



Papel del receptor de la Lipoproteína de baja densidad oxidado tipo lectina-1 como marcador sérico de la aterosclerosis

Role of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 as a serum marker of atherosclerosis

LETICIA FIGUEIRA^{*1 a,b}, JULIO CÉSAR GONZÁLEZ^{2 a,c}

Resumen

El receptor de lipoproteínas de baja densidad oxidado tipo lectina -1 (LOX-1) es una glicoproteína transmembrana que constituye el principal receptor de las lipoproteínas de baja densidad oxidada (LDLox), que participa en la disfunción endotelial, apoptosis y formación de células espumosas, eventos claves en la fisiopatología de la aterosclerosis. En el presente estudio se evaluó los niveles séricos de LOX-1, LDLox y los productos de peroxidación lipídica que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) y su evolución en el tiempo en conejos alimentados con dieta enriquecida con colesterol. Para ello, 42 conejos machos Nueva Zelanda fueron divididos en dos grupos durante 12 semanas: Grupo 1 (control): Conejarina. Grupo 2: Conejarina suplementada con 0,5% p/p de colesterol. Se realizaron determinaciones séricas de colesterol y sus fracciones, LOX-1, LDLox y TBARS al inicio, 4ta, 8va y 12ma semana de experimentación. 7 conejos de cada grupo fueron sacrificados a la 4ta, 8va y 12ma semana y se realizó estudio histológico de su aorta. Se encontró un aumento en los niveles séricos de LOX-1, LDLox y TBARS en el grupo 2 desde la 4ta semana de experimentación con respecto al control (Grupo 1) ($p < 0,0050$), lo cual se vio acompañado de ateromas. En conclusión, el LOX-1, LDLox y TBARS son marcadores séricos no invasivos de aterosclerosis; corroborando el papel del estrés oxidativo en la fisiopatología de la aterosclerosis.

Palabras clave: Receptor de lipoproteínas de baja densidad oxidado tipo lectina -1, lipoproteína de baja densidad oxidado, estrés oxidativo, aterosclerosis

Abstract

Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) is a transmembrane glycoprotein that constitutes the main receptor for oxidized low-density lipoproteins (oxLDL) and is involved in atherosclerosis and contributes to endothelial dysfunction, apoptosis, and foam cell formation. We evaluated the serum levels of LOX-1, oxLDL, and thiobarbituric acid-reactive lipid peroxidation products (TBARS) during the progression and evolution of atherosclerosis and its evolution over time in rabbits fed with a cholesterol diet. 42 New Zealand white male rabbits were randomly divided into two groups that received for 12 weeks: Group 1 (control): Standard diet (commercial rabbit food). Group 2: Cholesterol diet (0.5% cholesterol). Blood samples of overnight-fasted rabbits were collected on basal, fourth, eighth, and twelfth weeks, and concentration of lipid profile, LOX-1, oxLDL, and TBARS was determined. Seven of the animals from each group were sacrificed on the fourth, eighth, and twelfth week, and the aorta was dissected for histological studies. Our findings demonstrated that the LOX-1, oxLDL, and TBARS levels were significantly higher in Group 2 than in Group 1 starting on 4th week ($p < 0.0050$), which was accompanied by atherosclerotic lesions. These results support that serum LOX-1, oxLDL, and TBARS levels are noninvasive markers of atherosclerosis, supporting the role of oxidative stress in the physiopathology of atherosclerosis.

Keywords: Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, oxidized low-density lipoproteins, oxidative stress, atherosclerosis

^aLaboratorio de Investigación y Postgrado de la Escuela de Bioanálisis (LIPEB), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Carabobo – Venezuela. ^bLaboratorio Clínico Dra. Leticia Figueira Carabobo – Venezuela, ^cLaboratorio Clínico Julio César González. Carabobo – Venezuela. *Correspondencia: figueiraleticia@gmail.com

Orcid: ¹ [0000-0003-5865-5355](https://orcid.org/0000-0003-5865-5355)

² [0000-0003-1980-5848](https://orcid.org/0000-0003-1980-5848)

Introducción

La aterosclerosis es una enfermedad inmuno-inflamatoria crónica de los vasos sanguíneos que tiene como evento final la formación de la placa de ateroma. La infiltración de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el espacio subendotelial y su posterior oxidación constituye el evento inicial en el proceso de formación de la placa de ateroma, la cual es seguida por la infiltración, activación de células inflamatorias y la formación de las células espumosas (Khosravi y col., 2019).

La oxidación de las LDL, es un evento crucial para la aterogénesis; pues las LDL oxidadas (LDLox) poseen propiedades aterogénicas bien establecidas, ya que inducen la expresión de moléculas de adhesión celular, estimulan la activación de linfocitos, promueven la liberación de citoquinas inflamatorias, estimulan a las células musculares lisas, alteran la producción de óxido nítrico (NO), promueven la agregación plaquetaria y la formación de trombos y son quimiotácticas para los monocitos y macrófagos (Zingg y col., 2021).

Durante los últimos años, se ha reconocido que la inflamación juega un papel muy importante en la iniciación y desarrollo de la aterosclerosis (Marchio y col., 2019; Zingg y col., 2021); de hecho, se ha descrito que las LDLox estimulan la deposición de lípidos y la respuesta inflamatoria en la pared de los vasos sanguíneos, además de activar al receptor de lipoproteína de baja densidad oxidado tipo lectina-1 (LOX-1) (Kattoor y col., 2019).

El LOX-1 es una glicoproteína transmembrana que pertenece a la clase E de receptores carroñeros (SR) que media

la captación e internalización de las LDLox (Ogura y col., 2009; Xu y col., 2013; Tone y col., 2019). Este receptor constituye el principal receptor de las LDLox en las células endoteliales y se expresa en los macrófagos y células del músculo liso (Takanabe-Mori y col., 2013); es inducido por el estrés oxidativo y se asocia con la formación y desestabilización de la placa aterosclerótica; de hecho, el LOX-1 interactúa con la proteína C reactiva (PCR) y desempeña un papel prominente en las enfermedades inflamatorias (Stancel y col., 2016; Kattoor y col., 2019).

Existe evidencia de la estrecha relación entre el LOX-1 y la aterosclerosis, pues es responsable de mediar la mayoría de los efectos tóxicos de la LDLox; de hecho, se ha descrito que el LOX-1 se encuentra expresado en las lesiones ateroscleróticas, lo cual sugiere que podría desempeñar un papel importante desde las primeras etapas de la aterosclerosis, ya que funciona como una molécula de adhesión celular y está implicada en la inflamación (Kuge y col., 2008; Gorga y col., 2013; Pirillo y col., 2013); de igual manera se ha sugerido que el LOX-1 induce disfunción endotelial y contribuye en la formación y progresión de la placa aterosclerótica (Kattoor y col., 2019; Tone y col., 2019).

A pesar de la creciente evidencia de que el LOX-1 está implicado en la aterogénesis; su participación en la desestabilización de la placa, ruptura y la formación de trombos *in vivo*, no está clara. Se ha descrito un aumento en la expresión de esta proteína en la placa vulnerable y en eventos apoptóticos (Kuge y col., 2008), por lo tanto, el LOX-1 está implicado en procesos moleculares aterogénicos, y su capacidad de unirse a diversos ligandos hace que este receptor sea un biomarcador probable de

enfermedad vascular, así como un posible blanco farmacológico en el manejo de las enfermedades cardiovasculares (Reiss y col., 2009). A pesar de que está bien documentado que el LOX-1 participa en la fisiopatología de la aterosclerosis, no está clara su evolución a lo largo del proceso aterogénico. Es por lo que, en el presente estudio se evaluó los niveles séricos de LOX-1 como un posible biomarcador de aterosclerosis y su evolución en el tiempo en conejos alimentados con dieta enriquecida con colesterol.

Materiales y métodos

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Se emplearon 42 conejos machos de la raza Nueva Zelanda de 12 semanas de edad con un peso entre 1.200 a 1.300 gramos, provenientes del Bioterio del Instituto de Higiene "Rafael Rangel" (Caracas, Venezuela). Los animales fueron mantenidos en jaulas a temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) con ciclos de 12 horas luz/oscuridad. Después de una semana de ambientación en el Bioterio Experimental de la Universidad de Carabobo (Valencia, Venezuela), los conejos fueron divididos aleatoriamente en dos grupos de 21 conejos cada uno, organizados de la siguiente manera: Grupo 1 (Control): Los cuales fueron alimentados diariamente con conejarina comercial (Protinal, Venezuela). Grupo 2 (Colesterol): Alimentados diariamente con conejarina comercial suplementada con 0,5% p/p de colesterol.

Todos los conejos consumieron agua a libre demanda. El periodo experimental tuvo una duración de doce semanas. Los conejos fueron pesados antes, durante

y después de la experimentación. Los experimentos fueron aprobados por el Comité de Bioética, y siguieron las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio del National Institute of Health (NIH Publications No. 8023,1978).

ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS ALIMENTOS

Conejarina comercial (Protinal, Venezuela)

Maíz, sorgo, afrechillo de trigo, harinas de maíz, ajonjolí, algodón, girasol y soya, concha de arroz, bagacillo de caña, pasto deshidratado, melaza, grasa estabilizada, carbonato y fosfato de calcio, sal, minerales "trazas" (cobalto, cobre, hierro, manganeso, yodo y zinc), suplementos de las vitaminas A, B2, B12, C, D3, E, ácido pantoténico y niacina, antioxidante, suplemento antibiótico y anticoccidial. Proteína cruda 12%, grasa cruda 1%, fibra cruda 20%, extracto libre de nitrógeno 42%.

DIETA HIPERCOLESTEROLÉMICA

La administración de colesterol mediante el enriquecimiento de una dieta estándar se realizó de acuerdo con el método descrito en los modelos animales de aterosclerosis inducida por la dieta (Rasmusen y col., 2007); la cual se preparó disolviendo el colesterol en etil-éter y etanol absoluto, y cubriendo con esta mezcla los granos de la conejarina en una relación de 0,5 g de colesterol por cada 100 g de alimento y se dejó secar hasta la evaporación completa de los solventes por 24 horas.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

Las muestras de sangre fueron extraídas por punción intracardiaca a todos los conejos previo ayuno de 14 horas en

las semanas 0, 4^{ta}, 8^{va} y 12^{ma}, utilizando tubos sin anticoagulante. Posteriormente, las muestras previamente mantenidas en frío se centrifugaron a 3.000 rpm durante 15 minutos y el suero obtenido fue conservado en congelación a -70°C hasta el momento del procesamiento. Se realizaron determinaciones séricas de colesterol total (CT) por método enzimáticos (Wiener Lab, Argentina). La determinación del colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) y asociado a las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) se realizaron por precipitación y posterior determinación enzimática (Wiener Lab, Argentina). Las concentraciones séricas de LDLox y LOX-1 fueron determinadas por ensayo inmunoenzimático (NeoBiolab, Cambridge, Massachusetts, USA). Los TBARS fueron cuantificados mediante un método colorimétrico, el cual consistió en evaluar el efecto de las especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre los lípidos, que resulta en la producción de varias sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico y que pueden ser medidas por espectrofotometría (Ohkawa y col., 1979). Para ello, las muestras de suero fueron tratadas con ácido tricloroacético al 10% y centrifugadas a 1.600 g durante 15 min a 4°C. Seguidamente, el sobrenadante fue incubado con ácido tiobarbitúrico 0,67% durante 10 min a 100°C. Paralelamente se construyó una curva patrón con malonildialdehído. Se determinó la densidad óptica a 532 nm y la concentración de los productos de peroxidación lipídica fueron calculados y expresados como malonildialdehído formado. Los resultados de los TBARS fueron expresados en μM .

SACRIFICIO DE LOS ANIMALES. PREPARACIÓN DE TEJIDOS Y TIPIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LAS LESIONES ATROSCLERÓTICAS

Se sacrificó por dislocación cervical 7 conejos de cada grupo a la 4^{ta}, 8^{va} semana y al final del estudio. Se procedió a realizar la autopsia de dichos animales, extrayendo la arteria aorta para ser examinada. Las muestras de tejido extraídas fueron fijadas en formaldehído al 10 % en PBS durante 24 horas y procesadas según la técnica de rutina y posteriormente teñidas con hematoxilina – eosina, para luego ser observados por microscopía de luz. Las lesiones fueron tipificadas de acuerdo con la clasificación de la American Heart Association, la cual considera como lesiones tipo I, aquellas iniciales constituidas por células espumosas sub-endoteliales aisladas; las lesiones tipo II constituidas principalmente por un cúmulo de lípidos intracelulares; las lesiones tipo III son intermedias o pre-ateromas, caracterizadas por cúmulos de lípidos intracelulares y dispersos lípidos extracelulares; las lesiones tipo IV son los ateromas, representan lesiones avanzadas, y están constituidas por lípidos intracelulares y por una gran cantidad de lípidos extracelulares; las lesiones tipo V contienen tejido conectivo fibroso y en ocasiones se encuentran calcificaciones y las lesiones tipo VI son las placas complicadas (fisura, trombos, hematomas) (Stary y col., 1995).

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Se calculó el promedio y la desviación estándar para las variables estudiadas. Se realizó las pruebas de normalidad

de Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Jarque-Bera. Se empleó el análisis de Kruskal-Wallis con análisis post hoc mediante la prueba de U- de Mann-Whitney sobre cada par de grupos. Se empleó la correlación de Spearman para relacionar el LOX-1 con las variables del estudio. Se consideró significativo $p < 0,05$. Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.

Resultados

PERFIL LIPÍDICO DE LOS CONEJOS

Como se puede observar en la Tabla I, no se observó diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones séricas basales de los lípidos séricos entre los grupos de conejos sujetos a estudio. El colesterol total (CT) y sus fracciones en el grupo 1 permanecieron sin cambios significativos a lo largo del estudio. Sin embargo, en la 4^{ta}, 8^{va} y 12^{ma} semana de experimentación se observó un aumento significativo en la concentración de CT, c-HDL y c-LDL en el grupo 2 con respecto al grupo 1 ($p < 0,0001$). Para el grupo 2 las concentraciones de los lípidos variaron desde el inicio hasta el final del experimento, observándose un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,0001$) (Tabla I).

CONCENTRACIONES SÉRICAS DE LOS MARCADORES DE OXIDACIÓN

Como se puede apreciar en las Figuras 1, 2 y 3, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones séricas basales de LOX-1, LDLox y TBARS entre los grupos de conejos sujetos a estudio. De igual manera los marcadores de oxidación en el grupo 1 permanecieron sin cambios a lo largo del

Tabla I.
Lípidos séricos de los conejos sujetos a estudio

	CT (mg/dL)	c-LDL (mg/dL)	c-HDL (mg/dL)
Basal			
Grupo 1	71 ± 16	37 ± 10	33 ± 11
Grupo 2	69 ± 18	42 ± 11	35 ± 11
4 ^{ta} semana			
Grupo 1	74 ± 18	40 ± 12	36 ± 9
Grupo 2	286 ± 81 [*]	231 ± 48 [*]	62 ± 18 [*]
8 ^{va} semana			
Grupo 1	79 ± 19	48 ± 9	37 ± 12
Grupo 2	751 ± 151 [*]	629 ± 84 [*]	88 ± 29
12 ^{ma} semana			
Grupo 1	85 ± 18	51 ± 11	32 ± 11
Grupo 2	1008 ± 247 [*]	847 ± 102 [*]	96 ± 37 [*]
Valores p			
Grupo 1	0,9807	0,9458	0,9317
Grupo 2	0,0001	0,0001	0,0001

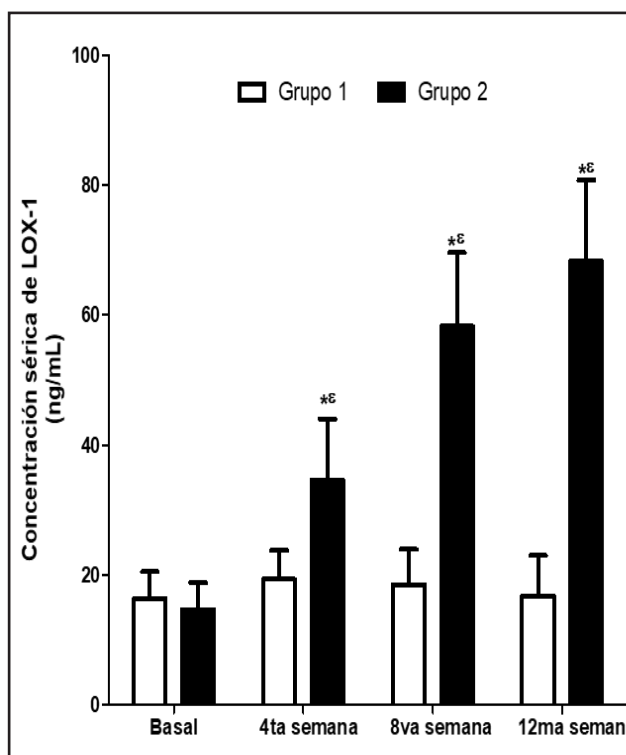


Figura 1. Concentraciones séricas de LOX-1 en los conejos sujetos a experimentación en la semana 0, 4^{ta}, 8^{va} y 12^{ma}. Los resultados fueron expresados como la media ± desviación estándar de la media (n=42 basal y 4^{ta} semana; n=28 en la 8^{va} semana; n=14 en la 12^{ma} semana). * $p < 0,0050$ vs. grupo control (Grupo 1). ϵ $p < 0,0001$ vs. su respectivo valor basal

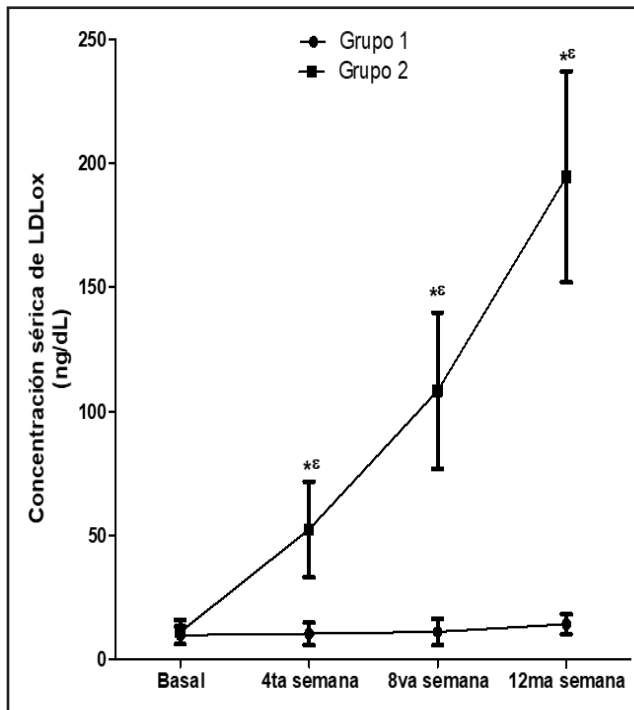


Figura 2. Concentraciones séricas de LDLox en los conejos sujetos a experimentación en la semana 0, 4^{ta}, 8^{va} y 12^{ma}. Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar de la media (n=42 basal y 4^{ta} semana; n=28 en la 8^{va} semana; n=14 en la 12^{ma} semana). *p<0,0050 vs. grupo control (Grupo 1). ^εp<0,0001 vs. su respectivo valor basal

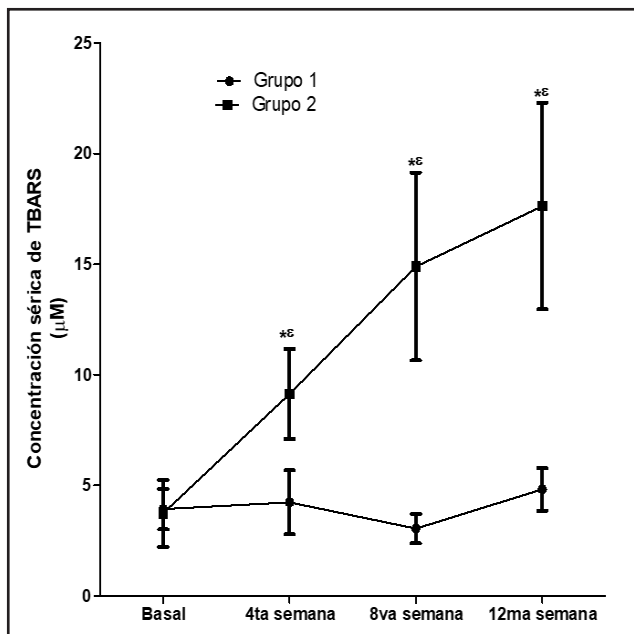


Figura 3. Concentraciones séricas de TBARS en los conejos sujetos a experimentación en la semana 0, 4^{ta}, 8^{va} y 12^{ma}. Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar de la media (n=42 basal y 4^{ta} semana; n=28 en la 8^{va} semana; n=14 en la 12^{ma} semana). *p<0,0050 vs. grupo control (Grupo 1). ^εp<0,0001 vs. su respectivo valor basal

experimento; por su parte, en el grupo 2 variaron a lo largo del estudio (p<0,0001). En la cuarta, octava semana y al final del experimento las concentraciones séricas de LOX-1, LDLox y TBARS aumentaron significativamente en el grupo 2 si se comparan con el grupo 1 y con respecto a sus valores basales (p<0,005).

En la Tabla II se muestra el análisis de Spearman de las correlaciones entre la concentración de LOX-1, LDLox, TBARS y los lípidos séricos, evidenciando correlación positiva significativa entre la LOX-1 con LDLox, TBARS y con el perfil lipídico (p<0,0001).

ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA AORTA

En la Tabla III se presenta la distribución de los conejos según el máximo grado de ateroma encontrado en los cortes de aorta, evidenciando que ningún conejo del grupo 1 presentó lesiones ateroscleróticas a lo largo del estudio. Por su parte, los conejos del grupo 2 presentaron lesiones de grado intermedio y avanzado al finalizar el estudio (Figura 4).

Discusión

La oxidación de las LDL es un factor crucial para la aterosclerosis pues contribuye con la disfunción endotelial, la cual está caracterizada por alteraciones en las propiedades anticoagulantes y antiinflamatorias del endotelio y su incapacidad de regular el tono vascular (Pirillo y col., 2013; Marchio y col., 2019). El estrés oxidativo está caracterizado por un desbalance entre la producción de ROS, y los sistemas de defensa antioxidantes. El incremento de las ROS conlleva la oxidación de las LDL, formando las LDLox,

Tabla II.

Análisis de la correlación de Spearman entre las concentraciones de LOX-1, LDLox, TBARS y los lípidos séricos

	r	p
LOX-1 & CT	0,3594	0,0001
LOX-1 & c-LDL	0,2795	0,0001
LOX-1 & c-HDL	0,1979	0,0001
LOX-1 & LDLox	0,5176	0,0001
LOX-1 & TBARS	0,2459	0,0001

c-HDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad, c-LDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad, CT: Colesterol total, LDLox: Lipoproteínas de baja densidad oxidada, LOX-1: Receptor de lipoproteína de baja densidad oxidado tipo lectina -1, TBARS: Productos de peroxidación lipídica que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico.

las cuales juegan un papel importante en la aterogénesis, pues ejerce efecto sobre las células endoteliales, plaquetas, macrófagos, fibroblastos y células de músculo liso, a través del receptor glicoproteína transmembrana LOX-1. Adicionalmente, otros SR tales como CD-36 y SR-A, pueden contribuir a la internalización de las LDLox y a la formación del ateroma (Mehta y col., 2002; Kattoor y col., 2019).

Diversos SR han sido identificados en base a su capacidad de eliminar a lípidos modificados. Se ha reportado que todos los SR unen LDL modificadas, excepto el SCARA-5 (Clase A) y LAMP (Clase D) (Plüddemann y col., 2007). Por su parte, el SR-A tipo 1 y II, CD-36 y LOX-1 están involucrados en la formación de las células espumosa mediante la internalización de LDL modificadas; de hecho, estudios *in vitro* sugieren que el SR-A y CD-36 contribuyen hasta con el 75% – 90% de la captación de las LDLox (Kunjathoor, 2002).

El LOX-1, es una proteína de membrana tipo II, de 50 KDa, miembro de los SR de clase E, que tiene un dominio extracelular, transmembrana y citoplasmático; constituye el principal receptor para las LDLox en las células endoteliales, y puede mediar la unión, internalización y degradación proteolítica de las LDLox (Mehta y col., 2002). El LOX-1 se expresa en una amplia variedad de células como las endoteliales, macrófagos, células de músculo liso vascular, cardiomiocitos, plaquetas y

Tabla III.

Distribución de los conejos según el máximo grado de ateroma encontrado en los cortes de aorta.

Grupo	Sin ateroma	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo V
Cuarta semana						
1	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
2	1 (14%)	2 (29%)	4 (57%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Octava semana						
1	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
2	0 (0%)	0 (0%)	2 (29%)	2 (29%)	3 (42%)	0 (0%)
Duodécima semana						
1	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (29%)	5 (71%)	0 (0%)

Datos presentados como n (%)

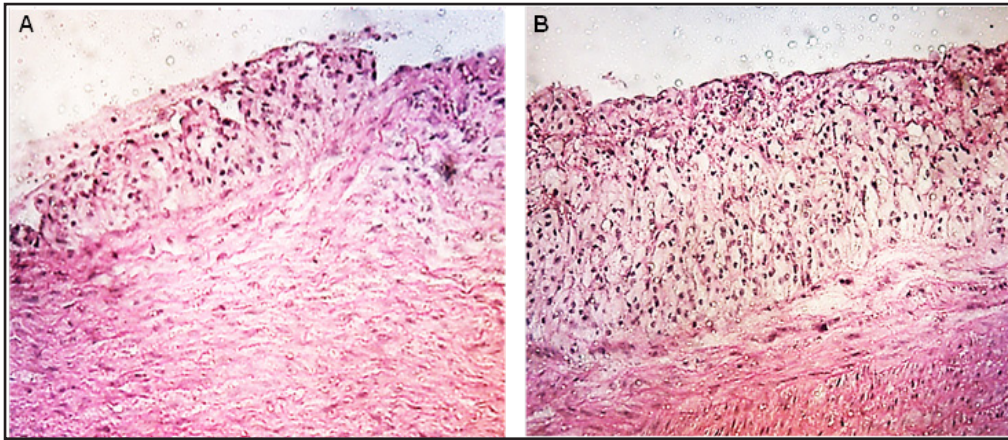


Figura 4. Cortes histológicos de las aortas de los conejos a lo largo del estudio. Lesión tipo II (Panel A) de un conejo perteneciente al grupo 1 en la 4^a semana. Se observa un cúmulo de lípidos intracelulares. Lesión tipo IV (Panel B) de un conejo perteneciente al grupo 2 al final del estudio. Se observa en la íntima arterial lípidos intracelulares y extracelulares en mayor extensión. Tinción hematoxilina – eosina. 50X.

fibroblastos (Kattoor y col., 2019; Tone y col., 2019).

Se ha descrito que el LOX-1 contribuye con la disfunción endotelial y apoptosis, y participa en la formación de las células espumosas en macrófagos y células de músculo liso; asimismo, se ha postulado que la expresión de LOX-1 puede ser inducida por diversas condiciones y factores pro-aterogénicos, tales como la diabetes, hipertensión y dislipidemias, el estrés de rozamiento, productos de glicosilación avanzada, las LDLox, diversas citoquinas y la angiotensina II a través del receptor tipo 1 (Kattoor y col., 2019). Por otra parte, se ha descrito que el LOX-1-soluble (sLOX-1) es un marcador sérico de diversas enfermedades cardiovasculares. Éste se forma cuando la porción extracelular del receptor LOX-1 se escinde por acción de metaloproteinasas, formando la sLOX-1; de hecho, existen reportes que indican que es un marcador temprano de disfunción endotelial en el síndrome metabólico (Civelek y col., 2015). Sus niveles elevados han sido asociados con hipertensión y diabetes mellitus tipo 2 (Civelek y col.,

2015). Asimismo, Hayashida y col. (2005) encontraron mayores niveles de sLOX-1 en pacientes con síndrome coronario agudo mostrando además ser un marcador más temprano que la troponina T, sugiriendo que la sLOX-1 podría ser considerado un marcador temprano de inestabilidad de la placa.

En el presente estudio pudimos apreciar que la administración de una dieta enriquecida con colesterol ocasionó un incremento en las concentraciones séricas de LOX-1, el cual se vio acompañado de un aumento en los niveles de LDLox y TBARS y de la formación de lesiones ateroscleróticas; evidenciando además asociación positiva entre dichos marcadores de oxidación. En este sentido, se ha descrito que las LDLox y las ROS juegan un papel importante en la aterosclerosis, pues inhibe la expresión de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y contribuye con la generación de ROS (Goyal y col., 2012), lo cual induce la expresión de moléculas de adhesión celular, proliferación de macrófagos, formación de colágeno, migración de células de músculo liso y activación plaquetaria, eventos

claves en la aterosclerosis (Kattoor y col., 2019; Khatana y col., 2020; Zingg y col., 2021). De hecho, en estudios previos demostramos que la administración de una dieta enriquecida con colesterol incrementó los niveles séricos de LDLox y TBARS desde la 6ta semana de experimentación, siendo esto revertido con la administración oral de antioxidantes, lo cual se vio acompañado de una reducción en la formación y severidad de lesiones ateroscleróticas (Figueira y González, 2008, 2022). Asimismo, Xu y col. (2022), encontraron que la relación LDLox/ LDL-c es un marcador para el diagnóstico temprano de aterosclerosis coronaria en pacientes con diabetes. Por su parte, Chen y col. (2022) demostraron mayores niveles séricos de LDLox en pacientes con enfermedad arterial coronaria, sugiriendo que el mismo es un marcador sérico de enfermedad cardiovascular, lo cual corrobora la importancia del estrés oxidativo en la etiopatogenia de la aterosclerosis y su participación desde las primeras fases de esta enfermedad.

El papel del LOX-1 sobre la aterosclerosis ha sido inequívoco; de hecho, se ha descrito que la delección del gen LOX-1 en ratones que recibieron una dieta enriquecida con colesterol durante 18 semanas estuvo asociada con disminución del estrés oxidativo, de la respuesta inflamatoria, degradación del NO y aterosclerosis (Mehta y col., 2007); y además disminuyó la formación de colágeno en regiones ateroscleróticas (Hu y col., 2008). Por ello, el LOX-1 es considerado actualmente como un potencial blanco terapéutico; de hecho muchas de las terapias cardiovasculares convencionales disponibles actualmente tales como la aspirina, estatinas e hipoglicemiantes orales ejercen efectos indirectos sobre la expresión de LOX-1 y

sobre la aterosclerosis (Mehta y col., 2004). Por otra parte, diversos antioxidantes han demostrado modular la expresión del LOX-1; en este sentido, el extracto de *Gingko biloba*, la cúrcuma y el ácido elálgico disminuye la expresión de LOX-1. Igualmente, el pycnogenol, la vitamina E y C, el resveratrol y la quercetina reducen la generación de LDLox mediada por ROS y la formación y progresión de lesiones ateroscleróticas (Figueira y González, 2008; Pothineni y col., 2017).

Es relevante señalar que la elevación de las concentraciones séricas de los marcadores de oxidación evaluados en el presente estudio se evidenció desde la cuarta semana de experimentación, lo cual sugiere que la LDLox, TBARS y LOX-1 son marcadores tempranos de aterosclerosis; pues intervienen en el inicio y progresión de esta enfermedad. De hecho, Chen y col. (2000) demostraron que la expresión de ARN y la proteína del LOX-1 está incrementada en la aorta de conejos Watanabe, un modelo experimental de aterosclerosis, evidenciando un incremento en la expresión de esta molécula a nivel de las células endoteliales de las arterias afectadas con lesiones ateromatosas de diferente grados, mostrando mayor expresión en las lesiones avanzadas; e inclusive demostraron expresión de LOX-1 en las células endoteliales de las arterias que aún no estaban afectadas, sugiriendo que el LOX-1 podría estar involucrado desde las primeras fases de la aterosclerosis. En este sentido, la evidencia indica que la interacción entre LDLox – LOX-1 juega un papel relevante en la aterosclerosis, promoviendo la disfunción endotelial y perpetuando un ambiente proinflamatorio y oxidativo característico desde las fases iniciales de la aterosclerosis. En este sentido,

se ha demostrado que la interrelación entre LDLox y LOX-1 conlleva la fosforilación de las proteínas activadas por mitógenos (MAPK) (Dandapat y col., 2007), resultando en un aumento en la producción de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión vascular tipo 1 (VCAM-1) y citocinas como la proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1 (MCP-1) (Aoyama y col., 1999), las cuales previamente hemos demostrado se encuentran incrementadas desde las primeras fases de la aterosclerosis (González y col., 2008; Figueira y González, 2018; 2020). Este ambiente inflamatorio incrementa la expresión de LOX-1 en las células endoteliales perpetuando un círculo vicioso de oxidación e inflamación entre LDLox y LOX-1 (Feng y col., 2014). De igual manera, Stancel y col., (2016) propusieron que la PCR y el LOX-1 forman un mecanismo cíclico con las LDLox en la aterogénesis, pues la PCR es un ligando del LOX-1 e incrementa la permeabilidad vascular, altera la vasodilatación dependiente del endotelio y juega un papel importante en la adhesión de monocitos al endotelio. Por otra parte, la inducción del LOX-1 reduce la fosforilación de la proteína quinasa B, la cual está involucrada en la activación de la eNOS mediante su fosforilación, disminuyendo la producción de NO (Besler y col., 2011). Además, la LDLox incrementa la producción de vasoconstrictores como la endotelina -1, e incrementa la expresión de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) (Singh y col., 2003), así como la producción de ROS mediante el incremento en la expresión y actividad de la NADPH oxidasa, lo cual se acompaña con una menor biodisponibilidad del NO, conllevando la disfunción endotelial (Kattoor y col., 2019).

El aumento de las concentraciones séricas de LOX-1, LDLox y ROS observados

en el presente estudio probablemente son debidos al proceso inmunoinflamatorio y oxidativo de la aterosclerosis inducido por la dieta enriquecida con colesterol; pues se ha descrito que la expresión de este receptor es baja en condiciones normales. Sin embargo, en presencia de un medio inflamatorio y oxidativo, se incrementa la expresión de LOX-1 (Xu y col., 2013). De hecho, la evidencia indica que la LDLox es el activador más potente de la LOX-1, pues la unión del LDLox a su receptor LOX-1 activa el factor nuclear κ B (NF- κ B), incrementando la expresión de LOX-1 y de otras moléculas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y de moléculas de adhesión celular en las células endoteliales (Aoyama y col., 1999; Kattoor y col., 2019). Asimismo, moléculas pro-inflamatorias tales como el TNF- α , la interleucina -1 (IL-1), interleucina -6 (IL-6) inducen la expresión de LOX-1 en células de músculo liso vascular. De igual manera, la activación de LOX-1, agrava el estrés oxidativo, lo que ocasiona una mayor formación de LDLox, auto-amplificando el ciclo (Xu y col., 2013), pues el LOX-1 incrementa la producción de ROS, al incrementar la actividad de la NADPH oxidasa por una vía mediada MMP14 – Rac 1. En este sentido, la inhibición de la unión LOX-1 a MMP14 disminuiría el estrés oxidativo (Sugimoto y col., 2009). Asimismo, se ha descrito que la LDLox induce la formación de ROS mediante el incremento de la expresión de NOX2, NOX4 y p47phox, y además activa la NF- κ B a través de LOX-1, lo cual activa vías proinflamatorias y al LOX-1 ocasionando un círculo vicioso de mayor captación de LDLox a través del LOX-1 activado, mayor formación de ROS y mayor expresión de LOX-1 (Xu y col., 2013). Así, la deleción de LOX-1 en ratones alimentados con dieta alta de colesterol ha demostrado disminuir

la expresión de NOX2, NOX4, p22phox y p47phox (Hu y col., 2008; Lu y col. 2011).

Diversos eventos podrían explicar el aumento en la formación de placas ateroscleróticas inducidas por la administración de una dieta enriquecida con colesterol observado en el presente estudio; en este sentido se ha descrito que la expresión de LOX-1 en macrófagos, células musculares lisas y endoteliales se ve incrementada en estados proinflamatorios resultando en un aumento de la fagocitosis de las LDLox por parte de los macrófagos y células de músculo liso (Yang y col., 2012), contribuyendo con la acumulación de lípidos y a la formación de las células espumosas. Asimismo, se ha descrito que la LDLox y LOX-1 pueden causar inestabilidad de la placa mediante un aumento en la producción de metaloproteasas de matriz extracelular (Yang y col., 2013; Kattoor y col., 2019).

En conclusión, bajo nuestras condiciones experimentales y de acuerdo con los resultados obtenidos, el LOX-1, LDLox y TBARS son marcadores tempranos no invasivos de oxidación y aterosclerosis; pues se elevaron desde la 4ta semana de estudio. Estos hallazgos sugieren que la oxidación juega un papel relevante en la fisiopatología de esta enfermedad, por lo que su determinación podría ayudar en el diagnóstico temprano, evaluación y estratificación del riesgo cardiovascular.

Referencias Bibliográficas

- Aoyama T, Sawamura T, Furutani Y, Matsuoka R, Yoshida M, Fujiwara H, Masaki T. 1999. Structure and chromosomal assignment of the human lectin-like oxidized low-density-lipoprotein receptor-1 (LOX-1) gene. *Biochem J* 339: 177.
- Besler C, Heinrich K, Rohrer L, Doerries C, Riwanto M, Shih D, Chroni A, Yonekawa K, Stein S, Schaefer N. 2011. Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease. *J Clin Investig* 121: 2693-708.
- Chen M, Kakutani M, Minami M, Kataoka H, Kume N, Narumiya S, Kita T, Masaki T, Sawamura T. 2000. Increased expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in initial atherosclerotic lesions of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arter Thromb Vasc Biol* 20: 1107-15.
- Chen Q, Li Z, Wang M, Li G. 2022. Over-expression of IL1R2 in PBMCs of Patients with Coronary Artery Disease and Its Clinical Significance. *Anatol J Cardiol* 26(9):710-716.
- Civelek S, Kutnu M, Uzun H, Erdenen F, Altunoglu E, Andican G, Seven A, Sahin A, Burcak G. 2015. Soluble Lectin-Like Oxidized LDL Receptor 1 as a Possible Mediator of Endothelial Dysfunction in Patients With Metabolic Syndrome. *J Clin Lab Anal* 29: 184-90.
- Dandapat A, Hu C, Sun L, Mehta J. 2007. Small Concentrations of oxLDL Induce Capillary Tube Formation from Endothelial Cells via LOX-1-Dependent Redox-Sensitive Pathway. *Arter Thromb Vasc Biol* 27: 2435-42.
- Feng Y, Cai Z, Tang Y, Hu G, Lu J, He D, Wang S. 2014. TLR4/NF-κB signaling pathway-mediated and oxLDL-induced up-regulation of LOX-1, MCP-1, and VCAM-1 expression in human umbilical vein endothelial cells. *Genet Mol Res* 13: 680-95.
- Figueira L, González J. 2008. Efecto del extracto de *Pinus maritime*, Vitamina C y E, sobre la concentración sérica de LDLox, PCR, Selectina-E, IL-6 y formación de ateromas en conejos con dieta hiperlipidémica. *Informe Médico* 10 (10): 593-607.
- Figueira L, González J. 2018. Efecto del resveratrol sobre las concentraciones séricas del factor de crecimiento endotelial vascular durante la aterosclerosis. (Effect of resveratrol on seric vascular endothelial growth factor concentrations during atherosclerosis). *Clin Investig Arterioscler* 30(5):209-216.
- Figueira L, González J. 2020. Efecto del resveratrol sobre quimioquinas séricas en la aterosclerosis. *Rev Fac Farm UCV* 83 (1y2): 7-23.
- Figueira L, González J. 2022. Efecto antiinflamatorio y antioxidante del resveratrol en la aterosclerosis. Papel de la molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria I. *Rev Fac Farma UCV*; 85(1y2): 51-66.

- González J, Figueira L, Reigosa A. 2008. Selectina-E, VCAM-1, FNT- α , IL-6, PCR y Fibrinógeno plasmático como marcadores de inflamación en la aterosclerosis, en conejos machos Nueva Zelanda, expuestos a una dieta hiperlipidémica. *Salus* 12 (2): 50-57.
- Gorga E, Vizzardì E, Bonadei I, Piovanelli B, Della P, Raddino R, Dei C. 2013. LOX-1 and its Implications on Cardiovascular Diseases a Possible New Perspective Target on Atherosclerosis. *J Clin Exp Cardiol* 4(4):232.
- Goyal T, Mitra S, Khaidakov M, Wang X, Singla S, Ding Z, Liu S, Mehta J. 2012. Current Concepts of the Role of Oxidized LDL Receptors in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 14: 150-9.
- Hayashida K, Kume N, Murase T. 2005. Serum Soluble Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 Levels Are Elevated in Acute Coronary Syndrome: A Novel Marker for Early Diagnosis. *ACC Curr J Re*; 14: 3.
- Hu C, Dandapat A, Sun L, Chen J, Marwali M, Romeo F, Sawamura T, Mehta J. 2008. LOX-1 deletion decreases collagen accumulation in atherosclerotic plaque in low-density lipoprotein receptor knockout mice fed a high-cholesterol diet. *Cardiovasc Res* 79: 287-93.
- Kattoor AJ, Goel A, Mehta JL. LOX-1. 2019. Regulation, Signaling and Its Role in Atherosclerosis. *Antioxidants (Basel)* 11;8(7):218.
- Khatana C, Saini NK, Chakrabarti S, Saini V, Sharma A, Saini RV, Saini AK. 2020. Mechanistic Insights into the Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Atherosclerosis. *Oxid Med Cell Longev* 2020:5245308.
- Khosravi M, Poursaleh A, Ghasempour G, Farhad S, Najafi M. 2019. The effects of oxidative stress on the development of atherosclerosis. *Biol Chem* 27;400(6):711-32.
- Kuge Y, Kume N, Ishino S. 2008. Prominent lectin-like oxidized low-density lipoprotein (LDL) receptor-1 (LOX-1) expression in atherosclerotic lesions is associated with tissue factor expression and apoptosis in hypercholesterolemic rabbits. *Biol Pharmac Bull* 31(8):1475-82.
- Kunjathoor V. 2002. Scavenger Receptors Class A-I/II and CD36 Are the Principal Receptors Responsible for the Uptake of Modified Low-Density Lipoprotein Leading to Lipid Loading in Macrophages. *J Biol Chem* 277: 49982-8.
- Lu J, Mitra S, Wang X, Khaidakov M, Mehta J. 2011. Oxidative Stress and Lectin-Like Ox-LDL-Receptor LOX-1 in Atherogenesis and Tumorigenesis. *Antioxid Redox Signal* 15: 2301-33.
- Marchio P, Guerra-Ojeda S, Vila JM, Aldasoro M, Victor VM, Mauricio MD. 2019. Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation. *Oxid Med Cell Longev* 2019:8563845.
- Mehta J, Dayuan L. 2002. Identification, Regulation and Function of a Novel Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor. *J Am Col Cardiol*; 39 (9):1429-35.
- Mehta J, Li D, Chen J, Yu F. 2004. Aspirin inhibits ox-LDL-mediated LOX-1 expression and metalloproteinase-1 in human coronary endothelial cells. *Cardiovasc Res* 64: 243-9.
- Mehta J, Sanada N, Hu C, Chen J, Dandapat A, Sugawara F, Satoh H, Inoue K, Kawase Y, Jishage K. 2007. Deletion of LOX-1 Reduces Atherogenesis in LDLR Knockout Mice Fed High Cholesterol Diet. *Circ Res* 100: 1634-42.
- Ogura S, Kakino A, Sato Y, Fujita Y, Iwamoto S, Otsui K, Yoshimoto R, Sawamura T. 2009. LOX-1 the multifunctional receptor underlying Cardiovascular Dysfunction. *Circulation* 73:1993-9.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Rev Anal Biochem* 95(2);351-8.
- Pirillo A, Norata G, Catapano A. 2013. LOX-1, OxLDL and atherosclerosis. *Mediators Inflamm* 2013:152786.
- Plüddemann A, Neyen C, Gordon S. 2007. Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods* 43: 207-17.
- Pothineni N, Karathanasis S, Ding Z, Arulandu A, Varughese K, Mehta J. 2017. LOX-1 in Atherosclerosis and Myocardial Ischemia: Biology, Genetics, and Modulation. *J Am Coll Cardiol* 69: 2759-68.
- Rasmusen C, Moinard C, Martin C, Tricottet V, Cynober L, Couderc R. 2007. L arginine plus atorvastatin for prevention of atheroma formation in genetically hypercholesterolaemic rabbits. *Br J Nutr* 97: 1083-9.
- Reiss A, Anwar K, Wirkowski P. 2009. Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor 1 (LOX-1) in atherogenesis. *Curr Med Chem* 16(21):2641-52.
- Singh R, Chen H, Kazzaz N, Li D, Liu L, Mehta J. 2003. Oxidized-LDL through LOX-1 increases the expression of angiotensin-converting enzyme in human coronary artery endothelial cells. *Cardiovasc Res* 5: 238-43.
- Stancel N, Chen C, Ke L, Chu C, Lu J, Sawamura T, Chen C. 2016. Interplay between CRP,

- Atherogenic LDL, and LOX-1 and Its Potential Role in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Clin Chem* 62: 320-27.
- Stary H, Chandler A, Dinsmore R, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfield M, Schwartz C, Wagner W, Wesler R. 1995. 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 atherosclerosis. *Am Heart Asso Circulation* 15:1512-31.
- Sugimoto K, Ishibashi T, Sawamura T, Inoue N, Kamioka M, Uekita H, Ohkawara H, Sakamoto T, Sakamoto N, Okamoto Y. 2009. LOX-1-MT1-MMP axis is crucial for RhoA and Rac1 activation induced by oxidized low-density lipoprotein in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 84: 127-36.
- Takanabe-Mori R, Ono K, Wada H, Takaya T, Ura S, Yamakage H, Satoh-Asahara N, Shimatsu A, Takahashi Y, Fujita M, Fujita Y, Sawamura T, Hasegawa K. 2013. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 plays an important role in vascular inflammation in current smokers. *J Atheroscler Thromb* 20(6):585-90.
- Tone K, Stappers M, Willment M, Brown G. 2019. C-type lectin receptors of the Dectin-1 cluster: Physiological roles and involvement in disease. *Eur J Immunol* 49: 2127-2133.
- Xu S, Ogura S, Chen J, Little P, Moss J, Liu P. 2013. LOX-1 in atherosclerosis: Biological functions and pharmacological modifiers. *Cell. Mol. Life Sci*; 70: 2859-72.
- Xu L, Yan X, Tang Z, Feng B. 2022. Association between circulating oxidized OxLDL/LDL-C ratio and the severity of coronary atherosclerosis, along with other emerging biomarkers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 191:110040.
- Yang H, Mohamed A, Zhou S. 2012. Oxidized low-density lipoprotein, stem cells, and atherosclerosis. *Lipids Health Dis* 11: 85.
- Yang S, Li Y, Du D. 2013. Oxidized low-density lipoprotein-induced CD147 expression and its inhibition by high-density lipoprotein on platelets *in vitro*. *Thromb Res* 132: 702-11.
- Zingg J, Vlad A, Ricciarelli R. 2021. Oxidized LDLs as signaling molecules. *Antioxidants* 10(8): 1184.