

Centro de Investigaciones Biomédicas
Centro de Investigaciones Biológicas

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE LA α -CRISTALINA EN EL ENDOTELIO VASCULAR

Dra. Nayade Pereira Roche, Lic. Mónica Bequet Romero, Lic. Ana K. Martínez Bermúdez, Lic. Dahis Manzanares y Dr. José Carlos García Piñeiro

RESUMEN

El endotelio vascular es un órgano de vital importancia para el mantenimiento de la función circulatoria. Su disfunción se asocia con enfermedades vasculares de alta incidencia. La búsqueda de agentes que reviertan o atenúen los efectos del daño oxidativo sobre el endotelio constituye una prioridad. Se utilizó la línea celular HSV para evaluar el daño producido por el isoprostano iPF_2 -III, producto de la peroxidación del ácido araquidónico por la acción de los radicales libres, y la capacidad protectora de la α -cristalina frente a esta agresión. La supervivencia de los cultivos celulares se evaluó por el ensayo MTT. Se obtuvo una disminución de la supervivencia en los cultivos tratados con iPF_2 -III a concentraciones mayores de 300 nmol durante 18 h de exposición. El tratamiento con α -cristalina disminuyó el efecto de iPF_2 -III en 20 %. Este trabajo propuso el efecto de las proteínas de *shock* término como protectoras endoteliales.

Descriptores DeCS: CRISTALINAS/uso terapéutico; ENDOTELIO VASCULAR; PROTEÍNAS DEL SHOCK TÉRMICO; ENFERMEDADES VASCULARES/ quimioterapia; ESTRÉS OXIDATIVO.

El endotelio vascular constituye un órgano de vital importancia para la integridad vascular. La síntesis y liberación de sustancias con acción autocrina y paracrina median un grupo de funciones dentro de las que se destaca el control del tono vascular.¹ La disfunción endotelial se asocia con trastornos vasculares importantes. El incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) constituye una de las principales causas de la disfunción endotelial.^{2,3}

Aún en condiciones basales la célula endotelial produce y libera cantidades significativas de H_2O_2 , cuyos niveles aumentan durante situaciones patológicas y contribuye al daño *per se*, sobre estructuras celulares y mediante la generación de radicales del oxígeno.⁴

Las células endoteliales son uno de los principales blancos de la acción de las ERO producidas por las propias células y por fagocitos activados durante situaciones de estrés, como en el proceso de isquemia

y reperfundión donde participa la enzima xantina oxidasa, vía metabólica de estrecha relación con el daño endotelial pues se ha comprobado que es la fuente principal de radicales libres en este tejido.⁵

En el endotelio, las ERO producen activación de la p38 proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y la fosforilación de la proteína de shock térmico 27 (HSP27), modulador de la respuesta intracelular del citoesqueleto al estrés oxidativo.⁶

Las proteínas de *shock* térmico son inducidas bajo situaciones de estrés y protegen las estructuras celulares de cambios irreversibles que afectan su funcionamiento. Se agrupan en grandes familias, dentro de la que se encuentra la familia de las pequeñas proteínas del *shock* térmico. Se ha observado que el aumento de la expresión de las proteínas HSP27 y α -cristalina, miembros de esta familia, está relacionado con la protección de la célula ante agentes inductores de la apoptosis.^{7, 8}

La α -cristalina, principal proteína del cristalino en los vertebrados, constituye alrededor de 40 a 50 % de su fracción proteica soluble. Está compuesta por 2 subunidades: α A-cristalina y α B-cristalina, con peso molecular de 20 kDa cada una. Estas subunidades forman agregados no covalentes, dinámicos y heterogéneos, de peso molecular alrededor de 800 kDa.⁹ Actúa como chaperona frente a proteínas modificadas por el estrés térmico, los agentes químicos desnaturizantes, el daño inducido por oxidación o fotoxidación, como sucede en las condiciones de estrés oxidativo o irradiación ultravioleta.^{10, 11} En el lente ocular su actividad chaperona es fundamental para mantener la solubilidad y estabilidad de las otras cristalinas, lo que contribuye al mantenimiento de su transparencia.

La α B-cristalina aparece en tejidos extralenticulares donde participa en la protección del citoesqueleto.^{7, 8, 12} Se conoce

además su capacidad de unión a las membranas del cristalino sin modificación de su actividad chaperona.¹³

Los niveles de α B-cristalina aumentan en el tejido nervioso en enfermedades neurodegenerativas.¹⁴ Durante el envejecimiento y la formación de cataratas se producen cambios estructurales que modifican su actividad chaperona.¹⁵

En el presente trabajo se propone la hipótesis de que la α -cristalina es capaz de proteger las células endoteliales en cultivo frente al daño oxidativo inducido por el isoprostano iPF_{2a} -III, isómero de prostaglandina formado a partir de la acción de radicales libres sobre el ácido araquidónico de los lípidos de la membrana celular.¹⁶

MÉTODOS

Cultivo celular

Se utilizó la línea celular H5V de endotelio murino¹⁷ con medio de cultivo DMEM al que se adicionó suero fetal bovino (SFB) 10 %. Las células se mantuvieron en una atmósfera húmeda con 5 % de CO_2 . Los experimentos se realizaron en placas de 96 pozos con 70 % de confluencia.

Diseño experimental

Los cultivos se trataron con el isoprostano iPF_{2a} -III (Cayman Chemical, USA) disuelto en etanol absoluto y las diluciones sucesivas se realizaron en *buffer* fosfato (PBS, pH 7.2).

La α -cristalina se aisló del cristalino bovino con 95 % de pureza determinada mediante HPLC (Martínez Benítez Z. Aislamiento y caracterización preliminar de α -cristalina bovina [Trabajo de Diploma].

Universidad de La Habana, 1998). La proteína se disolvió en PBS. Todos los compuestos se filtraron a 0,2 mm.

Se realizaron ensayos de toxicidad con los compuestos en estudio a diferentes concentraciones durante 18 h de exposición.

Los cultivos fueron tratados con α -cristalina durante 2 h previo al tratamiento con $iPF_{2\alpha}$ -III 500 nmol durante 18 h.

Ensayo de supervivencia celular

Se estimó la supervivencia celular mediante el ensayo de reducción del (3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl] -2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (MTT, Sigma). Esta sal de tetrazolio posee una forma soluble de color amarillo que se transforma en un formazán azul insoluble por causa de la actividad deshidrogenasa de las mitocondrias de las células vivas. Se considera que la cantidad de formazán que se produce en un cultivo es directamente proporcional a la cantidad de células vivas.¹⁸ Después del tratamiento con los compuestos en estudio, se añadió MTT (0,5 mg/mL disuelto en PBS pH 7,2) y se incubaron los cultivos a 37 °C durante 3 h. Seguidamente se eliminó el medio de cultivo y se añadieron 100 μ L de isopropanol ácido (HCl 0,04 mol), para solubilizar el formazán. Se determinó la absorbancia de la solución resultante a 570 nm.

Se calculó el porcentaje de supervivencia como:

$$\frac{\text{Densidad óptica de cultivos tratados}}{\text{Densidad óptica de cultivos no tratados}} \times 100$$

Análisis estadístico

Cada experimento se realizó al menos 3 veces, con 4 réplicas por condición experimental como mínimo. Se calculó la me-

dia, la desviación estándar y el error estándar de la media en cada condición experimental. Las diferencias entre las medias se establecieron mediante análisis de varianza de una vía seguido de la prueba de Tukey-Kramer. Se estableció 95 % como valor de significación estadística.

RESULTADOS

Efecto de la α -cristalina sobre la supervivencia de las células endoteliales

En la figura 1 se muestra el efecto de varias concentraciones de α -cristalina sobre la supervivencia de la línea celular endotelial H5V con exposición durante 18 h. Como se puede observar, la supervivencia celular se mantuvo por encima de 94 %. No hubo diferencias estadísticamente significativas con respecto a los cultivos celulares no tratados.

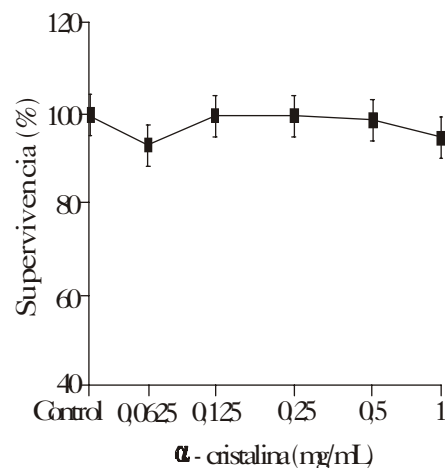


Fig. 1. Efecto de la α -cristalina sobre la supervivencia de las células endoteliales.

Efecto del $iPF_{2\alpha}$ -III sobre la supervivencia de las células endoteliales

Se determinó la citotoxicidad del $iPF_{2\alpha}$ -III durante 18 h de exposición a concentraciones nanomolares (fig. 2). A concentraciones mayores que 300 nmol se produce una disminución significativa de la supervivencia de las células endoteliales en cultivo que se hizo mayor a la concentración de 1 μ mol, por lo que se puede plantear que el efecto es dependiente de la concentración de $iPF_{2\alpha}$ -III.

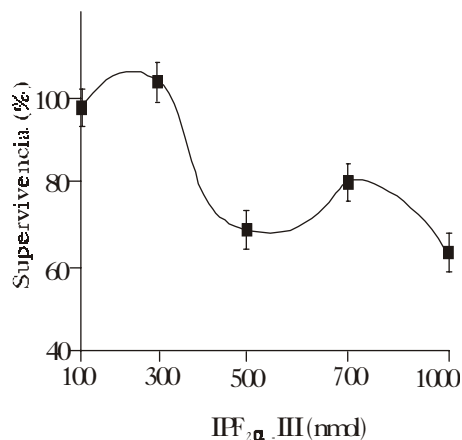


Fig. 2. Efecto del $iPF_{2\alpha}$ -III sobre la supervivencia de las células endoteliales.

Efecto protector de la α -cristalina

Como se observa en la figura 3 la α -cristalina atenuó la toxicidad inducida por $iPF_{2\alpha}$ -III (500 nmol) tanto a la concentración de 0,5 mg/mL como a la de 1 mg/mL. Con esta última concentración se aumentó 20 % de la supervivencia de las células endoteliales en cultivo.

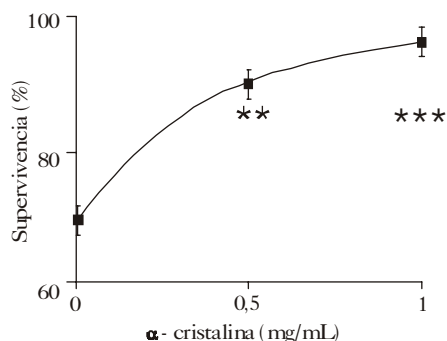


Fig. 3. Efecto protector de la α -cristalina sobre el endotelio vascular.

DISCUSIÓN

Los resultados observados en la figura 1 permiten llegar a la conclusión de que la α -cristalina no resulta tóxica para las células endoteliales en cultivo durante 18 h de exposición. No existen reportes previos de estudios con proteínas de *shock* térmico y cultivos celulares.

Por otra parte, los resultados presentados en la figura 2 coinciden con lo reportado por Martínez en 1998, quien observó que el $iPF_{2\alpha}$ -III producía una disminución de 30 % en la supervivencia del endotelio cerebral porcino luego de 48 h de tratamiento (Martínez AK. Isoprostanes in brain endothelial cell death [Tesis de maestría] McGrawHill University, Montreal, 1998). La mayor sensibilidad en la línea H5V de origen murino al tratamiento con el isoprostano, pudiera deberse a diferencias entre las especies en cuanto a la densidad de receptores para el compuesto.

La explicación del efecto protector de la α -cristalina frente al daño oxidativo de las células endoteliales es totalmente especulativa. Es poco probable que esta proteína, dado su peso molecular y complejidad estructural, pueda incorporarse al medio intracelular y allí ejercer la protección de

las estructuras celulares a través de su acción chaperona. Sería más razonable pensar que la α -cristalina pudiera actuar en el nivel extracelular impidiendo la unión del isoprostano a su(s) receptor(es) de membrana, bien por unión directa a dichos receptores, o secuestro de las moléculas lipídicas de isoprostano sin asociarse con la membrana, o ambos. Existen evidencias experimentales que podrían apoyar uno u otro mecanismo pues se ha demostrado que la α -cristalina puede unirse tanto a las proteínas intrínsecas de la membrana del cristalino, como a liposomas libres de proteínas.^{7,13,19}

Este trabajo abre una nueva línea en el estudio de las causas de la disfunción endotelial y sugiere una fuente potencial de su prevención: el tratamiento con α -cristalina. Los resultados muestran que el isoprostano $iPF_{2\alpha}$ -III, en concentraciones similares a las que se alcanzan en estados patológicos, afecta la supervivencia del endotelio vascular, que se une al hecho de ser un agente agregante y constrictor.²⁰ A niveles fisiológicos el $iPF_{2\alpha}$ -III induce la

proliferación de las células endoteliales,²¹ tal como ocurre con otras ERO y derivados del ácido araquidónico. Este hecho habla en favor de una posible función del $iPF_{2\alpha}$ -III (u otros isoprostanos) en el mantenimiento de la homeostasis vascular. No menos interesante resulta la observación de que la α -cristalina, un miembro de la familia de las proteínas de *shock* térmico de localización intracelular, pueda actuar en el nivel extracelular y atenuar los efectos de productos de la peroxidación de los lípidos de membrana. En resumen, estas observaciones sugieren la necesidad de ampliar los estudios de la función protectora de esta u otras proteínas frente al estrés oxidativo en el endotelio vascular.

Estos resultados están en concordancia con la observación previa de que el incremento en la expresión de la α B-cristalina induce un aumento de la supervivencia en la línea celular L929 tratada con TNF- α y estaurosporina.¹⁹ Sin embargo no existen reportes de que la adición de una proteína de *shock* térmico al medio de cultivo tenga un efecto protector de la célula.

SUMMARY

The vascular endothelium is a vital organ for keeping the circulatory function; its dysfunction is associated with vascular diseases of high incidence. The search for agents that reverse or mitigate the effects of the oxidative damage on the endothelium is a high priority. H5V cell line was used to evaluate the damage caused by iPF_2 -III isoprostane, a product of the free-radical catalized peroxidation of arachidonic acid, and the alpha crystallin's protective capacity to this attack. The survival of cell cultures was assessed through the MTT assay. There was reduced survival in cultures treated with iPF_2 -III isoprostane at concentrations higher than 300 nmol for 18 hrs of exposure. The therapy with alpha crystallin lowered the iPF_2 -III effect by 20%. This paper showed the effect of heat-shock proteins as endothelial protective agents.

Subject headings: CRYSTALLINS/therapeutic use; ENDOTHELIUM, VASCULAR HEAT-SHOCK PROTEINS; VASCULAR DISEASES/ drug therapy; OXIDATIVE STRESS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. López-Jaramillo P. Fisiología del endotelio vascular. En: López-Jaramillo P, ed. Bioquímica del endotelio vascular: implicaciones fisiológicas y clínicas. 4. ed. Quito: Lithoprint, 1998:19-40.
2. ———. Disfunción endotelial y enfermedad aterosclerótica. En: López-Jaramillo P, ed. Bioquímica del endotelio vascular: implicaciones fisiológicas y clínicas. 4.ed. Quito: Lithoprint, 1998:65-81.

3. Ferrari R, Bachetti T, Agnoletti L, Comini L, Curello S. Endothelial function and dysfunction in heart failure. *Eur Heart J* 1998;19:G41-7.
4. Kondo T, Kinouchi H, Kawase M, Yoshimoto T. Differential response in the release of hydrogen peroxide between astroglial cells and endothelial cells following hypoxia/reoxygenation. *Neurosci Lett* 1996;215:103-6.
5. Hoban LD, Paschall AJ, Eckstein J. Awake porcine model of intraperitoneal sepsis and altered oxygen utilization. *Circulatory Shock* 1991;34:252-62.
6. Hout J, Houle F, Marceau F, Landry J. Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circulation Res* 1997;80:383-92.
7. Derham BK, Harding JJ. α -crystallin as a molecular chaperone. *Prog Ret Eye Res* 1999;18:463-509.
8. Leroux MR, Melki R, Gordon B, Batelier G, Candido PM. Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. *J Biol Chem* 1997;272:24646-56.
9. Sun YX, Liang JJN. Intermolecular exchange and stabilization of recombinant human α A- and α B-crystallin. *J Biol Chem* 1998;273:286-90.
10. Lee JS, Liao JH, Wu SH, Chiou SH. α -crystallin acting as a molecular chaperonin against photodamage by UV irradiation. *J Protein Chem* 1997;16:283-9.
11. Wang K, Spector A. α -crystallin can act as a chaperone under conditions of oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:311-21.
12. Vande Klundert FA, Gijzen ML, Ijssel PR vanden, Snoeckx LH, Jong WW de. α B-crystallin and hsp25 in neonatal cardiac cells differences in cellular localization under stress conditions. *Eur J Cell Biol* 1998;75:38-45.
13. Chandrasekhar G, Cenedella RJ. Properties of α -crystallin bound to lens membrane: probing organization at the membrane surface. *Exp Eye Res* 1997;64:423-30.
14. Sechel AC van, Bajramovic JJ, Stipdonk MJB van, Persoon-Deen C, Geutskens SB, Noort JM van. EBV-Induced expression and HLA-DR-restricted presentation by human B cells of α B-crystallin, a candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Immunol* 1999;162:129-35.
15. Kamei A, Iwase H, Masuda K. Cleavage of aminoacid residue(s) from the N-terminal region of α A- and α B-crystallins in human crystallins lens during aging. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;13:373-8.
16. Liu T, Stern A, Roberts LJ, Morrow JD. The isoprostanes: novel prostaglandin-like products of the free radical-catalyzed peroxidation of arachidonic acid. *J Biomed Sci* 1999;6:226-35.
17. Garlanda C, Parravicini C, Sironi M, De Rossi M, Wainstok de Calmanovici R, Carozzi F *et al.* Progressive growth in immunodeficient mice and host cell recruitment by mouse endothelial cells transformed by polyoma middle-sized T antigen: implications for the pathogenesis of opportunistic vascular tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7291-5.
18. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986; 89:271-7.
19. Mehlen P, Schulze OK, Arrigo AP. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J Biol Chem* 1996;271:16510-4.
20. Minuz P, Andrioli G, Degan M, Gaino S, Ortolani R, Tommasoli R *et al.* The F2-isoprostane 8-epi-prostaglandin F2 α increases platelet adhesion and reduces the antiadhesive and antiaggregatory effects of NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1248-56.
21. Yura T, Fukunaga M, Khan R, Nassar GN, Badr KF, Montero A. Free-radical-generated F2-isoprostane stimulates cell proliferation and endothelin-1 expression on endothelial cells. *Kidney Int* 1999;56:471-8.

Recibido: 10 de febrero del 2000. Aprobado: 18 de mayo del 2000.

Dra. *Nayade Pereira Roche*. Centro de Investigaciones Biomédicas. Avenida 146 No. 3102 esquina a 31, reparto Cubanacán, municipio Playa, Ciudad de La Habana, Cuba, CP 11600.