Capacidad antioxidante de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en modelos de diabetes mellitus en ratón

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
Fernanda Awad[1], Alumna de quinto año
Eduardo Peñailillo[2], Alumno de cuarto año
Attilio Rigotti[3], Profesor asociado
[1] FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, BIOQUÍMICA
[2] ESCUELA DE MEDICINA
[3] ESCUELA DE MEDICINA,DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, DIABETES Y METABOLISMO,DEPARTAMENTO DE GASTROENTEROLOGÍA

INTRODUCCIÓN

La presencia de alteraciones en el metabolismo del colesterol constituye un importante factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como el infarto al corazón y al cerebro, las cuales representan la principal causa de mortalidad en la población mundial.

El colesterol junto con otros lípidos se transportan en la circulación sanguínea en complejos polimoleculares conocidos como lipoproteínas. Las lipoproteínas de alta densidad (HDL, *High Density Lipoproteins*) transportan el colesterol en el plasma sanguíneo desde los tejidos periféricos del cuerpo hasta el hígado (proceso denominado como transporte reverso de colesterol) para su posterior excreción hacia la bilis. Además del transporte reverso, se ha descrito que las partículas de HDL exhiben otras propiedades funcionales beneficiosas para el organismo como capacidad antioxidante, anti-inflamatoria, anti-apoptótica y anti-agregante plaquetaria [1]. Por lo tanto, el estudio de la funcionalidad de las HDL, más allá de su participación en el transporte reverso de colesterol, es importante para comprender mejor la actividad anti-aterogénica de las mismas y facilitar el desarrollo de nuevas terapias en medicina cardiovascular

basadas en la modulación de estas propiedades protectoras de las partículas de HDL.

Dentro de las condiciones patológicas de alto riesgo cardiovascular destaca la *diabetes mellitus* (DM), enfermedad que además de la hiperglicemia provoca alteraciones en el metabolismo lipídico y lipoproteico. Desde un punto de vista epidemiológico, la carga de los sistemas de salud derivada de la enfermedad diabética es muy importante y se proyecta que aumentará 2,1 veces para el año 2030 [2]. Por lo tanto, la investigación biomédica en esta área es de gran relevancia para el bienestar y los sistemas de salud de todo el mundo.

En este proyecto se propuso estudiar el posible impacto de la diabetes sobre la funcionalidad de las partículas de HDL. Se espera comprobar que en ratones que padecen de *diabetes mellitus* se producen partículas de HDL con menor función antioxidante lo que comprometería las propiedades ateroprotectoras descritas anteriormente.

METODOLOGÍA

Inducción de diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2 en ratones.

La inducción de diabetes tipo 1 se llevó a cabo mediante la administración intraperitoneal de estreptozotocina (100 mg/g de ratón), la cual provoca una destrucción química de las células β del páncreas lo que lleva a la deficiencia absoluta y severa de insulina.

La inducción de diabetes tipo 2 se logró mediante un tratamiento con nicotinamida (240 mg/g de ratón) 15 minutos antes de la administración de estreptozotocina (100 mg/g de ratón) para alcanzar un daño tóxico pancreático menos intenso que genere una disminución parcial de la síntesis de insulina. Adicionalmente, estos animales fueron alimentados por un mes con una dieta rica en grasas –como inductor de resistencia a insulina– iniciada una semana antes del tratamiento con nicotinamida/estreptozotocina [3]. En ambos modelos, los ratones del grupo control fueron sometidos a inyecciones que contenían el vehículo de las drogas administradas.

Determinación de glicemia basal y curva de tolerancia a la glucosa

La concentración de glucosa plasmática se determinó mediante un glucómetro Optium Xceed marca Abbott (Illinois,USA) utilizando una gota de sangre obtenida mediante punción de la vena de la cola del ratón. La tolerancia a la glucosa fue evaluada después de un mes del inicio del tratamiento para inducción de diabetes tipo 1 y 2 mediante el medición de la glicemia basal y 30, 60 y 120 minutos luego de administrar una carga de glucosa (2 g/kg peso de ratón) por vía intraperitoneal.

Recolección de sangre y tejido hepático y separación del plasma sanguíneo

Después de cuatro semanas de iniciado el tratamiento de inducción de diabetes tipo 1 y 2, los ratones fueron anestesiados con ketamina/xilacina 3:1 al 2% (120 ul/20 g de ratón) por vía intraperitoneal y se tomaron muestras de sangre de la vena cava inferior con una jeringa heparinizada. La sangre obtenida fue centrifugada a 4.000 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente y se recuperó la fracción plasmática, parte de la cual fue mezclada con sacarosa al 10% para preservar la funcionalidad de las partículas de HDL durante su aislamiento para posterior uso en el ensayo de funcionalidad antioxidante [4].

Separación cromatográfica de las lipoproteínas plasmáticas

Las muestras de plasma fueron procesadas mediante cromatografía líquida en una columna de exclusión molecular para separación de lipoproteínas. Las fracciones de HDL separadas por este método cromatográfico fueron recuperadas y guardadas en 10% de sacarosa a -20°C hasta su uso en el estudio funcional antioxidante.

Concentración de las partículas de HDL y determinación de proteínas en HDL

Las fracciones de HDL obtenidas por cromatografía líquida a partir del plasma de ratones diabéticos y controles fueron descongeladas hasta 4°C y se concentraron mediante tubos de ultrafiltración para luego determinar en cada muestra la concentración proteica por el método de Lowry antes de realizar el ensayo antioxidante [5].

Medición de la capacidad antioxidante de las partículas HDL

El método utilizado para la medición de la funcionalidad de HDL se basó en un ensayo de fluorescencia in vitro que consiste en la incubación de un compuesto lipídico oxidado (PAPCox) con diclorofluoresceína (DCF), compuesto que se ve fluorescente en presencia de radicales libres. La señal fluorescente basal producida por DCG después de la interacción de estos dos compuestos, se ve disminuida o aumentada cuando se agrega a la reacción partículas de HDL de naturaleza antioxidante o pro-oxidante, respectivamente [6].

El resumen del ensayo de funcionalidad antioxidante de las partículas de HDL in vitro se muestra en Figura 1.

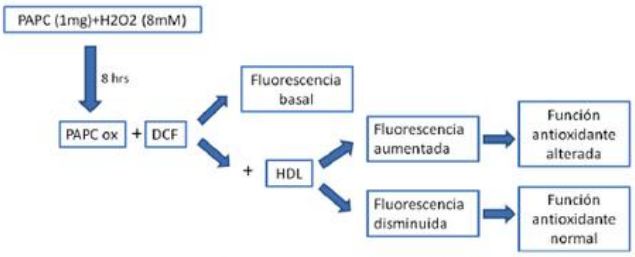

Figura 1: Diagrama de flujo del ensayo de funcionalidad antioxidante de las partículas de HDL in vitro.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Luego del tratamiento de inducción de diabetes, se midió la glicemia en ayuno para corroborar el desarrollo de esta disfunción metabólica en los animales (Figura 2). Los ratones tratados presentaron glicemias en ayuno significa-

tivamente más altas en comparación al grupo control. Esta alteración bioquímica se deben a que la glucosa, fuente principal de energía proveniente de los alimentos, no puede ser metabolizada debido a la deficiencia completa (diabetes tipo 1) o parcial (diabetes tipo 2) de insulina.

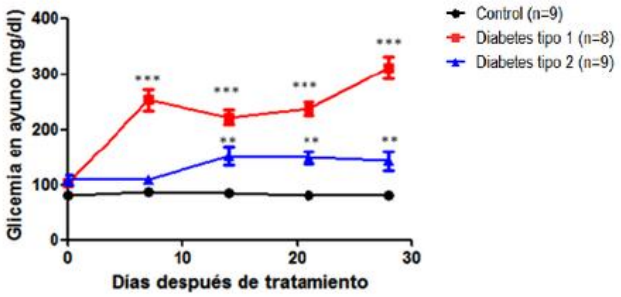

Figura 2: Curso temporal de la glicemia de ayuno en ratones después de tratamiento para inducción de diabetes tipo 1 y 2. Los ratones fueron tratados con estreptozotocina (100 g/kg peso de ratón) para inducir diabetes tipo 1 y estreptozotocina (100 mg/kg de ratón)/nicotinamida (240 mg/kg peso de ratón) más una dieta rica en grasas para inducir diabetes tipo 2. **, *** Significativamente diferente (P<0,001; P<0,0001 respectivamente) con respecto al grupo control.

El test de tolerancia a la glucosa es un examen de laboratorio que permite diagnosticar diabetes más allá de la determinación de los niveles de glicemia en ayuno. Este test consiste en la administración de una carga aguda de glucosa y el análisis de la respuesta de la glicemia en función del tiempo. Al analizar la curva de tolerancia a la glucosa un mes después de la inducción de diabetes, se observó que, tanto los ratones diabéticos tipo 1 como diabéticos tipo 2, exhibieron intolerancia a la glucosa en comparación con el grupo control (Figura 3), ya que mantuvieron niveles de glucosa plasmáticas más altos en el tiempo después de la sobrecarga aguda. Según lo esperado, los ratones con diabetes tipo 1 presentaron un mayor grado de intolerancia a la glucosa como consecuencia de la deficiencia completa de insulina, mientras que los ratones diabéticos tipo 2 presentaban solamente una deficiencia parcial de esta hormona y lograron cierto grado de regulación de los niveles de glucosa plasmáticos post-sobrecarga.

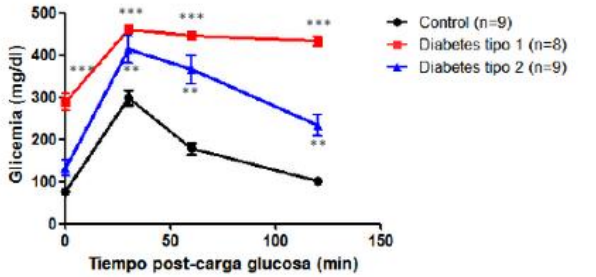

Figura 3: Curva de tolerancia a la glucosa en ratones después del tratamiento de inducción de diabetes tipo 1 y 2. La tolerancia a la glucosa fue evaluada después de 1 mes del inicio del tratamiento inductor de diabetes mediante el monitoreo temporal de la glicemia luego de administrar una carga de glucosa (2 g/kg peso de ratón) por vía intraperitoneal. **, *** Significativamente diferente (P<0,001; P<0,0001 respectivamente) con respecto al grupo control.

Como se describió anteriormente, existen múltiples mecanismos por los cuales las partículas de HDL protegen al organismo frente al desarrollo de enfermedad cardiovascular. Sin embargo, esta protección cardiovascular no se relaciona en forma estricta con los niveles de colesterol HDL, sino que también sería de gran relevancia analizar si las partículas HDL presentan una funcionalidad normal o alterada en sus propiedades anti-aterogénicas que incluyen una importante capacidad antioxidante.

Los resultados presentados en la Figura 4 muestran que, a pesar de la existencia de niveles de colesterol HDL normales (resultados no mostrados), esta clase de partículas lipoproteicas presentes en los animales con diabetes tipo 1 tienen menor capacidad antioxidante, mientras que esta función no se modifica en las partículas de HDL obtenidas de ratones con diabetes tipo 2.

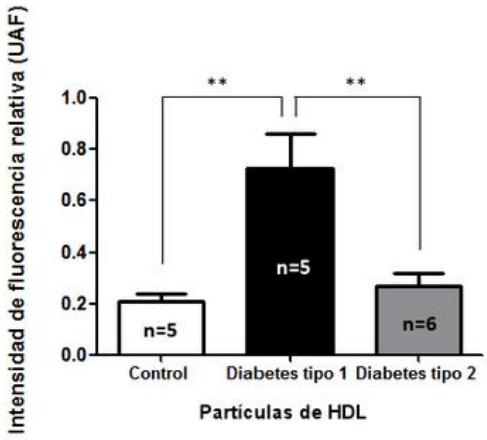

Figura 4: Capacidad antioxidante de las partículas lipoproteicas de alta densidad (HDL) obtenidas de ratones con diabetes 1 y 2. **Diferencia significativa (P<0,001). UAF: unidades arbitrarias de fluorescencia.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo demostraron que las partículas de HDL de los ratones con *diabetes mellitus* tipo 1 tienen su capacidad antioxidante significativamente disminuida en comparación a los controles. Se requieren estudios adicionales para definir si esta disfunción anti-oxidante se debe a alteraciones en la composición lipídica y/o apolipoproteica de las partículas de HDL presentes en los ratones con este tipo de diabetes.

En base a este hallazgo, se podrían realizar en el futuro análisis adicionales sobre las posibles causas y mecanismos determinantes de esta disfuncionalidad, plantear la aplicación de este método en forma más rutinaria en estudios humanos y diseñar posibles tratamientos para prevenir o revertir esta alteración funcional de las partículas de HDL de los pacientes diabéticos para controlar mejor el alto riesgo de enfermedad cardiovascular de esta patología de prevalencia creciente en el mundo.

PRINCIPIO CIENTÍFICO UTILIZADO

El estrés oxidativo es un mecanismo importante en el desarrollo de enfermedad cardiovascular, ya que induce la formación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas pro-inflamatorias y pro-aterogénicas que dan inicio al daño vascular. Diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que las partículas de HDL circulantes proveen una potente protección de las LDL frente al daño oxidativo previniendo la oxidación de estas partículas y con ello una disminución del riesgo cardiovascular. Por lo tanto, un deterioro en la capacidad antioxidante de las HDL podría tener un gran impacto en el riesgo cardiovascular, aumentando la probabilidad de desarrollar enfermedad ateroesclerótica y, por otro lado, la prevención y corrección de esta disfuncionalidad ofrece nuevas oportunidades para el manejo de esta patología de relevancia mundial.

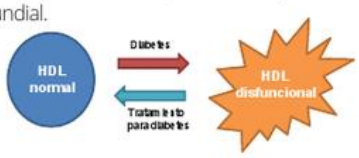

Figura 5: Deterioro de la funcionalidad antioxidante normal de las partículas de HDL durante el desarrollo de diabetes mellitus y la reversión de dicha disfuncionalidad por medio de tratamientos que mejoran esta enfermedad metabólica.

GLOSARIO

Capacidad anti-apoptótica: Capacidad de inhibir la muerte celular programada.

Capacidad anti-aterogénica: Capacidad de inhibir el desarrollo de ateromas en las paredes arteriales.

Ateroesclerosis: enfermedad arterial en la que los lípidos se depositan en la pared de estos vasos sanguíneos provocando una respuesta inflamatoria que puede complicarse con una reducción del flujo sanguíneo e infarto de un órgano.

Diabetes mellitus tipo 1: enfermedad caracterizada por niveles elevados de glucosa en la sangre secundaria a destrucción autoinmune de las células productoras de insulina del páncreas que lleva a una deficiencia absoluta de esta hormona

Diabetes mellitus tipo 2: enfermedad caracterizada por niveles elevados de glucosa en la sangre secundaria a una baja producción de insulina combinada con una resistencia de los receptores insulínicos para ser activados por dicha hormona.

Estreptozotocina: droga que destruye las células productoras de insulina en el páncreas.

Hiperglicemia: alta concentración de glucosa en el plasma sanguíneo.

Intraperitoneal: dentro de la cavidad delimitada por el peritoneo que consiste en la membrana que rodea los órganos abdominales.

Jeringa heparinizada: jeringa pretratada con heparina, un compuesto que impide la coagulación sanguínea.

Lípidos: conjunto de moléculas orgánicas hidrofóbicas con funciones energéticas y estructurales que se conocen comúnmente como grasas.

Lipoproteínas: complejos polimoleculares que transportan lípidos a través del plasma sanguíneo.

Metabolismo lipídico y lipoproteico: conjunto de procesos moleculares, bioquímicos, celulares y fisiológicos involucrados síntesis, remodelación y degradación de lípidos y lipoproteínas.

Nicotinamida: compuesto utilizado para contrarrestar el daño provocado por la estreptozotocina, logrando una deficiencia parcial de insulina.

Propiedad ateroprotectora: capacidad de proteger contra el desarrollo de ateroesclerosis y cuyo sinónimo es capacidad anti-aterogénica.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer a todos quienes han participado directa o indirectamente en el desarrollo de este trabajo de investigación, en particular a la Dra. Dolores Busso y Susana Contreras. Este estudio fue financiado por el proyecto FONDECYT Regular #1110712 .

REFERENCIAS

1. Vergeer M, Holleboom AG, Kastelein JJP, Kuivenhoven JA. The HDL hypothesis: does high-density lipoprotein protect from atherosclerosis? J Lipid Res. 51: 2058-73, 2010.

2. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diab Care. 27: 1047-1053, 2004.

3. Nakamura T, Terajima T, Ogata T, et al. Establishment and pathophysiological characterization of type 2 diabetic mouse model produced by streptozotocin and nicotinamide. Biol Pharmaceut Bull. 20: 1167-74, 2006.

4. Kekulawala JR, Murphy A, D'Souza W, et al. Impact of freezing on high-density lipoprotein functionality. Anal Biochem. 379: 213-5, 2008.

5. Kresge N, Simoni RD, Hill RL. The most highly cited paper in publishing history: protein determination by Oliver H. Lowry. J Biol Chem. 280: 25, 2005.

6. Navab M, Hama SY, Hough GP, et al. A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids. J Lipid Res. 42: 1308-17, 2001.

EQUIPO DE INVESTIGADORES

1 Fernanda Awad
2 Eduardo Peñailillo
3 Profesor Attilio Rigotti

1 2 3