chaperona patológica en placas amiloides asociadas a enfermedades como el Alzheimer y Creutzfeldt-Jakob (8).

Diversos estudios implicados en la caracterización estructural de esta proteína revelan que la apoE presenta un dominio N-terminal con el sitio de unión al receptor separado por una región bisagra del dominio C-terminal, que contiene la región de unión a lípidos (7).

Esta proteína presenta una naturaleza polimórfica (establecida por Utermann y cols.) (9), dado que el gen presenta tres alelos codominantes ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ ), que generan las tres isoformas principales de apoE (E2, E3 y E4). No obstante, el fenotipo predominante en la población es apoE3/3 (6).

#### 3.2.1. Aterosclerosis y apoE

La **aterosclerosis** es una enfermedad inflamatoria crónica de etiología multifactorial, en la que están implicados factores ambientales y genéticos, y cuyo desarrollo acontece progresivamente en lugares específicos del entramado vascular (10). En su desarrollo están implicados el depósito lipídico en el espacio subendotelial, los fenómenos trombóticos, la disfunción endotelial y la respuesta inflamatoria crónica de la pared vascular (11).

La trascendencia del colesterol ha sido crucial en el desarrollo de la placa de ateroma, ya que está presente desde el comienzo de su formación (11). A pesar de los cambios en el estilo de vida y los nuevos enfoques farmacológicos, la enfermedad cardiovascular, consecuencia del desarrollo de la placa aterosclerótica, continúa siendo una de las mayores causas de muerte en el primer mundo (12).

En general, se considera que la apoE protege frente al desarrollo de la aterosclerosis debido a su función en el transporte reverso de colesterol y aclaramiento hepático, aunque el efecto protector depende de la isoforma y nivel plasmático total de apoE, así como del tipo celular responsable de su síntesis. No obstante, niveles elevados de apoE en plasma pueden suponer un riesgo aterosclerótico, dado que estimula la síntesis de VLDL al ser su principal constituyente. Se postula que existe un rango óptimo de apoE en plasma que confiere un máximo beneficio (13).

### 3.3. EL RATÓN CARENTE DE APOE COMO MODELO EXPERIMENTAL

La aterosclerosis se desarrolla lentamente en el ser humano, lo que hace necesario la realización de largos estudios epidemiológicos para el análisis de factores de riesgo y prevención. Frente a este problema, aparecen **modelos animales** para el estudio de aterosclerosis en los que se controlan variables dietéticas y ambientales, que permiten medir características, principalmente histológicas, difíciles de estudiar en el ser humano. No obstante, el trabajo con animales dificulta la interpretación de los resultados a la hora de extrapolar al ser humano (14).

El **ratón** es un animal ampliamente utilizado en investigación ya que su tiempo de generación es corto, se reproduce con facilidad y se dispone de razas puras con interesantes fenotipos heredables. Además, tiene un bajo coste de mantenimiento y ocupa poco espacio. No obstante, las cepas salvajes de ratones son resistentes a la aterosclerosis, ya que sus valores de colesterol plasmático son bajos y éste está distribuido mayoritariamente en las HDL, al carecer de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) (16). Únicamente la estirpe C57BL/6J desarrolló procesos aterogénicos inducidos por una dieta rica en grasa saturada y colesterol (10,14).

Se pensó que la ausencia de apoE provocaría la acumulación de partículas lipídicas en plasma, induciendo el desarrollo de placas de ateroma (14). En 1992, los laboratorios de Breslow (15) y Maeda (16) desarrollaron un modelo de **ratón knock-out** para el **gen ApoE** mediante técnicas de recombinación homóloga a partir de células madre embrionarias (ESC) de cepas de ratones con mayor predisposición a desarrollar aterosclerosis, como la estirpe C57BL/6J. Las lesiones ateroscleróticas eran muy frecuentes en todo el árbol arterial, incluso cuando se alimentaban con dietas normales, a diferencia de los ratones congéneres *wild-type* (12,14).

Los ratones carentes de apoE aceleran el desarrollo de la placa cuando son alimentados con dietas occidentales (21% grasa y 0,15% colesterol). Este modelo experimental desarrolla una aterosclerosis espontánea que mimetiza muchos rasgos característicos de la patología en el ser humano, como estrías grasas y núcleos necróticos. Por ello, es un modelo fundamental para estudiar el impacto de los factores ambientales en el desarrollo de aterosclerosis (17) y el efecto de las dietas sobre el metabolismo lipídico (18).

### 3.3.1. Influencia de la dieta en el desarrollo de la aterosclerosis

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que la dieta posee una gran influencia en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, que tienen la aterosclerosis como mecanismo fisiopatológico subyacente. La dieta mediterránea, caracterizada por el consumo de vegetales y de aceite de oliva virgen extra, disminuye el riesgo de enfermedad coronaria en la población (19).

Las proteínas son un conjunto de sustancias muy variables en función de su composición de aminoácidos que modifican su digestibilidad y su utilización metabólica (19). El papel de las fuentes proteicas en el desarrollo de la aterosclerosis es un campo poco explorado en cuanto a su dinámica molecular y regulación, comparado con otros macronutrientes como azúcares o lípidos.

Las dietas basadas en **proteína de soja** reducen el riesgo de enfermedad coronaria al disminuir la síntesis de apoB y estimular la expresión de receptores de LDL. Concretamente, las globulinas 7S de soja son las responsables de dicho estímulo. Se cree que el alto contenido en isoflavonas de los extractos de soja, así como la lecitina de soja, podrían ser los responsables de este efecto protector. Al favorecerse la captación de LDL en el hígado, disminuyen sus niveles en plasma (20). Un estudio (21) sugiere que el efecto antiaterogénico de estas dietas se debe en parte a la inhibición de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), lo que resulta en una menor migración de los mismos al espacio subendotelial, evento que ocurre en la primeras fases de la aterogénesis. Por el contrario, las dietas basadas en proteínas de origen animal, como la caseína, incrementan las concentraciones de colesterol y triglicéridos, además de la oxidación de lipoproteínas y el área de lesiones ateroscleróticas (22).

El tratamiento dietético con hidrolizados de **colágeno de pollo** previene la aterosclerosis al reducir los niveles de colesterol plasmático, hepático y triglicéridos, e inhibir la expresión de citoquinas inflamatorias. Particularmente, la interleuquina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y la molécula soluble de adhesión intercelular 1 (sICAM-1) son las principales citoquinas proinflamatorias implicadas en el proceso aterogénico (23).

## 3.4. ESTRÉS OXIDATIVO Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las **especies reactivas de oxígeno** (ROS) generadas en la cadena de transporte mitocondrial durante la fosforilación oxidativa regulan diversos procesos celulares. No obstante, un exceso de las mismas conlleva la alteración del equilibrio redox mantenido normalmente por los mecanismos antioxidantes, generando el conocido **estrés oxidativo**. Las ROS en exceso, al ser moléculas tan inestables, reaccionan con otras, a las que modifican para estabilizarse. De esta manera, dañan de forma directa el DNA, lípidos y proteínas, pudiendo ser un rasgo prominente de muchas enfermedades agudas y crónicas, como el cáncer y la enfermedad cardiovascular (24).

### 3.4.1. Hipótesis lipídica: desarrollo de la placa aterosclerótica

La **hipótesis lipídica**, postulada por N. N. Anichkov, sostiene que el depósito de colesterol en la placa de ateroma reduce la luz de los vasos sanguíneos, incrementando el riesgo de enfermedad cardiovascular. El sistema circulatorio está recubierto por una monocapa de células endoteliales que regulan la permeabilidad de su pared a macromoléculas como las LDL. Ante un trastorno en la función endotelial tras algún tipo de agresión, esta permeabilidad se altera y el endotelio dañado adquiere la capacidad de modificar las LDL que establezcan contacto con su superficie, facilitando su atrapamiento subendotelial (11,24).

El incremento de los niveles plasmáticos de LDL promueve su oxidación al reaccionar con los radicales libres de oxígeno liberados por las células endoteliales, macrófagos y células musculares lisas (24). Se generan las LDL mínimamente modificadas (LDL-MM) que activan el endotelio y adquieren una gran capacidad quimiotáctica sobre monocitos circulantes, al inducir la expresión de MCP-1. Los monocitos atraviesan el endotelio, se activan y se convierten en macrófagos, que expresan unos receptores *scavenger* para la LDL modificada, cuya expresión está regulada por citoquinas y por el receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ). Al carecer estos receptores de mecanismos de desensibilización, los macrófagos comienzan a fagocitar de forma masiva las LDL oxidadas, acumulando y reesterificando grandes cantidades de colesterol, generando las llamadas **células espumosas**. La acumulación de estas células ricas en contenido lipídico en la íntima arterial origina la estría grasa (24,25).

Las células espumosas acumulan lípidos hasta que sufren necrosis y liberan su contenido rico en enzimas lisosomales, al espacio extracelular. Este proceso modifica y daña todavía más el endotelio de la íntima y los componentes intersticiales, induciendo una segunda cascada inflamatoria, que culmina con la formación de un trombo, en un proceso denominado **aterotrombosis** (24,26). En definitiva, las LDL modificadas por oxidación son los principales elementos proaterogénicos, que facilitan el inicio del proceso inflamatorio subendotelial.

### 3.4.2. Protección vascular por HDL

Se atribuyen **propiedades antiaterogénicas** a las **HDL** ya que evitan la acumulación de colesterol en la pared arterial por su transporte reverso al hígado para su excreción. Además, poseen una función antioxidante debido a la apoAI y a enzimas como las paraoxonasas o el factor activador de plaquetas en plasma acetilhidrolasa (PAF-AH). Las HDL también regulan negativamente la síntesis de adhesinas en el endotelio vascular, evitando el acúmulo de LDL y la quimiotaxis de monocitos. Asimismo, previenen la disfunción endotelial al estimular la síntesis de óxido nítrico por las células endoteliales, que media la relajación de estas células con un potente efecto antitrombótico (11,27).

### 3.4.3. Paraoxonasa 1

La **paraoxonasa 1** (PON1), con la que se trabaja en el presente trabajo, es la enzima más conocida de la familia paraoxonasa. Está codificada por el gen *Pon1*, localizado en el cromosoma 7 en humanos y 6 en ratón. Es una esterasa dependiente de calcio que hidroliza organofosfatos como el paraoxon, por el que recibe su nombre, aunque también tiene actividad lactonasa. Hidroliza ésteres como el fenilacetato, propiedad que servirá para determinar su actividad enzimática *in vitro*. Su síntesis es fundamentalmente hepática pero también se ha demostrado su actividad en riñón, cerebro y pulmón. Es una enzima extracelular, que una vez secretada, mantiene su péptido señal para asociarse con las HDL, a las que confiere el papel antiaterogénico (28).

El sustrato natural de esta enzima es todavía desconocido, pero se ha demostrado una relación inversa entre su actividad y el riesgo de lesiones ateroscleróticas, al actuar como antioxidante natural de las LDL y de las propias HDL, preservando su función. PON1 degrada los peróxidos lipídicos y evita su acumulación sobre las LDL, por lo que inhibe la migración de monocitos al endotelio (29). Además, inhibe la biosíntesis de colesterol en macrófagos y preserva su transporte reverso. En este contexto, PON1 se expresa en células propensas al estrés oxidativo, en el fluido folicular y espermatozoides para impedir la posible infertilidad generada por la incapacidad de modular el estrés oxidativo (30).

A pesar de que los polimorfismos genéticos en esta enzima suponen el mayor efecto en los niveles de actividad enzimática, los factores ambientales también afectan a su actividad. En un estudio (31), se ha comprobado que ratones de la estirpe C57BL/6J alimentados con una dieta aterogénica durante tres meses, experimentan un descenso del 60% en la actividad de esta enzima y en los niveles de mRNA hepático. Además, la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos afecta a la actividad de PON1 en ratas, ya que dietas basadas en trioleína incrementan en un 46% la actividad de esta enzima, mientras que las basadas en aceite de pescado la disminuyen en un 39%. En humanos, se ha visto que el aceite de oliva incrementa los niveles séricos de la enzima, con un efecto más acusado en mujeres. Los ácidos monoenoicos, particularmente el ácido oleico, incrementan la actividad de PON1 y la protegen de la inactivación oxidativa.

Por último, se ha visto que el tratamiento con fármacos hipolipemiantes, como las estatinas y los fibratos, induce la expresión del gen *Pon1*, aumentando la concentración de la enzima en suero. Los fibratos actúan como ligandos de PPAR $\alpha$ , induciendo la expresión de PON1, apoAI y LPL. En consecuencia, se produce un aumento de los niveles de HDL y una disminución de triglicéridos (32,33).

## 4. OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto consiste en evaluar la influencia del tipo de proteína dietética (caseína, soja, pollo y pavo) sobre la lipemia y el estatus oxidativo en plasma sanguíneo de un modelo animal de desarrollo espontáneo de aterosclerosis, como es el ratón carente de la apolipoproteína E. Este fin fue abordado empleando animales de ambos sexos y para ello, los objetivos concretos planteados fueron:

1. Cuantificación y distribución de colesterol plasmático.
2. Separación y análisis de las diferentes lipoproteínas plasmáticas, así como la caracterización de su estado oxidativo en las diferentes condiciones experimentales.
3. Cuantificación *in vitro* de la actividad paraoxonasa 1 en suero.
4. Valoración de la capacidad protectora de las HDL para inhibir la oxidación lipídica de las LDL.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Los animales se estabularon en el animalario del Centro de Investigación Biomédica de Aragón, con la autorización del Ministerio de Agricultura y del Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza. Se emplearon 100 ratones carentes de la apolipoproteína E (60 machos y 40 hembras) de dos meses de edad con sustrato genético C57BL/6J y obtenidos por cruces de la colonia a partir de ratones obtenidos en el laboratorio *Charles River* de Italia (B6.129P2-Apo<sup>tm1Unc</sup>/J).

Al comienzo se registró el peso inicial y se obtuvo una muestra de sangre del ganglio maxilar de los animales previamente ayunados durante 12 horas. Se determinaron sus niveles plasmáticos basales de colesterol, triglicéridos y HDL, que se utilizaron como criterio para la distribución en cuatro grupos homogéneos de quince machos y diez hembras. Cada grupo de animales recibió una dieta aterogénica purificada (colesterol al 0,15% (w/w) y grasa saturada de palma al 20% (w/w)), enriquecidas con un 11,2% de caseína y proteínas de soja, pollo y pavo, respectivamente.

**Tabla 1.** Composición de las dietas purificadas suministradas a cada grupo experimental.

<i>Ingredientes (g/kg)</i>	<i>Caseína</i>	<i>Soja</i>	<i>Pollo</i>	<i>Pavo</i>
<i>Harina de maíz</i>	371,9	371,9	371,9	371,9
<i>Proteína de pavo</i>	-	-	-	111,8
<i>Proteína de pollo</i>	-	-	111,8	-
<i>Caseína</i>	111,8	-	-	-
<i>Proteína de soja</i>	-	111,8	-	-
<i>Maltodextrina</i>	123,8	123,8	123,8	123,8
<i>Sacarosa</i>	79,9	79,9	79,9	79,9
<i>Aceite de soja</i>	31,9	31,9	31,9	31,9
<i>Celulosa</i>	39,9	39,9	39,9	39,9
<i>Mix mineral</i>	27,9	27,9	27,9	27,9
<i>Mix vitaminas</i>	8,0	8,0	8,0	8,0
<i>Bitartrato de colina</i>	2,0	2,0	2,0	2,0
<i>L-Cistina</i>	1,4	1,4	1,4	1,4
<i>Colesterol</i>	1,5	1,5	1,5	1,5
<i>Aceite de palma</i>	200	200	200	200

Las dietas fueron formuladas con todos sus ingredientes, liofilizadas y almacenadas al vacío a -20°C. Los animales tuvieron acceso *ad libitum* a alimentos y agua, recibiendo diariamente la ración de nueva dieta. Una alícuota de cada dieta fue analizada para conocer el porcentaje de ácidos grasos y aminoácidos y el contenido de colesterol. Se efectuaron controles de ingesta sólida y líquida y seguimiento quincenal del peso de los animales.

Tras 12 semanas de intervención y un ayuno de 12 horas, se sacrificaron los animales en condiciones de mínimo sufrimiento mediante sofocación con CO<sub>2</sub>. Se extrajo la sangre del ventrículo izquierdo en presencia o ausencia de EDTA (plasma y suero respectivamente), se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos y las alícuotas de suero y plasma fueron congeladas a -80°C.

## 5.2. SEPARACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS DEL PLASMA POR FPLC

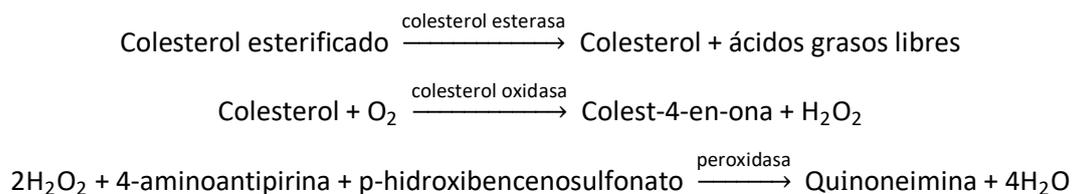
El equipo de FPLC consta de una columna cromatográfica de Superose 6B, un colector de fracciones y tubos Centricron donde son recogidas las muestras. Normalmente, el sistema está almacenado en tampón PBS pH 7,4 con azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) al 0,1% para evitar el crecimiento de microorganismos. Antes de proceder a la inyección de la muestra, es necesario lavar y equilibrar la columna con el propio tampón de elución PBS sin azida de sodio. Se utilizó la técnica de FPLC para separar las lipoproteínas de las muestras de plasma según su tamaño. La matriz de la columna consiste en esferas porosas de pequeño tamaño que constituyen un polímero entrecruzado de agarosa que permite un rango de separación óptimo de  $5 \cdot 10^3$  -  $5 \cdot 10^6$  Da de peso molecular. De esta forma, las proteínas de menor tamaño son retenidas temporalmente, mientras que las de mayor peso molecular no pueden penetrar en los poros y son eluidas rápidamente.

A partir de las muestras de plasma de cada animal, se realizaron cuatro *pools* en función de la proteína dietética suministrada, mezclando 5  $\mu\text{L}$  del plasma de cada animal. De esta forma, cada *pool* correspondía a la mezcla de plasmas de los animales que recibieron la misma proteína dietética, permitiendo realizar las posteriores determinaciones bioquímicas para comparar los resultados obtenidos en función de la proteína suministrada. Para analizar el perfil lipoproteico del plasma, se cargaron en la columna 100  $\mu\text{L}$  de plasma procedente de cada *pool* diluido 1/6 en PBS. La filtración se realizó con un volumen de flujo de 0,3 ml/min y se recogieron fracciones de 500  $\mu\text{l}$  en un colector, que fueron numeradas en los tubos, empezando en A1 y terminando en D12.

Las proteínas absorben a una longitud de onda de 280 nm por los anillos aromáticos de sus aminoácidos, por lo que la salida de éstas de la columna se detecta normalmente por absorción de luz en un espectrofotómetro a dicha longitud de onda, obteniéndose un cromatograma que indica la posición de las proteínas una vez separadas del suero. Estas fracciones se emplearon para realizar pruebas de actividad biológica y enzimática.

## 5.3. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL EN PLASMA

El colesterol plasmático se determinó por colorimetría con el *Kit Infinity™ Cholesterol* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) por hidrólisis de los ésteres de colesterol mediante la enzima colesterol esterasa y la oxidación posterior por la enzima colesterol oxidasa del colesterol liberado. El peróxido de hidrógeno generado se utilizó para obtener el compuesto coloreado quinoneimina, a partir de la enzima peroxidasa y los sustratos abajo mencionados, con una absorbancia máxima a 505 nm. Al ser una reacción estequiométrica, un mol de quinoneimina equivale a un mol de ésteres de colesterol, lo que permite conocer la cantidad de éstos en plasma.



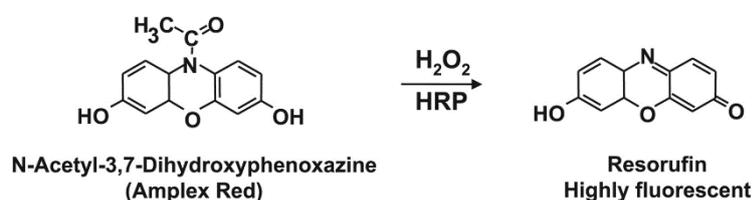
Para efectuar la reacción, las muestras de plasma de cada animal se diluyeron a la mitad en agua destilada y desionizada. Se incubaron 2  $\mu\text{L}$  de cada muestra con 100  $\mu\text{L}$  de reactivo, que contiene las enzimas y sustratos necesarios para la reacción, durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación. Se incluyeron 2  $\mu\text{L}$  de agua ADDE como blanco y 2  $\mu\text{L}$  de un calibrador de colesterol de 200 mg/dl. Las muestras se añadieron por duplicado para minimizar errores experimentales y la lectura de las absorbancias se realizó a 505 nm en el lector SPECTROstar Nano (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania) para placas. Una vez restada la absorbancia del blanco, la concentración de colesterol en cada muestra se obtuvo mediante una relación de proporcionalidad entre la absorbancia generada por el calibrador y su concentración conocida, y la absorbancia de la muestra. Se realizó la media aritmética de todas las muestras de cada grupo para comparar entre las diferentes condiciones experimentales.

## 5.4. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL EN FRACCIONES DE FPLC

### 5.4.1. Colesterol total

El colesterol total en cada una de las fracciones lipoproteicas obtenidas se cuantificó por fluorimetría con el *Kit Amplex Red Reagent*. Las reacciones enzimáticas acopladas coinciden con las del método anterior a excepción de la última, ya que no se genera quinoneimina, sino un compuesto fluorescente por la enzima peroxidasa (HRP), lo que dota a este ensayo de una mayor sensibilidad.

Se realizó una recta patrón de colesterol en un rango de 0,3 a 20  $\mu\text{M}$ . En cada placa se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de los estándares o de las muestras por orden de elución la columna, así como 50  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción con las enzimas y reactivos. El *Amplex Red* (N-Acetil-3,7-dihidroxi-fenoxazina) es una molécula no fluorescente, que en presencia del peróxido de hidrógeno liberado en las reacciones enzimáticas acopladas, genera la molécula resorufina altamente fluorescente, en una reacción catalizada por la enzima HRP (34). Tras incubar las placas durante 30 minutos a 37°C, se midió la fluorescencia en un lector de placas SPECTROstar Omega (BMG Labtech), usando un filtro de 550 y 595 nm para la excitación y emisión, respectivamente. Para conocer la concentración de colesterol en cada fracción se corrigió la fluorescencia del blanco y se interpoló en la recta de calibrado, teniendo en cuenta el factor de dilución de la muestra 1/6 al realizar el FPLC, obteniéndose de esta manera un perfil de colesterol de las fracciones lipoproteicas eluidas de la columna cromatográfica.



**Figura 2.** Mecanismo de generación del compuesto fluorescente resorufina a partir de Amplex Red y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una reacción catalizada por la enzima HRP.

### 5.4.2. Colesterol libre y esterificado

El colesterol libre se cuantificó con el ensayo descrito en 5.4.1. omitiendo la enzima colesterol esterasa, de forma que los ésteres de colesterol permanecieron intactos y no fueron cuantificados. La forma esterificada se midió como la diferencia entre el total y el libre.

## 5.5. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD PARAOXONASA

La actividad arilesterasa de la enzima PON1 se cuantificó empleando las muestras de suero conservadas a -80°C obtenidas en el momento del sacrificio, ya que las muestras de plasma contienen el anticoagulante EDTA, que al ser un quelante de calcio, inhibiría la actividad de esta enzima. Se preparó una mezcla de reacción que contenía cloruro cálcico dihidratado 0,9 mM, fenilacetato 1mM y tampón TRIS HCl 20 mM pH 8. Antes de proceder a las medidas de las muestras, se realizaron dos ensayos para controlar el ruido del proceso. En uno de ellos se hizo una lectura del suero sin sustrato para comprobar que los componentes del suero no generan incremento de absorbancia. En el segundo ensayo se hizo una lectura del sustrato sin suero para descartar la hidrólisis no enzimática del fenilacetato. En ambos casos, la variación de absorbancia fue despreciable comparada con la obtenida en presencia de suero y sustrato.

Se utilizó el sustrato de PON1 artificial **fenilacetato** para evaluar su actividad. En una cubeta de cuarzo se mezclaron por inversión 798 µL de la mezcla de reacción y 2 µL de suero fresco recién descongelado de cada animal. Esta cubeta se colocó en el espectrofotómetro SPECTROstar Nano termostatzado a 37°C, donde se dejó atemperar durante 30 segundos. Seguidamente, el lector midió la variación de absorbancia a 275 nm durante 1 minuto para obtener resultados de  $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ . Se realizó la lectura de las muestras por duplicado para minimizar errores experimentales y se calculó la media aritmética. La actividad enzimática de PON1 se calculó como se indica a continuación, lo que permitió expresarla en UI/L de suero, que equivalen a 1 µmol de fenilacetato hidrolizado por minuto en las condiciones de ensayo.

$$\frac{\text{UI}}{\text{L}} = \frac{\Delta\text{Abs}/\text{min}}{\epsilon_{275\text{ nm}}} \cdot \frac{V_{\text{Total}} \cdot 10^6}{V_{\text{Muestra}}}$$

En la ecuación superior  $V_{\text{Total}}$  es 800 µL,  $V_{\text{Muestra}}$  es 2 µL y el coeficiente de extinción molar del fenilacetato a 275 nm tiene un valor de  $\epsilon = 1310 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Una vez obtenidos los valores de UI/L de PON1 de cada animal, se hizo la media aritmética entre todos los animales del grupo para comparar entre las diferentes condiciones experimentales.

## 5.6. ENSAYO DE OXIDACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS

El diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) es utilizado en cultivos celulares para estimar las especies reactivas de oxígeno intracelulares. Este compuesto atraviesa fácilmente la membrana plasmática y es hidrolizado por esterasas intracelulares a la forma polar y no fluorescente de diclorofluoresceína (DCFH), que queda retenida en el citoplasma. En presencia de ROS, dicho compuesto se oxida al compuesto fluorescente diclorofluoresceína (DCF), lo que permite cuantificar el daño oxidativo celular. No obstante, para evaluar el estrés oxidativo en plasma, se disolverá el DCFH-DA en metanol para liberar directamente la DCFH tras una incubación a temperatura ambiente y en oscuridad. Al poner en contacto el reactivo con las muestras de plasma que contienen lipoproteínas, la DCFH reaccionará con las ROS, oxidándose para generar el compuesto fluorescente diclorofluoresceína, que emite una señal detectable en el espectrofotómetro de manera proporcional al grado de oxidación (34,35).

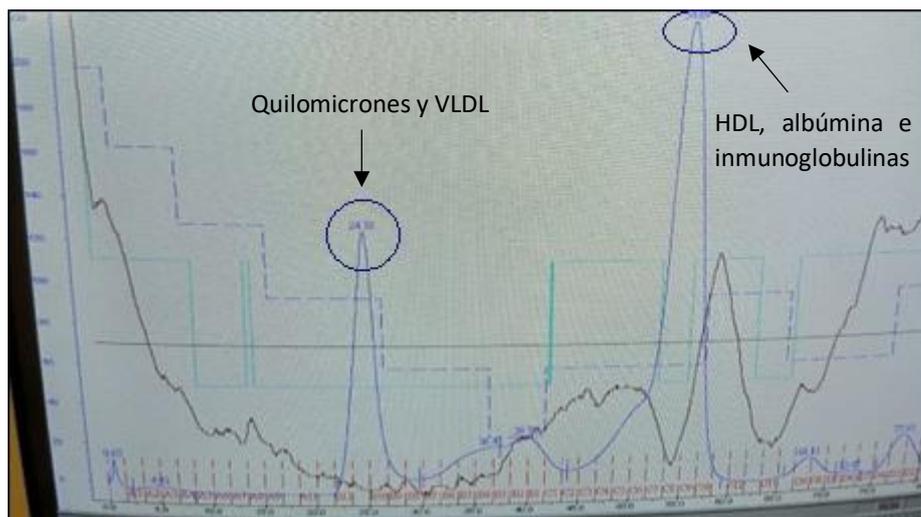


## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. SEPARACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS DEL PLASMA POR FPLC

A partir de los *poles* de plasma de los grupos experimentales, se obtienen los diferentes cromatogramas gracias a un espectrofotómetro asociado, que detecta absorción a 280 nm.

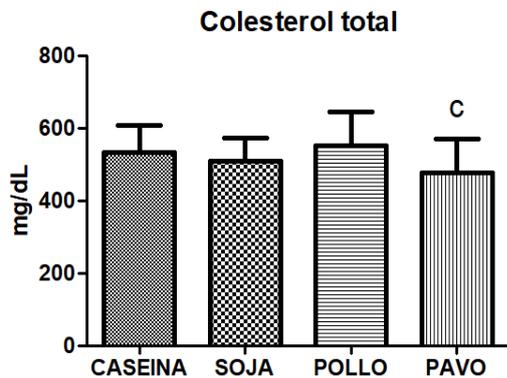
Las primeras partículas lipoproteicas en ser eluidas de la columna son los quilomicrones y las VLDL, ya que tienen un mayor contenido lipídico y son las de mayor tamaño. Por ello, no penetran adecuadamente en los poros de la columna y permanecen muy poco tiempo en ella. Seguidamente, salen las LDL, dado que tienen un menor contenido lipídico que las anteriores, por lo que su tamaño también es menor. A continuación, son eluidas las HDL, que tienen una mayor proporción proteica y menor cantidad de lípidos que las anteriores, de forma que su tamaño es menor y quedan retenidas durante más tiempo en los poros de la columna. Además, se distinguen dos picos reducidos al final del perfil, correspondientes a las HDL nacientes, que al carecer de colesterol, son más pequeñas que las HDL maduras y funcionales. Por último, cabe destacar que se observa un pico muy elevado, correspondiente a las proteínas más abundantes del plasma, como la albúmina y las inmunoglobulinas, que coeluyen con las HDL.



**Figura 4.** Imagen de un cromatograma obtenido al separar por FPLC las lipoproteínas plasmáticas de un ratón *ApoE* KO alimentado con la dieta de proteína de pavo. En el eje X se muestra la fracción en la que se eluyen las proteínas de la columna, y en el eje Y, la abundancia relativa de cada una.

## 6.2. RATONES HEMBRA

### 6.2.1. Determinación de colesterol total en plasma

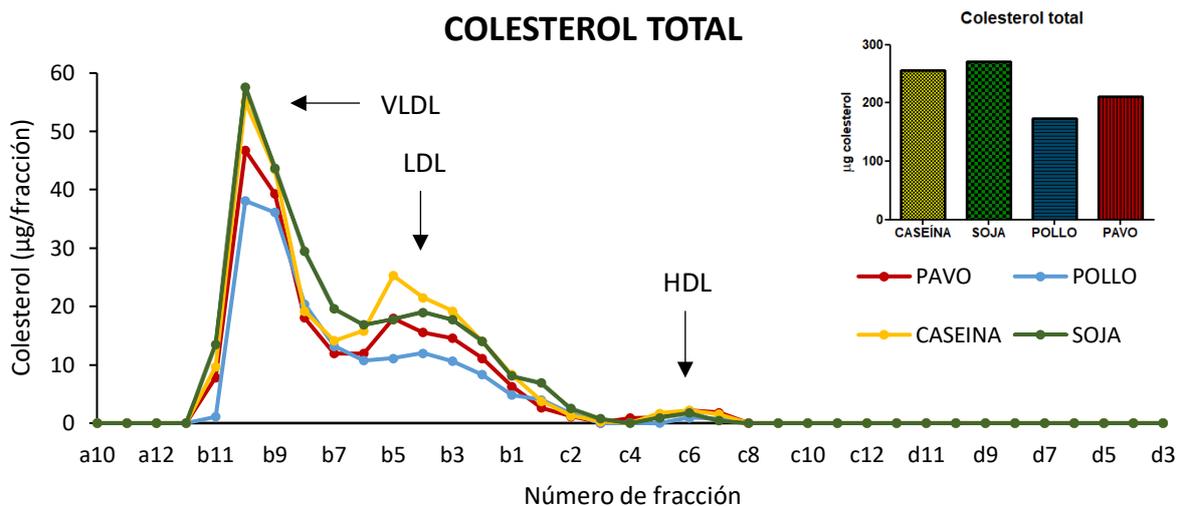


**Figura 5. Valores plasmáticos de colesterol.** Resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test t de Student. C:  $p \leq 0,05$  vs. pollo.

En la figura 5 se representan los valores de colesterol plasmático de cada uno de los grupos experimentales. Se observa que todos mostraron un valor alrededor de 500 mg/dl. No obstante, se observan diferencias significativas entre el grupo de pavo y pollo ( $P \leq 0,05$ ). Las hembras alimentadas con proteína de pavo presentaron una concentración de 477 mg/dl, valor significativamente menor que los 553 mg/dl en las hembras alimentadas con proteína de pollo. Ante estos resultados, se podría concluir que la ingesta de proteína de pavo en hembras *ApoE* KO provoca una disminución en los valores de colesterol plasmático con respecto al grupo de pollo.

### 6.2.2. Determinación de colesterol en fracciones de FPLC

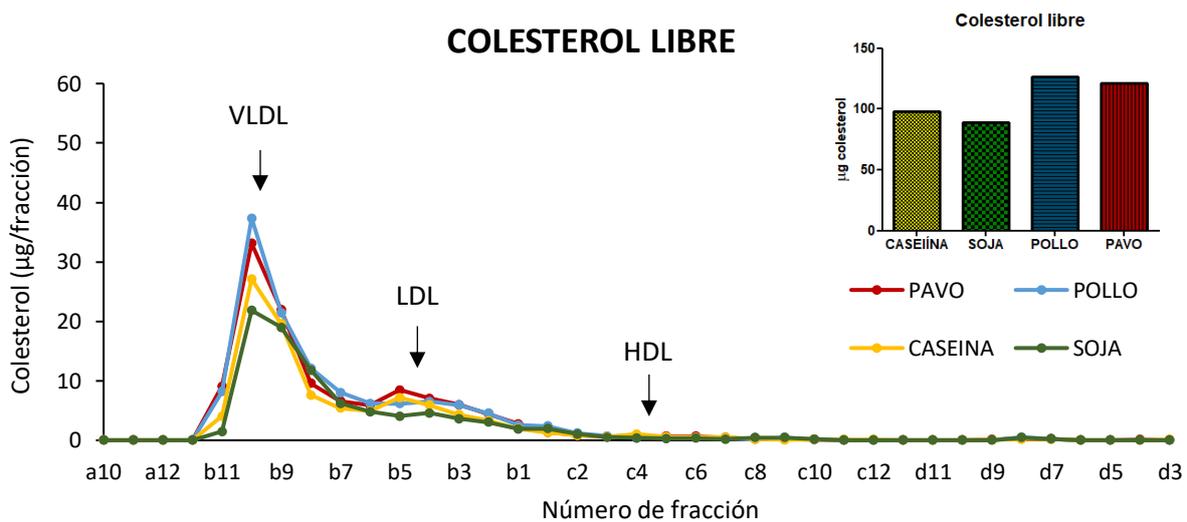
El objetivo de este ensayo fue determinar la concentración de colesterol en cada fracción eluida de la columna y configurar el perfil de colesterol para cada grupo experimental. Se determinó el colesterol total y el libre, omitiendo en este caso la enzima colesterol esterasa. El perfil de la forma esterificada se obtuvo como la diferencia entre el total y el libre. Además, como el volumen de cada fracción es de 500  $\mu$ L, se puede calcular la cantidad de colesterol presente en cada una y sumar las cantidades para comparar el colesterol entre grupos. En las figuras 6, 7 y 8 se representan los diferentes perfiles obtenidos.



**Figura 6. Perfil de colesterol total de las fracciones de FPLC de ratones *ApoE* KO hembra.** La curva amarilla representa al grupo de caseína, la verde al grupo de soja, la azul al grupo de pollo y la roja al grupo de pavo. El gráfico de barras representa el sumatorio de colesterol de todas las fracciones de cada grupo experimental.

En la figura 6 se observa una gran cantidad de **colesterol total** asociado a VLDL, las primeras en salir de la columna. El siguiente pico es algo más moderado y corresponde al asociado a LDL. Por último, se observa un ligero pico de colesterol que corresponde a las lipoproteínas de menor tamaño, las HDL. Las HDL nacientes no van a ser detectadas por este método, ya que están recién sintetizadas y todavía carecen de colesterol. El perfil observado es típico de ratones carentes de apoE, los cuales tienen muchas VLDL y LDL acumuladas en plasma, por ello la mayor parte del colesterol plasmático está asociado a ellas. Las HDL apenas presentan colesterol, a diferencia de los ratones congéneres *wild-type* que muestran la mayor parte de éste asociado a HDL.

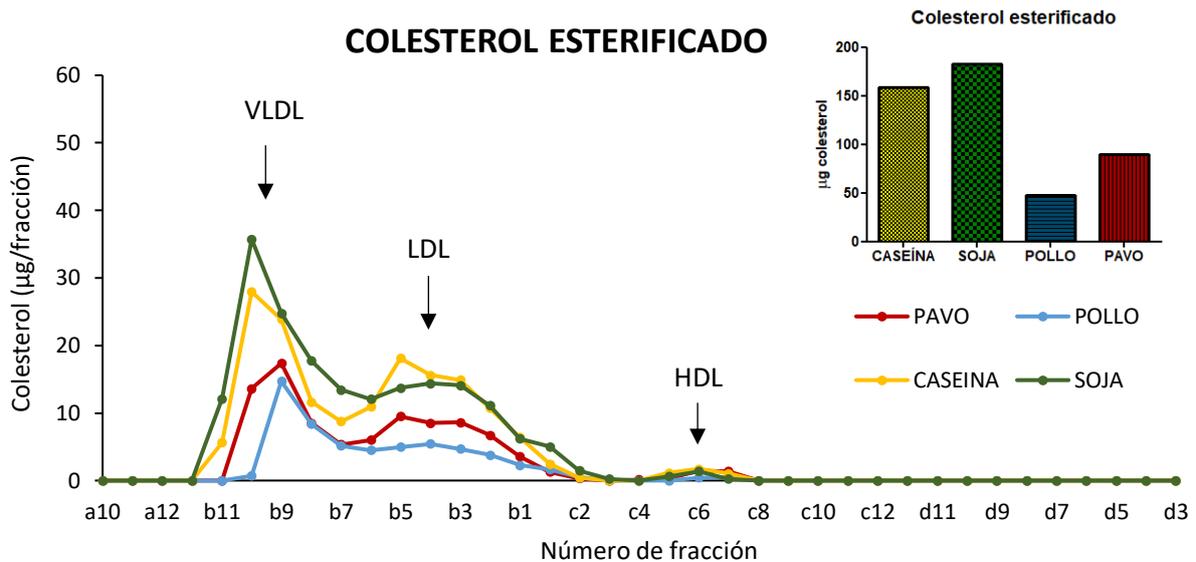
Si se calcula el área bajo la curva de los diferentes perfiles, se observa en la figura 6 que el grupo de pollo tiene una menor cantidad de colesterol total, concretamente 174  $\mu\text{g}$ . Sin embargo, el grupo de soja presenta una cantidad de 271  $\mu\text{g}$  de, la más alta de los cuatro grupos. A pesar de estas leves diferencias, todos los grupos siguen el mismo patrón de distribución de colesterol, es decir, todos lo tienen asociado mayoritariamente a las VLDL, luego a las LDL y en menor medida a las HDL. Cabe destacar que la determinación colorimétrica de colesterol total asignó valores superiores de este lípido al grupo de pollo, lo que no concuerda con el resultado obtenido por el método fluorimétrico. Este hecho podría ser debido a que los datos obtenidos presentan variaciones muy ligeras entre ellos.



**Figura 7.** Perfil de colesterol libre de las fracciones de FPLC de ratones hembra *ApoE KO*. El gráfico de barras representa el sumatorio de colesterol de todas las fracciones de cada grupo experimental.

Al omitir la coolesterol esterasa, los ésteres de coolesterol permanecen intactos en la muestra y no son cuantificados. En la figura 7 se muestra el perfil de **coolesterol libre**, cuyo patrón de distribución es semejante al de la figura 6.

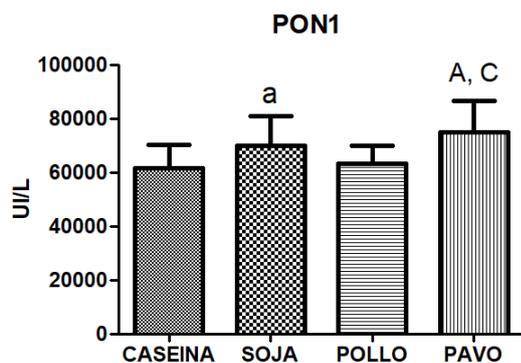
La forma **esterificada** se encuentra bastante asociada a las LDL, dado que su forma libre apenas se asocia a ellas. De la misma manera, las VLDL no tienen tanto coolesterol esterificado como libre, aunque siguen siendo las lipoproteínas con mayor cantidad, al ser las más abundantes en el plasma de estos ratones *ApoE KO*. Por su parte, las HDL no tienen apenas coolesterol libre asociado, por lo que estas lipoproteínas contienen la mayor parte de este lípido esterificado. Por otro lado, se observan diferencias en función de la dieta en la asociación de coolesterol a las lipoproteínas, ya que en el caso de la dieta de pollo y pavo, la forma más abundante de coolesterol asociada a VLDL y LDL es la libre, mientras que en la dieta de caseína y soja, es la esterificada.



**Figura 8.** Perfil de colesterol esterificado de las fracciones de FPLC de ratones hembra *ApoE KO*. El gráfico de barras representa el sumatorio de colesterol de todas las fracciones de cada grupo experimental.

Se podría concluir que el grupo de soja es el que más colesterol total tiene asociado a lipoproteínas, encontrándose la mayor parte esterificado. En cuanto al grupo de pollo, sucede lo contrario, ya que es el grupo con menor cantidad total, pero su mayor parte se encuentra libre en plasma, y tiene muy poca cantidad en su forma esterificada.

### 6.2.3. Cuantificación de la actividad paraoxonasa



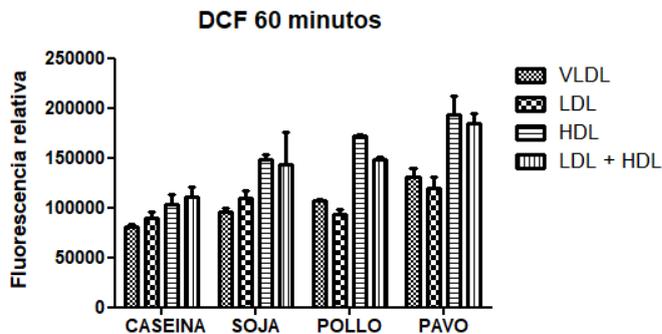
**Figura 9.** Valores de actividad paraoxonasa en suero. Resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test t de Student. a, A:  $p \leq 0,05$  ó  $p < 0,01$  vs. caseína; C:  $p < 0,01$  vs. pollo.

La hidrólisis del fenilacetato permitió evaluar la actividad esterasa de PON1 y expresarla en UI/L. En la figura 9 se representa la media aritmética de actividad PON1 en suero manifestada en cada grupo, así como su desviación estándar. Se observan diferencias muy significativas entre el grupo de pollo y pavo ( $P < 0,01$ ), entre el de caseína y pavo ( $P < 0,01$ ) y significativas entre el de caseína y soja ( $P \leq 0,05$ ). El grupo de soja y sobre todo el de pavo, mostraron una mayor actividad esterasa PON1 *in vitro*, de 70076 y 74854 UI/L, respectivamente. Es decir, estos grupos hidrolizan con mayor eficiencia el fenilacetato.

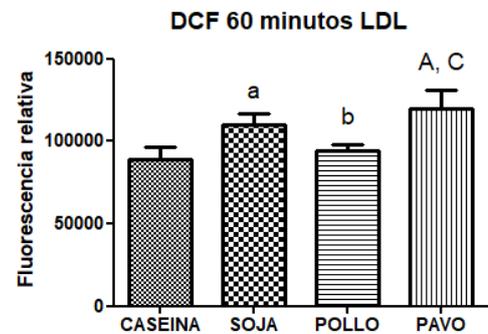
La PON1 tiene un efecto antiaterogénico al actuar como antioxidante natural de las LDL, degradando los peróxidos lipídicos y evitando su acumulación sobre las LDL, de forma que se previene o ralentiza la formación de la placa de ateroma en el espacio subendotelial (29). Se puede concluir que la ingesta de proteína de pavo y de soja produce un aumento de actividad paraoxonasa 1 si se compara con la ingesta de caseína y pollo en las hembras *ApoE KO*.

#### 6.2.4. Ensayo de oxidación de lipoproteínas plasmáticas

El objetivo de este ensayo fue determinar la oxidación de las diferentes lipoproteínas plasmáticas y estudiar la capacidad de las HDL para prevenir o inactivar la formación de fosfolípidos oxidados en las LDL. Se sometieron las diferentes lipoproteínas de cada grupo por separado, además de una muestra con LDL y HDL, a una medida de las ROS, empleando el compuesto diclorofluoresceína.



**Figura 10.** Estado oxidativo de las diferentes lipoproteínas en ratones hembra *ApoE KO*. Los datos representados están tomados tras 1 h de incubación con DCF. Resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar.



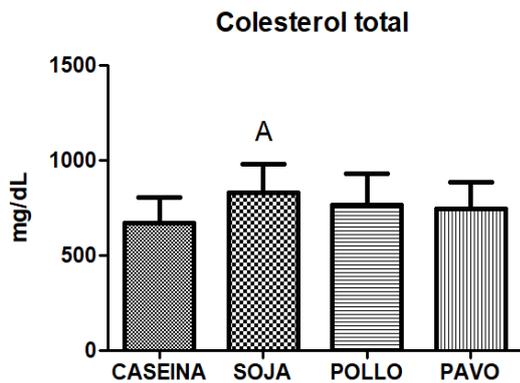
**Figura 11.** Estado oxidativo de las LDL en ratones hembra *ApoE KO*. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test t de Student. a, A:  $p \leq 0,05$  ó  $p < 0,01$  vs. caseína; b:  $p \leq 0,05$  vs. soja y C:  $p < 0,01$  vs. pollo.

En la figura 10 se muestra la fluorescencia emitida por las diferentes lipoproteínas de cada grupo estudiado tras 60 minutos de incubación con DCF. Las HDL de todos los grupos emiten una señal mayor que el resto de lipoproteínas, indicando una mayor oxidación de éstas frente a las LDL. Se trata de un resultado imprevisto, dado que a priori se esperaba una mayor oxidación de las LDL, una de las principales causas del inicio del proceso aterogénico. Además, no se aprecia el efecto protector de las HDL cuando se incuban junto con las LDL, ya que este pocillo tendría que emitir una señal de fluorescencia menor a la emitida por el pocillo de LDL. Una idea que podría explicar este hecho es que las LDL de estos ratones están muy poco oxidadas, de forma que el efecto protector y antioxidante de las HDL es prácticamente inapreciable. Por otro lado, al comparar entre los diferentes grupos experimentales, no se observan diferencias significativas en el estado oxidativo de las lipoproteínas.

Al comparar el estado oxidativo de las LDL según la fuente proteica (figura 11) se ve que los animales alimentados con la dieta de pavo presentan una oxidación mayor que los animales alimentados con caseína y pollo ( $P < 0,01$  en ambos). Por otro lado se aprecia que las LDL del grupo soja presentan una oxidación significativamente mayor que caseína y pollo ( $P \leq 0,05$ ).

### 6.3. RATONES MACHO

#### 6.3.1. Determinación de colesterol total en plasma

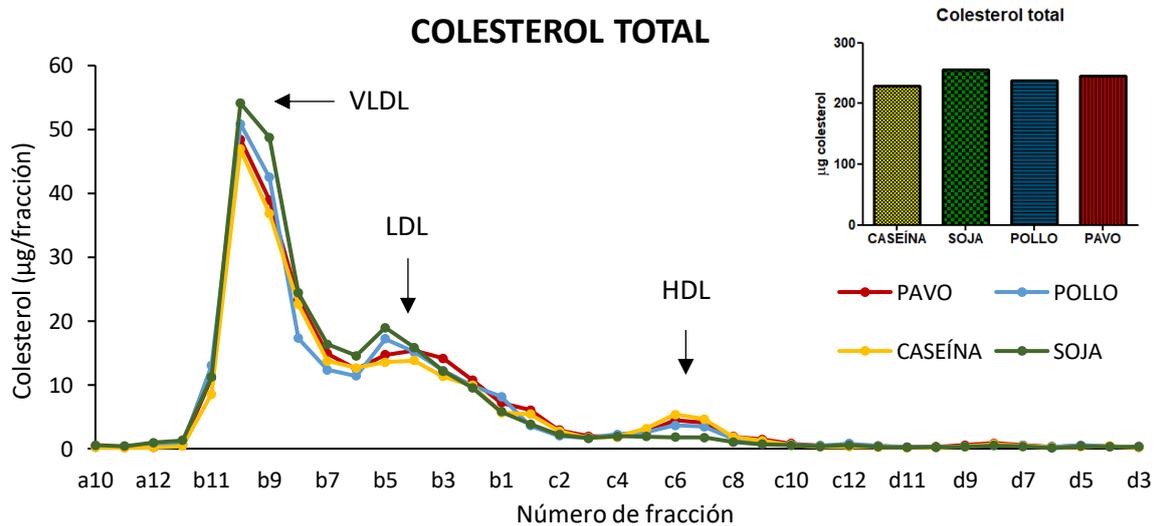


**Figura 12.** Valores plasmáticos de colesterol. Resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test no paramétrico de Mann-Whitney. A:  $p < 0,01$  vs. caseína.

En la figura 12 se representa la concentración media de colesterol plasmático de cada grupo de ratones macho. A pesar de que los grupos no difieren mucho en dicha concentración, se observa una diferencia muy significativa ( $P < 0,01$ ) entre el grupo de caseína y soja. Los ratones macho que recibieron caseína como única fuente proteica tienen los niveles de colesterol más bajos, concretamente 668 mg/dl. Diversos estudios nutricionales han demostrado que proteínas de origen animal, como la caseína, incrementan los niveles de este lípido en plasma, por lo que se trata de un resultado inesperado (22). Por otro lado, los machos alimentados con proteína de soja presentan los niveles de colesterol más altos de los cuatro grupos, concretamente de 830 mg/dl.

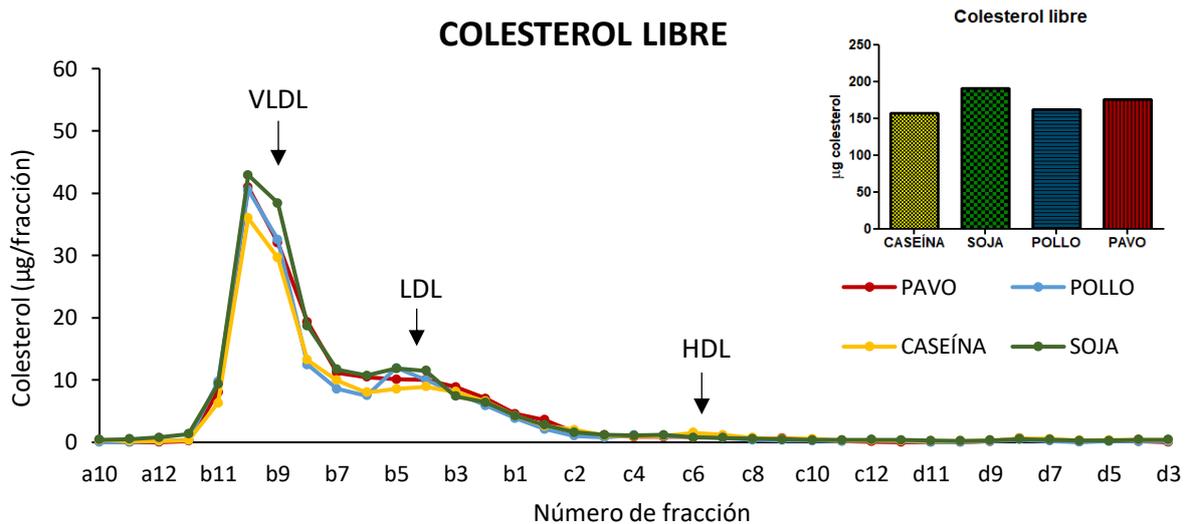
#### 6.3.2. Determinación de colesterol en fracciones de FPLC

En las figuras 13, 14 y 15 se muestran los tres perfiles de colesterol de cada grupo estudiado.



**Figura 13.** Perfil de colesterol total de las fracciones de FPLC de ratones macho *ApoE KO*. El gráfico de barras representa el sumatorio de colesterol de todas las fracciones de cada grupo experimental.

Se observa que los cuatro grupos son homogéneos dado que muestran patrones muy similares de distribución de **colesterol total**, típicos de ratones *ApoE* KO. Además, todos presentan cantidades totales de este compuesto muy similares, en torno a 240  $\mu\text{g}$ , como se estima en el gráfico de barras de la figura 13. Cabe destacar que el grupo de soja presenta la mayor parte del colesterol asociado a VLDL y LDL, pero sus HDL son las que menos cantidad llevan asociada de los cuatro grupos. En cuanto al grupo de caseína ocurre lo contrario, ya que es el grupo con mayor colesterol unido a HDL y con menor cantidad asociada a VLDL y LDL.

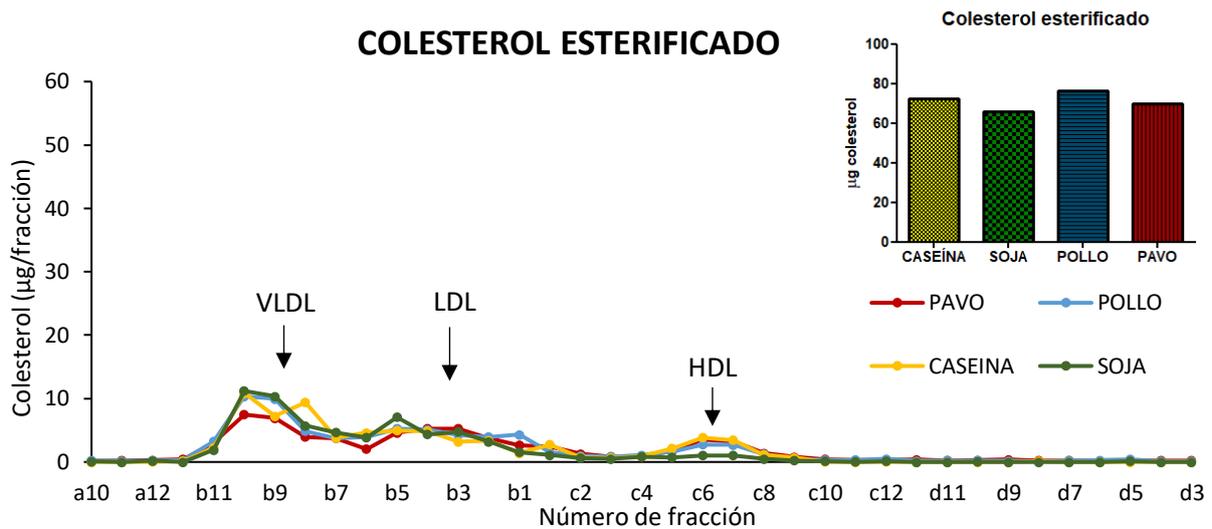


**Figura 14.** Perfil de colesterol libre de las fracciones de FPLC de ratones macho *ApoE* KO. El gráfico de barras representa el sumatorio de colesterol de todas las fracciones de cada grupo experimental.

Al igual que con el colesterol total, no se observan diferencias significativas entre grupos y la mayor parte de la forma **libre** está asociado a VLDL y LDL. Como se observa en el gráfico de barras, puede apreciarse una ligera predominancia de cantidad de colesterol libre en el grupo de soja, como ocurre con el total.

En el perfil de **colesterol esterificado** se observa que VLDL, LDL y HDL transportan cantidades semejantes en plasma. Cabe destacar que el colesterol asociado a VLDL está prácticamente libre, ya que el pico de VLDL en el perfil de la forma esterificada es muy pequeño en comparación con el pico en el perfil de su forma libre. El colesterol asociado a LDL también está mayoritariamente libre, pero la diferencia no es tan significativa. Las HDL apenas presentan colesterol libre asociado y destaca únicamente el grupo de caseína con una ligera cantidad asociado a ellas. Es decir, la mayor parte de colesterol asociado a HDL en todos los grupos está en su forma esterificada.

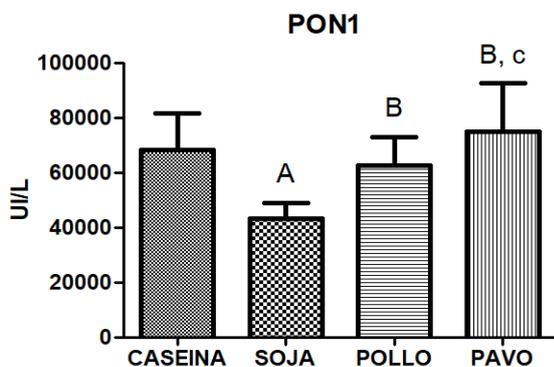
Ante estos resultados, se podría concluir que los ratones macho *ApoE* KO son bastante homogéneos en cuanto a su cantidad y distribución de colesterol, aunque el grupo de soja presenta una mayor cantidad, principalmente en su forma libre. Estos animales muestran poco colesterol esterificado asociado a sus lipoproteínas, principalmente VLDL y LDL, y no se aprecia una lipoproteína predominante en su transporte.



**Figura 15.** Perfil de colesterol esterificado de las fracciones de FPLC de ratones macho *ApoE KO*. El gráfico de barras representa el sumatorio de colesterol de todas las fracciones de cada grupo experimental.

Un estudio (36) sugiere que el colesterol libre asociado a VLDL y LDL y el colesterol esterificado asociado a HDL constituyen factores de riesgo cardiovascular y el ratio entre ambas formas de colesterol supone un potente índice para el diagnóstico clínico de enfermedad vascular. Se ha visto que pacientes con patologías cardiovasculares tienen elevado el colesterol total, principalmente en su forma libre, y disminuido el colesterol esterificado asociado a las HDL. Los ratones macho *ApoE KO* tienen muy poco colesterol esterificado asociado a VLDL y LDL, lo que constituye un factor de riesgo.

### 6.3.3. Cuantificación de la actividad paraoxonasa



**Figura 16.** Valores de actividad paraoxonasa en suero. Resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test no paramétrico de Mann-Whitney. a, A:  $p \leq 0,05$  ó  $p < 0,01$  vs. caseína; b, B:  $p \leq 0,05$  ó  $p < 0,01$  vs. soja y c:  $p < 0,01$  vs. pollo.

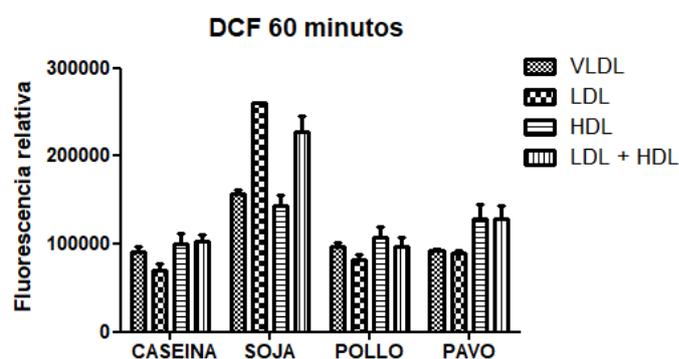
En la figura 16 se representa la media aritmética de actividad PON1 en cada grupo experimental. Se observa una disminución significativa de la actividad PON1 en el grupo de los animales alimentados con la dieta de soja si se compara con el resto de los grupos experimentales ( $P < 0,01$ ). En cuanto al resto de grupos, cabe destacar que el de pavo presenta una mayor actividad enzimática PON1 que el resto, siendo esta diferencia significativa con el grupo de soja y pollo ( $P < 0,01$  y  $P \leq 0,05$  respectivamente). Con los resultados obtenidos, se puede concluir que la proteína de pavo es la que mayor efecto antiaterogénico tiene de todas las estudiadas en ratones macho *ApoE KO*, dado que los animales alimentados con dicha fuente proteica presentaron niveles de actividad PON1 más elevados.

Cabe destacar que la actividad PON1 varía en función de la condición experimental y en ambos sexos, se le atribuye a la proteína de pavo un mayor efecto antiaterogénico. En definitiva, estudios adicionales de PON1 con diferentes dietas proteicas podrían tener un impacto como elección de la fuente proteica en pacientes con una patología de riesgo aterosclerótico.

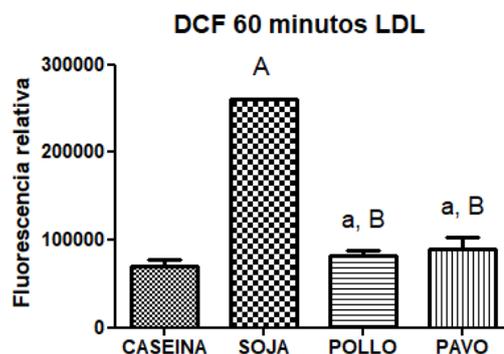
Sin embargo, es de extrañar que el grupo alimentado con proteína de soja muestre la menor actividad enzimática, ya que estudios anteriores atribuyen un papel protector a la soja frente al desarrollo del proceso aterosclerótico (20). Una hipótesis que podría explicar este hecho es que los animales de este grupo fueron alimentados con un extracto de proteínas puro, y como se ha comentado en la introducción, el efecto protector de la soja podría ser consecuencia del elevado contenido en isoflavonas de los extractos de soja utilizados en otros ensayos experimentales (37).

### 6.3.4. Ensayo de oxidación de lipoproteínas plasmáticas

La estimación de las ROS en muestras de lipoproteínas se determinó con el compuesto diclorofluoresceína. En el caso de los machos, al igual que en las hembras, se tomaron medidas de fluorescencia a los 60 minutos de incubación con el compuesto DCF.



**Figura 17.** Estado oxidativo de las diferentes lipoproteínas en ratones macho *ApoE KO*. Los datos representados están tomados tras 1 h de incubación con DCF. Resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar.



**Figura 18.** Estado oxidativo de las LDL en ratones hembra *ApoE KO*. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test t de Student. a, A:  $p \leq 0,05$  ó  $p < 0,01$  vs. caseína; B:  $p < 0,01$  vs. soja.

En la figura 17 se muestra la fluorescencia emitida por las diferentes lipoproteínas de cada grupo estudiado tras 60 minutos de incubación con DCF. Los grupos de caseína, pollo y pavo muestran patrones de fluorescencia comunes, con las HDL más oxidadas que el resto de lipoproteínas. Además, el pocillo LDL + HDL no muestra la disminución esperada en la señal emitida por las LDL, lo que tampoco afirma el efecto protector de las HDL. No obstante, el grupo de soja presenta una mayor fluorescencia, y por tanto, una mayor oxidación para todas las lipoproteínas, especialmente para las LDL. En este grupo se aprecia el efecto protector de las HDL, dado que el pocillo LDL + HDL emite menor señal que el de LDL, lo que indica la prevención de la oxidación lipídica de las LDL.

En la figura 18, al comparar el estado oxidativo de las LDL según la fuente proteica, se ve que los animales alimentados con la dieta de soja presentan una oxidación significativamente mayor que los animales alimentados con caseína, pollo y pavo ( $P < 0,01$ ). Además, se perciben diferencias significativas entre el grupo de caseína y los de pollo y pavo ( $P \leq 0,05$  en ambos casos).

En definitiva, todo parece indicar que los ratones macho alimentados con proteína de soja tenían las LDL bastante oxidadas. Únicamente en este grupo se observa el efecto de protección vascular ejercido por las HDL. Sin embargo, al igual que ocurre con los ratones hembra, las LDL del resto de grupos parecen no estar muy oxidadas, de forma que es muy complicado apreciar el efecto protector y antioxidante de las HDL.

## 7. CONCLUSIONES

En función de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos y de acuerdo a los objetivos establecidos al inicio de este trabajo, se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. La ingesta de **pavo** en la dieta produce una disminución en los niveles de **colesterol plasmático**, así como un aumento de la actividad **paraoxonasa 1** en suero, en comparación con la ingesta de caseína y pollo, en **ratones hembra ApoE KO**. Además, se observa que los animales alimentados con proteínas de pollo y pavo presentan la mayor parte del colesterol asociado a lipoproteínas, en su forma libre.
2. No existen diferencias significativas en el **estado oxidativo de las lipoproteínas** entre los distintos grupos experimentales en **ratones hembra ApoE KO**.
3. La ingesta de **soja** en la dieta produce un aumento de **colesterol plasmático** frente a la ingesta de **caseína** en **ratones macho ApoE KO**.
4. La ingesta de **soja** induce una menor actividad **paraoxonasa 1** en suero, en comparación con la ingesta de caseína, pollo y pavo, en **ratones macho ApoE KO**.
5. La capacidad de las HDL para inactivar los peróxidos lipídicos solo es efectiva cuando los niveles de oxidación de las LDL son elevados. La ingesta de **soja** produce un aumento de la **oxidación de las LDL** en comparación con la ingesta de caseína, pollo y pavo, en **ratones macho ApoE KO**, lo que permite observar el efecto protector de las HDL.

## 8. CONCLUSIONS

Based on the results obtained in the different experiments and according to the objectives set at the beginning of this study, the following conclusions have been achieved:

1. Dietary **turkey** intake produces a decrease in **plasma cholesterol** levels, as well as an increase in serum **paraoxonase 1** activity, in comparison with casein and chicken intake, in **female ApoE KO** mice. In addition, it's observed that the animals fed with chicken and turkey proteins present most of the cholesterol associated with lipoproteins, in their free form.
2. There are no significant differences in the **oxidative status of lipoproteins** between the different experimental groups in **female ApoE KO** mice.
3. Dietary **soy** intake results in increased **plasma cholesterol** versus **casein** intake in **male ApoE KO** mice.
4. **Soy** intake induces lower serum **paraoxonase 1** activity, in comparison with casein, chicken and turkey intake in **male ApoE KO** mice.

5. The ability of HDL to inactivate lipid peroxides is only effective when LDL oxidation levels are high. **Soy** intake produces an increase in **LDL oxidation** in comparison with casein, chicken and turkey intake, in **male ApoE KO** mice, which allow us to observe the protective effect of HDL.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Errico TL, Chen X, Martin Campos JM, Julve J, Escolà-Gil JC, Blanco-Vaca F. Mecanismos básicos: estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*. 2013;25(2):98-103.
2. Carvajal C. Lipoproteínas: metabolismo y lipoproteínas aterogénicas. *Asociación Costarricense de Medicina Forense*. 2014;31(2). ISSN 1409-0015.
3. Mahley RW, Ji Z-S. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *Journal of Lipid Research*. 1999;40;16.
4. Luis DA de, Izaola O, Primo D, García Calvo S, Gómez Hoyos E, López Gómez JJ, et al. Relación de la variante rs1800777 del gen CETP (proteína transportadora de ésteres de colesterol) con la masa grasa y HDL colesterol, en sujetos obesos con diabetes mellitus tipo 2. *Nutrición Hospitalaria*. 2017;34(6):1328-32.
5. Shore VG, Shore B. Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry*. 1973;12(3):502-7.
6. Mahley R. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*. 1988;240(4852):622-30.
7. Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *Journal of Lipid Research*. 2009;50: S183-8.
8. Weisgraber KH. Apolipoprotein E: Structure-Function Relationships. *Advances in Protein Chemistry*. Elsevier 1994; 45:249-302.
9. Utermann G, Langenbeck U, Beisiegel U, Weber W. Genetics of the Apolipoprotein E System in Man. *American Society of Human Genetics*.-1979; 32:339-347.
10. Navarro MA, Arbonés JM, Acín S, Carnicer R, Sarría AJ, Surra JC, et al. Animales de experimentación utilizados como modelos en la investigación de la arteriosclerosis. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*. 2005;17(2):82-93.
11. Lezcano EJ. Modificación de las rutas metabólicas de las lipoproteínas de alta densidad en fases precoces del daño endotelial en obesidad y diabetes: estudio en modelo experimental animal. [Tesis doctoral] Universidad de Zaragoza. Medicina, Psiquiatría y Dermatología. 2013.
12. Santos-Gallego CG, Badimon JJ, Ibáñez B. Modelos experimentales de aterosclerosis. *Revista Española de Cardiología Suplementos*. Elsevier 2013; 13:3-12.

13. Mahley RW, Rall SC. Apolipoprotein E: Far More Than a Lipid Transport Protein. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2000;1(1):507-37.
14. Paul A, Joven J. El ratón deficiente en apolipoproteína E y su aplicación al estudio de la arteriosclerosis. *Clínica e Investigación En Arteriosclerosis*. 2001;13(4):162-6.
15. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. 1992;71(2):343-53.
16. Zhang S, Reddick R, Piedrahita J, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*. 1992;258(5081):468-71.
17. Acín S, Navarro MA, Carnicer R, Arbonés-Mainar JM, Guzmán MA, Arnal C, et al. Dietary cholesterol suppresses the ability of olive oil to delay the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Atherosclerosis*. 2005;182(1):17-28.
18. Arbonés-Mainar JM, Navarro MA, Carnicer R, Guillén N, Surra JC, Acín S, et al. Accelerated atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice fed Western diets containing palm oil compared with extra virgin olive oils: A role for small, dense high-density lipoproteins. *Atherosclerosis*. 2007;194(2):372-82.
19. Lou-Bonafonte JM, Arnal C, Navarro MA, Osada J. Efficacy of bioactive compounds from extra virgin olive oil to modulate atherosclerosis development. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2012;56(7):1043-57.
20. Adams MR, Golden DL, Anthony MS, Register TC, Williams JK. The Inhibitory Effect of Soy Protein Isolate on Atherosclerosis in Mice Does Not Require the Presence of LDL Receptors or Alteration of Plasma Lipoproteins. *J Nutr*. 2002;132(1):43-9.
21. Nagarajan S, Burris RL, Stewart BW, Wilkerson JE, Badger TM. Dietary Soy Protein Isolate Ameliorates Atherosclerotic Lesions in Apolipoprotein E-Deficient Mice Potentially by Inhibiting Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression. *J Nutr*. 2008;138(2):332-7.
22. Damasceno NRT, Gidlund MA, Goto H, Dias CTS, Okawabata FS, Abdalla DSP. Casein and Soy Protein Isolate in Experimental Atherosclerosis: Influence on Hyperlipidemia and Lipoprotein Oxidation. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2001;45(1):38-46.
23. Zhang Y, Kouguchi T, Shimizu K, Sato M, Takahata Y, Morimatsu F. Chicken Collagen Hydrolysate Reduces Proinflammatory Cytokine Production in C57BL/6.KOR-ApoEsh1 Mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)*. 2010;56(3):208-10.
24. Calmarza P. Lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas. *Revista Electrónica de Biomedicina / Electronic Journal of Biomedicine*. 2008; 3:1-64.
25. Olivares-Corichi IM, Medina-Navarro R., Torres-Ramos Y., Montes Cortés DH. Daño a proteínas por estrés oxidante: Lipoproteína de baja densidad e insulina. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 2006; 14(4): 237-240.

26. Martínez-González J, Llorente-Cortés V, Badimon L. Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas. *Revista Española de Cardiología*. 2001; 54(2):218-31.
27. Kosmas CE, Martinez I, Sourlas A, Bouza KV, Campos FN, Torres V, et al. High-density lipoprotein (HDL) functionality and its relevance to atherosclerotic cardiovascular disease. *Drugs Context*. 2018; 7:1-9.
28. Mackness M, Mackness B. Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. *Gene Elsevier*. 2015;567(1):12-21.
29. Camps J, Marsillach J, Joven J. The paraoxonases: role in human diseases and methodological difficulties in measurement. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2009; 46(2):83-106.
30. Furlong CE, Suzuki SM, Stevens RC, Marsillach J, Richter RJ, Jarvik GP, et al. Human PON1, a biomarker of risk of disease and exposure. *Chemico-Biological Interaction*. 2010; 187(1-3):355-61.
31. Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochemical Pharmacology*. 2005; 69(4):541-50.
32. Deakin S, Leviev I, Guernier S, James RW. Simvastatin Modulates Expression of the *PON1* Gene and Increases Serum Paraoxonase: A Role for Sterol Regulatory Element-Binding Protein-2. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2003; 23(11):2083-9.
33. Paragh G, Harangi M, Seres I. Effect of Lipid Lowering Medications on PON1. En: Mackness B, Mackness M, Aviram M, Paragh G, editores. *The Paraoxonases: Their Role in Disease Development and Xenobiotic Metabolism*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2008; 6:251-66.
34. Paige Davis Volk A, Moreland JG. ROS-Containing Endosomal Compartments. En: *Methods in Enzymology*. Elsevier; 2014; 535:201-214.
35. LeBel CP, Ischiropolous H. and Bondy SC. Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chemical Research in Toxicology*. 1992; 5:227-231.
36. Bagheri B, Alikhani A, Mohktari H, Rasouli M. The Ratio of Unesterified/esterified Cholesterol is the Major Determinant of Atherogenicity of Lipoprotein Fractions. *Medical Archives - Journal of the Academy of Medical Science*. 2018;72(2):103.
37. Lou-Bonafonte JM, Gabás-Rivera C, Navarro MA, Osada J. PON1 and Mediterranean Diet. *Nutrients*. 2015;7(6):4068-92