

Universidad de Concepción
Facultad de Farmacia
Depto. Bioquímica Clínica e Inmunología



Participación del Receptor de Apolipoproteína A-I,
Ecto-F₁-ATPasa, en la Vasodilatación Mediada por
Óxido Nítrico

Paula Antonia Honorato Vásquez

Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica Clínica e
Inmunología

Patrocinante y guía de tesis: Dra. Claudia Radojkovic Navarro

Co-guía Dr. Marcelo González Ortiz

Comisión

Evaluador externo: Dr. Jorge Toledo Alonso

Evaluador interno: Dr. Claudio Aguayo Tapia

Concepción Mayo 2015

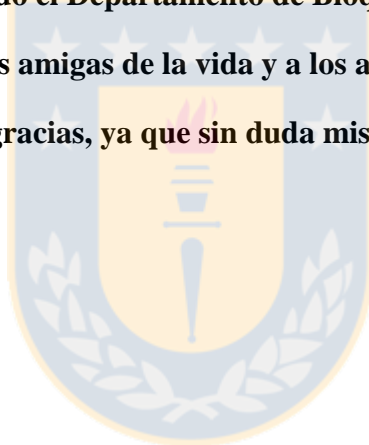
A mi familia, a mis padres Isabel y Roberto

A mis hermanos Roberto y Sebastián

A todo el Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología

A mis amigas de la vida y a los amigos que hice en este camino

A todos muchas gracias, ya que sin duda mis logros también son sus logros



ÍNDICE

ÍNDICE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	7
ABREVIACIONES	8
RESUMEN	9
ABSTRACT.....	10
INTRODUCCIÓN	11
Enfermedad cardiovascular e hipertensión	11
Función endotelial.....	12
Síntesis de óxido nítrico	14
Regulación de la actividad de la eNOS.....	17
1) Interacciones proteína-proteína:.....	17
2) Cofactores y sustratos:	17
3) Fosforilaciones:.....	17
4) Cambios en la expresión de la eNOS:.....	18
5) Competidores de la eNOS:.....	18
Lipoproteínas de alta densidad y apolipoproteína A-I.....	18
Lipoproteínas de alta densidad, apoA-I y óxido nítrico.....	24
Receptores endoteliales de HDL y apoA-I.....	26
a) SR-BI.....	26
b) ABCA1	26
c) Ecto-F ₁ -ATPasa.....	27
HIPÓTESIS.....	33
OBJETIVO GENERAL.....	33
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
METODOLOGÍA.....	34
A. Obtención de ligandos de ecto-F ₁ -ATPasa	34
1. IF ₁ :.....	34
2. Obtención y purificación de apoA-I humana plasmática:	34
3. Producción de apoA-I humana recombinante	36
B. Análisis histológico.....	45

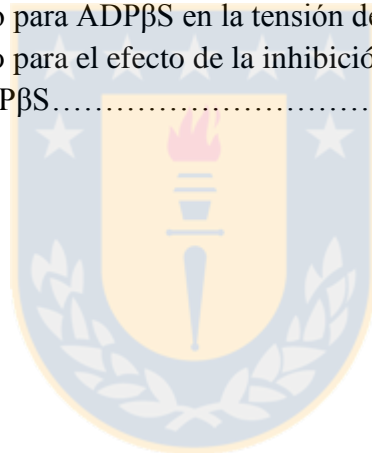
C. Medición de la tensión de anillos de vena coriónica y de vena umbilical humana	46
D. Análisis estadístico.....	47
RESULTADOS.....	49
A. Obtención y purificación de apoA-I humana plasmática.....	49
1.- Obtención de apoA-I plasmática, mediante cromatografía de exclusión.....	49
2.- Obtención de apoA-I plasmática, por aislamiento desde gel	54
B. Producción de apoA-I humana recombinante.....	56
1.- Generación del vector adenoviral.....	56
2.- Producción masiva de apoA-Ihr	62
3.- Ensayos funcionales de apoA-Ihr.....	69
C. Expresión de ecto-F ₁ -ATPasa en endotelio de vena coriónica	73
D. Medición de la tensión de anillos de vena coriónica y vena umbilical humana	77
DISCUSIÓN	92
CONCLUSIONES	105
PROYECCIONES	106
ANEXOS	108
FINANCIAMIENTO	117
REFERENCIAS.....	118



ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Estructura y función de las óxido nítrico sintasas	15
Figura 2: Estructura de las HDL y de su principal proteína, la apoA-I	21
Figura 3. Transporte reverso de colesterol.....	23
Figura 4: ATP sintasa mitocondrial	29
Figura 5: Representación esquemática del proceso de formación del vector de transferencia pAdTrack-apoA-I.....	39
Figura 6: Representación esquemática de la formación del adenovirus de apoA-Ihr.....	43
Figura 7: Verificación de la pureza de HDL, mediante electroforesis SDS-PAGE	51
Figura 8: Cromatograma de la separación de proteínas de las HDL	52
Figura 9: Análisis de la pureza de los pools de apoA-I aislada desde HDL.....	53
Figura 10: Purificación de apoA-I desde gel de poliacrilamida	55
Figura 11: Generación del vector de transferencia pAdTrack-apoA-I	57
Figura 12: Expresión de apoA-Ihr en medio de cultivo de células HEK-293A	58
Figura 13: Ensayos de proliferación con medios de cultivo de HEK-293A transfectadas	60
Figura 14: Confirmación de la recombinación homóloga	61
Figura 15: Generación de los viriones recombinantes	64
Figura 16: Ensayo de selección de multiplicidad de infección (MOI)	65
Figura 17: Ensayos de purificación de apoA-Ihr por cromatografía de inmunoafinidad	67
Figura 18: Purificación de apoA-Ihr de cultivos de células SiHa.....	68
Figura 19: Biodisponibilidad de NO en HUVEC tratadas con apoA-Ihr	70
Figura 20: Actividad de la eNOS en HUVEC incubadas con apoA-Ihr.....	71
Figura 21: Ensayos de miografía con apoA-Ihr	72
Figura 22: Análisis histológico de CD31	74
Figura 23: Detección de ecto-F ₁ -ATPasa en vena umbilical humana	75
Figura 24: Detección de ecto-F ₁ -ATPasa en vena coriónica humana.....	76
Figura 25: Efecto dosis y tiempo-dependencia de apoA-I en la tensión de vasos sanguíneos.....	78
Figura 26: Efecto de apoA-I 50 µg/mL en la tensión de vasos sanguíneos.....	79
Figura 27: Efecto de la inhibición de la eNOS, sobre la vasodilatación generada por apoA-I	81
Figura 28: Efecto de la abrasión mecánica del endotelio, sobre la vasodilatación generada por apoA-I	82
Figura 29: Efecto de la inhibición de ecto-F ₁ -ATPasa, sobre la vasodilatación generada por apoA-I	84
Figura 30: Efecto de la inhibición de ABCA1, sobre la vasodilatación generada por apoA-I.....	86
Figura 31: Efecto de la inhibición de SR-BI, sobre la vasodilatación generada por apoA-I..	87
Figura 32: Efecto de ADP sobre la tensión de vasos sanguíneos	89
Figura 33: Efecto de ADPβS sobre la tensión de vasos sanguíneos.....	90

Figura 34: Efecto de la inhibición de la eNOS, sobre la vasodilatación generada por ADPβS	91
Figura anexa 1: Curvas de tiempo para el efecto de la inhibición de la eNOS, sobre la vasodilatación generada por apoA-I	108
Figura anexa 2: Curvas de tiempo para el efecto de la abrasión mecánica del endotelio, sobre la vasodilatación generada por apoA-I	109
Figura anexa 3: Curva de tiempo para el efecto de la inhibición de ecto-F ₁ -ATPasa con IF ₁ , sobre la vasodilatación generada por apoA-I	110
Figura anexa 4: Curva de tiempo para el efecto de la inhibición de ecto-F ₁ -ATPasa con oligomicina, sobre la vasodilatación generada por apoA-I	111
Figura anexa 5: Curva de tiempo para el efecto de la inhibición de ABCA1, sobre la vasodilatación generada por apoA-I	112
Figura anexa 6: Curva de tiempo para el efecto de la inhibición de SR-BI, sobre la vasodilatación generada por apoA-I	113
Figura anexa 7: Curva de tiempo para ADP en la tensión de vasos sanguíneos.....	114
Figura anexa 8: Curva de tiempo para ADPβS en la tensión de vasos sanguíneos	115
Figura anexa 9: Curva de tiempo para el efecto de la inhibición de la eNOS, sobre la vasodilatación generada por ADPβS.....	116



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Moléculas vasoactivas liberadas por endotelio vascular	13
Tabla 2: Diseño de la secuencia de apoA-I humana recombinante	38



ABREVIACIONES

ABCA1.- ATP <i>binding cassette</i> A1	ICAM.- molécula 1 de adhesión intercelular
ADMA.- dimetilarginina asimétrica	IF ₁ : factor inhibitorio 1
Akt.- proteínas quinasas B	iNOS.- sintasa de óxido nítrico inducible
ApoA-I.- apolipoproteína A-I	LCAT.- lecitina colesterol aciltransferasa
ATP.- adenosina trifosfato	LDL.- lipoproteínas de baja densidad
BAECs.- células endoteliales de aorta de bovino	L-NAME: <i>N</i> -nitro-L-arginina metil éster
BLT-1.- Bloqueador de transporte de lípidos-1	MAPK.- proteína quinasa activada por mitógenos
BH ₄ .- tetrahidrobiopterina	MOI: multiplicidad de infección
CaM.- Calmodulina	NADPH.- nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
CETP.- proteína de transferencia de ésteres de colesterol	nNOS.- sintasa de óxido nítrico neuronal
CF6.- factor acoplante 6	NO.- óxido nítrico
ECV.- enfermedad cardiovascular	PEI.- polietilenimina
eNOS.- sintasa de óxido nítrico endotelial	PKB.- proteína quinasa B
FAD.- flavina adenina dinucleótido	PI3K.- fosfoinositol 3-quinasa
FMN.- flavina mononucleótido	ROS.- especies reactivas del oxígeno
GMPc.- guanosín monofosfato cíclico	SFB: suero bovino fetal
HAECs.- células endoteliales de aorta humana	SR-BI.- receptor <i>scavenger</i> clase B tipo I
HCAECs.- células endoteliales de arteria coronaria humana	TNF- α .- factor de necrosis tumoral α
HDL.- lipoproteínas de alta densidad	VCAM.- Molécula 1 de adhesión de células vasculares
HUVECs.- células endoteliales de vena de cordón umbilical	VEGF.- factor de crecimiento de endotelio vascular
	VLDL.- lipoproteínas de muy baja densidad.

RESUMEN

La enfermedad cardiovascular es la primera causa de muerte de Chile y el mundo. El factor de riesgo de mayor prevalencia para esta condición es la hipertensión arterial, la cual se asocia a la disminución de la síntesis de óxido nítrico (NO) por el endotelio vascular.

Un factor protector de la función endotelial y de la síntesis de NO son las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y su proteína mayoritaria la apolipoproteína A-I (apoA-I). Sin embargo, aún es tema de controversia el rol de apoA-I libre de lípidos sobre regulación del tono vascular y los receptores que pudieran mediar estos efectos.

Ecto-F₁-ATPasa es un receptor de alta afinidad para apoA-I libre de lípidos en células endoteliales. La unión entre ecto-F₁-ATPasa y apoA-I aumenta la actividad hidrolasa de ATP de esta enzima, generando ADP extracelular. En nuestro laboratorio, ecto-F₁-ATPasa ha sido asociado a efectos benéficos de apoA-I en células endoteliales, en particular a la mayor síntesis de NO vía la sintasa endotelial de óxido nítrico (eNOS).

En este trabajo se abordó la regulación del tono vascular por apoA-I y la participación de la ecto-F₁-ATPasa en estos efectos. Para ello, se produjo apoA-I humana recombinante, mediante la generación de un adenovirus, y se evaluó su efecto sobre el tono vascular, por la técnica de miografía de alambre, utilizando venas umbilicales y placentarias humanas.

Los resultados demostraron que concentraciones fisiológicas de apoA-I generan un efecto vasodilatador en ambos tipos de vasos sanguíneos. Este efecto es completamente dependiente de ecto-F₁-ATPasa, mientras SR-BI, receptor de HDL, no participa en ellos. La implicancia de ABCA1, el cual une apoA-I libre de lípidos, debe ser confirmada por otras aproximaciones, debido a la baja especificidad del inhibidor utilizado (glibenclamida).

Estos resultados confirman los hallazgos realizados por nuestro laboratorio en cultivos de células endoteliales, donde apoA-I, a través de ecto-F₁-ATPasa, aumenta la actividad de la eNOS y la síntesis de NO. Además, los ensayos de miografías validan la implicancia fisiológica de la vía apoA-I / ecto-F₁-ATPasa /eNOS. Estos resultados aportan a la comprensión de mecanismos implicados en la regulación del tono vascular y al diseño de futuras terapias complementarias para el tratamiento de hipertensión y ECV.

ABSTRACT

Cardiovascular disease is the first cause of mortality in Chile and the world. Among risk factors, hypertension is the most prevalent, and it is associated to a lower synthesis of nitric oxide (NO) by vascular endothelium.

One protector factor for endothelial function and NO synthesis is high density lipoproteins (HDL) and their major protein, apolipoprotein A-I (apoA-I). However, the role of lipid-free apoA-I in the regulation of vascular tone is still controversial, as well as the role of receptors for apoA-I that could mediate these effects.

Ecto-F₁-ATPase is a receptor with high affinity for lipid-free apoA-I in endothelial cells. ApoA-I binding to ecto-F₁-ATPase increases its ATP hydrolase activity, generating high extracellular ADP. In our laboratory, ecto-F₁-ATPase has been associated with beneficial effects of apoA-I on endothelial cells, particularly with the synthesis of NO through the endothelial nitric oxide synthase (eNOS).

The aim of this work was to determine the regulation of vascular tone by apoA-I and the involvement of ecto-F₁-ATPase in these effects. For this purpose, we produced recombinant human apoA-I, through the generation of an adenovirus. The vascular tone was assessed by wire myography technique in human umbilical and placenta veins.

Our results demonstrated that physiological concentrations of apoA-I induce a vasodilator effect in both blood vessel types. This effect is completely dependent on ecto-F₁-ATPase activity, while SR-BI, an HDL receptor, is not involved. The implication of ABCA1, which binds apoA-I in its lipid-free form, should be confirmed using other experimental approaches, because of the low specificity of the inhibitor used in this study (glybenclamide).

These results confirm the evidence shown by our laboratory in endothelial cell cultures, where apoA-I, through ecto-F₁-ATPase, increases the eNOS activity and the synthesis of NO. Besides, the results of the vascular reactivity validate the physiological relevance of apoA-I / ecto-F₁-ATPase / eNOS pathway. These results contribute to the knowledge of mechanisms implicated in the regulation of vascular tone and to the design of complementary therapies for the treatment of hypertension and ECV.

INTRODUCCIÓN

Enfermedad cardiovascular e hipertensión

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en todo el mundo. Se calcula que en el año 2008 murieron por esta causa 17,3 millones de personas, lo cual representa un 30% de todas las muertes registradas en el mundo ese año, y se calcula que en 2030 morirán cerca de 23,3 millones de personas por ECV [1]. En Chile la realidad es similar, las ECV son la primera causa de muerte en el país, alcanzando un 32% en el año 2010 [2,3].

La mayoría de las ECV pueden prevenirse actuando sobre los factores de riesgo, como son el tabaquismo, dietas desbalanceadas, la obesidad, la inactividad física, la hipertensión arterial y la diabetes. De éstos, el factor de mayor prevalencia es la hipertensión arterial, alcanzando un 26,9% de incidencia y se relaciona con el 16,5% de las muertes anuales por ECV [1].

La hipertensión arterial es una enfermedad crónica, caracterizada por un aumento de la presión arterial sistólica (≥ 140 mmHg) y diastólica (≥ 90 mmHg). A nivel mundial, uno de cada tres adultos presenta hipertensión arterial, trastorno que causa aproximadamente la mitad de todas las defunciones por accidente cerebro-vascular o cardiopatía en el mundo y en Chile [1,4].

En nuestro país, según la Encuesta Nacional de Salud del 2010, un 55,74% de la población presenta elevación de la presión arterial sistólica y un 33,71% de la presión arterial diastólica. Además, un 65,05% de la población está en conocimiento de padecer problemas de presión arterial elevada y sólo el 37,26% de ellos se encuentra bajo tratamiento con drogas antihipertensivas [5]

Debido a estos antecedentes, el estudio y conocimiento de los mecanismos subyacentes a esta enfermedad cobran gran relevancia. El desarrollo de hipertensión arterial se ha relacionado con la alteración de la función del endotelio vascular, la cual, a su vez, ha sido asociada al inicio y progresión de la placa ateromatosa y al desarrollo de ECV.

Función endotelial

El endotelio vascular está constituido por una monocapa de células endoteliales que recubre el interior de los vasos sanguíneos. Si bien es una estructura simple, funcionalmente es muy sofisticada. Han sido ampliamente descritos los diversos procesos biológicos que el endotelio regula, entre los cuales destacan la permeabilidad vascular, la fibrinólisis y la coagulación, la inflamación, el tono vascular, el metabolismo de colesterol, la angiogénesis, etc. Estas funciones están determinadas por la expresión de diversas moléculas de acción autocrina y paracrina sintetizadas por el endotelio (Tabla I).

La alteración de la función de las células endoteliales se denomina disfunción endotelial. Diversos desórdenes metabólicos, como diabetes, dislipoproteinemias y aterosclerosis, se han relacionado con esta condición. La disfunción endotelial determina la alteración de todas las funciones realizadas por el endotelio, dentro de las cuales, el control del tono vascular es un indicador temprano del desarrollo de esta patología y un determinante de la progresión de este fenómeno [6].

La dilatación vascular dependiente de endotelio es llevada a cabo por distintas moléculas de acción autocrina y paracrina, entre ellas, el óxido nítrico (NO). Este radical constituye una de las moléculas vasodilatadoras más potentes derivadas de endotelio [7]; por este motivo, la función endotelial se puede determinar de manera indirecta a través de la liberación NO, lo cual se mide clínicamente mediante la capacidad de dilatación de una arteria en respuesta a estímulos, como la oclusión transitoria del vaso o la administración de acetilcolina. En la disfunción endotelial, existe una disminución de la síntesis y/o biodisponibilidad de NO, lo cual es determinante en el inicio y desarrollo de hipertensión y aterosclerosis [8].

El NO está involucrado en una gran variedad de funciones que cumple el endotelio vascular, por lo que el estudio y comprensión de los múltiples procesos que llevan a su síntesis y biodisponibilidad, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, son de gran importancia para generar herramientas farmacológicas que favorezcan el manejo de diversas patologías cardiovasculares.

Tabla 1: Moléculas vasoactivas liberadas por endotelio vascular

Función	Moléculas involucradas	Referencias
Regulación del tono vascular	Óxido nítrico, prostaciclina, leucotrienos y tromboxano, endotelina-1, monóxido de carbono	[9,10,11,12]
Control de la hemostasis	Factor activante plaquetario, factor de Von Willebrand, inhibidor de la vía del factor tisular, activante del plasminógeno tisular, monóxido de carbono y óxido nítrico	[13,14,15]
Inflamación	Molécula 1 de adhesión de células vasculares (VCAM-1), molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1), E-selectina, óxido nítrico y prostaciclina	[16,17]
Proliferación celular	Endotelina-1, factor de crecimiento endotelio vascular	[18,19]

Síntesis de óxido nítrico

El NO es sintetizado en mamíferos por 3 isoformas de la sintasa de óxido nítrico (NOS, del inglés *nitric oxide synthase*): NOS neuronal (nNOS o NOS1), NOS inducible (iNOS o NOS2) y NOS endotelial (eNOS o NOS3) [20]. Cada isoforma es codificada por un gen diferente. Para el caso de nNOS, su gen está presente en el cromosoma 12 y codifica una proteína de 150-160 kDa; el gen de iNOS está localizado en el cromosoma 17 y genera una proteína de un peso de 125-135 kDa, mientras para eNOS, su gen se encuentra en el cromosoma 7 (7q35-q36) y codifica una proteína de 1203 aminoácidos, con un peso molecular de 133 kDa [21].

Estas tres isoformas constituyen enzimas independientes, formadas por un polipéptido, estructurado en dos dominios funcionales. El dominio oxidasa (N-terminal) se une al grupo prostético hemo, así como al cofactor redox tetrahidrobiopterina (BH₄) y al sustrato L-arginina. El dominio C-terminal, con actividad reductasa, presenta los sitios de unión para flavina mononucleótido (FMN), flavina adenina dinucleótido (FAD), y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) [22,23]. Para la síntesis de NO, se requiere la formación de un homodímero de NOS, en el cual el dominio reductasa interacciona funcionalmente con el dominio oxidasa del monómero contiguo, mientras BH₄ se localiza en la interfase del dímero, otorgándole estabilidad (Figura 1) [24,25]. Las NOS catalizan la conversión de L-arginina a NO y L-citrulina, en presencia de O₂ y NADPH. Los electrones cedidos por NADPH (equivalentes reductores) se transfieren desde el dominio reductasa a través de FAD, luego FMN y finalmente el grupo hemo, hasta el dominio oxigenasa [26,27]. Se ha demostrado que las NOS requieren del cofactor redox BH₄ para la generación eficiente de NO y una proteína reguladora, la calmodulina (CaM), la cual une iones Ca²⁺ [28](Figura 1).

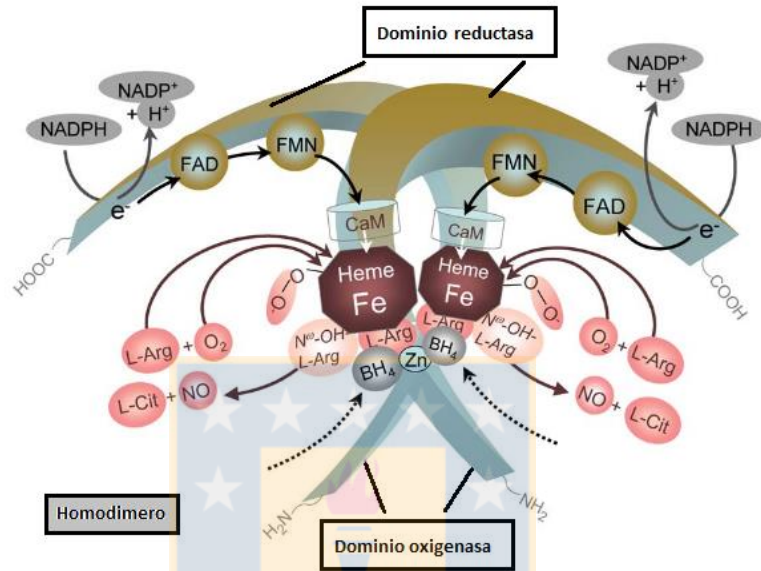


Figura 1. Estructura y función de las óxido nítrico sintasas

Las isoenzimas de NOS forman homodímeros para generar NO. Cada monómero se compone de un dominio reductasa y un dominio oxigenasa. Los cofactores flavina adenina dinucleótido (FAD) y flavina mononucleótido (FMN), en el dominio reductasa, aceptan electrones de adenina nicotinamida dinucleótido fosfato (NADPH) y los transportan al grupo hemo en el dominio oxigenasa. En presencia del sustrato L-arginina y del cofactor 5, 6, 7, 8-tetrahidro-L-biopterina (BH_4), el dímero de NOS reduce el O_2 y se genera NO y L-citrulina. N^{ω} -hidroxi-L-arginina ($N^{\omega}-OH-L-Arg$) es un intermedio en la reacción [29].

Tanto nNOS como eNOS son expresadas constitutivamente y requieren del aumento intracelular de Ca^{2+} para incrementar su actividad; en contraparte, la expresión de iNOS es inducida en respuesta a estímulos inflamatorios y presenta CaM unida permanentemente como una subunidad adicional. Por lo tanto, la regulación de la actividad de iNOS se realiza de manera transcripcional [23,30].

En el endotelio, la síntesis de NO puede ser gatillada por diferentes estímulos fisiológicos, como por ejemplo: acetilcolina, histamina, adenosina, adenosina trifosfato (ATP), bradiquinina y estrógenos, factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), adiponectina, estrés hemodinámico o *shear stress*, entre otros [31,32]. El NO liberado por la célula endotelial difunde hacia las células del músculo liso vascular, donde inhibe canales de calcio dependientes de voltaje, reduciendo directamente la corriente de Ca^{2+} intracelular [33], o estimula la guanilato ciclasa soluble para la formación de guanosina monofosfato cíclico (GMPc), la cual disminuye la liberación de calcio intracelular por el retículo sarcoplásmico, en respuesta a inositol 1,4,5-trifosfato. Estos eventos determinan la disminución de las concentraciones de calcio intracelular [34], la cual determina la relajación de las células de músculo liso y la inhibición de su proliferación. Por otro lado, el NO ejerce efectos independientes de músculo liso, los que se deben a la liberación de NO hacia el lumen vascular. A nivel plaquetario, inhibe la adhesión y agregación; en leucocitos, disminuye la adhesión e infiltración [35], y sobre las propias células endoteliales, participa en la modificación proteica vía S-nitrosilación, mecanismo importante para la correcta función celular [36], disminuye la apoptosis [37,38], regula la integridad de monocapa endotelial, modulando las uniones adherentes [39], aumenta la migración de las células endoteliales [40], entre otras.

La localización celular de la eNOS es única entre los miembros de la familia NOS, puesto que se encuentra principalmente en las cavéolas de la membrana plasmática y en el aparato de Golgi, ubicándose en la cara citosólica de ambas estructuras [41]. La importancia funcional de esta localización radica en la regulación diferencial: en la membrana plasmática, la eNOS se activa de manera más eficiente por Ca^{2+} , mientras en el aparato de Golgi la síntesis de NO es más dependiente de la fosforilación por Akt [42,43].

Regulación de la actividad de la eNOS

A nivel endotelial, la síntesis de NO está determinada por distintos mecanismos, como son:

- 1) Interacciones proteína-proteína: en las cavéolas, la eNOS forma complejos con caveolina-1, interacción que determina una inhibición de la actividad de la eNOS. En respuesta a estímulos extracelulares, se produce un aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular, el cual se une a CaM, y este complejo desplaza a caveolina-1 de su interacción con la eNOS, determinando su activación y la producción de NO [44]. También se describe en literatura las proteínas NOSIP (*eNOS Interacting Protein*) y NOSTRIN (*eNOS Trafficking Inducer*), de 34 y 58 kDa, respectivamente. Estas moléculas promueven la traslocación de la eNOS desde las cavéolas hacia membranas intracelulares, disminuyendo la síntesis de NO [45,46,47].
- 2) Cofactores y sustratos: como se mencionó, la eNOS requiere para su actividad enzimática de la presencia de los cofactores BH_4 , NADPH, FAD y FMN, y los sustratos L-arginina y O_2 . Se ha descrito que la disminución de la disponibilidad de cofactores y/o sustratos conlleva la disminución de la síntesis de NO [48]. Así Acosta *et al.* describe que pacientes en diversos estados patológicos, como en los casos de insulino resistencia, tabaquismo e hipercolesterolemia, presentan una reducción significativa de los niveles de BH_4 y GTPCH I (guanosina trifosfato ciclohidrolasa I, enzima encargada de generar BH_4 en mamíferos), lo cual conlleva a una reducción de la síntesis de NO [6]. L-arginina es el sustrato exclusivo de la eNOS para la producción de NO, pero la enzima arginasa II compite con la eNOS por este sustrato, para la formación de urea y L-ornitina, sugiriendo un rol potencial de esta enzima en una regulación negativa de la síntesis de NO [49]. De manera interesante, se ha encontrado elevada la expresión o actividad de arginasa II en pacientes con disfunción endotelial, asociada a hipertensión pulmonar y aterosclerosis [50].
- 3) Fosforilaciones: la secuencia primaria de la eNOS presenta sitios de fosforilación, como serina, treonina y tirosina, los cuales modulan rápidamente su actividad enzimática. Por ejemplo, en la secuencia eNOS bovina, las fosforilaciones Ser617, Ser635 y Ser1179 son activadoras, mientras las fosforilaciones Ser116 y Thr495 son inhibitorias [32]. En el

humano, la fosforilación en Ser1177 aumenta la actividad de la eNOS, mientras en Thr495 genera el efecto opuesto [51]. La fosforilación de la eNOS es modulada por kinasas, fosfatasas y por interacciones proteína-proteína [52].

- 4) Cambios en la expresión de la eNOS: la expresión de la eNOS es regulada por diversos mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales. Entre los primeros destacan secuencias en el promotor de la eNOS y elementos reguladores *cis* y *trans*, mientras entre los segundos se encuentran la regulación de la estabilidad del ARNm de la eNOS [53,54,55,56].
- 5) Competidores de la eNOS: la síntesis de NO también se puede ver disminuida por moléculas endógenas, como es la dimetil arginina asimétrica (ADMA), un competidor de L-arginina por el sitio catalítico de la eNOS [57]. Por otro lado, análogos farmacológicos de L-arginina inhiben la eNOS, como la L-N^G-monometil arginina (L-NMMA) y la L-nitro arginina metil ester (L-NAME) [58].

Lipoproteínas de alta densidad y apolipoproteína A-I

Las células endoteliales están continuamente expuestas a moléculas transportadas por la sangre y a variaciones del flujo sanguíneo. Existe una serie de factores protectores y de riesgo que determinan la función del endotelio vascular. Entre los factores de protección se ha descrito la insulina, factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), estrógenos, fármacos como las estatinas, y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) [59,60,61].

Las HDL son un grupo heterogéneo de lipoproteínas presentes en plasma, las cuales pueden ser aisladas por ultracentrifugación a una densidad de 1,063-1,210 g/mL [62]. Las HDL están constituidas en un 15-20% por colesterol esterificado, alrededor de un 5% por triglicéridos, 3-5% por colesterol libre y un 26-32% por fosfolípidos (predominantemente fosfatidilcolina). El 45-55% restante lo conforman apolipoproteínas (apos), entre las cuales alrededor de un 70% corresponde a apoA-I, un 20% a apoA-II y el resto a proteínas minoritarias, como albúmina, apoA-IV, apoE, apoC, lecitin-colesterol aciltransferasa (LCAT) [63,64,65], entre otras. Espacialmente, los residuos polares de los lípidos (principalmente colesterol y fosfolípidos) forman una monocapa que se expone hacia el exterior de la lipoproteína, en contacto con el plasma. En el centro de esta estructura se

disponen los componentes apolares, como el colesterol esterificado y los triglicéridos. En estos complejos quedan inmersas las apolipoproteínas, las cuales se disponen de manera similar a los lípidos, dejando expuestas las regiones polares hacia la superficie y los residuos apolares hacia el centro de la lipoproteína [66] (Figura 2A).

La composición lipídica de las HDL determina la forma que éstas adoptan en el espacio (discoidal o esférica) y la conformación de las apoproteínas en cada subpoblación. En las HDL discoidales, se conocen dos modelos de orientación de la apoA-I: el modelo de cinturón y el modelo en valla o en cerca de piquete [63]. Las distintas estructuras de las HDL se asocian a funciones diferentes en el organismo, como se describe más abajo.

La apoA-I es el principal componente proteico de las HDL, y juega un importante papel en la biogénesis y función de estas lipoproteínas [67,68]. En circulación sanguínea, es posible encontrar la apoA-I asociada a las HDL (alrededor del 90%) y en forma libre de lípidos o pobremente lipidada (5-10%) [69].

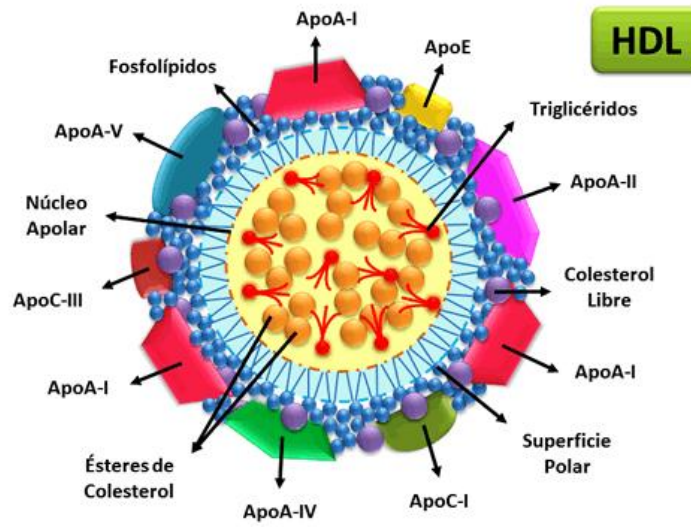
La apoA-I es sintetizada principalmente por el hígado (alrededor del 70%) y secundariamente por el intestino delgado (30% aprox.). El gen de la apoA-I se encuentra en el cromosoma 11 (11q23-q24) y presenta 4 exones y 3 intrones [70]. El exón 4 codifica la estructura primaria de la proteína, la cual es sintetizada inicialmente como un precursor de 267 aminoácidos, denominado pre-pro-apoA-I [71]. En el citoplasma, la pre-pro-proteína pierde 18 aminoácidos en el extremo N-terminal, lo cual genera pro-apoA-I. Este precursor es liberado a circulación, donde por la acción de enzimas proteolíticas, como la proteína morfogénica ósea 1, es convertida en la proteína madura de 243 aminoácidos y una masa de 28 kDa [72,73,74].

La apoA-I madura comprende de un dominio N-terminal globular, localizado desde el residuo 1 al 43, y un dominio C-terminal, desde el residuo 43 al 243 [66]. En su estructura secundaria presenta 10 dominios anfipáticos α -hélice anti-paralelos consecutivos, de 11 y 22 aminoácidos, interrumpidos por β -*loops* en los residuos Pro o Gly (Figura 2B). Las estructuras α -hélice, del dominio C-terminal, tienen una importancia central, puesto que median la interacción de apoA-I con fosfolípidos y con receptores, ya que a medida que esta

proteína se asocia con lípidos en las HDL, adopta diferentes conformaciones, las que determinan distintas afinidades por sus receptores [75,76].



A.



B.

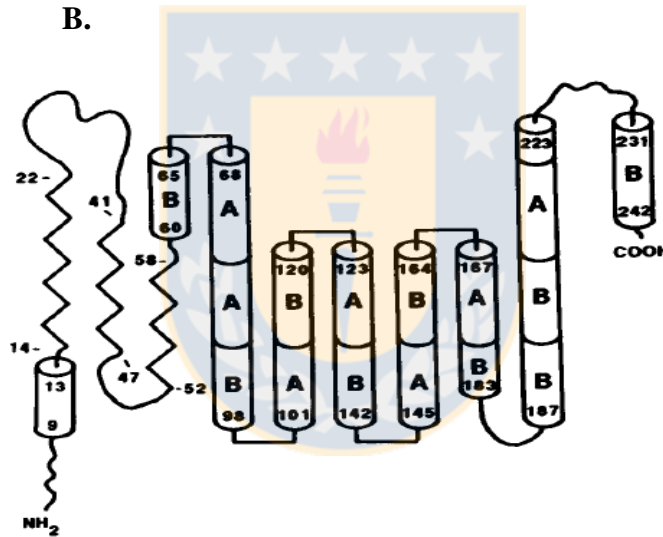


Figura 2: Estructura de las HDL y de su principal proteína, la apoA-I

A: Se muestra los principales componentes proteicos y lipídicos presentes en las HDL y su distribución dentro de estas lipoproteínas. B: Modelo de la estructura secundaria de la apoA-I. Los cilindros indicados con A y B corresponden a α -hélices, las estructuras β como $\wedge\wedge$, y las vueltas como \square [77].

Los niveles circulantes de HDL y de apoA-I se relacionan con un estado de protección frente al desarrollo de aterosclerosis. La función más ampliamente descrita para estas estructuras es el transporte reverso de colesterol [64,78], el cual es un mecanismo fisiológico que permite la captación del exceso de colesterol presente en tejidos periféricos (como la íntima de la pared de vasos arteriales), su subsecuente esterificación en el plasma por medio de la enzima LCAT, y su transporte final al hígado para su excreción o reciclaje.

El transporte reverso de colesterol se inicia con el eflujo de lípidos desde las células periféricas hacia las pre- β -HDL o HDL nacientes, las cuales están constituidas por 1 o 2 partículas de apoA-I muy pobremente lipidadas, con proporciones similares de lecitina y esfingomielina. Estas estructuras representan alrededor del 2 al 5% de las HDL plasmáticas. En las pre- β -HDL, la apoA-I es reconocida por el transportador *ATP-binding cassette* subfamilia A tipo I (ABCA1), el cual media el eflujo de lípidos y colesterol desde los tejidos periféricos hacia la apoA-I plasmática [79,80] (Figura 3). A medida que esta partícula se enriquece en lípidos, adquiere una forma discoidal, la que se acompaña de un cambio conformacional de la apoA-I. Esta HDL enriquecida en lípidos contiene colesterol libre, apoA-I y fosfolípidos, los cuales son considerados sustrato ideal para la acción de LCAT [81], la cual cataliza la esterificación del colesterol libre presente en las HDL, utilizando cadenas de ácidos grasos de la fosfatidilcolina. Esta reacción toma lugar en la superficie de las HDL y requiere de la presencia de la apoA-I como cofactor. Los ésteres de colesterol formados migran al interior de la partícula discoidal, lo que causa un cambio en la forma de la HDL hacia estructuras esféricas [68]. Estas HDL maduras constituyen la amplia mayoría de las HDL circulantes, y se caracterizan por presentar migración α .

Los ésteres de colesterol y otros lípidos presentes en los complejos de HDL esféricas tienen como destino la captación selectiva por el receptor *scavenger* clase B tipo 1 (SR-BI) en el hígado y otros tejidos esteroideogénicos, o el intercambio por triglicéridos en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) circulantes, por medio de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP). El catabolismo de las VLDL genera lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales son reconocidas y endocitadas por los receptores de LDL presentes en el hígado o en tejidos periféricos [63] (Figura 3).

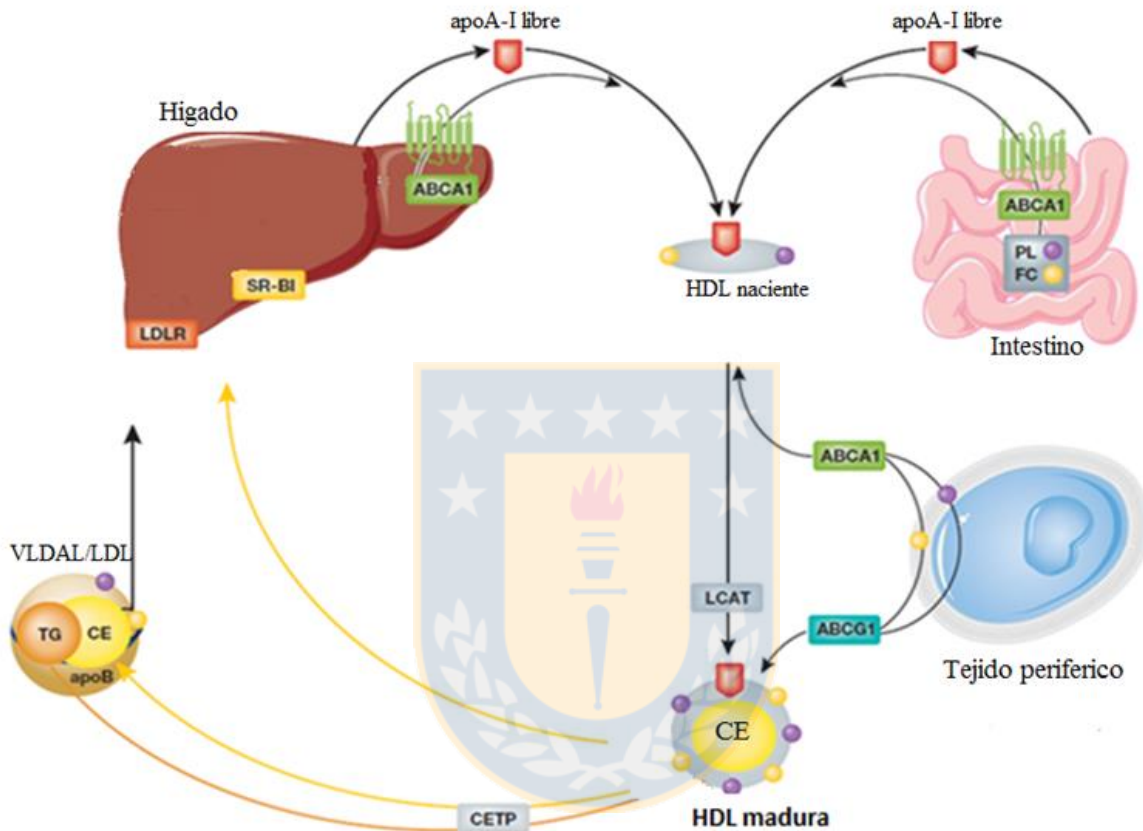


Figura 3. Transporte reverso de colesterol

La apoA-I libre de lípidos es secretada por el hígado y el intestino. A través de interacciones con ABCA1 en tejidos periféricos, adquiere fosfolípidos y colesterol libre, generando HDL nacientes. El colesterol libre en las HDL es esterificado por la LCAT, lo cual, junto al aporte de lípidos periféricos vía ABCG1, permite la formación de un núcleo hidrofóbico en las HDL y la maduración de estas lipoproteínas. El colesterol asociado a las HDL es captado por el hígado a través del receptor hepático SR-BI, o bien es transferido por CETP a las VLDL / LDL, y captado posteriormente a través del receptor de LDL hepático (LDLR) [82]. CE: colesterol esterificado; TG: triglicéridos; FC: colesterol libre; PL: fosfolípidos; BA: ácidos biliares.

Lipoproteínas de alta densidad, apoA-I y óxido nítrico

Además del transporte reverso de colesterol, se ha descrito que las HDL y la apoA-I poseen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes [83,84] y antitrombóticas [85], junto con generar un efecto proliferativo, migratorio y antiapoptótico en las células endoteliales [86,87]. En conjunto, todas estas funciones determinan una protección frente al desarrollo de disfunción endotelial, aterosclerosis y ECV.

De particular interés son los efectos directos de las HDL y la apoA-I sobre la pared vascular, los cuales favorecen una condición anti-aterogénica. Entre ellos, las HDL potencian la vasodilatación, al aumentar la síntesis y la biodisponibilidad de NO. Este efecto es llevado a cabo por distintos mecanismos. Por un lado, se ha descrito que las HDL aumentan la actividad de la eNOS, evaluada por la formación de L-[³H]citrulina, en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) [88]. Además, tanto las HDL como la apoA-I, aumentan la abundancia proteica de la eNOS [89] y favorecen la fosforilación de esta enzima en residuos activadores (Ser1179), mientras disminuyen esta modificación en residuos inhibitorios (Thr497), en células endoteliales de aorta de bovino (BAEC). Estos efectos son realizados corriente abajo de la activación de las vías de señalización fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) / proteína kinasa B (PKB o Akt) y *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK) [90].

Sumado a lo anterior, se ha descrito que las HDL regulan la localización intracelular de la eNOS. A este respecto, las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL) depletan las cavéolas de colesterol, lo que produce la traslocación de la eNOS a compartimentos membranosos internos en la célula, lo cual se asocia a una menor actividad de esta enzima [91]. Las HDL antagonizan los efectos de las oxLDL, ya que ceden colesterol a las cavéolas, por tanto preservan la localización y función de la eNOS [92]. También se ha descrito que las oxLDL incrementan la generación de aniones superóxidos (O_2^-), los que reaccionan con el NO, formando peroxinitritos. Este estado oxidativo derivado de las oxLDL es revertido por el poder antioxidante de las HDL, favoreciendo así la bioactividad de NO [93].

En relación a apoA-I libre, se ha demostrado que co-localiza con la eNOS en la región perinuclear de células BAEC [94], proporcionando evidencia de la colocación de apoA-I y la eNOS en células endoteliales [94,95]. Por otro lado resultados obtenidos por Leon y Briceño, en nuestro laboratorio, demuestran que apoA-I aumenta la actividad de la eNOS y la síntesis de NO, en células HUVECs y esto se asocia al aumento de la fosforilación de la eNOS en el residuo S1177, residuo activador de esta enzima [95,96]. Además Ferré en el año 2011, en un estudio *in vivo*, correlacionó los niveles de apoA-I con la capacidad de dilatación de arterias pequeñas, luego de inducir una isquemia [97]. También se ha observado que apoA-I promueve la re-endotelización *in vivo* en ratones, promoviendo la integridad de la monocapa endotelial [86], y en conejos hiperlipémicos, apoA-I retrasa el desarrollo de aterosclerosis en la pared arterial [98].

A pesar de los estudios que demuestran la protección endotelial ejercida por apoA-I libre, existen grupos que avalan efectos opuestos. Por ejemplo, Briand y col. estudió el efecto de apoA-I libre en células BAECs. Sus resultados indican que apoA-I tiene importantes efectos deletéreos sobre las células endoteliales, ya que disminuye la actividad de eNOS y por lo tanto la producción de NO. En este mismo contexto Lebuffe y col. evaluó la vasorelajación dependiente de NO en conejos transgénicos para apoA-I humana y observó que la relajación vascular dependiente de endotelio en la aorta abdominal fue deteriorada dramáticamente en estos animales transgénicos [99,100]. Es así como aun es tema de controversia los efectos de apoA-I sobre el endotelio vascular y el control del tono vascular.

De esta misma manera no existe claridad sobre los receptores implicados en las diversas funciones que apoA-I cumple en el endotelio vascular. Se han descrito diferentes receptores de HDL y apoA-I libre en el endotelio vascular, los cuales han sido relacionados a la síntesis de NO. Así, para las HDL, se ha descrito el receptor de la esfingosina 1-fosfato (S1PR) [101] y el receptor *scavenger* clase B tipo I (SR-BI) [88], mientras para apoA-I libre o pobremente lipídada, se ha identificado el transportador *ATP-binding cassette*, sub-familia A, tipo 1 (ABCA1) [102] y la ecto-F₁-ATPasa [103]. A continuación se describirán brevemente los receptores de apoA-I, tanto en su forma lipídada en HDL como libre de lípidos o pobremente lipídada.

Receptores endoteliales de HDL y apoA-I

a) SR-BI

Este receptor es expresado por una gran variedad de tipos celulares, tales como: hepatocitos, células pulmonares, macrófagos y células endoteliales. Ubicado en el cromosoma 12 en humanos, esta glicoproteína de 509 aminoácidos cuenta con un gran dominio extracelular anclada a la membrana plasmática, a través de los extremos N y C-terminal, que son regiones transmembrana hidrofóbicas, con extensiones cortas en el citoplasma [104].

La unión de SR-BI con las HDL es realizada a través de interacciones con apoA-I [88], lo cual conlleva la activación de la tirosina quinasa Src, y la consecuente fosforilación de la eNOS en residuos activadores, vía PI3K/Akt y MAPK [90]. Además, la unión de las HDL a SR-BI mantiene constante la concentración del colesterol caveolar, evitando el eflujo generado por las oxLDL y la deslocalización de la eNOS descrita en este fenómeno. Así las HDL, a través de SR-BI, mantienen a la eNOS asociada a las cavéolas, donde puede ser activada por estímulos externos [92]. Finalmente, HDL a través de SR-BI promueve la reparación endotelial, la migración y la proliferación de células endoteliales, y la re-endotelización en un modelo murino de lesión arterial [86,105].

b) ABCA1

Ubicado en el cromosoma 9 en humanos, el gen de ABCA1 codifica una proteína de 2201 aminoácidos, con un peso de 220 kDa. ABCA1 posee 12 dominios transmembrana α -hélices, 6 dominios extracelulares y 5 intracelulares altamente conservados, donde se encuentran los extremos N y C terminales [67,106].

Este receptor presenta una distribución ubicua, sin embargo, su expresión es baja en células endoteliales [107]. A pesar de ello, se ha descrito que ABCA1 es responsable del 30% de la unión de apoA-I libre a la superficie del endotelio vascular [103].

Como se mencionó anteriormente, ABCA1 participa en el transporte reverso de colesterol, en particular en el eflujo de colesterol y fosfolípidos desde tejidos periféricos hacia apoA-I libre o pobremente lipidada, para la subsecuente formación de HDL. Además, ABCA1 media la transcitosis de apoA-I a través de células endoteliales aórticas [108]. Sin embargo, poco se sabe de su participación en otros efectos de apoA-I libre sobre el endotelio vascular, como por ejemplo, en la síntesis de NO.

c) Ecto-F₁-ATPasa

Este complejo proteico ha sido descrito como un nuevo receptor de apoA-I libre o pobremente lipidada, y se ha relacionado con efectos protectores de apoA-I en las células endoteliales. Estructuralmente, ecto-F₁-ATPasa corresponde a la ATP sintasa mitocondrial, expresada en la superficie de distintos tipos celulares. Por este motivo, se describirá a continuación la ATP sintasa mitocondrial, para luego presentar las evidencias de la expresión ectópica de esta enzima y su relación con la función endotelial.

La ATP sintasa, también denominada complejo V de la cadena transportadora de electrones, se ubica en la membrana interna de la mitocondria y tiene por función la síntesis de ATP a partir ADP y fósforo inorgánico, utilizando la energía suministrada por el flujo de protones que se produce en el espacio intermembrana de la mitocondria [109]. Estructuralmente, esta enzima está compuesta en células eucariotas por 16 subunidades, las cuales conforman la unidad F₁ (tres heterodímeros $\alpha\beta$ más las subunidades γ , δ y ϵ), la unidad F₀ (subunidades a, e, f, g, A6L, b, d, F₆ y OSCP), un rotor (subunidades γ , δ y ϵ), y un estator (subunidades b, d, F₆ y OSCP) (Figura 4). En el dominio F₁ reside la actividad catalítica de la enzima, mientras que F₀ es un canal transmembrana que ancla la enzima a la membrana mitocondrial [110]. El dominio F₀ utiliza el gradiente de protones creado por los otros cuatro complejos de la cadena transportadora de electrones para conducir la rotación del rotor central, el que a su vez induce el cambio conformacional de los tres heterodímeros $\alpha\beta$ de la unidad F₁, que conduce a la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i. En el caso de la ATP sintasa eucariota, el paso de 10 protones a través de la unidad F₀ da lugar a una vuelta completa la unidad F₁ y genera 3 moléculas de ATP [111].

En ausencia de un gradiente de protones, por ejemplo, en el caso de hipoxia o isquemia, la enzima se comporta como una hidrolasa de ATP. Esta pérdida de potencial de energía está estrechamente regulada por el factor inhibidor 1 (IF₁), una proteína intra-mitocondrial que impide la hidrólisis de ATP. IF₁ es una proteína de 84 aminoácidos y existe como un homotetrámero en su forma inactiva, y como homodímero activo cuando el pH en la matriz mitocondrial disminuye (pH<6,5) [112,113]. Esta conformación le permite unirse fuertemente a 2 dominios F₁ de ATP sintasas contiguas, mediante la interacción tanto con los dímeros αβ como con el tallo central, bloqueando de este modo la rotación y la hidrólisis de ATP [114,115].



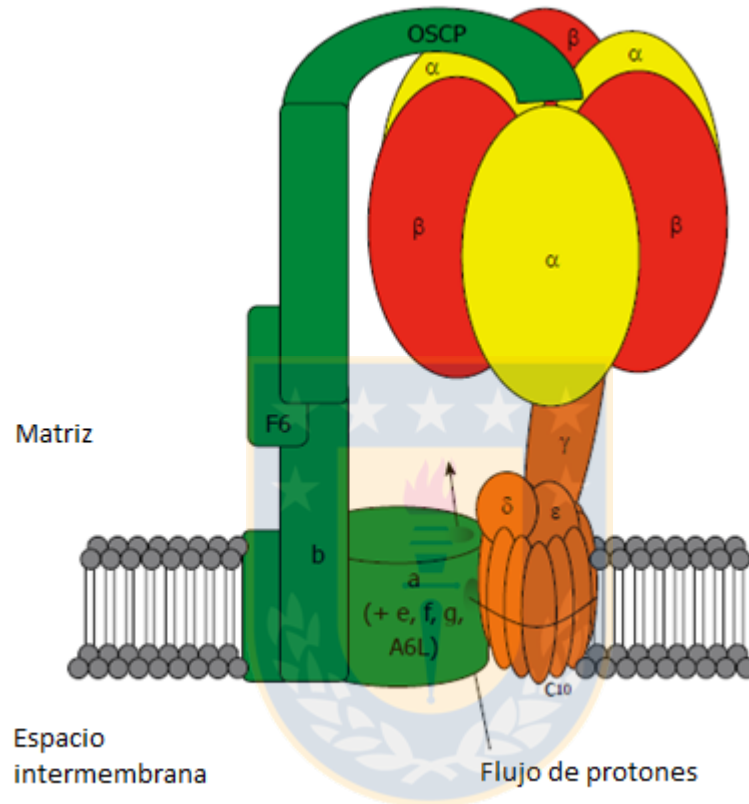


Figura 4: ATP sintasa mitocondrial

En células eucariontes, F_1F_0 ATP sintasa es un complejo proteico compuesto por 16 subunidades. F_1 es la unidad catalítica y está constituida por las subunidades α y β (rojo y amarillo), γ , δ , ϵ y el anillo c (naranja). F_0 es un canal de protones asociado a membrana, y está formado por las subunidades a , e , f , g , $A6L$, b , $F6$, d y oligomycin sensitivity-conferring protein ($OSCP$) (verde) [110].

A partir de fines de los años 90, diversos estudios han descrito la presencia de la ATP sintasa en la superficie de distintos tipos celulares, como son: hepatocitos [116], células tumorales [117,118], adipocitos [119], queratinocitos [120], osteoclastos, macrófagos y neutrófilos [115].

En relación a la expresión ectópica de la ATP sintasa en la superficie de células endoteliales, las primeras referencias datan de fines de los años 90 por el grupo de Moser y col. [115]. En estos estudios, se describió que la angiostatina, un producto del clivaje del plasminógeno, inhibe la proliferación de células endoteliales, lo cual es dependiente de la unión de la angiostatina a una proteína de superficie, que correspondió a la ATP sintasa. La actividad anti-proliferativa de la angiostatina, al igual que su unión a la superficie celular, fue inhibida en más del 90% por un anticuerpo anti la subunidad α de la ATP sintasa, confirmando la importancia de este complejo proteico [115]. Estudios posteriores de este grupo demostraron que la ATP sintasa sintetiza e hidroliza ATP en la superficie celular, actividad que es bloqueada por la angiostatina [121]. Posteriormente, investigaciones realizadas por otro grupo demostraron que la ATP sintasa sólo presenta actividad hidrolasa en la superficie celular, generando ADP a partir de ATP, por lo cual fue denominada ecto-F₁-ATPasa. Producto de esta actividad, el ADP extracelular activa un receptor purinérgico aún no descrito en este tipo celular, e induce la proliferación de las células endoteliales, disminuyendo la apoptosis [103]. Además, se demostró que la ecto-F₁-ATPasa es un receptor de alta afinidad para apoA-I libre de lípidos, unión que aumenta la actividad hidrolasa de esta enzima y sus efectos en las células endoteliales. Por el contrario, la inhibición de la actividad de ecto-F₁-ATPasa por la proteína IF₁, revierte el efecto proliferativo y antiapoptótico generado por la apoA-I [103]. Por otra parte, la unión de apoA-I a ecto-F₁-ATPasa estimula la transcitosis de apoA-I y HDL a través de células endoteliales aórticas, por la generación de ADP extracelular y activación del receptor purinérgico P2Y₁₂. Este efecto se ve disminuido por el inhibidor de ecto-F₁-ATPasa, la proteína IF₁ [122].

Estos resultados demuestran que ecto-F₁-ATPasa participa en efectos protectores generados por apoA-I en las células endoteliales, lo cual sugiere que este receptor podría estar involucrado en otros efectos de la apoA-I sobre el endotelio vascular, tales como la regulación del tono vascular, a través de la síntesis de NO. A este respecto, resultados de nuestro laboratorio realizados por León y col. en células endoteliales HUVEC [95], muestran

que la actividad de la eNOS aumenta significativamente (72%) por efecto de apoA-I libre, luego de 30 min de incubación, acción que se ve disminuida parcialmente (69%) por inhibidores de ecto-F₁-ATPasa, constituyendo la primera evidencia experimental que relaciona este receptor con la síntesis de NO. Por otro lado Briceño y col. observó ecto-F₁-ATPasa está implicada en la fosforilación de eNOS en ser-1177 en HUVECs tratadas con apoA-I, ya que al utilizar dos inhibidores para esta enzima (IF₁ y oligomicina) se observa una disminución de este efecto [96].

En literatura, existe escasa evidencia que relaciona la ecto-F₁-ATPasa con la regulación del tono vascular, derivando todas ellas de un mismo grupo de investigación. En el año 2001 fue descrito que el factor de acoplamiento 6 (CF6), una proteína de 76 aminoácidos constituyente de la unidad F₀ y del estator de la ATP sintasa, se encuentra presente en circulación sanguínea [123]. CF6 es liberado desde la superficie de las células endoteliales en respuesta a estímulos, como el factor de necrosis tumoral, alta concentración de glucosa y el estrés por flujo o *shear stress* [124,125]. Posteriormente, en el año 2005, se describe que CF6 se une a la cadena β de ecto-F₁-ATPasa en la superficie de células endoteliales, lo cual aumenta la actividad hidrolasa de esta enzima y genera un influjo transitorio de protones [126]. La acidosis intracelular produce la inhibición de la síntesis de prostaciclina y NO, llevando a la elevación de la presión arterial y la inducción de moléculas pro-aterogénicas, como endotelina-2, receptor activador de la uriquinasa tipo plasminógeno, receptor de estrógenos β , receptor-1 de las oxLDL (LOX-1), entre otras [127]. Este fenómeno se observó también en ratas normotensas a las cuales se les administró CF6 de manera intravenosa, efecto que fue revertido por un anticuerpo específico dirigido contra la subunidad β de la ecto-F₁-ATPasa [126]. CF6 se encuentra presente en altos niveles en circulación sanguínea de ratas con hipertensión espontánea, pacientes con hipertensión, diabetes, enfermedad renal de estado final, infarto agudo al miocardio y enfermedades cardíacas coronarias. Según se postula, CF6 contribuye a la patogénesis de ECV, en particular a la hipertensión arterial [127].

Como se observa, los antecedentes de literatura utilizando CF6 proponen un efecto hipertensivo de esta molécula, el cual depende de la actividad de la ecto-F₁-ATPasa. Estos hallazgos se oponen a los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, que demuestran que apoA-I, a través de una mayor actividad de ecto-F₁-ATPasa, aumenta la síntesis de NO en

cultivos de células endoteliales. Esta discrepancia pone en evidencia la necesidad de realizar estudios en modelos de vasos sanguíneos humanos, con el fin de verificar los antecedentes obtenidos por nuestro laboratorio en cultivos celulares.

En resumen, el efecto protector de las HDL sobre el endotelio está ampliamente descrito, pero aún es tema de controversia la acción de apoA-I libre de lípidos sobre las células endoteliales, en particular en la síntesis de NO, y los receptores que pudieran estar involucrados en estos efectos. Por lo tanto, surge el interés de realizar estudios con vasos sanguíneos, para validar los resultados obtenidos por nuestro laboratorio en cultivos de células endoteliales y comparar estos hallazgos con lo descrito en literatura. Una posibilidad para comprobar aquello nos la brinda la técnica de miografía, la cual permite determinar los cambios en la fuerza de contracción isométrica en vasos sanguíneos tratados *ex vivo*, en canales individuales de un miógrafo [128]. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para medir la reactividad de vasos sanguíneos frente a diferentes moléculas, ya sean vasodilatadoras o vasoconstrictoras. En relación al material biológico, representan un buen modelo de estudio, ya que posee características que son: es tejido humano, es un tejido fresco, y es de donde se obtienen las células endoteliales de vena umbilical, modelo endotelial más usado en cultivo celular. Además este modelo orgánico constituye material de desecho luego del parto. A partir de estos tejidos, es posible aislar las venas umbilicales y las venas coriónicas, las cuales han sido descritas en literatura para la evaluación de la acción de distintas moléculas sobre el tono vascular [129,130]. Por lo tanto, la técnica de miografía, utilizando vasos sanguíneos humanos, sería de gran utilidad para confirmar el efecto de apoA-I sobre el tono vascular y la implicación de los receptores de apoA-I en ellos.

HIPÓTESIS

ApoA-I humana, a través del receptor Ecto-F₁-ATPasa, genera un efecto vasodilatador, el cual es dependiente de la síntesis de óxido nítrico por el endotelio vascular.

OBJETIVO GENERAL

Demostrar que apoA-I humana genera vasodilatación dependiente de la síntesis de óxido nítrico en dos modelos de vasos venosos humanos y establecer la participación del receptor ecto-F₁-ATPasa en este efecto.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Producir y caracterizar apoA-I humana recombinante.
2. Demostrar la expresión de ecto-F₁-ATPasa en células endoteliales de vena coriónica humana.
3. Evaluar la participación del receptor ecto-F₁-ATPasa, en la vasodilatación generada por apoA-I humana recombinante, vía síntesis endotelial de NO, en vena coriónica humana.
4. Determinar la implicancia del receptor ecto-F₁-ATPasa, en la vasodilatación generada por apoA-I humana recombinante, vía síntesis endotelial de NO, en vena umbilical humana.

METODOLOGÍA

A. Obtención de ligandos de ecto-F₁-ATPasa

1. **IF₁**: La secuencia 10-47 de la proteína IF₁ humana, correspondiente a la mínima secuencia inhibitoria [131], fue proporcionada por el Dr. Laurent Martinez, del Laboratorio de HDL y Señalización, INSERM U-1043, de la ciudad de Toulouse, Francia.

2. **Obtención y purificación de apoA-I humana plasmática**: Las muestras de plasma fueron obtenidas desde voluntarios sanos, normolipémicos, normoglicémicos y no fumadores, previo consentimiento informado. Se obtuvo una muestra de sangre en ayuno por punción venosa, con EDTA 1,0 mg/mL como anticoagulante. De cada muestra se separó el plasma por centrifugación a 2.000 x g por 10 min, y se obtuvo un *pool* de plasmas, al cual se agregó Preservante de Alaupovic (ácido ε-aminocaproico 1 M, EDTA 10%, glutation 5%, penicilina 10.000 U/mL, streptomycin 10.000 µg/mL), en relación 1 mL por cada 100 mL de plasma. Las HDL se separaron mediante ultracentrifugaciones secuenciales con ajuste de densidad [62], en ultracentrífuga Sorvall WX con rotor T865. Una primera centrifugación a 146.600 x g, por 24 h a 15°C, permitió separar las VLDL y los quilomicrones. La densidad del infranadante fue ajustada a 1,063 g/L con KBr, según la ecuación:

$$gr\ KBr = \frac{(df - di) \times V}{1 - (df \times 0,315)}$$

Donde *df* y *di* corresponden a densidad final e inicial (g/mL), respectivamente, *V* es el volumen final (mL) de plasma o infranadante

Este infranadante fue centrifugado bajo las mismas condiciones descritas, con lo cual se recuperó el anillo de LDL. La densidad del infranadante fue ajustada a 1,210 g/L con KBr y fue centrifugado 185.600 x g durante 48 h a 15°C, para recolectar el anillo de HDL.

Las HDL fueron dializadas en tampón fosfato salino (PBS) 10 mM a 4°C, para eliminar el KBr. Luego burbujeadas con N₂ y almacenadas a 4°C hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó con el kit Pierce BCA Protein (Thermo Scientific),

utilizando BSA como estándar. Para comprobar la pureza de las HDL, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%, y se comparó con una muestra de plasma y de albúmina humana, principal contaminante de esta técnica.

Las proteínas fueron aisladas mediante delipidación de las HDL, según lo descrito por McConathy y col. [132], con una mezcla fría de cloroformo-metanol (1:1) por 30 min a 4°C, seguida de una centrifugación a 3.300 x g por 20 min a 4°C. Este proceso fue repetido 3 veces. El precipitado proteico fue secado bajo corriente de nitrógeno, resuspendida en tampón Tris-EDTA-salino (Tris 0,1 M, EDTA 27 mM, NaCl 1,54 M, pH 8) y cuantificado como descrito previamente.

El aislamiento de la apoA-I a partir del *pool* de proteínas de las HDL se realizó mediante dos métodos, detallados a continuación:

1. Cromatografía de exclusión en columna Sephadex G-150, utilizando como fase móvil tampón Tris-EDTA-salino-urea (Tris 0,1 M, EDTA 27 mM, NaCl 1,54 M, urea 7 M, pH 8). La detección de las proteínas presentes en los eluatos fue realizada a 280 nm, mientras la composición de las fracciones con densidad óptica mayor a 0,05 fue realizada con un ELISA indirecto, utilizando anticuerpos específicos para apoA-I (1C11B7-biotina, 1/4.000) y albúmina (policlonal, 1/15.000), ambos desarrollados previamente en nuestro laboratorio. Con estos resultados, se formó un *pool* de apoA-I, el cual fue cuantificado con el kit Pierce BCA Protein.

2. Elución desde gel de poliacrilamida SDS-PAGE, según lo descrito por Brace en 2010 [133]. Este método se basa en separar el *pool* de proteínas de las HDL en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%, a 100 mV por 90 min. Luego, se separa el marcador de peso molecular y un carril con muestra, lo cual se tiñe con solución azul de Coomassie. Identificada la banda de apoA-I, ésta se utilizó como patrón para cortar en el gel no teñido la zona correspondiente a la migración de apoA-I, el cual fue incubado en agua nanopure toda la noche a temperatura ambiente, para permitir la elución de la apoA-I desde el gel. Luego, la solución de apoA-I fue dializada en tampón PBS a 4°C, concentrada con polietilenglicol de peso molecular mayor a 20.000, y la concentración de proteínas fue cuantificada con el kit Pierce BCA Protein.

3. Producción de apoA-I humana recombinante

Dadas las grandes cantidades de proteína requerida para los ensayos de miografía de esta tesis, fue necesaria la producción de apoA-I humana recombinante (apoA-I_{hr}), mediante la utilización de herramientas de biología molecular. Para esto se generó un vector adenoviral, siguiendo las recomendaciones del sistema comercial *AdEasyTM-Vector System* (Quantum Biotechnologies, EE.UU.).

3.1.- Generación del vector adenoviral

3.1.1.- Diseño y subclonamiento de la apoA-I_{hr} secretable

Se utilizó la secuencia nucleotídica de apoA-I humana madura, a la cual se le adicionó, en su extremo N-terminal, la secuencia del péptido señal de secreción nativo de la eritropoyetina humana y en el C-terminal, una cola de seis repeticiones de histidina (Tabla II). La síntesis química fue realizada por la empresa GeneArt (Alemania), y el vector fue denominado pUckan-apoA-I. La secuencia de apoA-I fue aislada mediante digestión enzimática con las endonucleasas de restricción *KpnI* y *NotI*, y fue purificada desde gel de agarosa, utilizando el kit *SilicaBead DNA Gel Extraction* (Fermentas). La secuencia de apoA-I se insertó, mediante ligación enzimática con la enzima *T4 ligasa*, en el sitio de multiclonamiento del vector de transferencia pAdTrack-CMV (Quantum Biotechnologies, EE.UU.), obteniéndose el vector de transferencia pAdTrack-apoA-I (Figura 5).

3.1.2.- Expresión de apoA-I_{hr} en el medio de cultivo de células HEK-293A

Células HEK-293A cultivadas en placas de 24 pocillos, fueron transfectadas con el vector pAdTrack-apoA-I, utilizando el polímero catiónico polietilenimida (PEI). Para ello, las células en 80% de confluencia fueron privadas de suero por 4 h y se prepararon 2 soluciones, una con PEI (1,5 µL del reactivo por cada µg de ADN, en medio de cultivo sin suero) y otra conteniendo 1 µg de ADN plasmidial en medio sin suero. Ambas soluciones fueron mezcladas e incubadas a temperatura ambiente por 10 min. La mezcla fue adicionada a los pocillos, incubando por 8 h. El medio de cultivo fue reemplazado por DMEM 10% suero, siendo incubado toda la noche. A continuación, las células fueron depletadas de suero por 48 h. La eficiencia de transfección fue evaluada por microscopia de fluorescencia,

siguiendo la presencia de la proteína fluorescente verde (GFP). El medio de cultivo fue recolectado y almacenado para posteriores ensayos de *western blots* y de funcionalidad, mientras las células fueron lisadas con tampón RIPA (Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, SDS 0,1%, Tritón X-100 1%) suplementado con un *cocktail* de inhibidores de proteasas (Thermo Scientific). Los lisados fueron incubados por 30 min a 4°C en agitación, luego sonicados (3 pulsos de 30 W por 10 seg) y centrifugados a 14.000 x g a 4°C por 10 min. El contenido proteico de los medios de cultivo y de los lisados fue cuantificado por el método de BCA, posteriormente fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

3.1.3.- Confirmación de la expresión de apoA-Ihr por western blots

Los medios de cultivo de células HEK-293A transfectadas con el plásmido pAdTrack-apoA-I fueron mezcladas con tampón de carga Laemmli (Tris-HCL 31,3 mM, SDS 1,5%, azul de bromofenol 0,15%, glicerol 25% y β -mercaptoetanol 5%) y calentados a ebullición por 10 min. 50 μ g de proteínas totales fueron separadas en un gel SDS-PAGE 12%, a 100 V por 90 min, y transferidas a membranas de nitrocelulosa (250 mA por 90 min) en cámara húmeda. El bloqueo fue efectuado con leche descremada 5% en PBS por 1 h, y posteriormente se incubó toda la noche con 3 anticuerpos monoclonales anti-histidina (Penta, Tetra, RGS, Qiagen) en dilución 1/1000. Un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a HRP (dilución 1:3000) fue incubado durante 2 h a temperatura ambiente. El revelado fue realizado con el reactivo quimioluminiscente *Western lightning plus-ECL*" (Perking Elmer). Este mismo procedimiento se realizó con un anticuerpo anti apoA-I (1C11B7, producido en el laboratorio, dilución 1/10.000), a fin de comprobar la presencia de la proteína en los *western blots*.

Tabla 2: Diseño de la secuencia de apoA-I humana recombinante

En azul: secuencia de apoA-I humana madura; en verde: secuencia correspondiente al péptido señal de secreción de la eritropoyetina humana; en rojo: cola de histidina; en negro: sitios de corte para endonucleasas de restricción *KpnI* y *NotI*.

<p>Secuencia nucleotídica de apoA-Ihr</p>	<p>CGCCACCATGGGGGTGCACGAATGTCCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCT GCTGTCGCTCCCTCTGGGCCTCCAGTCCTGGGCGATGAACCCCCCAGAGCC CCTGGGATCGAGTGAAGGACCTGGCCACTGTGTACGTGGATGTGCTCAAAGAC AGCGGCAGAGACTATGTGTCCCAGTTTGAAGGCTCCGCCTGGGAAAACAGCT AAACCTAAAGCTCCTTGACAACCTGGGACAGCGTGACCTCCACCTTCAGCAAGC TGCGCGAACAGCTCGGCCCTGTGACCCAGGAGTTCTGGGATAACCTGGAAAAG GAGACAGAGGGCCTGAGGCAGGAGATGAGCAAGGATCTGGAGGAGGTGAAG GCCAAGGTGCAGCCCTACCTGGGACGACTTCCAGAAGAAGTGGCAGGAGGAGA TGGAGCTCTACCGCCAGAAGGTGGAGCCGCTGCGCGCAGAGCTCCAAGAGGG CGCGCGCCAGAAGCTGCACGAGCTGCAAGAGAAGCTGAGCCACTGGGCGAG GAGATGCGCGACCGCGCGCGCCCATGTGGACGCGCTGCGCACGCATCTGGC CCCCTACAGCGACGAGCTGCGCCAGCGCTTGGCCGCGCGCCTTGAGGCTCTCA AGGAGAACGGCGGCCAGACTGGCCGAGTACCACGCCAAGGCCACCGAGCA TCTGAGCACGCTCAGCGAGAAGGCCAAGCCCGCGCTCGAGGACCTCCGCCAA GGCCTGCTGCCCGTGGTGGAGAGCTTCAAGGTCAGCTTCTGAGCGCTCTCGA GGAGTACACTAAGAAGCTCAACACCCAGCATCATCACCATCACCATTGAGC Tamaño aprox: 843 bp</p>
<p>Secuencia aminoacídica de apoA-Ihr</p>	<p>MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGMKAAVLTAVLFLTGSQARHFWQQD EPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQFEGSALGKQLNLKLLDNWDSVTS TFSKLREQLGPVTQEFWDNLEKETEGLRQEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQ EEMELYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEMRDRARAHVDALRTHL APYSDELRQRLAARLEALKENGGARLAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQGL LPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQHHHHHH Tamaño de la proteína: 28 kDa MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLG</p>

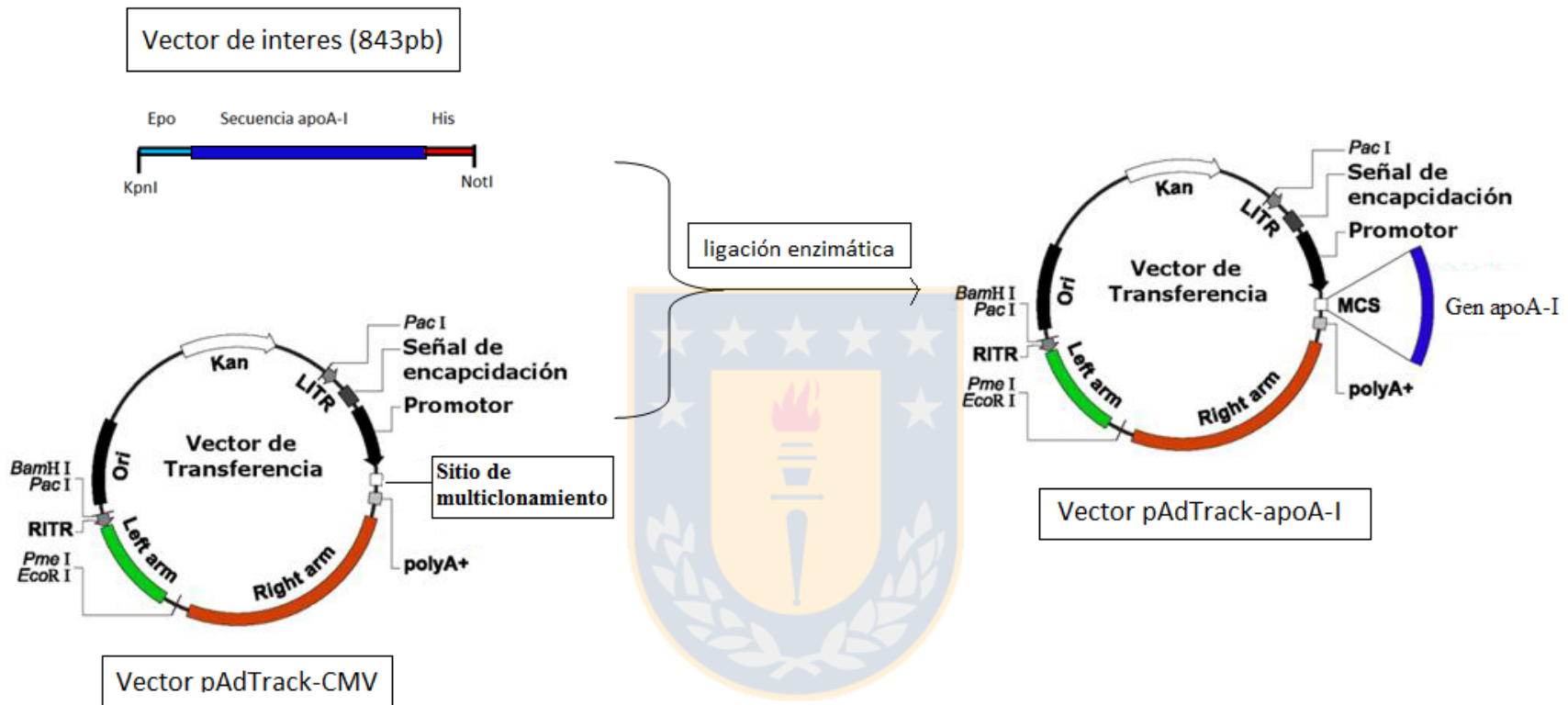


Figura 5: Representación esquemática del proceso de formación del vector de transferencia pAdTrack-apoA-I.

El vector de interés contiene la secuencia de la proteína madura de apoA-I, el péptido señal de secreción de la eritropoyetina humana y una repetición de 6 histidinas. El vector se sub-clonó en el sitio de multiclonamiento en el vector pAdTrack-CMV, previamente digerido con las endonucleasas *KpnI* y *NotI*, obteniendo el vector de transferencia, pAdTrack-apoA-I.

3.1.4.- Ensayo funcional de los medios de cultivo de células HEK-293A

Para confirmar que la apoA-Ihr producida por las células HEK-293A era funcional, se realizó un ensayo de proliferación, mediante la técnica de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), en células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC). Las HUVEC fueron obtenidas desde vena umbilical, según el método descrito por Jaffe y col. [134], desde partos fisiológicos y cesáreas recientes (menos de 8 h), de mujeres gestantes y neonatos sanos, sin patología ni tratamiento farmacológico. Este procedimiento fue realizado en el Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Regional de Concepción. Todas las donantes que aceptaron participar del estudio firmaron un consentimiento informado, el cual fue previamente revisado y aprobado por el Comité Ético Científico del Hospital Regional de Concepción.

El material biológico fue transportado en PBS 10 mM pH 7,4 hasta el Depto. de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia. La vena umbilical fue canulada, lavada con PBS 10 mM pH 7,4 y tratada con colagenasa (0,04% en medio M-199) durante 10 min a 37°C. El medio fue recuperado, centrifugado por 10 min a 350 x g, y el *pellet* fue resuspendido en 5 mL de medio M-199 suplementado con EGM-2 Singlequot kit (Lonza). El recuento celular y la viabilidad fueron confirmados por observación al microscopio óptico, utilizando Azul de Tripán.

10.000 células HUVEC fueron distribuidas en una placa de 96 pocillos y cultivadas por 24 h en medio M-199 suplementado con EGM-2. Luego, se adicionó las siguientes condiciones: apoA-I aislada desde plasma humano, el medio de cultivo de las células HEK-293A transfectadas con pAdTrack-apoA-I, ambas a 50 µg/mL, o el medio de cultivo de células no transfectadas. Estas condiciones fueron incubadas por 24 h, y la proliferación fue cuantificada con el reactivo *Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit* (Life Technologies), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La absorbancia fue determinada a 540 nm en el lector multi-modal Biotek Synergy 2.

3.1.5.- Generación del vector recombinante

El vector de transferencia recombinante pAdTrack-apoA-I fue digerido con la endonucleasa *PmeI* y se co-electroporó con el plasmidio pAd-EASY (Quantum Biotechnologies, EE.UU), en una proporción de 1 µg:100 ng, en la cepa *E. coli BJ5183* (*endA**sb**CB**CrecBCgalKmet thi-1 bioThsdr* [Str^r]). Las bacterias transformadas fueron cultivadas en placas con kanamicina, lo que permitió seleccionar las colonias transformadas, las cuales fueron expandidas, para realizar la extracción del vector recombinante con el kit *plasmidmidi* (QIAGEN). La confirmación de la recombinación homóloga fue realizada por análisis de restricción con la endonucleasa *PacI*. Posteriormente, el vector recombinante fue transformado en la cepa de *E. coli Top 10* (F' [*lacIqTetr*] *mcrA*Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ* ΔM15 Δ*lacX74 deoRrecA1 araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galUgalK**rpsL**endA1 nupG*) para su amplificación y purificación, mediante el kit *Nucleo<BondXtra Maxi* (MACHEREY-NAGEL).

3.1.6.- Generación de viriones adenovirales

El ADN adenoviral recombinante (10 µg) fue linealizado con la endonucleasa *PacI* y separado en gel de agarosa 1%. Desde el gel, la banda de interés fue aislada, para ser transfectada en las células HEK-293A, cultivadas a 70% de confluencia, en placas de 100 cm². Este procedimiento fue realizado utilizando el reactivo Lipofectamina “*SatisFection Transfection Reagent*” (Agilent Technologies) (Figura 6).

Para la transfección, 10 µg del genoma viral fueron transferidos a un tubo de 1,5 mL conteniendo 195 µL de medio DMEM. En otro tubo se adicionó 30 µL de reactivo Lipofectamina y se completó a un volumen de 200 µL con medio DMEM sin suero. El contenido de ambos tubos fue mezclado por pipeteo suave y se incubó a 25°C por 20 min. En este período, las células fueron lavadas con PBS 10 mM pH 7,4 e incubadas con DMEM suero bovino fetal (SFB) 10%, para luego agregar el total de la mezcla de transfección. La eficiencia de la transfección fue evaluada cualitativamente 24 h post-tratamiento, mediante observación del color verde de GFP por microscopía de fluorescencia. Los halos de lisis fueron observados luego de 10 días, tiempo en el cual se procedió a extraer las partículas virales desde el cultivo. Para esto, las células HEK-293A fueron recuperadas y centrifugadas a 520 x g durante 5 min. El *pellet* fue resuspendido en medio DMEM sin suero

y las células (que contenían los viriones) fueron lisadas mediante tres pasos sucesivos de congelación-descongelación, de -80°C a temperatura ambiente, seguido de agitación vigorosa. La muestra fue centrifugada a $520 \times g$ por 10 min y el sobrenadante fue almacenado a -80°C .

3.2.- Producción masiva de apoA-I humana recombinante

La producción de apoA-Ihr fue realizada en células SiHa. Primeramente, se seleccionó la multiplicidad de infección (MOI) adenoviral adecuada, para lo cual las SiHa fueron cultivadas a una densidad de 1×10^5 células por pocillo, en placas de 24 pocillos, con medio DMEM 5% SFB. Pasadas 24 h, se agregó distintas cantidades de partículas virales por célula (5-150), y se incubó por 48 h. Los medios de cultivo fueron colectados y analizados por *western blot* para detectar la presencia de apoA-Ihr, como se detalló anteriormente. El MOI se determinó como la cantidad de partículas virales con la cual se obtuvo mayor expresión de apoA-Ihr, sin que el cultivo presentara efecto citopático severo, determinado por microscopía.

Posteriormente, células SiHa fueron cultivadas con DMEM 5% SFB por 24 h, en placas de 100 mm^2 , hasta alcanzar 80% de confluencia (alrededor de 6×10^8 células por placa). El cultivo fue transducido con el adenovirus, con la MOI antes determinada. Transcurridas 12 h, el medio fue reemplazado por DMEM sin suero, y se mantuvo en esta condición por 48 h. El medio de cultivo fue recuperado, centrifugado a $370 \times g$ durante 10 min, alicuotado y almacenado a -20°C con inhibidor de proteasas. Estos medios fueron analizados por *western blot* para confirmar la expresión de apoA-Ihr por las células SiHa.

La apoA-Ihr fue aislada desde el medio de cultivo de las células SiHa, mediante 2 metodologías, como se describe a continuación:

3.2.1.- Cromatografía de afinidad

Esta técnica fue realizada en una columna de *Sepharose* activada con bromuro de cianógeno (4B-BrCN, Sigma), a la cual se unió covalentemente el anticuerpo 1C11B7 desarrollado en el laboratorio, el cual reconoce apoA-I humana. Para ello, la *Sepharose* activada fue hidratada en reposo con HCl 1 M durante 15 min, luego el ácido fue eliminado y la resina fue lavada con tampón acoplante (NaHCO_3 0,1 M, NaCl 0,5 M pH 8,3). Los grupos activos

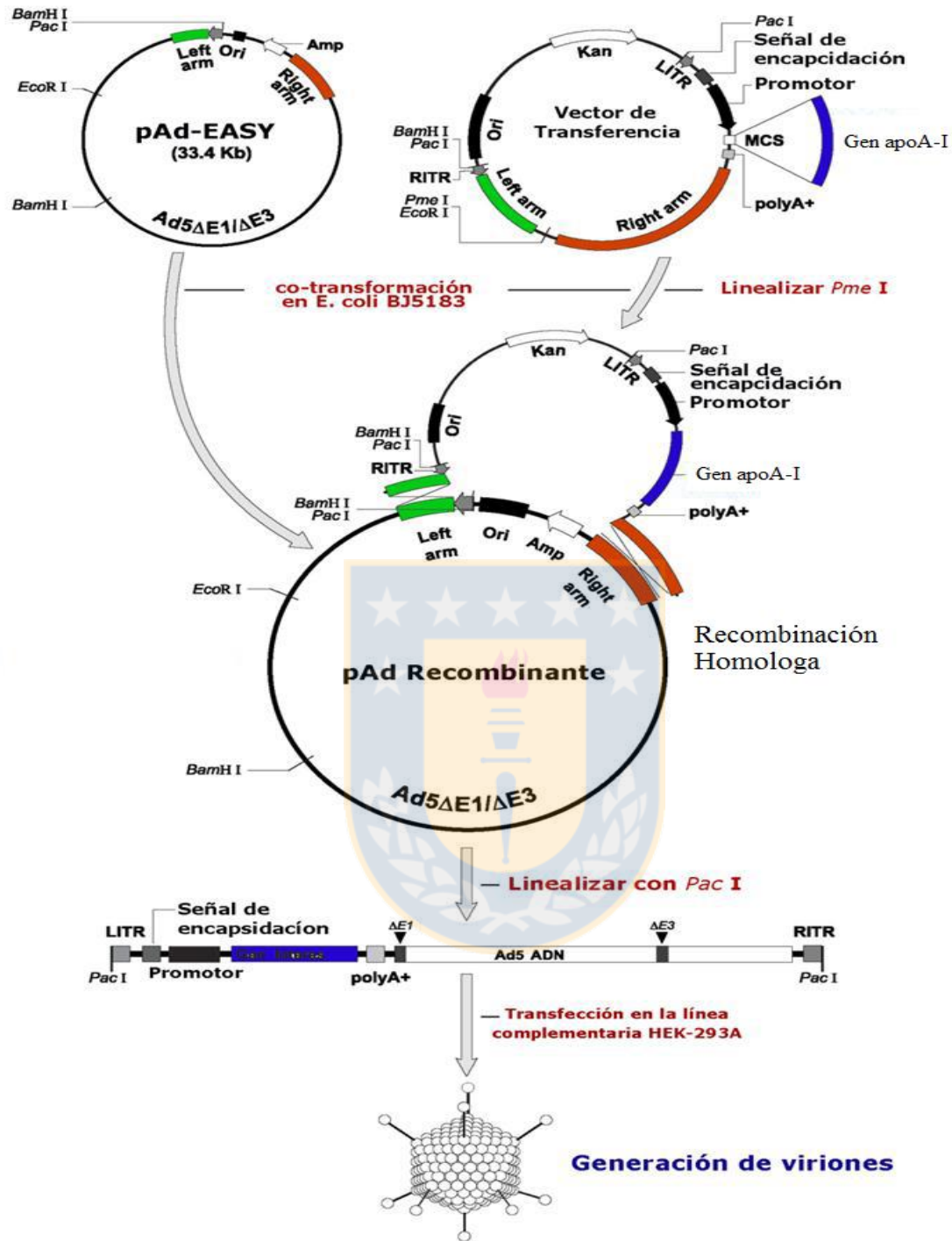


Figura 6: Representación esquemática de la formación del adenovirus de apoA-Ihr

El vector recombinante para apoA-Ihr fue generado por la recombinación homóloga entre el vector de transferencia pAdTrack-apoA-I y el genoma viral el vector pAd-Easy en células *E. coli* BJ5183. La producción de los viriones adenovirales fue realizada en células HEK-293A.

remanentes fueron bloqueados con glicina 0,2 M pH 8, y luego la *Sepharose* fue lavada en forma alternante con tampón acetato (acetato de sodio 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 4) y tampón acoplante. La resina fue dispuesta en una columna de 2 mL. La capacidad de unión fue confirmada con apoA-I humana plasmática de concentración conocida.

3.2.2.- *Elución desde gel de poliacrilamida SDS-PAGE*

La purificación de apoA-Ihr desde gel fue realizada como se describió previamente para apoA-I aislada desde el *pool* de proteínas de HDL. La concentración de apoA-Ihr fue estimada desde *western blots*, comparando la señal con la correspondiente a apoA-I plasmática.

3.3.- **Ensayos de funcionalidad de la apoA-I humana recombinante**

Para verificar la actividad biológica de apoA-Ihr, se realizaron los ensayos funcionales que se detallan a continuación. Todos estos protocolos utilizaron células HUVEC, las cuales fueron obtenidas desde vena umbilical, según lo descrito anteriormente, cumpliendo los requerimientos establecidos por el Comité Ético Científico del Hospital Regional de Concepción.

3.3.1.- *Biodisponibilidad de NO*

Estos análisis fueron realizados con la sonda 4 amino-5 metilamino-2'-7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM-DA, Calbiochem), según lo descrito previamente [95]. Para estos ensayos, 10.000 células fueron distribuidas en cada pocillo, en placas de 96 pocillos, y se incubaron por 48 h con medio M-199 suplementado con EGM-2. Los cultivos fueron incubados durante 4 h en PBS 10 mM pH 7,4, y luego por 45 min con la sonda DAF-FM-DA 5 μ M diluida en PBS 10 mM, suplementado con L-arginina 100 μ M. Al final de esta incubación, se agregó apoA-I obtenida desde plasma o apoA-Ihr, 100 μ g/mL. La fluorescencia fue detectada luego de 30 min en un fluorímetro Sinergy 2 (Biotek), utilizando longitudes de onda de excitación y emisión 495 / 515 nm. Las células fueron lisadas con

KOH 0,5 N (4°C, 30 min), para cuantificar proteínas totales, mediante el método *Pierce BCA Protein Assay Kit*.

3.3.2.- Actividad de la eNOS en células HUVECs

Esta metodología se basó en la formación de L-citrulina a partir de L-arginina, producto de la actividad de la eNOS, según lo descrito previamente [95]. Las células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos, a una densidad de 50.000 células por pocillo, por 48 h en medio completo, y luego por 4 h en medio M-199 2% suero. A cada pocillo se adicionó un mezcla de L-[³H]-arginina 4 µCi/mL (5 µM) y L-arginina no marcada 100 µM, que contenía además apoA-I o apoA-Ihr, 100 µg/mL, todo lo cual fue incubado por 30 min. Las células fueron lisadas con KOH 0,5 N (30 min a 4°C), y de cada lisado se utilizó 25 µL para cuantificar proteínas totales (*Pierce BCA Protein Assay Kit*), mientras el lisado restante fue digerido con 100 µL de ácido fórmico 95% (60 min, 4°C). Las muestras fueron separadas por una cromatografía de intercambio catiónico Dowex 50W (50X8-200), utilizando agua como fase móvil. La radiactividad de la fracción no retenida (L-[³H]citrulina) fue determinada en una mezcla de 90 µL de lisado con 2,7 mL de líquido de centelleo Ecoscint GL (National Diagnostic), en un contador de centelleo (Depto. de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción).

3.3.3.- Ensayos de miografía en venas placentarias y venas umbilicales.

Esta metodología se describe en el punto C

B. Análisis histológico

La expresión de ecto-F₁-ATPasa fue confirmada en vena umbilical y vena placentaria humana, mediante inmunohistología, según protocolos clásicos de marcaje [135]. El material biológico fue obtenido tal como se detalla en la sección A3.1.4. Ambas venas fueron seccionadas y fijadas en paraformaldehído 4% por 4 h. Los cortes fueron colocados en un molde rectangular en parafina fundida a 60°C, dejando enfriar por 24 h. Se realizaron cortes del taco de parafina de 4 µm de grosor, en un micrótopo SLEE Rotary Microtome CUT 5062, disponible en el Depto. de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas,

Universidad de Concepción. Los portaobjetos fueron previamente tratados con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) para luego depositar los cortes en baño de agua a 50°C, y se dejaron secar a 37°C. El proceso de desparafinización e hidratación de los cortes fue realizado siguiendo las siguientes incubaciones: xilol por 10 min (3 veces), etanol 100% por 5 min, etanol 95% por 5 min (2 veces), etanol 70% por 5 min, etanol 50% por 5 min y finalmente agua destilada.

El bloqueo de la peroxidasa endógena fue realizado por incubación con peróxido de hidrógeno 10% en metanol, durante 15 min. La recuperación del tejido y el desenmascaramiento antigénico fueron efectuados con EDTA 10% a 96°C por 40 min. Los cortes fueron enfriados a temperatura ambiente y en oscuridad, y se realizaron 3 lavados por 5 min con PBS 10 mM pH 7.4 a temperatura ambiente. Luego, se procedió a bloquear con suero normal de caballo (NHS) 5%, y a incubar con un anticuerpo anti CD31 (1:50, BD Pharmingen) ó con un anticuerpo anti la subunidad β de la ATP sintasa (1:50, Invitrogen) durante 20 h en cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego de lavados, los cortes fueron incubados con un anticuerpo anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa (1:50, Sigma), por 2 a 3 h en cámara húmeda y oscuridad, a temperatura ambiente. Finalmente, los cortes fueron incubados con solución de sustrato DAB (dimetil amino bencidina) fresca, durante 15 min en oscuridad. Luego de lavados con agua, las muestras fueron teñidas con hematoxilina de Harris, seguido de lavados con agua corriente para retirar el exceso de colorante.

Para la deshidratación, los cortes fueron lavados rápida y consecutivamente con alcohol 70°C, alcohol 96% (3 veces), y luego con lavados de 5 min con alcohol 96%, alcohol 100% (2 veces), de 10 min con xilol, 7 min con carbolixol y 10 min con xilol (2 veces). Posteriormente, los cortes fueron secados y montados con medio de montaje Entellan (Dako Citomation), para ser observados en un microscopio óptico Microdisector Laser Leica LMD7000, en el Centro de Microscopía Avanzada de la Universidad de Concepción.

C. Medición de la tensión de anillos de vena coriónica y de vena umbilical humana

Se realizó la medición de la tensión de anillos de vena coriónica humana y de cordón umbilical [128,130]. Tanto las placentas como los cordones umbilicales fueron obtenidos desde el Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Regional Guillermo Grant Benavente, como se describió anteriormente, y el material biológico fue trasladado al

Laboratorio de Fisiología Vascular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

En el caso de la placenta, se escogió una vena secundaria de un largo tal que permitiera seccionarla en anillos pequeños de 5 mm cada uno. Para el cordón umbilical, la vena fue aislada y seccionada de forma similar a la vena coriónica. Los anillos venosos fueron colocados en los alambres conductores de los diferentes canales del miógrafo 610M Multiwire Myograph System (Danish MyoTechnology A/S, Denmark), los cuales se encontraban sumergidos en solución Krebs-vaso sanguíneo (KCl 4,6 mM) a 37°C, con bombeo constante de O₂ 95% y CO₂ 5%. Cada anillo fue ajustado manualmente a una tensión de 1 g, permitiendo su estabilización por 1 h. Luego, solución Krebs-potasio (KCl 124 mM) fue adicionada para confirmar la reactividad de cada anillo, generando máxima contracción. Cada canal fue lavado 4 a 5 veces con solución Krebs-vaso sanguíneo, hasta retornar a los niveles basales de tensión. U46619 100 nM, un análogo de tromboxano A₂ que induce la vasoconstricción, fue adicionado a cada vaso, y luego de aproximadamente 15 min, se agregaron diferentes concentraciones de apoA-I (25-100 µg/mL). La mínima concentración de apoA-I a la cual se observó vasodilatación, fue utilizada para evaluar la participación de receptores de apoA-I, mediante la incubación con los siguientes inhibidores: IF₁ y oligomicina A para la ecto-F₁-ATPasa, glibenclamida para ABCA1 y BLT-1 para SR-BI (Sigma). La participación de la actividad de la eNOS fue evaluada mediante las siguientes aproximaciones: 1) el uso de *N*-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, Sigma), inhibidor de la eNOS, y 2) mediante la denudación mecánica del endotelio del vaso sanguíneo. La adición de los inhibidores fue realizada 45 min antes del estímulo con apoA-I.

La implicancia de ADP, como producto de la actividad de la ecto-F₁-ATPasa, fue evaluada en los ensayos de miografías. Para ello, ADP y un análogo no hidrolizable adenosina 5'-β-tio-difosfato (ADPβS, Sigma) fueron adicionados a distintas concentraciones, siguiendo el mismo protocolo descrito para los análisis con apoA-I.

D. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el *software* GraphPADPrism (San Diego CA, USA). Los resultados de reactividad de los vasos aislados se ajustaron a curvas de dosis-respuesta.

La comparación de las curvas y las respuestas máximas bajo diferentes condiciones fueron analizadas por el test Mann Whitney. Los resultados fueron expresados como los promedios \pm error estándar, donde n indica el número de experimentos diferentes. Se considera un valor de $p < 0,05$ para designar diferencias estadísticamente significativas.



RESULTADOS

A. Obtención y purificación de apoA-I humana plasmática

La obtención de las HDL fue realizada desde plasma humano por el método de ultracentrifugación con ajuste de densidad, con el cual se obtiene un anillo enriquecido en HDL. Para confirmar la pureza de las HDL, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%, bajo condiciones denaturantes. Como controles se utilizó albúmina humana, principal contaminante de las HDL en este método de aislamiento, y apoA-I y apoA-II aisladas anteriormente. La figura 7 muestra una imagen representativa de los aislamientos de HDL realizados durante esta tesis. Se observa que las HDL presentan una gran banda cercana a los 25 kDa, correspondiente a apoA-I (28 kDa), además de otras bandas minoritarias, que evidencian otras proteínas presentes en estas lipoproteínas. Este método permitió aislar HDL con un alto grado de pureza, como se comprueba por la baja presencia de albúmina y de apoA-II, con respecto a la señal otorgada por apoA-I.

Posteriormente, las proteínas contenidas en las HDL fueron aisladas mediante delipidación con una mezcla fría de cloroformo-metanol. La separación de la apoA-I desde el *pool* de proteínas de las HDL fue realizada por 2 métodos: cromatografía de exclusión y purificación desde gel.

1.- Obtención de apoA-I plasmática, mediante cromatografía de exclusión

Utilizando como fase estacionaria Sephadex G-150 y como fase móvil tampón Tris-EDTA-salino-urea 7M, fue posible separar alrededor de 12-15 mg de proteína total de las HDL. La figura 8 muestra un cromatograma representativo de la separación por este método, en el cual se observa un gran *peak* con un hombro hacia la izquierda, que sugiere la presencia de dos proteínas mayoritarias o bien una única proteína a la forma de homo-oligómeros. Las fracciones 80 a la 230, correspondientes a la mayor densidad óptica a 280 nm, fueron analizadas por ELISA indirecto, para detectar la presencia relativa de apoA-I y albúmina. Estos análisis revelan que la gran mayoría de las proteínas de cada fracción corresponde a apoA-I, siendo despreciable la señal de albúmina. Estos resultados permiten postular que la forma del *peak* observado a 280 nm correspondería a apoA-I presente en al menos dos

estados, por ejemplo como monómero y dímero, cada uno de ellos con distinto tiempo de retención en la columna de exclusión.

Con los resultados obtenidos, fue posible formar dos *pools* de apoA-I, uno constituido por las fracciones 90 a 130 y otro con las fracciones 131 a 160. El análisis de la pureza de estos *pools*, mediante electroforesis en gel SDS-PAGE 10% (Figura 9), muestra una banda mayoritaria a los 25 kDa, correspondiente a apoA-I (28 kDa), no detectándose albúmina humana (63 kDa), ni apoA-II (17kDa). En esta figura no se observa la aparición de posibles oligómeros de apoA-I, esto podría deberse a que éstos se encuentran en menor concentración y no serían visibles con la tinción de azul de coomasie, o bien que el método de denaturación realizado para la electroforesis es más eficiente para separar los oligómeros de la apoA-I, que la fase móvil de la cromatografía de exclusión.



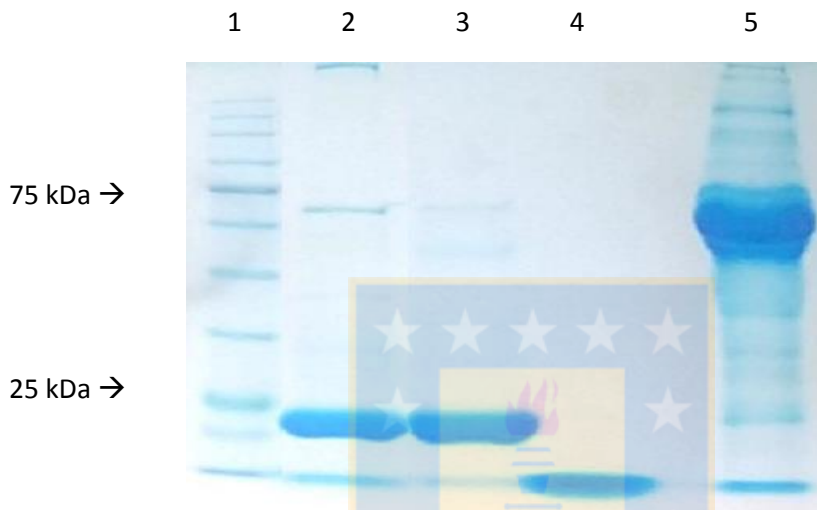


Figura 7: Verificación de la pureza de HDL, mediante electroforesis SDS-PAGE

La figura muestra un resultado representativo de la confirmación de la pureza de las HDL aisladas desde plasma, mediante el método de ultracentrifugación con ajuste de densidad. Carril 1: patrón de peso molecular, carril 2: muestra de HDL (50 μ g de proteína), carril 3: control apoA-I, carril 4: control A-II y carril 5: control albúmina humana.

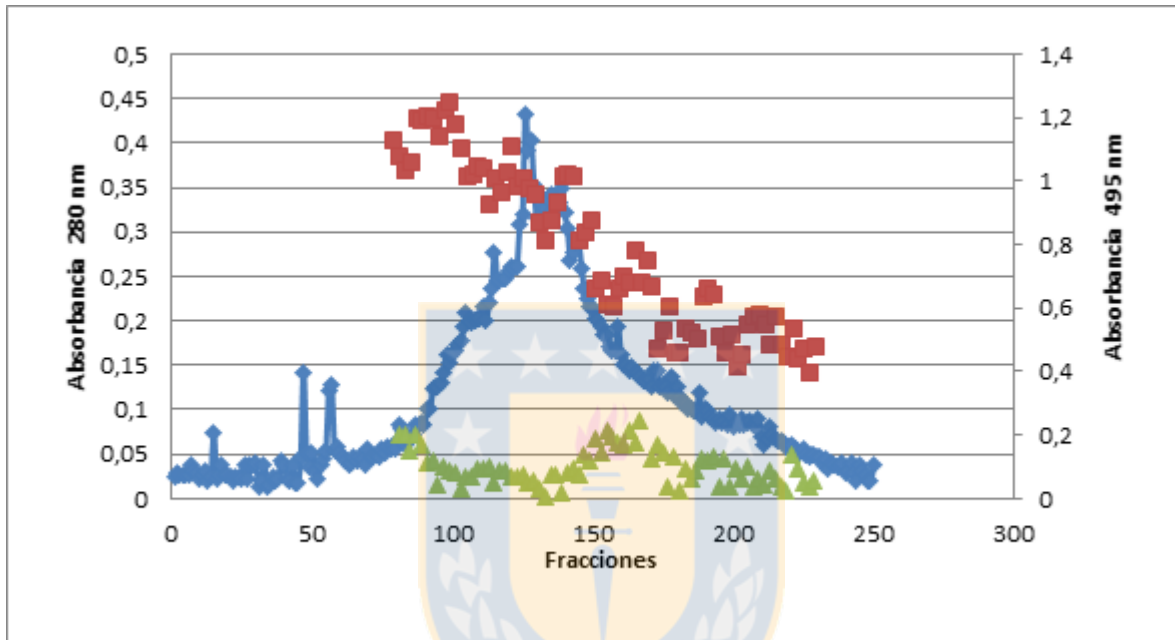


Figura 8: Cromatograma de la separación de proteínas de las HDL

Se presenta un resultado representativo de las separaciones de apolipoproteínas de HDL. Los eluatos fueron medidos a 280 nm para la detección de proteínas totales (azul). Las fracciones con mayor densidad óptica fueron analizadas por ELISA indirecto (495 nm), utilizando un anticuerpo anti apoA-I (1C11B7, rojo) acoplado a biotina y un anticuerpo anti albúmina (verde), ambos desarrollados previamente en el laboratorio.

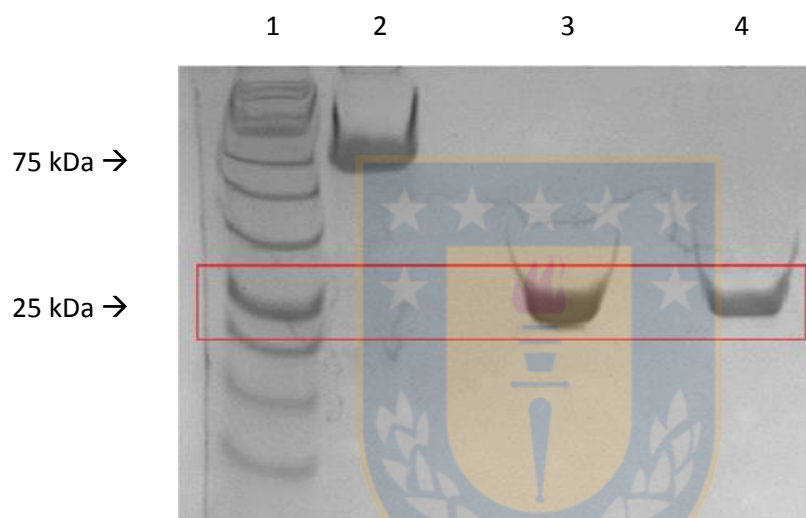


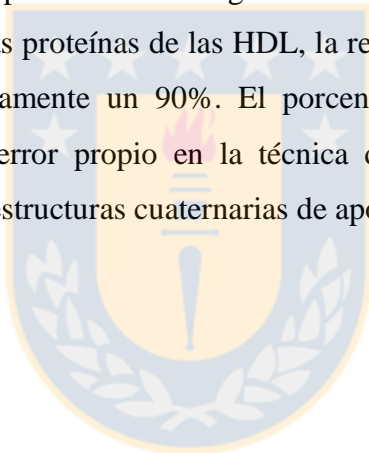
Figura 9: Análisis de la pureza de los *pools* de apoA-I aislada desde HDL

Se presenta una figura representativa de los análisis de pureza de los *pools* de apoA-I señalada en el recuadro rojo. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: albúmina humana, carril 3: *pool* concentrado apoA-I, carril 4: *pool* diluido de apoA-I. Cada carril contiene 50 µg de proteína total.

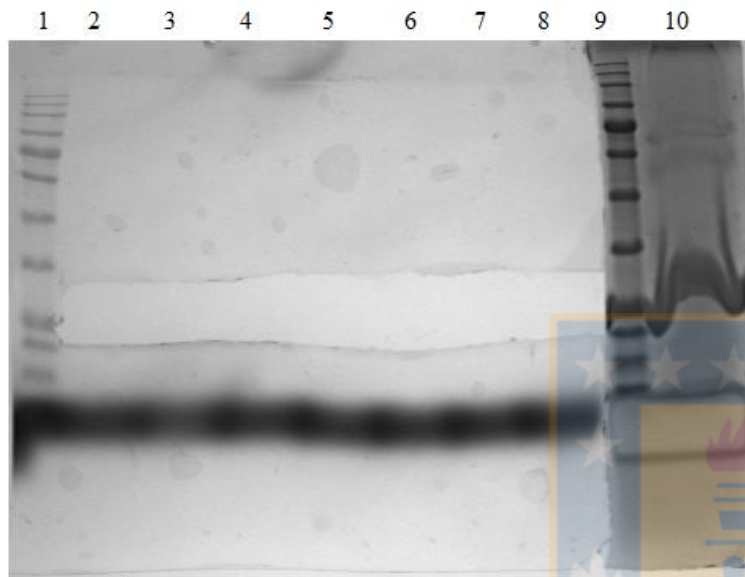
2.- Obtención de apoA-I plasmática, por aislamiento desde gel

Durante el desarrollo de esta tesis, hubo distintos inconvenientes con la técnica de cromatografía de exclusión. Una opción fue la separación de apoA-I desde gel de poliacrilamida, según lo descrito por Brace en 2010 [133]. Según esta técnica, la apoA-I recuperada es funcional, a pesar de las condiciones denaturantes de separación electroforética.

Para este propósito, 50 μg de proteína total del *pool* de proteínas de las HDL fueron sembrados en cada carril de un gel SDS-PAGE 12%. Una vez realizada la electroforesis, el gel fue cortado verticalmente, dejando un carril de apoA-I y el marcador de peso para ser teñidos con Azul de Coomasie. Este fragmento de gel fue utilizado como patrón de para cortar el resto del gel en la zona de migración de apoA-I. Como se muestra en la Figura 10, apoA-I fue completamente recuperada desde el gel. Considerando que apoA-I constituye alrededor del 80% del total de las proteínas de las HDL, la recuperación de apoA-I mediante este método fue de aproximadamente un 90%. El porcentaje restante de apoA-I puede corresponder a diferencia por error propio en la técnica de cuantificación o a distintas migraciones electroforéticas de estructuras cuaternarias de apoA-I



A.



B.

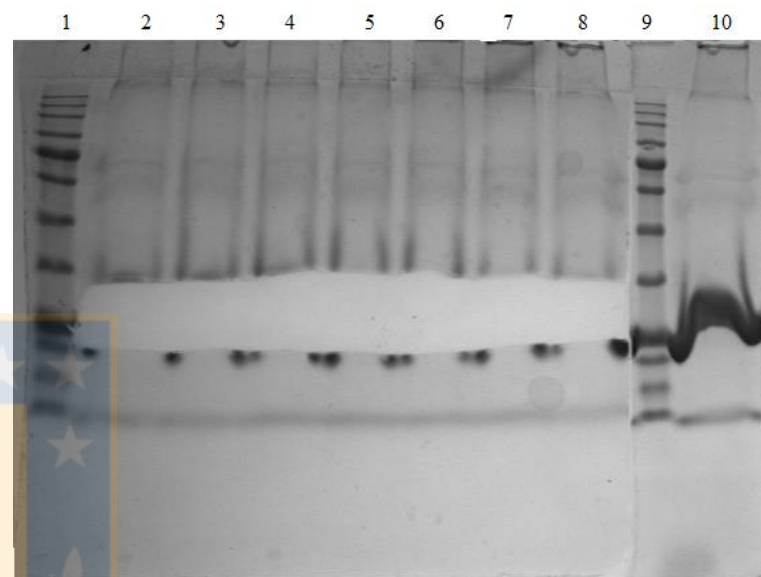


Figura 10: Purificación de apoA-I desde gel de poliacrilamida

50 μ g de proteína total de HDL delipidada (carriles 2-8 y 10) fueron separados en un gel SDS-PAGE 12%. Utilizando como patrón los carriles 9 y 10 teñidos con Azul de Coomasie, el gel fue cortado horizontalmente para recuperar la banda de apoA-I. Se muestran los resultados antes (A) y después de teñir el gel (B).

B. Producción de apoA-I humana recombinante

1.- Generación del vector adenoviral

1.1.- Diseño y subclonamiento del vector pAdTrack-apoA-I

Para la generación del vector de transferencia pAdTrack-apoA-I, la secuencia de apoA-I humana fue extraída desde el vector pUckan-apoA-I, mediante digestión enzimática con las endonucleasas *KpnI* y *NotI*. Este corte generó un fragmento de 3300 pb aproximadamente y el fragmento de interés que contiene la información de apoA-I de 840 pb. La banda de apoA-I fue aislada desde el gel e insertada, mediante ligación con *T₄ DNA ligasa*, en la región de multiclonamiento del vector pAdTrack-CMV, el cual había sido previamente linealizado con las enzimas *KpnI* y *NotI*. Este protocolo originó el vector de transferencia pAdTrack-apoA-I, de aproximadamente 10200 pb, como se explica en la figura 5. La correcta inserción de apoA-I fue confirmada mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (figura 11), donde se observa que la digestión del vector pAdTrack-apoA-I con *KpnI* y *NotI* libera un inserto del tamaño esperado (840 pb), no así el control pAdTrack-CMV digerido con las mismas enzimas.

1.2.- Expresión de apoA-Ihr en el medio de cultivo de células HEK-293A

Para confirmar que el vector de transferencia pAdTrack-apoA-I es capaz de producir apoA-I, células HEK-293A fueron transfectadas con el plásmido. La incorporación en las células fue seguida mediante fluorescencia, por la síntesis de GFP (Figura 12). Las células con intenso marcaje verde corresponden a células que co-expresan GFP y apoA-I, puesto que ambas proteínas se encuentran reguladas por el mismo promotor. Pasado 48 h de transfección, los medios de cultivo y los lisados celulares fueron analizados por *western blot* para verificar la presencia de apoA-I. Como se muestra en la figura 12, la detección con los anticuerpos anti histidina no generaron señal en los medios de cultivo de células transfectadas, mientras el anticuerpo anti apoA-I (1C11B7) demuestra la presencia de esta proteína en estas muestras y en los lisados de células transfectadas. Estos resultados sugieren que la formación del vector de transferencia se realizó sin inconvenientes y es capaz de producir apoA-I en el cultivo celular. Sin embargo, estos hallazgos ponen en evidencia un defecto en la detección de la cola de histidina.

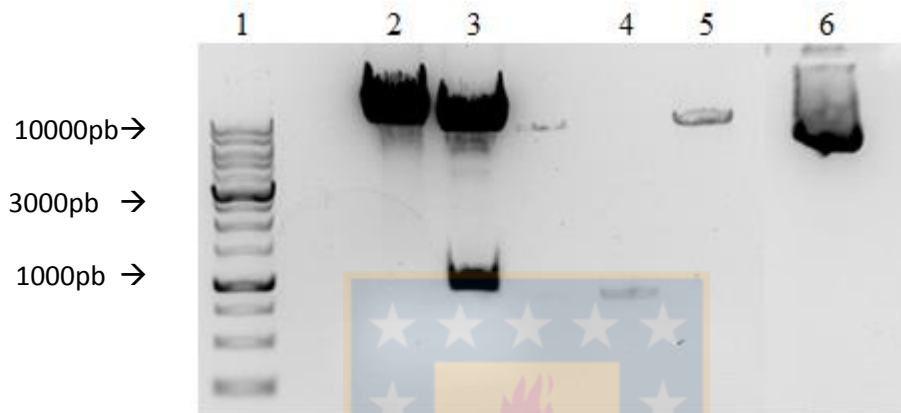
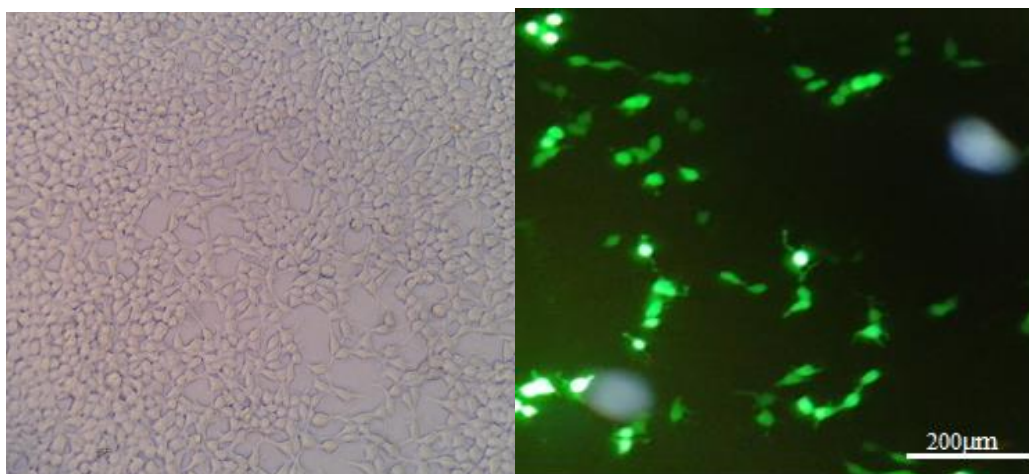


Figura 11: Generación del vector de transferencia pAdTrack-apoA-I

Confirmación del subclonamiento, mediante análisis de restricción con las endonucleasas *KpnI* y *NotI*. Carril 1: marcador de pares de bases, carril 2: pAdTrack-apoA-I linealizado con *KpnI*, carril 3: pAdTrack-apoA-I digerida con *KpnI* y *NotI*, carril 4: control secuencia apoA-Ihr, carril 5: control pAdTrack-CMV digerido con *KpnI* y *NotI*, carril 6: control pAdTrack-apoA-I sin cortar.

A.



B.



C.



Figura 12: Expresión de apoA-Ihr en medio de cultivo de células HEK-293A

A: panel de la izquierda se observa las células HEK-293A en microscopio óptico. Panel de la derecha la transfección de células HEK-293A con el plásmido pAdTrack-apoA-I. Se observa el marcaje verde de la proteína trazadora GFP (aumento 10x) B: Análisis de *western blot* para los medios de cultivos de HEK-293A transfectadas con pAdTrack-apoA-I, analizados con distintos anticuerpos anti histidina. Carril 1: anticuerpo Penta, 2: anticuerpo Tetra, carril 3: anticuerpo RGS, carril 4: anticuerpo anti apoA-I total (1C11B7). C: Análisis de *western blot* para apoA-Ihr, utilizando el anticuerpo anti apoA-I 1C11B7. Carril 1: apoA-I obtenida desde plasma humano, carril 2: medio de cultivo de HEK-293A transfectadas, carril 3: medio de cultivo de HEK-293A no transfectadas, carril 4: lisado celular de HEK-293A transfectadas.

1.3.- Ensayo funcional con los medios de cultivo

ApoA-I plasmática aumenta el número de células metabólicamente activas, como ha sido demostrado previamente [103,136]. Para verificar que la apoA-Ihr es capaz de generar efectos biológicos, se realizó un ensayo de proliferación celular con los medios de cultivo de HEK-293A transfectadas, la cual fue comparada con apoA-I aislada desde plasma. Los resultados muestran un aumento de un 32 y un 38% ($p < 0,05$) en la proliferación de células HUVEC al ser expuestas a los medios de cultivo de células transfectadas y a apoA-I plasmática, respectivamente, al compararlos con la condición basal (sin estímulo). Al analizar los resultados con ambos estímulos, no se observan diferencias significativas (Figura 13). Por otro lado, y de manera interesante, células HUVEC incubadas con el medio de cultivo de HEK-293A no transfectadas muestran un efecto diferente, con una disminución de la proliferación celular que alcanza significancia estadística con respecto a la condición basal.

1.4.- Generación del vector adenoviral recombinante

Confirmada la presencia y la actividad biológica de apoA-Ihr en los medios de cultivo de células HEK-293A, se procedió a realizar la recombinación homóloga, entre el vector de transferencia pAdTrack-apoA-I y el vector adenoviral pAdEasy, en la cepa de *E. coli* BJ5183 (Figura 6). Esta etapa genera el vector recombinante, el cual contiene la unidad transcripcional para apoA-I y la proteína trazadora GFP, ambas aportadas por pAdTrack-apoA-I, y el vector adenoviral pAdEasy, adenovirus humano serotipo 5; sin embargo, carece de las regiones E1 y E3 necesarias para la producción de las proteínas de la cápside de los viriones infectivos.

Para la confirmación de la correcta recombinación, el vector pAdEasy-apoA-I fue digerido con la endonucleasa *PacI*, lo que generó dos bandas de ADN, una por sobre los 10.000 pb (alrededor de 30 kpb, correspondiente a pAdEasy linealizado) y otra de 3.000 pb generada por 2 sitios de restricción para *PacI* en el vector pAdTrack-apoA-I (ver figura 6). Los resultados muestran 3 colonias positivas para el vector recombinante (C1, C2 y C3, Figura 14). De ellas, la colonia C2 fue utilizada para generar el adenovirus recombinante.

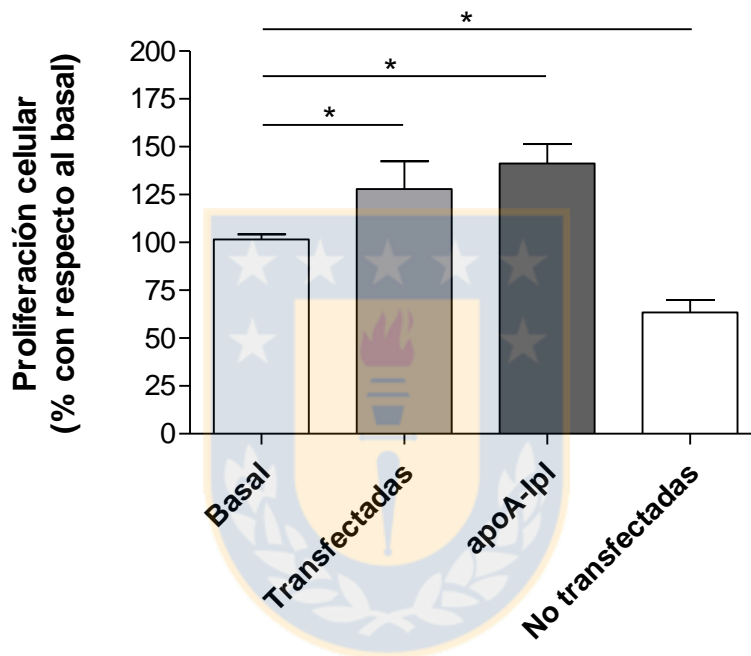


Figura 13: Ensayos de proliferación con medios de cultivo de HEK-293A transfectadas

Las células HUVEC fueron incubadas por 24 h con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del medio de cultivo de células HEK-293A, recuperado 48 h luego de la transfección con pAdTrack-apoA-I. Estos resultados son comparados con apoA-I humana aislada desde plasma (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y con el medio de cultivo de HEK-293A no transfectadas (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los valores corresponden al promedio \pm error estándar. $n = 2$ experimentos independientes, cada uno por triplicado. * $p < 0,05$ vs basal.

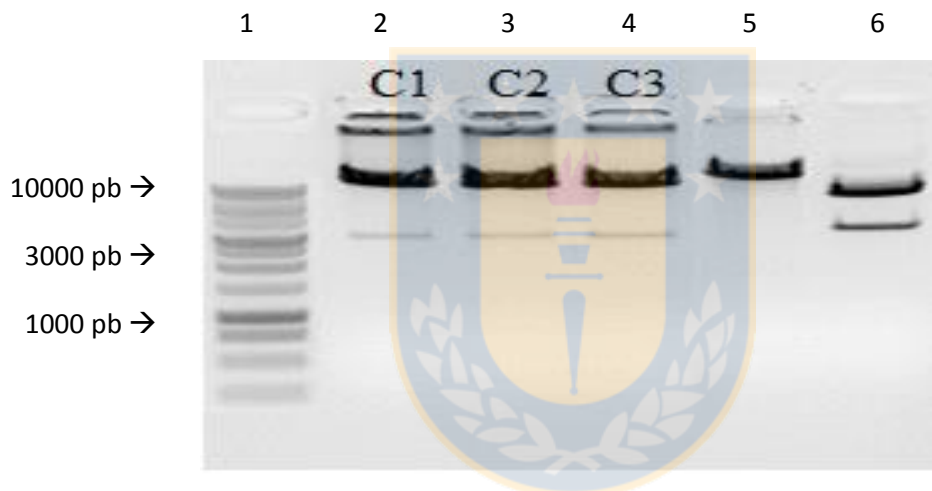


Figura 14: Confirmación de la recombinación homóloga

Análisis de restricción con la enzima de restricción *PacI*, en colonias *BJ5183*. Carril 1: marcador de peso molecular, carriles 2-4: colonias positivas para la recombinación homóloga (C1, C2 y C3), carril 5: control *pAdEasy* digerido con *PacI* y carril 6: control *pAdTrack-apoA-I* digerido con *PacI*.

1.5.- Generación de viriones adenovirales

El vector recombinante fue linealizado con *PacI*, para ser transfectado con Lipofectamina en células HEK-293A. Estas células corresponden a la línea de empaquetamiento del adenovirus, ya que aportan *in trans* los genes carentes, lo que permite la encapsulación de los viriones infectivos. La producción de estos viriones se observa con la formación de halos de lisis en el cultivo celular, los cuales corresponden a formaciones tipo cometa observadas con microscopio de fluorescencia, generadas por la lisis de células infectadas y la posterior infección de células vecinas (Figura 15). Los viriones Ad-apoA-I fueron amplificados en esta misma línea celular.

2.- Producción masiva de apoA-Ihr

La producción de apoA-Ihr se realizó en células SiHa, una línea celular de cáncer de cuello de útero. Este tipo celular fue elegido porque presentan en su superficie el receptor adenoviral CAR, el cual facilita la entrada del adenovirus a la célula.

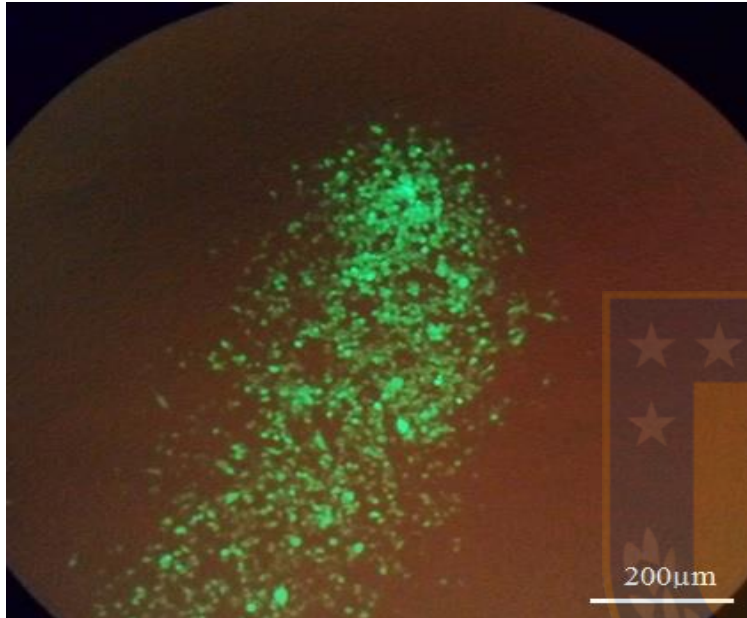
Como paso preliminar, fue necesario seleccionar la multiplicidad de infección (MOI) para las células SiHa. Para ello, las células fueron infectadas con distintas cantidades de adenovirus (5 - 150 UFC/célula) (Figura 16A). 24 post-transducción, se observó la expresión de GFP en todos los pocillos infectados. Con 25 y 50 UFC/célula, la fluorescencia fue más intensa y las células aún conservaban sus características morfológicas. A mayores cantidades de viriones (75, 100 y 150 UFC/célula), se pierde la fluorescencia y se observa un efecto citopático importante. De esta manera, se seleccionó 25 y 50 UFC/célula como posibles condiciones para el MOI.

Para dilucidar cuál de estas condiciones es la mejor para transducir células SiHa, se realizó un análisis de *western blot* de los medios de cultivo y del lisado celular luego de 48 h de transducción. Los resultados muestran la presencia de una banda proteica cercana a los 25 kDa, que correspondería a apoA-Ihr, tanto en el medio de cultivo como en el lisado celular y en el control positivo de apoA-I aislada desde plasma humano (figura 16B). Puesto que no se observan diferencias entre la banda de apoA-Ihr con 25 o 50 UFC/célula, se decidió trabajar con un MOI de 20, para la producción masiva de apoA-Ihr. Cabe señalar que la banda de

apoA-Ihr no fue detectada en el medio de cultivo de células SiHa transducidas con el adenovirus vacío (Ad-mock), en el cultivo de células SiHa no transducidas, ni en los lisados celulares correspondientes, como tampoco en el medio de cultivo ni lisado celular de SiHa no infectadas (Figura 16B).



A.



B.

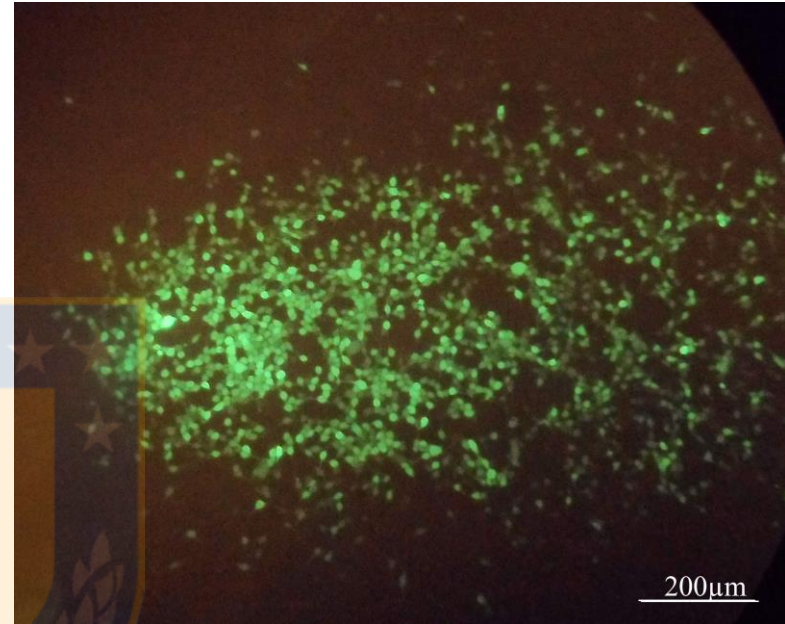
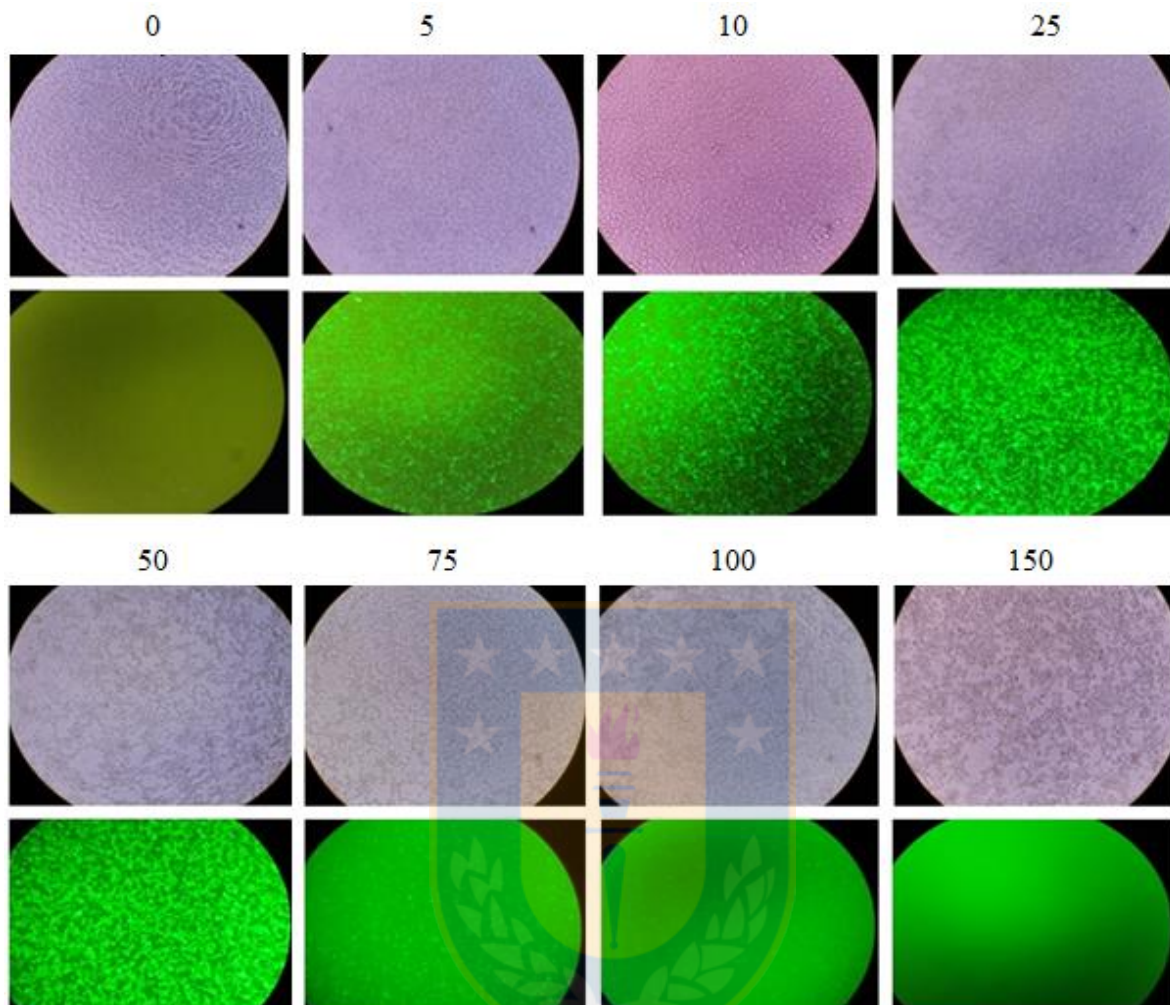


Figura 15: Generación de los viriones recombinantes

Los viriones recombinantes fueron generados por la transfección de células HEK-293A con el vector pAdEasy-apoA-I, previa digestión con *PacI*. Se presentan 2 imágenes representativas a los 9 días post-transfección, donde se observa la generación de viriones infectivos por la fluorescencia de la proteína GFP. La forma de cometa (halos de lisis) es característica de la formación de estos vectores. Aumento 10x.

A.



B.



Figura 16: Ensayo de selección de multiplicidad de infección (MOI)

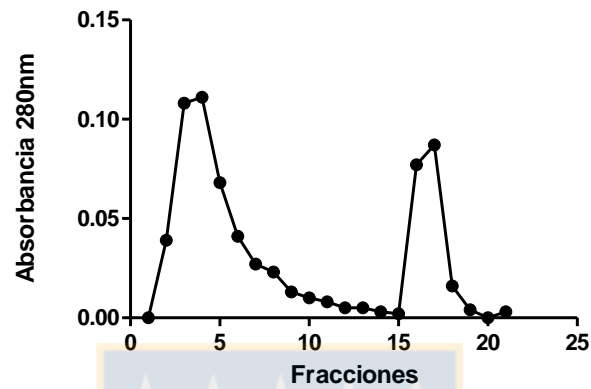
A: En el panel superior se muestra la imagen del cultivo de células SiHa en campo claro, mientras en el panel inferior se presenta la fotografía por microscopía de fluorescencia (expresión de GFP). Sobre cada imagen se indica las unidades formadoras de color por célula (UFC/célula) utilizadas. Aumento 10x. B: Análisis de la expresión de apoA-Ihr por *western blot*. Carril 1: apoA-I plasmática, carril 2: medio de cultivo SiHa-AdApoA-I (50UFC/célula), carril 3: medio de cultivo SiHa-Admock (50UFC/célula), carril 4: medio cultivo SiHa sin infectar, carril 5: medio cultivo SiHa-AdApoA-I (20UFC/célula), carril 6: lisado celular de SiHa-Admock (20UFC/célula), carril 7: lisado celular SiHa-AdApoA-I (50UFC/célula), carril 8: lisado de SiHa sin infectar, carril 9: lisado SiHa-AdApoA-I (20UFC/célula).

Una vez seleccionado el MOI, se produjo la proteína a escala masiva, en cultivo de células SiHa transducidas durante 48 h, obteniéndose un total de 60 mL de medio de cultivo.

Para la purificación de la apoA-Ihr desde el medio de cultivo, se propuso inicialmente la técnica de cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC), específicamente níquel ácido-nitrilotriacético (Ni-NTA). Sin embargo, dado que ninguno de los 3 anticuerpos anti histidina reconocieron a la proteína (figura 12B), se prefirió elegir otro método de aislamiento. El primero de ellos fue en una cromatografía de inmutofinidad, utilizando el anticuerpo 1C11B7, puesto que éste demostró reconocer tanto a apoA-I plasmática como apoA-Ihr en *western blot*. En la figura 17A se observa el cromatograma para el *pool* de proteínas totales de las HDL delipidadas. El primer *peak* representa la fracción no retenida por la columna y el segundo *peak* corresponde a la fracción retenida, es decir, a apoA-I. Al realizar la misma separación, esta vez utilizando 250 µl (correspondiente a 150 µg de proteína aproximadamente) del medio de cultivo que contiene apoA-Ihr, se observa que no hubo *peak* de elusión (Figura 17B), lo cual demuestra que el anticuerpo 1C11B7 no reconoce a la apoA-Ihr en solución. Este ensayo fue confirmado utilizando distintas cantidades de medio de cultivo, obteniéndose los mismos resultados (datos no mostrados).

Dado a que la separación por inmutofinidad no otorgó los resultados esperados, se recurrió a la metodología descrita por Brace en 2010, quien demostró que apoA-I puede ser recuperada desde gel SDS-PAGE, sin que pierda sus propiedades funcionales [133]. Este protocolo, aplicado anteriormente a la purificación de apoA-I plasmática, permitió obtener apoA-Ihr desde los medios de cultivo, utilizando como patrón de migración apoA-I plasmática. La cuantificación de apoA-Ihr se realizó por comparación de la señal en *western blot*, con la otorgada por apoA-I plasmática (Figura 18). Según esta metodología, fue posible obtener alrededor de 0,5 g de apoA-Ihr por litro de medio de cultivo, luego de 48 h de transducción.

A.



B.

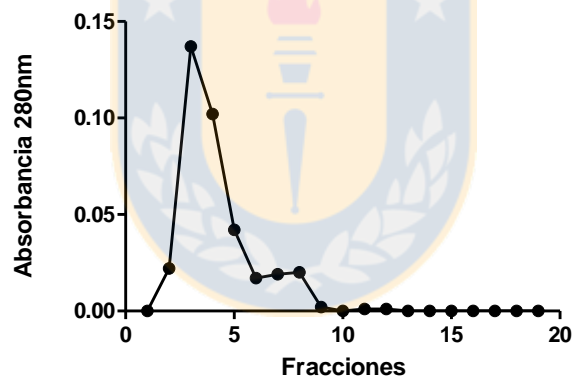


Figura 17: Ensayos de purificación de apoA-Ihr por cromatografía de inmunoafinidad
La resina (*Sepharose*) fue acoplada a un anticuerpo anti apoA-I (1C11B7) para la purificación de apoA-Ihr. Se presenta la separación cromatográfica de 500 μg de proteína total de HDL delipidada (A) y de 150 μg de medio de cultivo con apoA-Ihr (B).

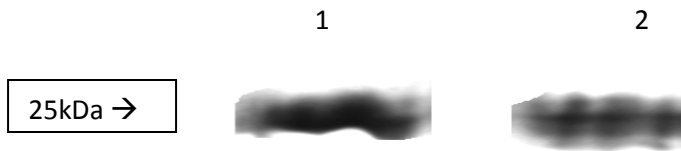


Figura 18: Purificación de apoA-Ihr de cultivos de células SiHa

Células SiHa fueron infectadas con 25 UFC/célula. Luego de 48 h, se detectó la presencia de apoA-Ihr en los medios de cultivo. Carril 1: control de apoA-I humana plasmática (50 µg proteína), carril 2: apoA-Ihr. (25 µg proteína)



3.- Ensayos funcionales de apoA-Ihr

Para verificar que la apoA-Ihr purificada es funcionalmente activa, se realizó ensayos de biodisponibilidad de NO, actividad de eNOS y miografías.

La medición de la biodisponibilidad de NO fue realizada en células HUVEC, utilizando la sonda DAF-FM-DA. Se observó que apoA-I plasmática y apoA-Ihr generaron un aumento estadísticamente significativo de la biodisponibilidad de NO, con respecto a la condición basal (21 y 33%, respectivamente, $p < 0,05$), no observándose diferencias significativas entre ambos estímulos (Figura 19).

Los ensayos de actividad de la eNOS fueron realizados en células HUVEC, mediante la transformación de L-arginina tritiada a L-citrulina tritiada (Figura 20). En estos experimentos, apoA-Ihr aumentó al doble la formación de L-citrulina, con respecto al basal sin estímulo, al igual que apoA-I aislada desde plasma e histamina, siendo estos resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

Finalmente, los ensayos de miografía fueron realizados con anillos de venas coriónicas y de venas umbilicales humanas. Los resultados muestran una disminución de la tensión de estos vasos en presencia de apoA-Ihr y de apoA-I plasmática, a concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$, con respecto al control sin estímulo. Este efecto alcanza una magnitud superior al 20%, siendo estadísticamente significativo en ambos modelos ($p < 0,001$). En vena umbilical, este efecto fue observado a partir de los 4 minutos y en vena coriónica a partir de los 3 min (Figura 21).

El conjunto de estos resultados demuestra que fue posible producir apoA-Ihr, el método implementado para su purificación es eficiente y que esta proteína es funcional, comparable con la apoA-I obtenida desde el plasma humano.

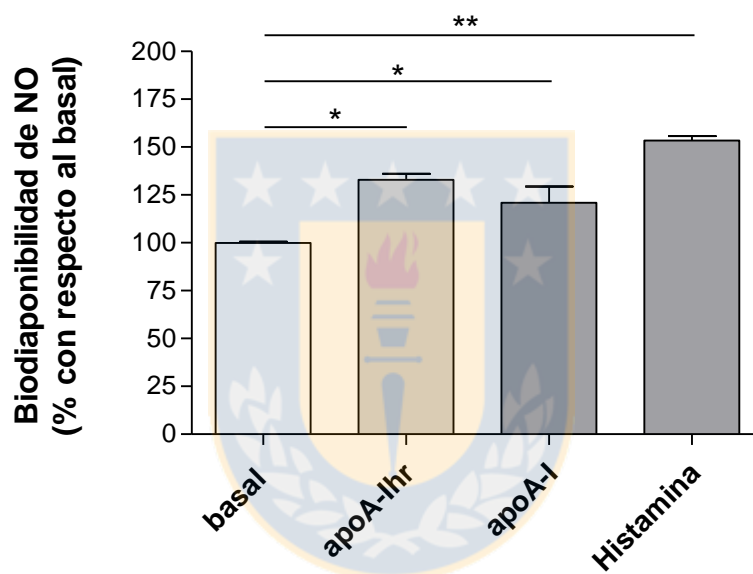


Figura 19: Biodisponibilidad de NO en HUVEC tratadas con apoA-Ihr

Las células HUVEC fueron pre-tratadas con la sonda DAF-FM-DA y L-arginina. Posteriormente, fueron incubadas con apoA-Ihr (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o con los controles apoA-I plasmática (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o histamina (1 mM), durante 30 min. Los valores corresponden al promedio \pm error estándar. n=3 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ vs basal.

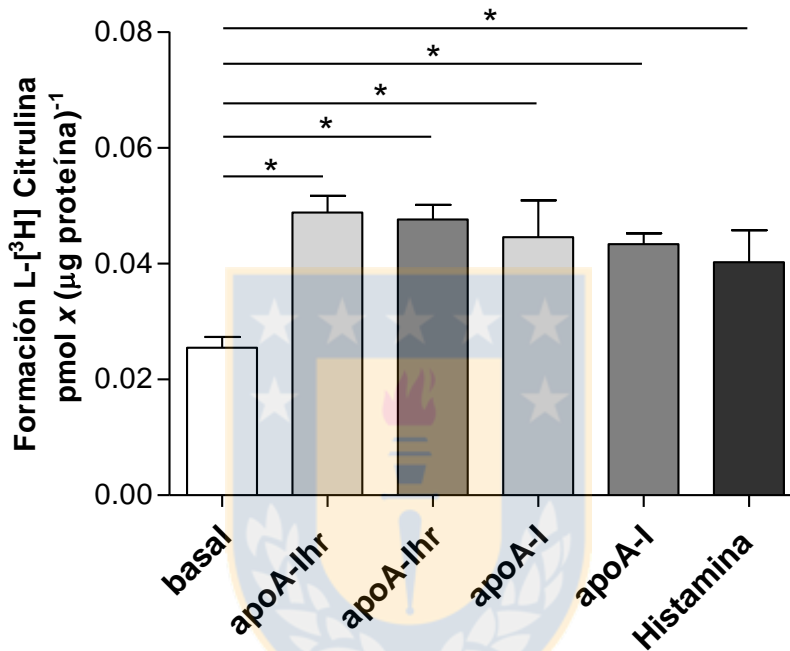
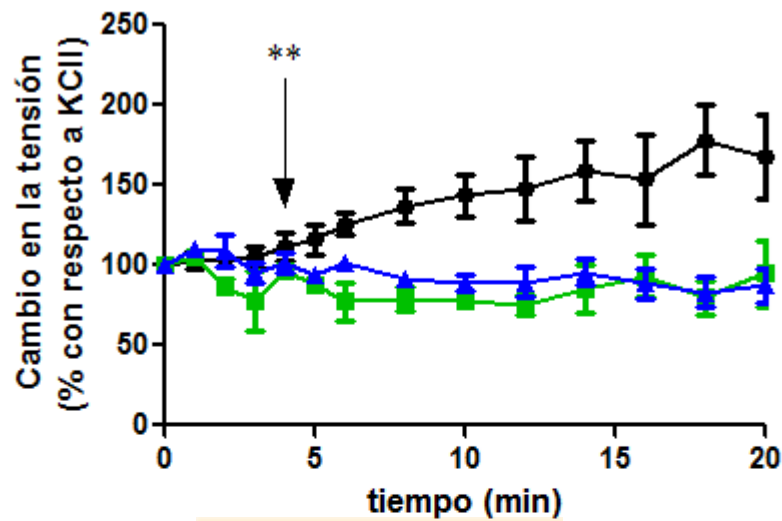


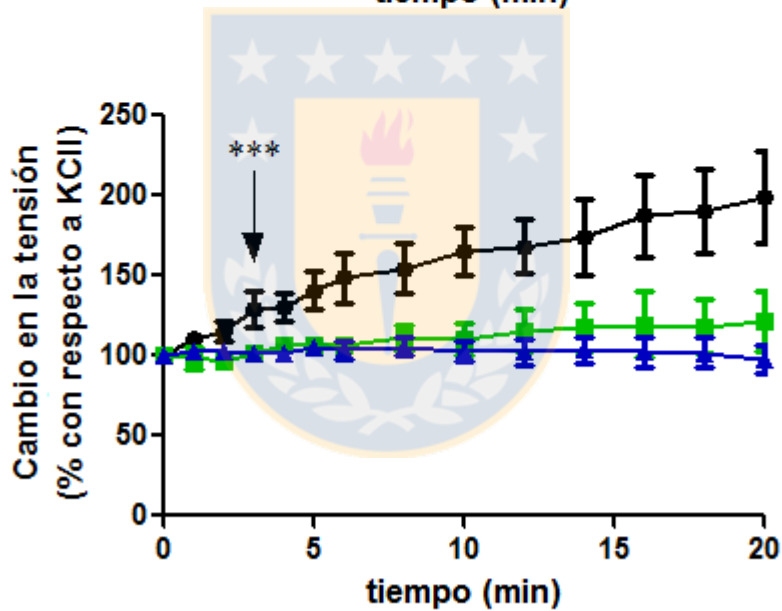
Figura 20: Actividad de la eNOS en HUVEC incubadas con apoA-Ihr

Células HUVEC fueron incubadas en presencia de apoA-Ihr o apoA-I plasmática, a concentración de 50 µg/mL (plomo claro) y 100 µg/mL (plomo oscuro) o histamina (1mM), por 30 min. La formación de L-[³H]-citrulina desde L-[³H]-arginina fue utilizada para cuantificar la actividad de la eNOS. Los valores corresponden al promedio ± error estándar. n=2 experimentos independientes; *p<0,05 vs basal.

A.



B.



● Basal

■ apoA-Ihr

▲ apoA-I plasmática

Figura 21: Ensayos de miografía con apoA-Ihr

Anillos de vena umbilical (A) y de vena coriónica (B) fueron pre-contraídos con U46619. Alcanzada la máxima contracción, se adicionó apoA-Ihr o apoA-I plasmática, 50µg/mL. Las flechas indican el tiempo desde el cual se observa un efecto estadísticamente significativo de ambas apoA-I con respecto al control basal. Los valores son expresados respecto a la contracción máxima de KCl y corresponden al promedio ± error estándar. n=5 experimentos independientes. **p<0,001; ***p<0,0001 vs basal.

C. Expresión de ecto-F₁-ATPasa en endotelio de vena coriónica

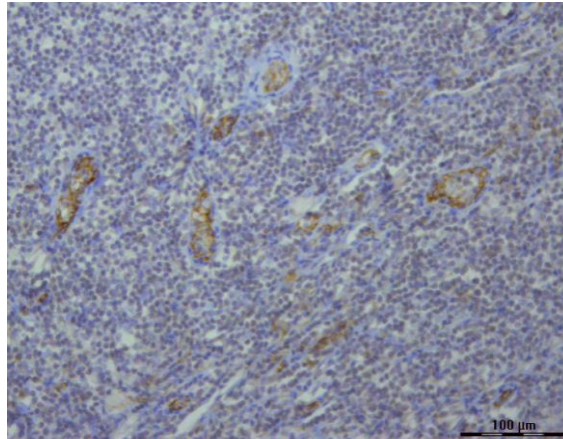
La expresión de ecto-F₁-ATPasa ha sido demostrada previamente en células endoteliales de vena umbilical humana [103], pero no en vena coriónica. Por este motivo, se realizó un análisis inmunohistológico de cortes transversales y longitudinales de vena coriónica y de vena umbilical, para detectar esta ecto-enzima.

En primer lugar, se realizó la detección del marcador endotelial CD31 en ambos tipos de vasos sanguíneos. En la Figura 22 se observa el precipitado café generado por la oxidación del sustrato DAB, marcando la superficie de la monocapa endotelial, tanto en cortes longitudinales como transversales. Este marcaje denota un patrón membranoso asociado exclusivamente a la monocapa endotelial, puesto que el tejido muscular liso subyacente al endotelio carece de esta coloración. Estos resultados concuerdan con la distribución exclusivamente endotelial que presenta el marcador CD31, el cual sólo se encuentra en la superficie de este tipo celular [137,138].

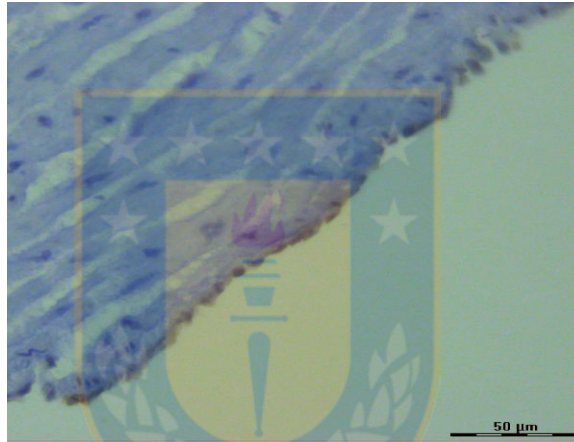
En relación a ecto-F₁-ATPasa, se observa un marcaje específico en el endotelio de vena umbilical y de vena coriónica, aunque si se detecta un marcaje inespecífico en el tejido muscular liso (Figuras 23 y 24). El patrón observado para ecto-F₁-ATPasa es similar en ambos vasos sanguíneos, presentando una distribución membranosa, muy parecida al marcaje descrito para CD31.

Estos resultados demuestran la expresión de ecto-F₁-ATPasa en la superficie del endotelio de los dos modelos de vasos sanguíneos que se utilizarán para determinar el efecto de apoA-I sobre el tono vascular.

A.



B.



C.

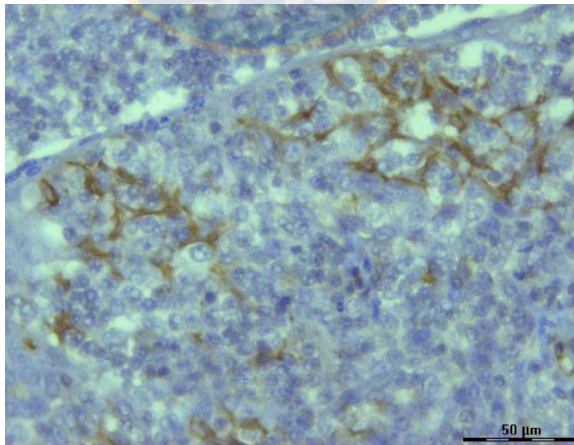


Figura 22: Análisis histológico de CD31

Las muestras fueron teñidas con hematoxilina de Harris y tratadas con un anticuerpo anti CD31, tanto en cortes longitudinales (A y C) como transversales (B). A y B: vena umbilical, C: vena coriónica. Aumento 20x en A y 40X en B y C.

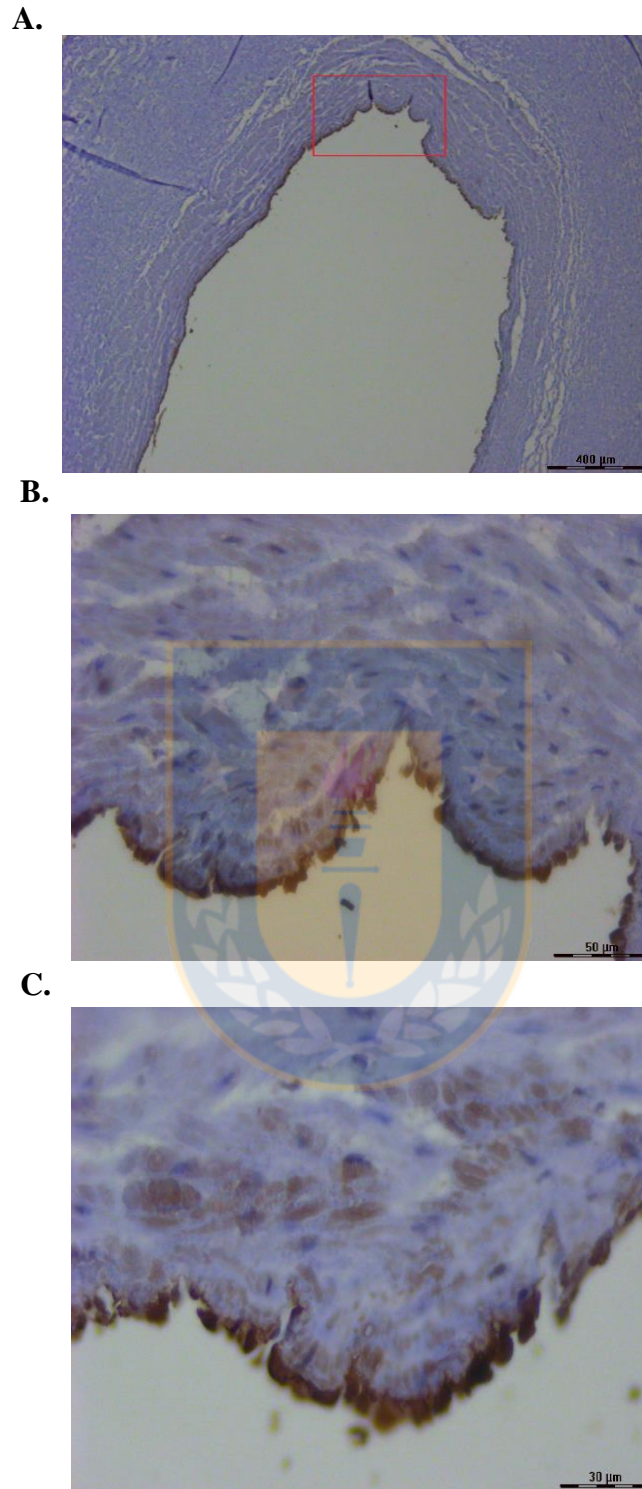
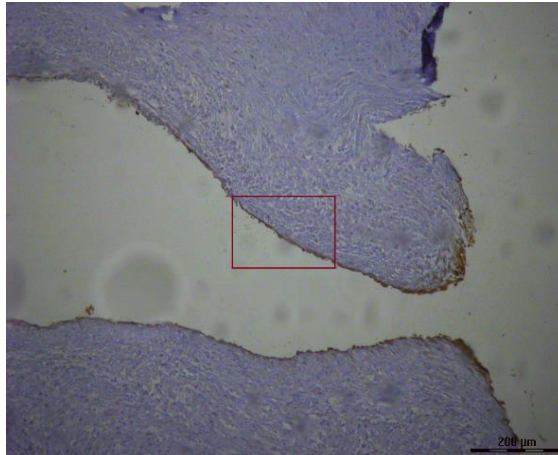
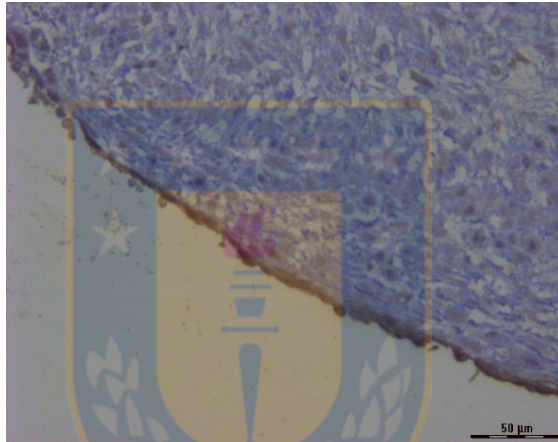


Figura 23: Detección de ecto-F₁-ATPasa en vena umbilical humana
Análisis histológico de cortes transversales de vena umbilical humana. A: Aumento 5x. B: aumento a 40x de la zona marcada en rojo en la figura A. C: aumento 63x de la misma zona.

A.



B.



C.

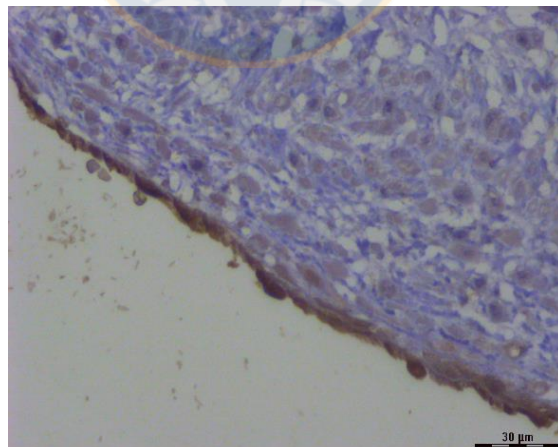


Figura 24: Detección de ecto-F₁-ATPasa en vena coriónica humana

Análisis histológico de cortes transversales de vena coriónica humana. A: Aumento 10x. B: aumento a 40x de la zona marcada en rojo en la figura A. C: aumento 63x de la misma zona.

D. Medición de la tensión de anillos de vena coriónica y vena umbilical humana

Para la evaluación del efecto vasodilatador de apoA-I humana, se utilizó como modelo de estudio las miografías, técnica con la cual es posible detectar cambios en la contracción isométrica de anillos de vasos sanguíneos. Esto fue realizado en venas coriónicas y en venas umbilicales humanas.

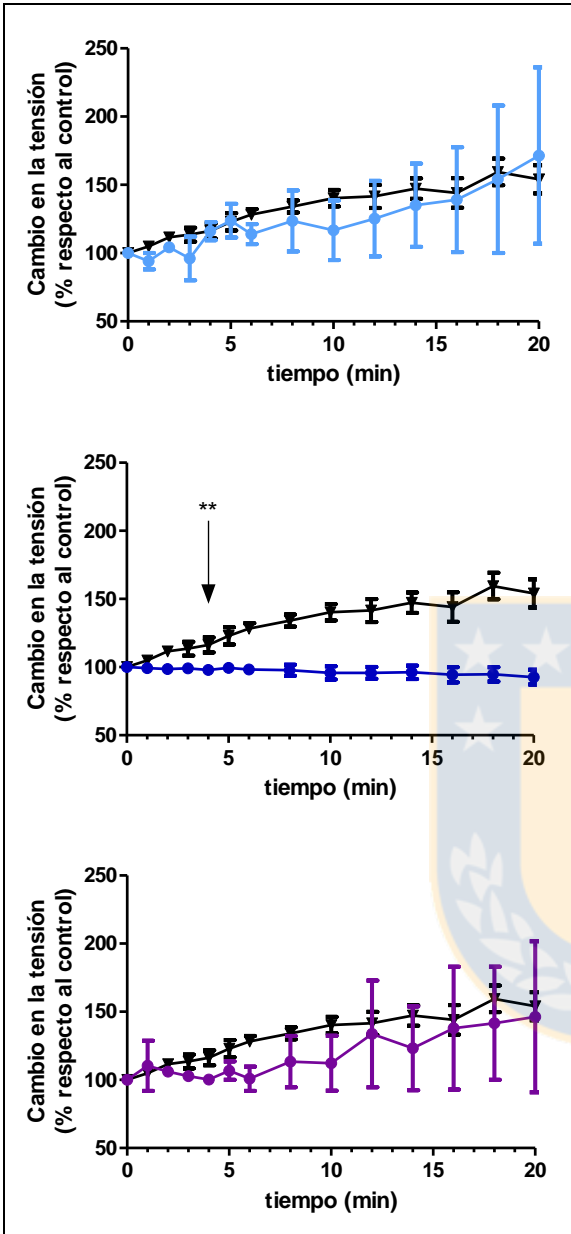
Los resultados mostrados a continuación son el conjunto de datos obtenidos con apoA-Ihr y con apoA-I aislada desde plasma, ya que no hubo diferencia en el efecto generado por ambas proteínas, como se presentó en la Figura 21.

1.- Efecto de apoA-I en la tensión de vasos sanguíneos

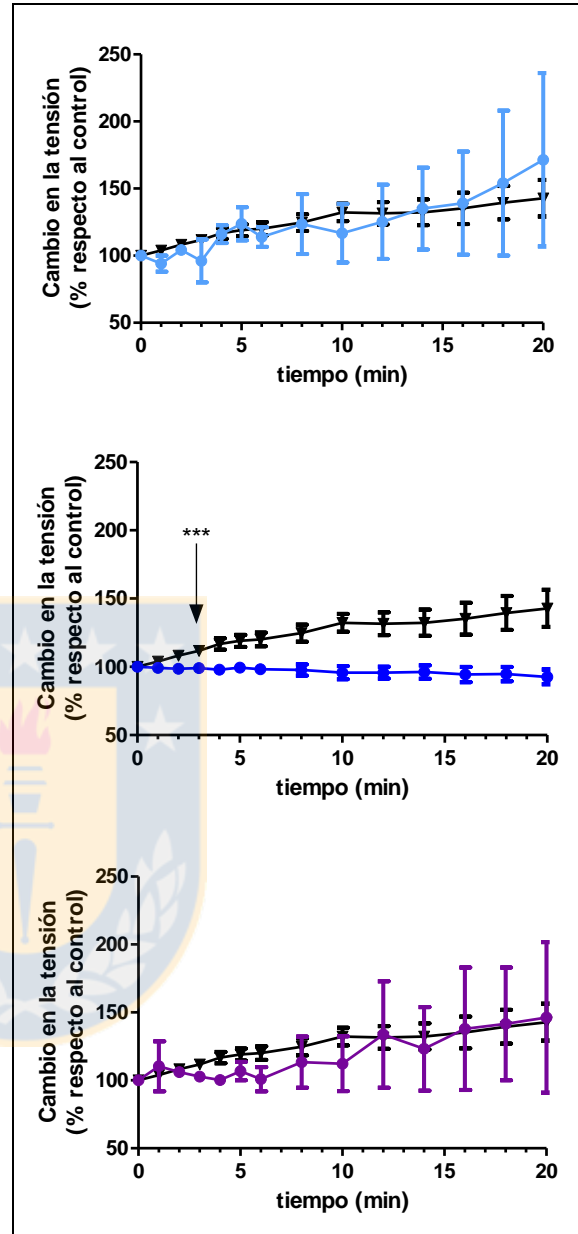
Un primer ensayo consistió en determinar el efecto dosis-dependencia de apoA-I. En la Figura 25 se observa que apoA-I 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ produce un pequeño efecto vasodilatador entre los 6 y los 16 min aproximadamente, el cual no alcanza significancia estadística, debido a la dispersión de los datos. A concentración 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, apoA-I genera un efecto vasodilatador claro en ambos modelos, el cual es estadísticamente significativo en vena umbilical a partir de los 4 min y en vena coriónica a partir de los 3 min, manteniéndose hasta el final del ensayo (20 min). Al analizar este resultado a los 10 min de medición, se observa que apoA-I produce un 37,15% de vasodilatación en vena umbilical ($p < 0,05$) y un 22,02% en vena coriónica ($p < 0,001$), al compararlos con el comportamiento de la condición basal a ese tiempo (Figura 26). Finalmente, a concentración 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, apoA-I genera vasodilatación de menor magnitud que a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pero este efecto no alcanza significancia estadística (Figura 25).

Debido a lo anterior, se estableció que apoA-I será utilizada a concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para los ensayos posteriores, y se presentarán los análisis a los 10 min de incubación. Las gráficas completas del efecto en el tiempo se incluyen en la sección de anexos.

A.



B.



▲ Basal
 ● A-I 25µg/mL
 ● apoA-I 50µg/mL
 ● apoA-I 100µg/mL

Figura 25: Efecto dosis y tiempo-dependencia de apoA-I en la tensión de vasos sanguíneos

Distintas concentraciones de apoA-I fueron adicionadas a anillos de vena umbilical humana (A) y vena coriónica humana (B), pre-contraídos con U46619 (100 nM). Las flechas indican el tiempo desde el cual los valores son estadísticamente significativos, con respecto a la condición basal en ese tiempo. Los valores son expresados como el promedio \pm error estándar. n=3 experimentos independientes. **p<0,001; ***p<0,0001 vs basal.

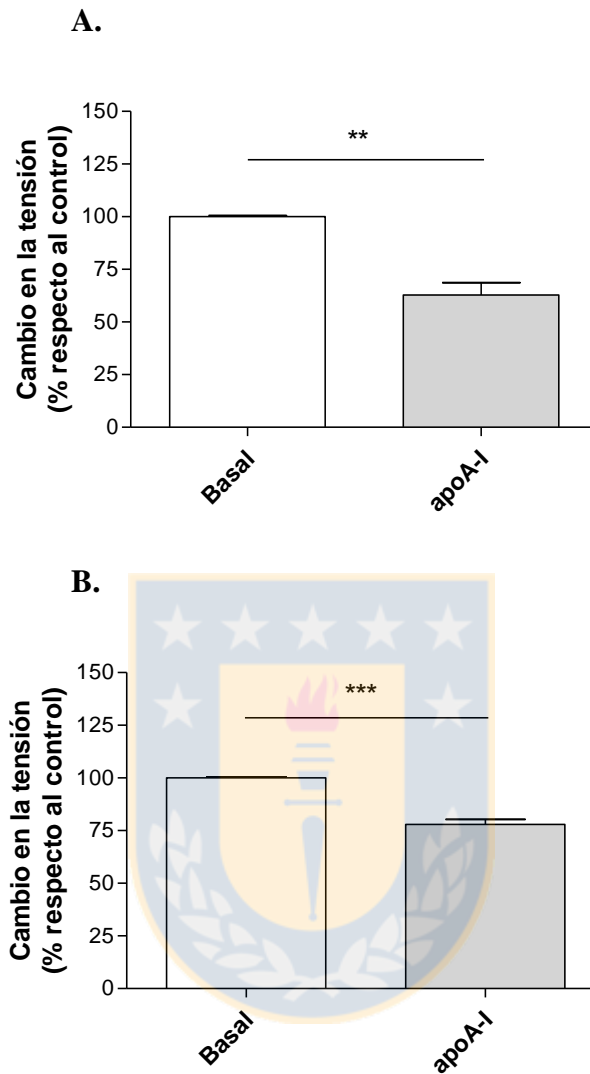


Figura 26: Efecto de apoA-I 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en la tensión de vasos sanguíneos

Se presentan los resultados de la vasodilatación producida por apoA-I en vena umbilical (A) y en vena coriónica (B) pre-contraídos, a los 10 min post-estímulo. Los valores son expresados como el promedio \pm error estándar. $n \geq 7$ experimentos independientes. ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$ vs basal.

2.- Participación de la eNOS en el efecto vasodilatador de apoA-I

Para confirmar que el efecto vasodilatador de apoA-I era dependiente de la síntesis de NO por parte de la eNOS, se utilizaron dos metodologías: 1) uso de L-NAME (L-nitroarginina metil éster), inhibidor de la eNOS, y 2) remoción mecánica del endotelio.

En la Figura 27 (y Figura anexa 1), se observa que la incubación con L-NAME revierte completamente el efecto vasodilatador de apoA-I en ambos tipos de vasos sanguíneos. La tensión de los anillos en la co-incubación de apoA-I con L-NAME no difiere de la condición basal sin estímulo.

Al igual de lo que ocurre con L-NAME, la abrasión del endotelio en los anillos de vena umbilical y de vena coriónica produce la pérdida total del efecto vasodilatador generado por apoA-I (Figura 28, Figura anexa 2).

Estos resultados demuestran que apoA-I genera vasodilatación en vasos sanguíneos y que este efecto es dependiente del endotelio vascular, vía síntesis de NO por parte de la eNOS.



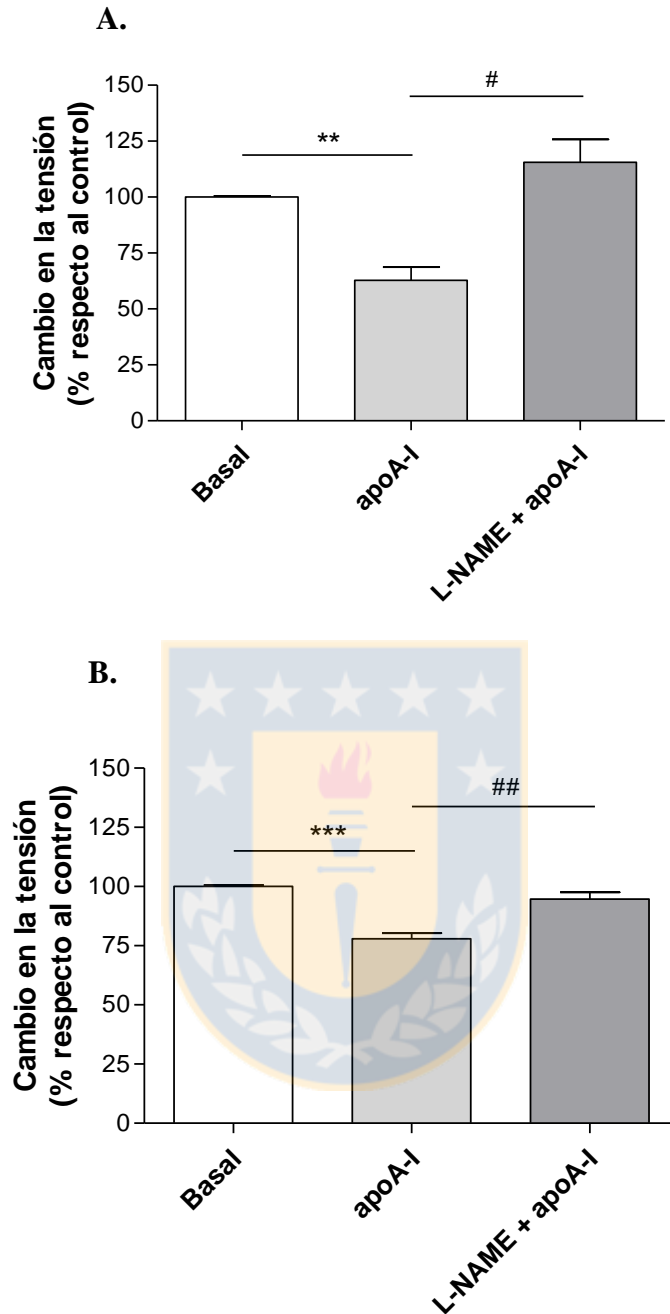


Figura 27: Efecto de la inhibición de la eNOS, sobre la vasodilatación generada por apoA-I

Anillos venosos obtenidos desde vena umbilical humana (A) y de venas secundarias de placenta (B), fueron pre-incubados con L-NAME (200 μ M) por 45 min, luego de lo cual se agregó apoA-I 50 μ g/mL, previa contracción con U46619 (100nM). Los resultados son presentados a los 10 min de adicionada apoA-I. Los valores son expresados como el promedio \pm error estándar. $n \geq 3$ experimentos independientes. ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ vs basal. # $p < 0,05$; ## $p < 0,005$ vs apoA-I

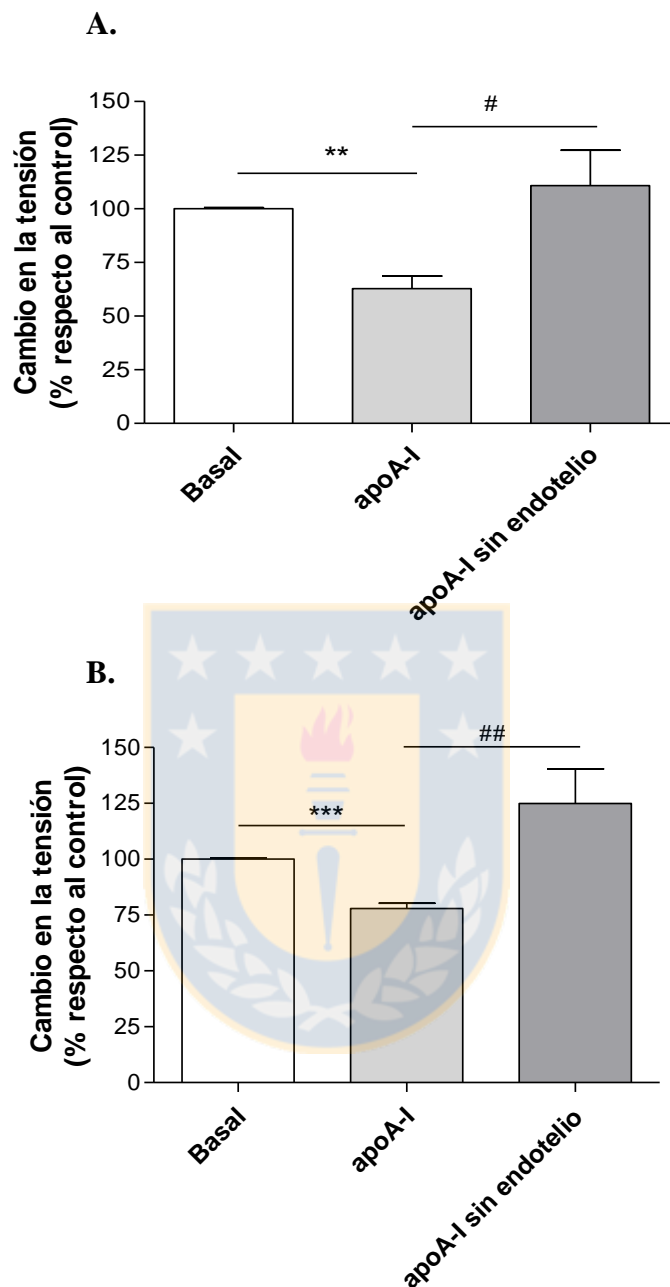


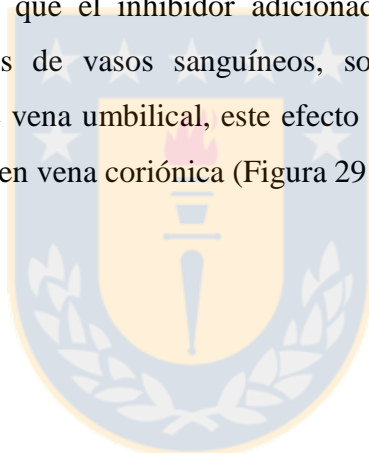
Figura 28: Efecto de la abrasión mecánica del endotelio, sobre la vasodilatación generada por apoA-I

Anillos de vena umbilical (A) y de venas coriónicas (B) fueron sometidos a la remoción del endotelio. Luego de inducir contracción con U46619 (100 nM), se adicionó apoA-I (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los resultados son presentados a los 10 min de adicionada apoA-I. Los valores son expresados como el promedio \pm error estándar. $n \geq 3$ experimentos independientes. ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$ vs basal. # $p < 0,05$; ## $p < 0,001$ vs apoA-I.

4. Participación de ecto-F₁-ATPasa en el efecto vasodilatador de apoA-I

Como se demostró anteriormente, el receptor ecto-F₁-ATPasa se expresa en el endotelio de vena umbilical y de vena coriónica, por lo cual podría estar implicado en el efecto vasodilatador generado por apoA-I. Esta premisa fue evaluada mediante dos inhibidores de ecto-F₁-ATPasa: la proteína IF₁, la cual se une al dominio catalítico de la enzima, y oligomicinina A, un antibiótico que bloquea el paso de protones a través de la unidad F₀.

En estos ensayos se observó que la pre-incubación con ambos inhibidores produce la pérdida de la vasodilatación observada con apoA-I (50 µg/mL) (Figura 29 y Figura anexa 3). En presencia de IF₁, tanto el efecto combinado con apoA-I como el inhibidor por sí solo no difieren de la condición basal. Para oligomicinina A, esta situación es similar sólo en la co-incubación con apoA-I, puesto que el inhibidor adicionado individualmente aumenta la contracción en ambos modelos de vasos sanguíneos, sobrepasando los valores de la condición basal. Para el caso de vena umbilical, este efecto es sólo una tendencia, mientras alcanza significancia estadística en vena coriónica (Figura 29 y Figura anexa 4).



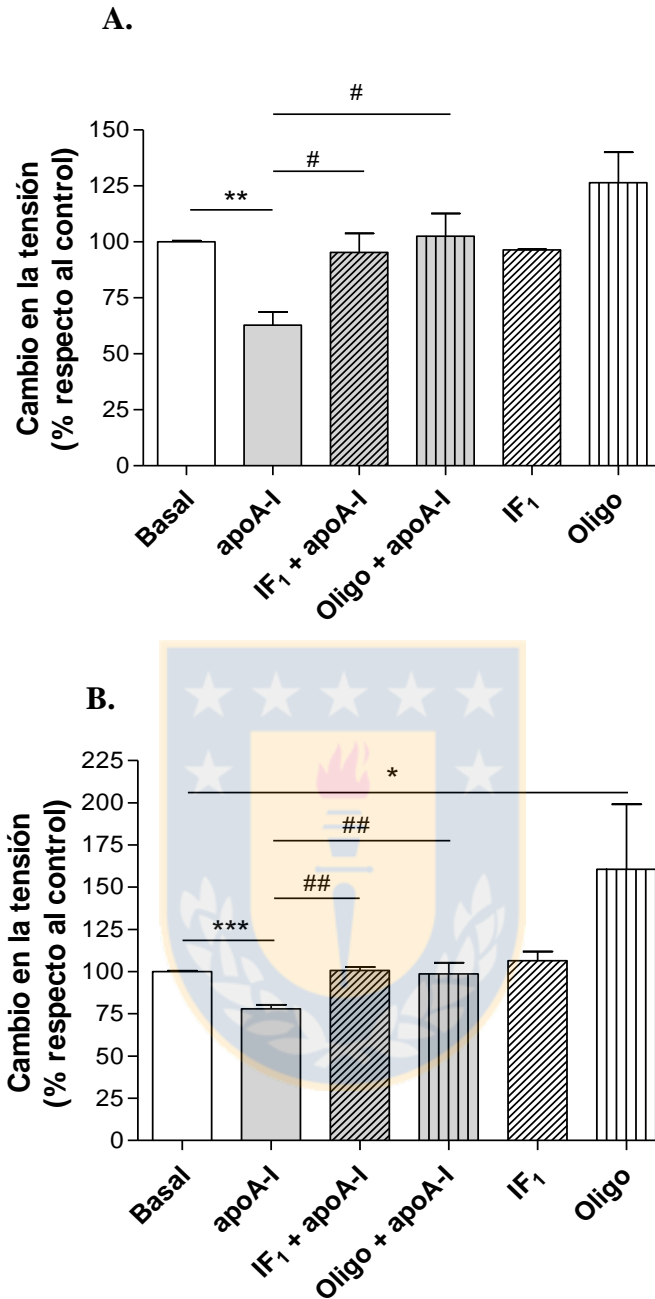


Figura 29: Efecto de la inhibición de ecto-F₁-ATPasa, sobre la vasodilatación generada por apoA-I

Anillos de vena umbilical (A) y de vena coriónica (B) fueron incubados con IF₁ (1,8 μM) u oligomicina A (oligo, 125 nM), 00 nM) por 45 min luego de lo cual se adicionó apoA-I (50 μg/mL), previa contracción con U46619 (100nM). Los resultados muestran el efecto a los 10 min post-adición de apoA-I. Los valores son expresados como el promedio ± error estándar. n ≥ 3 experimentos independientes. *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001 vs basal. #p<0,05; ##p<0,001 vs apoA-I;

4.- Participación de otros receptores en el efecto vasodilatador de apoA-I

La expresión de otros receptores de apoA-I ha sido descrita en el endotelio vascular, principalmente ABCA1 y SR-BI [88,108]. Estos receptores, en particular SR-BI, han sido relacionados con efectos protectores de apoA-I a nivel endotelial y pudieran estar implicados en el efecto vasodilatador observado en nuestros ensayos con apoA-I. Para evaluar la participación de estos receptores, se utilizaron 2 inhibidores: glibenclamida para ABCA1 y BLT-1 para SR-BI.

Con glibenclamida, se observa una inhibición total del efecto vasodilatador de apoA-I en ambos tipos de vasos sanguíneos (Figura 30, Figura anexa 5). En el caso de vena umbilical, la acción conjunta de apoA-I y el inhibidor muestra una vasoconstricción por sobre la condición basal (sobre el 60%, $p < 0,05$), y el inhibidor incubado de manera individual muestra un efecto similar. Para vena coriónica, esto no ocurre y tanto la co-incubación de glibenclamida con apoA-I como la condición sólo con el inhibidor no muestran diferencias significativas con respecto a la condición basal, a pesar de observarse una tendencia a la vasoconstricción, de menor magnitud a lo detectado en vena umbilical.

Con respecto a BLT-1, la acción conjunta de apoA-I y este inhibidor no muestra diferencia con respecto al efecto de apoA-I por sí sola. Además, la incubación individual de BLT-1 no genera cambios en la contracción isométrica de venas umbilicales y coriónicas, al compararlo con la condición basal (Figura 31, Figura anexa 6).

El conjunto de estos resultados sugiere que ecto- F_1 -ATPasa y ABCA1 estarían implicados en el efecto vasodilatador de apoA-I, no así SR-BI. Estos hallazgos se condicen con el hecho de utilizar apoA-I libre en nuestros ensayos, puesto que ecto- F_1 -ATPasa y ABCA1 reconocen apoA-I delipidada, mientras SR-BI une apoA-I sólo en el contexto de las HDL [88].

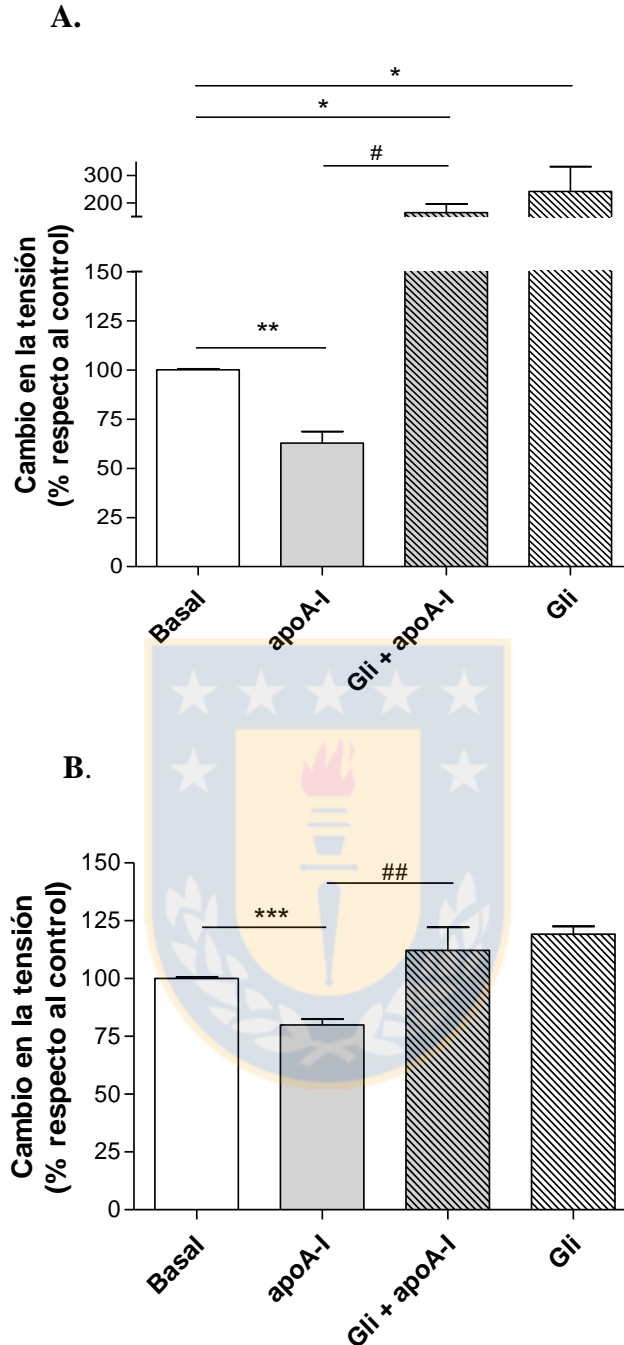


Figura 30: Efecto de la inhibición de ABCA1, sobre la vasodilatación generada por apoA-I

Anillos de vena umbilical (A) y de vena coriónica (B) fueron incubados glibenclamida (Gli, 250 μ M) por 45 min antes de la adición de apoA-I 50 μ g/mL, previa contracción de U46619 (100nM). Los resultados son presentados a los 10 min de adicionada apoA-I. Los valores son expresados como el promedio \pm error estándar. $n \geq 3$ experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$ vs basal. # $p < 0,05$; ## $p < 0,001$ vs apoA-I.

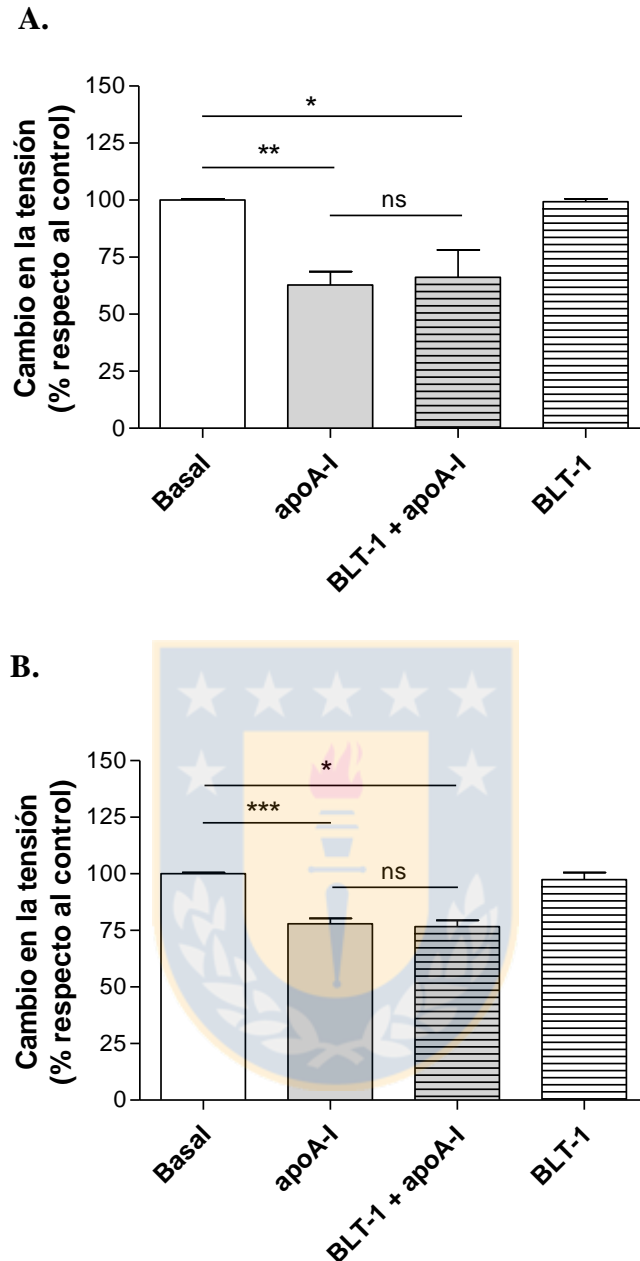


Figura 31: Efecto de la inhibición de SR-BI, sobre la vasodilatación generada por apoA-I

Anillos de vena umbilical (A) y de vena coriónica (B) fueron incubados con BLT-1 (10 μ M) por 45 min antes de la adición de apoA-I 50 μ g/mL, previa contracción con U46619 (100nM) Los resultados son presentados a los 10 min de adicionada apoA-I. Los valores son expresados como el promedio \pm error estándar. $n \geq 3$ experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$ vs basal.

5.- Efecto de ADP y ADPβS en la tensión de vasos sanguíneos

Ha sido descrito que la actividad hidrolasa de Ecto-F₁-ATPasa genera ADP extracelular, el cual se postula desencadena efectos biológicos, a través de la activación de receptores purinérgicos [103,139]. Por este motivo, fue de interés evaluar ADP y un análogo no hidrolizable (ADPβS) en la tensión de venas coriónicas y umbilicales. Estas moléculas fueron ensayadas a concentraciones de 1-10-100 y 0,1-1-10 nM, respectivamente, condiciones que han demostrado generar respuestas biológicas en estudios de la vía de la Ecto-F₁-ATPasa, utilizando cultivos de células endoteliales [103].

Los resultados muestran que ninguna de las concentraciones ensayadas de ADP genera cambios en la tensión de los anillos venosos, con respecto a la condición basal (Figura 32, Figura anexa 7). Con respecto a ADPβS, éste tampoco induce cambios en el tono de venas umbilicales; sin embargo, en vena coriónica, ADPβS produce vasodilatación, la cual alcanza significancia estadística a la concentración 10 nM (12% de vasodilatación) (Figura 33, Figura anexa 8).

Para comprobar si el efecto vasodilatador observado con ADPβS 10 nM depende de la síntesis de NO por parte de la eNOS, se realizaron ensayos con L-NAME (Figura 34, Figura anexa 9). Los resultados obtenidos muestran que el efecto vasodilatador del nucleótido es revertido completamente con el inhibidor de la eNOS, a partir del primer minuto de co-incubación.

Estos resultados sugieren que la generación de ADP en la superficie celular podría generar vasodilatación vía síntesis de NO, al menos en vena coriónica. De esta manera, la actividad hidrolasa de ecto-F₁-ATPasa en la superficie de las células endoteliales podría participar de este efecto.

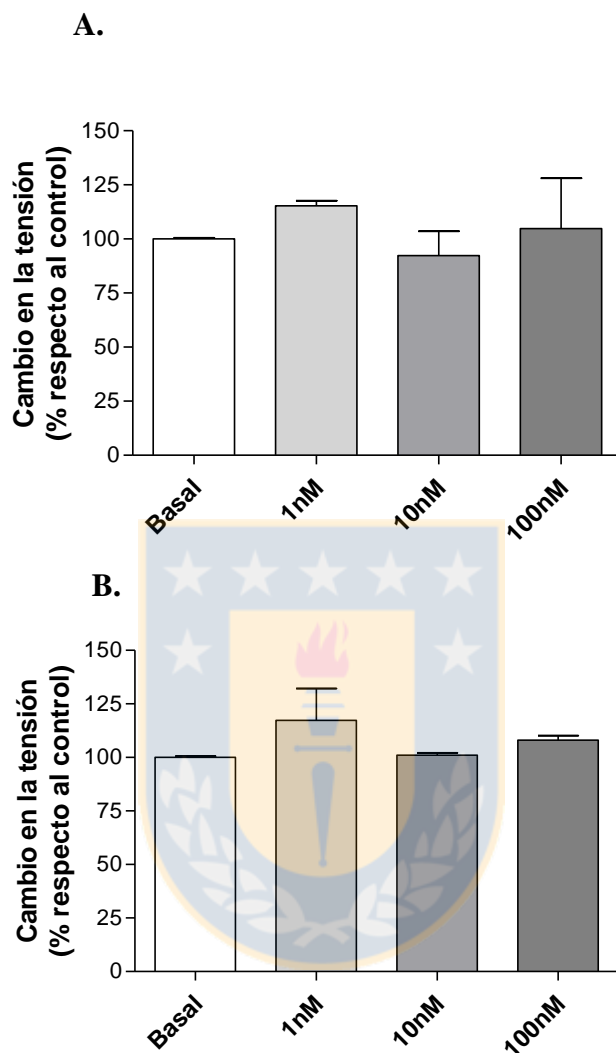


Figura 32: Efecto de ADP sobre la tensión de vasos sanguíneos

Anillos de vena umbilical (A) y de vena coriónica (B) fueron incubados con U46619 (100 nM). Alcanzada la contracción máxima, se adicionó ADP. Los resultados son presentados a los 10 min de adicionado el ADP. Los valores son expresados como el promedio \pm error estándar. $n = 3$ experimentos independientes.

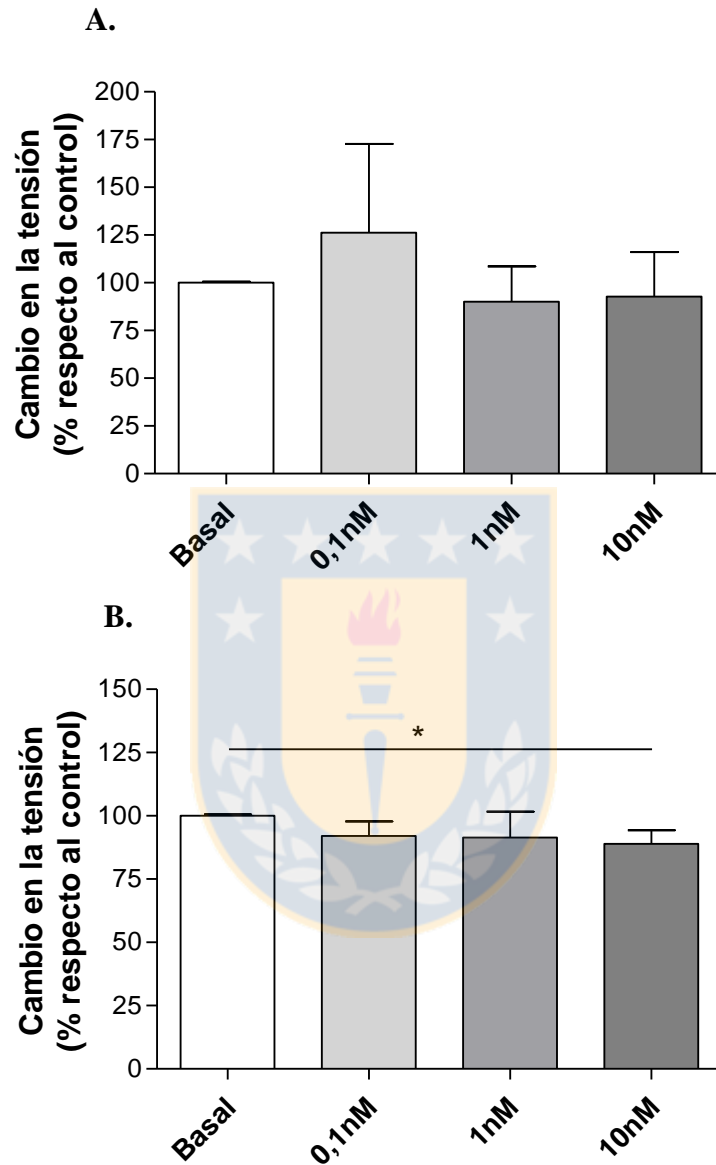


Figura 33: Efecto de ADPβS sobre la tensión de vasos sanguíneos

Anillos de vena umbilical (A) y de vena coriónica (B) fueron incubados con U46619 (100 nM). Alcanzada la contracción máxima, se adicionó ADPβS. Los resultados son presentados a los 10 min de adicionado el ADPβS. Los valores son expresados como el promedio ± error estándar. $n \geq 3$ experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs basal.

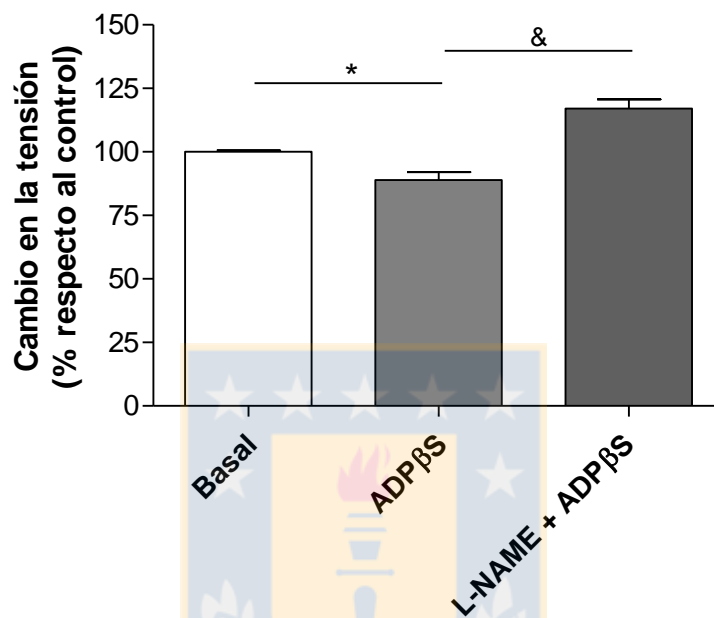


Figura 34: Efecto de la inhibición de la eNOS, sobre la vasodilatación generada por ADPβS

Anillos de vena coriónica fueron incubados con U46619 (100 nM). 45 min antes de la adición de ADPβS 10 nM, se incubó con L-NAME (200 μM). Los resultados son presentados a los 10 min de adicionado ADPβS. Los valores son expresados como el promedio ± error estándar. n ≥ 3 experimentos independientes. *p<0,05 vs basal. &p<0,05 vs ADPβS.

DISCUSIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en Chile y el mundo. Para el año 2008, el 30% de las muertes mundiales fueron por esta causa, y en Chile estas cifras alcanzaron el 26% en el año 2009. Esta situación, que se prevé continuará aumentando en los próximos años, puede ser limitada o revertida actuando sobre los factores de riesgo, como son el tabaquismo, la obesidad, la inactividad física y la hipertensión arterial. Este último es el factor de riesgo de mayor prevalencia en nuestra población y el principal determinante para el desarrollo de enfermedad cerebrovascular y enfermedad coronaria [4]. Debido a estos antecedentes, el estudio y conocimiento de los mecanismos subyacentes a la hipertensión arterial cobran gran relevancia, con el fin de prevenir su instauración y mejorar los actuales tratamientos de esta enfermedad.

La hipertensión arterial esencial o idiopática tiene su origen en la disfunción endotelial, condición en la cual el endotelio vascular no logra realizar sus funciones fisiológicas [6]. A su vez, la hipertensión arterial es un factor de riesgo preponderante para el desarrollo de disfunción endotelial [2]. Se ha descrito que la alteración en la regulación del tono vascular se debe a la disminución de la síntesis y/o biodisponibilidad de agentes vasodilatadores, principalmente el óxido nítrico (NO), el cual es sintetizado por la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) en el endotelio vascular.

Ha sido ampliamente descrito que las lipoproteínas de alta densidad (HDL) constituyen un factor protector contra el desarrollo de disfunción endotelial y de ECV [65]. Las HDL favorecen la función endotelial, aumentando la síntesis de NO [140], entre otros mecanismos. Estos efectos son dependientes en gran medida de la interacción de su proteína mayoritaria (apoA-I) con receptores de la superficie endotelial [94,98].

Si bien es conocida la función protectora de apoA-I asociada a las HDL, aún no hay claridad sobre el efecto que esta proteína libre de lípidos pueda realizar en la regulación del tono vascular. Por este motivo, la finalidad de este trabajo fue determinar el efecto de apoA-I humana sobre el tono de dos modelos de vasos sanguíneos humanos y la participación del receptor ecto-F₁-ATPasa en este efecto. Para esto, se realizaron 4 objetivos principales:

- 1.- Producir apoA-I humana recombinante (apoA-Ihr).

2.- Confirmar la expresión ecto-F₁-ATPasa en el endotelio de los vasos sanguíneos utilizados en este estudio.

3.- Evaluar el efecto de apoA-I sobre el tono de vasos sanguíneos humanos.

4.- Establecer si el efecto de apoA-I sobre el tono de vasos sanguíneos es dependiente del receptor ecto-F₁-ATPasa.

Producción de apoA-I humana recombinante

La apoA-I es el principal componente proteico de las HDL, comprendiendo hasta el 70% del total de sus proteínas [69]. La apoA-I tiene una gran relevancia fisiológica, dado su rol central en el metabolismo de colesterol y en efectos protectores directos a nivel de la pared vascular, tanto en su forma asociada a HDL como libre de lípidos [94,140]. En consecuencia, su obtención para investigación y fines terapéuticos es de gran importancia.

En esta tesis, el primer objetivo fue producir apoA-Ihr, debido a la gran cantidad de proteína requerida para el desarrollo de los ensayos de miografías, con los cuales se determinó los cambios en el tono de vasos sanguíneos. Actualmente, es posible producir apoA-I de manera recombinante mediante técnicas de biología molecular, utilizando distintos tipos de células, como bacterias [141,142,143], líneas celulares de mamífero [86,98,144], levaduras [145], entre otros, todas ellas con diferentes grados de éxito. En esta tesis se produjo apoA-Ihr, utilizando vectores adenovirales, según el manual de protocolo *AdEasy™-Vector System*. Los adenovirus son vectores ampliamente utilizados como sistema de entrega de genes exógenos. A la fecha, se han identificado más de 40 serotipos distintos de adenovirus y 93 variedades diferentes, los cuales infectan generalmente el epitelio ocular, respiratorio o gastrointestinal [146]. El uso de vectores adenovirales presenta una serie de ventajas comparativas [147,148,149,150], frente a otras formas de producción de proteínas recombinantes antes mencionadas, como por ejemplo:

- Poseen un amplio tropismo, infectando una amplia gama de células de mamíferos.
- Pueden transducir células quiescentes y células en división.
- Se expresan de forma episomal en la célula huésped.

- Son sistemas bien caracterizados bioquímica y genéticamente.
- Pueden ser amplificados a grandes títulos (10^{10} a 10^{11} UFC/mL, los cuales pueden concentrarse hasta 10^{13} UFC/mL).
- Permiten la inserción de hasta 7,5 kb de ADN exógeno.
- Si se utiliza un adenovirus con tropismo para células humanas, se logra la expresión de proteínas con la estructura y modificaciones post-traduccionales características de esta especie.

El vector adenoviral más comúnmente utilizado es el adenovirus humano serotipo 5. Este adenovirus carece del gen E1, lo que genera virus defectuosos en su replicación e incapaces de producir partículas virales infecciosas en la célula huésped. Además, este vector no presenta la región E3, la cual codifica proteínas involucradas en la evasión del sistema inmune. Estas deleciones crean espacio en el vector para el ADN exógeno y elimina la capacidad de su auto-replicación en la célula huésped.

La construcción del adenovirus recombinante es un proceso de 2 pasos. El primero consiste en la inserción del gen (o genes) que se desean expresar, en un vector de transferencia (Figuras 5 y 11), en este caso se utilizó pAdTrack. En la segunda etapa, el vector de transferencia resultante es insertado en el genoma adenoviral por recombinación homóloga, obteniéndose el vector adenoviral con la información del gen que se desea expresar, en nuestro caso fue pAdEasy-apoA-I (Figuras 6 y 14). Esta secuencia se debe a que el ADN adenoviral consiste en un gran genoma (36 kb) que contiene secuencias para casi todas las enzimas de restricción. De esta manera, el vector de transferencia permite incorporar secuencias de ADN más pequeños en el vector adenoviral. Posteriormente, el adenovirus fue producido en células HEK-293A, ya que son células transformadas que completan la formación del adenovirus, al transferir *in trans* los genes E1 para la replicación adenoviral. La generación del adenovirus se evidencia en los cultivos celulares con la formación de halos de lisis (Figura 15). Estos se producen por un mecanismo aún no descrito, pero estaría involucrada la degradación del citoesqueleto celular, lo que hace a la célula más vulnerable a la lisis, facilitando la liberación de las copias adenovirales y la posterior infección a las células vecinas [151].

Para la producción de proteínas recombinantes mediante infección con vectores adenovirales, existen varias líneas celulares, como por ejemplo Hela, Caski, HT-3 y SiHa, todas ellas provenientes de cáncer cervical humano. Su importancia radica en la expresión del receptor de coxsackie virus y adenovirus (CAR), el cual hace susceptible a la célula a la infección por adenovirus [152].

La producción de apoA-Ihr fue realizada en células SiHa (Figura 16) una línea proveniente del epitelio de un cáncer cervical, infectadas con el virus del papiloma humano variante 16 (VPH-16) [152]. El análisis de los medios de cultivo mediante *western blot* muestra la producción de apoA-Ihr, observándose una banda única cercana a los 25 kDa. En cuanto a la cuantificación de apoA-Ihr, ésta no pudo ser realizada por los métodos tradicionales (Bradford, Lowry, etc.), con los cuales se subestimaba la cantidad de proteína recombinante. Puesto que los ensayos de *western blot* con el anticuerpo anti 1C11B7 permitían detectar apoA-Ihr con una señal correlacionada con la cantidad de proteína estimada en el medio de cultivo, se intentó cuantificar apoA-Ihr mediante un ELISA competitivo, utilizando como estándar apoA-I plasmática (datos no mostrados). Con esta aproximación, también se obtuvo resultados que sub-estiman la cantidad de proteína, lo cual se debe, al parecer, a que el anticuerpo utilizado no presenta la misma afinidad por la proteína en solución o en matriz (gel). Dados estos inconvenientes, se optó por un método semi-cuantitativo en *western blot*, comparando la señal de las bandas de apoA-I plasmática de concentración conocida con la apoA-Ihr, y corroborado su concentración con la actividad biológica.

En cuanto a la purificación de apoA-Ihr desde los medios de cultivo, inicialmente se propuso utilizar una técnica asociada al reconocimiento de la cola de histidina presente en el extremo C-terminal del constructo de apoA-I, como es la cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC). En los ensayos de *western blot* realizados para la detección de la cola de histidina, ningún anticuerpo arrojó señal positiva (Figura 12B). Esto puede explicarse porque la cola de histidina se puede encontrar oculta en la estructura terciaria de la proteína; sin embargo, los ensayos de *western blot* fueron realizados bajo condiciones denaturantes, que debieran exponer la totalidad de la estructura primaria de la apoA-I. Estos antecedentes nos llevan a pensar en algún problema en la expresión de la cola de histidina o

en algún clivaje realizado en el cultivo celular. Para confirmar la presencia de la cola de histidina de la apoA-Ihr, sería necesario secuenciar esta proteína.

Dados los inconvenientes en la detección de la cola de histidina, se decidió implementar otro método de purificación, como es la separación desde gel, como se realizó con la apoA-I plasmática. Este método es descrito en bibliografía para obtener apoA-I desde plasma humano, sin alterar sus características funcionales [133]. Este protocolo permitió la obtención de apoA-I plasmática de manera pura, sin interferentes, según lo observado por tinción de gel SDS-PAGE. Sin embargo, la confirmación de la pureza de apoA-Ihr y de apoA-I plasmática aislada por este método debiera ser realizada por técnicas más sensibles, como HPLC.

En cuanto a la producción masiva de apoA-Ihr, se ha descrito en bacterias un rendimiento de 20 mg de proteína por litro de medio de cultivo [153]. En este trabajo se obtuvo 500 mg de proteína por litro de medio de cultivo, superando ampliamente lo descrito por otros autores en otro sistema. Este rendimiento permitió generar apoA-Ihr para esta tesis y para otros trabajos realizados en nuestro laboratorio. Si bien este rendimiento es óptimo, éste podría ser aún mejor, si se considera que los resultados obtenidos en esta tesis derivaron de la utilización de adenovirus sin purificar desde los lisados de células HEK-293A. De esta manera, si se realizaran los mismos ensayos, esta vez con adenovirus purificados por ultracentrifugación con CsCl, se podría obtener mejores rendimientos de la proteína recombinante.

Los análisis de actividad biológica mostraron que apoA-Ihr es una proteína funcional, lo cual fue confirmado con distintas aproximaciones experimentales (proliferación, biodisponibilidad de NO, actividad de la eNOS, ensayos de miografía, Figuras 19, 20, 21). En todos estos ensayos, apoA-Ihr se comportó de manera similar a la apoA-I obtenida desde plasma, a concentraciones similares.

Expresión de ecto-F₁-ATPasa

El segundo objetivo tuvo relación con la confirmación de la expresión de ecto-F₁-ATPasa en el endotelio de los vasos sanguíneos utilizados en esta tesis: vena de cordón umbilical y vena coriónica, ambas aisladas desde humanos. Aunque las células endoteliales comparten ciertas funciones, también presentan diferencias considerables, tanto morfológica como funcionalmente, en una misma especie, en función del lecho vascular de origen y el tamaño de los vasos sanguíneos que recubren [154]. Por este hecho, se decidió trabajar con dos tipos vasculares distintos, que validen el efecto biológico de apoA-I sobre el tono vascular y la dependencia de ellos en el receptor ecto-F₁-ATPasa. Si bien estos modelos endoteliales provenientes de la circulación feto-maternal (cordón umbilical y placenta) corresponden a venas, estas presentan características diferentes a la circulación del recién nacido y del adulto. Los nutrientes y oxígeno que necesita el feto vienen de la madre hacia las venas placentarias y posteriormente la vena umbilical y luego al feto. De esta manera, estas venas en el feto representan morfológica y funcionalmente a las arterias en un individuo.

La ATP sintasa, o complejo V de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria, ha sido descrita en la superficie de diferentes tipos celulares, donde se ha denominado ecto-F₁-ATPasa, por su actividad hidrolasa de ATP. En células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), ecto-F₁-ATPasa fue descrita inicialmente por Moser en los años 90 [115], y en 2009 se identificó como un receptor de alta afinidad para apoA-I [103]. Sin embargo, en células endoteliales de vena placentaria humana, no se ha descrito este receptor. Mediante inmunohistoquímica, se demostró la expresión de la cadena β de la ecto-F₁-ATPasa en este tipo endotelial, presentando un patrón membranoso similar al observado en vena umbilical (Figura 24). Este marcaje se observa hacia el lumen, asociado a la clásica estructura de monocapa (Figura 23). El protocolo de marcaje se realiza en ausencia de detergentes, a fin de minimizar la permeabilización de los tejidos; a pesar de ello, no se puede descartar un posible marcaje intracelular que, en este caso, pudiera corresponder a la ATP sintasa mitocondrial. Sin embargo, en células musculares lisas se observó un marcaje inespecífico, no concluyente de la presencia de este receptor en estas células. El marcaje observa en células endoteliales apoya el hecho que la señal en el endotelio se debe a la expresión de la enzima en la superficie celular. Sumado a ello, el patrón de tinción

presentado para ecto-F₁-ATPasa en ambos tipos de vasos sanguíneos es similar al observado para CD31 (Figura 22), el cual es un marcador específico de la superficie de células endoteliales [137,138].

Los resultados obtenidos son concordantes con la expresión constitutiva de este receptor en células endoteliales de cordón umbilical [103,115] y representan la primera evidencia de la presencia de ecto-F₁-ATPasa en la superficie de células endoteliales de vena placentaria humana.

Efecto vasodilatador de apoA-I humana

Diversos estudios han abordado el efecto de apoA-I en la regulación del tono vascular; sin embargo, esto aún es tema de controversia [95,96,97,99,100,155]. Además, hay quienes postulan que apoA-I *per se* no afecta la función endotelial, sino que esta proteína en el ambiente lipídico de las HDL la que genera los efectos positivos de estas lipoproteínas [89,156].

Para aclarar esta discrepancia, nuestros primeros ensayos consistieron en realizar una curva de distintas concentraciones de apoA-I y evaluarlas en el tiempo, tanto en vena umbilical como en vena coriónica. En ambos tipos de vasos, a 25 µg/mL se observa una tendencia de un efecto vasodilatador pero que no alcanza a ser significativo, esto puede deberse a que las concentraciones plasmáticas de apoA-I libre fluctúan entre los 45-178 µg/mL, por lo que 25 µg/mL está muy por debajo de las concentraciones fisiológicas de esta proteína. Cuando los vasos fueron estimulados con 100 µg/mL de apoA-I, se observa algo parecido a lo descrito anteriormente, se observa (Figura 25) una tendencia a vasodilatar los primeros minutos, pero este efecto no alcanza significancia estadística. Este resultado podría explicarse ya que en el modelo de trabajo no sólo encontramos el endotelio vascular sino que también tejido sub-endotelial, como musculo liso. En este, no han sido descritos receptores de apoA-I, pero no podemos descartar el efecto que apoA-I pueda tener sobre este tejido, el cual puede ser contrario al ejercido por el endotelio.

Por otro lado, se observó un efecto vasodilatador de apoA-I, con respecto a la condición basal a 50 µg/mL, diferencia que fue estadísticamente significativa, desde los primeros minutos de incubación y hasta el final de los análisis (Figura 25). Estos resultados fueron similares para apoA-I aislada desde plasma como para apoA-I_{hr} (Figura 21). El efecto

vasodilatador observado con apoA-I 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ alcanzó un 37,15% vena umbilical y un 22,02% en vena coriónica (Figura 26), esta diferencia se puede deber ya que si bien las células endoteliales comparten ciertas funciones comunes, también presentan diferencias considerables tanto morfológica como funcionalmente dentro de la misma especie en función del lecho vascular de origen y el tamaño de los vasos [154]. Estos resultados, a nivel fisiológico, constituyen un efecto importante. En este contexto, las miografías se realizan con anillos de vasos sanguíneos, pero *in vivo* el efecto de apoA-I podría afectar a todo el árbol vascular, como por ejemplo, el sistema coronario o cerebrovascular, dos de las zonas de más riesgo de hipertensión. Por lo tanto, si *in vivo* los vasos sanguíneos de una zona particular tuvieran una dilatación de la magnitud señalada con apoA-I, produciría una baja de la presión sanguínea, que se traduciría, por ejemplo, en normalizar presiones arteriales levemente aumentadas o en disminuir el riesgo de presiones extremadamente elevadas.

El control de la hipertensión es de gran importancia, debido a las alarmantes cifras de prevalencia de esta condición en la población mundial y en nuestro país. Según la Encuesta Nacional de Salud de 2010, un 65,05% de la población chilena padece problemas de presión arterial elevada y sólo el 37,26% de ellos se encuentra bajo tratamiento antihipertensivo. Esto abre un blanco de estudio de esta enfermedad, cómo prevenirla y cómo tratarla, con el fin de evitar patologías más severas, como las ECV. En la actualidad, se clasifica como hipertenso en etapa I a aquellas personas que en dos mediciones de presión arterial en cada brazo, separados al menos 30 seg, en días distintos y en un lapso no mayor a 15 días, arroja una presión cuyo promedio de mediciones sea mayor o igual a 140/90 mmHg, mientras en etapa 3 se clasifican a los individuos con una presión sobre los 180/110 mmHg. Si los resultados obtenidos en este trabajo se aplicaran a los valores de hipertensión señalados, los pacientes en etapa 1 podrían alcanzar valores normales de presión arterial, mientras los pacientes en etapa 3 podrían alcanzar los valores de etapa 1 o incluso llegar a los rangos de referencia normales.

Actualmente, la terapia farmacológica de primera línea para el manejo de la hipertensión arterial son los beta bloqueadores, diuréticos, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y antagonistas de los receptores de angiotensina, bloqueadores receptores alfa, entre otros [157,158]. Todos estos fármacos presentan efectos secundarios, dentro de los cuales destacan la hiponatremia, hiper/hipokalemia, intolerancia a la glucosa,

hipotensión ortostática, disfunción eréctil, bradicardia, depresión, deterioro de la función renal, entre otras. Frente a esto, una posible terapia con apoA-I presenta ventajas comparativas, puesto que al ser una molécula endógena, se reducen las posibilidades de efectos secundarios.

Nuestros resultados demuestran que el efecto vasodilatador generado por apoA-I es totalmente dependiente del endotelio vascular, en particular de la síntesis de NO por la eNOS, como lo establece la total reversión del efecto de apoA-I en presencia de L-NAME, un inhibidor competitivo de la eNOS, y la remoción mecánica el endotelio (Figura 27 y 28, Figura anexas 1 y 2). Estos resultados se condicen con los resultados previos en nuestro laboratorio con cultivos de células endoteliales HUVEC, en los cuales apoA-I libre 50 $\mu\text{g/mL}$ aumenta la actividad de la eNOS en un 72%, determinado por ensayos de conversión de L-[^3H] arginina a L-[^3H] citrulina [95], al igual que la fosforilación de la eNOS en el residuo activador Ser-1177 [96].

Si bien se ha establecido que apoA-I asociada a las HDL genera efectos protectores a nivel endotelial, los resultados aquí presentados apoyan la tesis que apoA-I libre, a concentraciones fisiológicas, ejerce un efecto vasodilatador sobre el endotelio vascular.

Receptores de apoA-I implicados en el efecto vasodilatador

En células endoteliales de vena umbilical (HUVEC), ecto- $\text{F}_1\text{-ATPasa}$ ha sido descrito como un receptor de alta afinidad para apoA-I libre, con un valor de constante de disociación (K_d) de 13 $\mu\text{g/mL}$ a 37°C (B_{max} : 450 ng apoA-I / mg proteína celular). Además, ecto- $\text{F}_1\text{-ATPasa}$ en este tipo celular es responsable del 70% de la unión de apoA-I a la superficie celular, mientras el 30% restante correspondería al transportador ABCA1 [103]. Por este motivo, el principal candidato para mediar la vasodilatación generada por apoA-I en los anillos de vasos sanguíneos es ecto- $\text{F}_1\text{-ATPasa}$. Para confirmar esta hipótesis, se utilizó dos inhibidores específicos: IF_1 y oligomicina. Los resultados obtenidos demuestran que ecto- $\text{F}_1\text{-ATPasa}$ participa de manera central en el efecto de apoA-I, ya que la presencia de estos inhibidores revierte completamente la vasodilatación generada por esta proteína. De manera interesante oligomicina incubada de manera individual produce una vasoconstricción por sobre la condición basal, efecto que es estadísticamente significativo en vena coriónica (Figura 29 y Figura anexa 4). Por el contrario, IF_1 se comporta como el control basal (Figura

29 y Figura anexa 3). Esta diferencia podría atribuirse a los mecanismos de acción ejercida por estas moléculas. IF₁ es una proteína mitocondrial que se une a la forma de homodímero al dominio catalítico F₁ de la ATP sintasa [114]. Esta actividad también ha sido descrita en la superficie de células endoteliales, donde inhibe igualmente a ecto-F₁-ATPasa [103]. Por otro lado, oligomicina A es un antibiótico de la familia de los macrólidos, que actúa bloqueando el canal de protones del dominio F₀, de la ATP sintasa, a través de la unión a la sub-unidad OSCP (*oligomycin sensitivity-conferring protein*). Si bien la concentración utilizada de oligomicina A es la descrita para inhibir la ecto-F₁-ATPasa en la superficie endotelial sin afectar la ATP sintasa mitocondrial, no se puede descartar la posibilidad que las células musculares lisas presenten distinta sensibilidad a esta molécula, pudiendo en este tejido verse afectada la función de la ATP sintasa mitocondrial. A la fecha no se ha reportado la expresión de ecto-F₁-ATPasa en la superficie de las células musculares lisas, pero no se puede descartar su presencia en ellas, la cual igualmente pudiera ser afectada por oligomicina A. A diferencia de oligomicina A, que es un antibiótico de la familia de los macrólidos, IF₁ es una proteína la cual de igual forma podría tener una dualidad de acción tanto a nivel de superficie endotelial como a nivel mitocondrial, sin embargo a la fecha no se ha descrito un mecanismo de transporte de proteínas desde la superficie celular hacia la mitocondria. Dado esto IF₁, parece ser, más específico para inhibir ecto-F₁-ATPasa en la superficie celular.

De manera interesante el efecto vasodilatador, observado vía ecto-F₁-ATPasa se opone a lo obtenido por el grupo de Osanai [123,126,127], quienes describen que CF6, un componente propio de la ATPasa mitocondrial, se encontraría elevado en plasma frente a diferentes estímulos, como *shear stress*, TNF α y alta glucosa. Este factor se une a la subunidad β de la ATP sintasa de superficie, lo cual conduce a una acidosis intracelular, resultando en la elevación de la presión arterial e inducción de moléculas pro-aterogénicas, debido a la inhibición de la generación de prostaciclina y NO. Estos efectos se llevarían a cabo, ya que CF6 aumenta la liberación de ADMA, un competidor de L-arginina por el sitio catalítico de eNOS. Nuestros resultados proponen un nuevo mecanismo de acción de ecto-F₁-ATPasa en el control de la presión arterial, vía apoA-I libre, el que involucra la activación de la eNOS y la subsecuente liberación de NO.

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, existen otros receptores de apoA-I en la superficie endotelial, como ABCA1 y SR-BI, los cuales reconocen esta proteína a la forma

libre de lípidos y asociada a las HDL, respectivamente [88,108]. ABCA1 juega un rol central en el eflujo de colesterol, y se encuentra expresado en macrófagos, fibroblastos y hepatocitos, principalmente [79]. En células endoteliales, la expresión de esta proteína es baja [159], y se asocia al transporte reverso del colesterol y la transcitosis de apoA-I [102,108]. Dados estos antecedentes, se evaluó la participación de ABCA1 utilizando el inhibidor glibenclamida, esperando que su aporte sea mínimo, comparado con ecto-F₁-ATPasa, como ha sido demostrado en otros estudios [103]. Glibenclamida inhibe ABCA1 a través de la supresión de la actividad ATPasa de este transportador. La concentración utilizada de glibenclamida (250 μ M) ha sido reportada en otros estudios como suficiente para la inhibición de ABCA1 [160].

Como se observa en la Figura 30 y más aún en la Figura anexa 5, glibenclamida inhibe por completo el efecto vasodilatador observado con apoA-I. De manera sorprendente, glibenclamida aumenta la tensión de los vasos sanguíneos por sobre la condición basal, siendo estadísticamente significativo en vena umbilical humana. Si bien glibenclamida es un inhibidor de ABCA1, en literatura se describe que, a la concentración utilizada en estos ensayos, puede ejercer efectos independientes de este transportador, como es el bloqueo de canales de potasio dependientes de ATP. Esta acción genera una depolarización de membrana de células musculares lisas, lo cual promueve el influjo de Ca²⁺, mediante la apertura de canales de Ca²⁺ voltaje dependiente, y así eleva la tensión vascular. Por otro lado, glibenclamida induce vasodilatación dependiente de endotelio, lo cual involucra la síntesis de NO a través del aumento de los niveles de calcio endotelial, e independiente de endotelio, donde también involucra la movilización de calcio y la actividad de proteína kinasa C [161]. Debido a esto, los resultados obtenidos con glibenclamida debieran ser confirmados con otra metodología de mayor especificidad, como es el uso de siRNA para ABCA1 en cultivo de células endoteliales o bien el uso de anticuerpos bloqueantes específicos para este transportador.

Con respecto a SR-BI, la activación de este receptor es realizada por las HDL a través de interacciones con apoA-I [88]. Para determinar la participación de SR-BI en los resultados con apoA-I, se utilizó el inhibidor BLT-1 [162]. Los BLTs (*Block Lipid Transport*) son una familia de moléculas bloqueadores específicos del transporte de lípidos a través de SR-BI. Entre ellos, BLT-1 ha sido descrito como el inhibidor más potente de SR-BI. Como se

muestra en la Figura 31 y la Figura anexa 6, la co-incubación de BLT-1 no modifica el efecto vasodilatador de apoA-I, lo cual excluye la participación de SR-BI en estos efectos y apoya el hecho que la apoA-I utilizada se encuentra libre de lípidos al momento de ser adicionada a los vasos sanguíneos y no se lipida durante el tiempo de los ensayos.

Con estos resultados se concluye que en el efecto vasodilatador de apoA-I, participa el receptor ecto-F₁-ATPasa. Además se concluye que es necesario investigar la real implicancia de ABCA1 sobre este efecto, utilizando otra metodología.

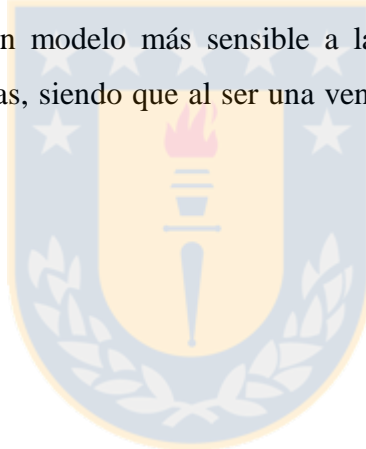
ADP como posible mediador del efecto de apoA-I vía ecto-F₁-ATPasa

Debido a que se postula que los efectos biológicos producidos por ecto-F₁-ATPasa dependen de la generación extracelular de ADP, como consecuencia de la actividad hidrolasas de esta enzima, se realizó ensayos con ADP. Los resultados muestran que ADP no genera cambios en la tensión de anillos umbilicales ni placentarios (Figura 32 y Figura anexa 7), lo cual se puede deber a una ausencia real de efecto de este nucleótido o a la hidrólisis que puede sufrir esta molécula en la superficie celular. Se han descrito una serie de ecto-nucleotidasas en la superficie de células endoteliales, las cuales se agrupan principalmente en dos grupos capaces de fosforilar y formar ATP (adenosina → AMP → ADP → ATP) como también hacer la reacción inversa. Estas son 1) ATP-difosfohidrolasa y 5'- nucleotidasa; 2) ecto-nucleótido quinasas, adenilato quinasas y nucleósido difosfato quinasas [163]. Para dilucidar estas posibilidades, se repitió estos ensayos con un análogo no hidrolizable de ADP, denominado 5'-β-thio-diphosphate, ADPβS [164]. Los experimentos realizados con ADPβS presentan una tendencia a la vasodilatación, la cual alcanza significancia estadística a 10 nM en vena coriónica (Figura 33 y Figura anexa 8). Al co-incubar ADPβS 10nM con L-NAME (200 μM) el efecto vasodilatador fue revertido (Figura 34 y Figura anexa 9), evidenciando así el posible rol de ADP en la activación de eNOS y la subsecuente formación de NO. Estos resultados evidencian además el posible papel que podría cumplir ADP, como producto de la actividad de ecto-F₁-ATPasa.

En la superficie de células endoteliales se han descrito una serie de receptores P2Y como P2Y₁, P2Y₁₁, P2Y₁₂ [165]. Entre ellos, aquéllos activados preferencialmente por ADP son P2Y₁ y P2Y₁₂ [166]. Se ha descrito que el receptor P2Y₁ contribuye a la re- endotelización y angiogénesis luego de una injuria vascular [167], y que P2Y₁₂ media la

captación y transporte de HDL y apoA-I libre, en células endoteliales, vía estimulación de ecto-F₁-ATPasa con apoA-I y la subsecuente generación de ADP [122]. Con estos antecedentes, y para corroborar que el efecto vasodilatador de apoA-I vía ecto-F₁-ATPasa depende de la síntesis de ADP, se podría complementar estos ensayos utilizando inhibidores selectivos de P2Y₁ y P2Y₁₂ en presencia de apoA-I, en cultivos de células endoteliales.

En cuanto a los vasos sanguíneos utilizados en esta tesis, ambos son aislados desde tejidos de humanos, por lo cual constituyen una buena herramienta de estudio. La mayor diferencia entre ambos modelos radica en que la vena umbilical representa un vaso de la macrovasculatura, mientras las venas placentarias representan más a la microvasculatura. A pesar de esto, los resultados obtenidos son concordantes entre sí, principalmente en lo que respecta a los objetivos principales de esta tesis, lo cual valida los hallazgos observados previamente en cultivos de células endoteliales HUVEC. Resulta interesante evidenciar que la vena umbilical resultó ser un modelo más sensible a las moléculas utilizadas en este estudio que las venas placentarias, siendo que al ser una vena de mayor calibre, se esperaba lo contrario.



CONCLUSIONES

1. En este trabajo se produjo 2 herramientas moleculares, primero un adenovirus para la síntesis de apoA-I humana recombinante y segundo la proteína apoA-I humana recombinante la cual resulto ser una proteína biológicamente funcional.
2. Nuestros resultados demuestran que apoA-I libre produce vasodilatación, mediante la síntesis de NO, vía eNOS, a través de la actividad de ecto-F₁-ATPasa. Estos resultados representan la primera evidencia experimental *ex vivo* en tejido humano de la participación de ecto-F₁-ATPasa en el efecto de apoA-I a nivel endotelial.



PROYECCIONES

Los resultados y productos generados en esta tesis permiten ampliar el estudio de los efectos biológicos de apoA-I. Para ello, se proponen las siguientes líneas de investigación:

1.- La producción del adenovirus y apoA-Ihr abre un nuevo campo de estudio tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, el adenovirus puede ser utilizado para infectar células o tejidos y potenciar su funcionalidad, mediante la síntesis de apoA-I. En relación a apoA-Ihr, ésta podría ser utilizada para estudios en pacientes, con el fin de evaluar futuras terapias farmacológicas para enfermedades agudas y crónicas de alta prevalencia en el mundo y nuestra población, como son la hipertensión y la ECV.

2.- Los ensayos realizados con vasos sanguíneos incluyen efectos de apoA-I e inhibidores sobre el endotelio, el sub-endotelio, tejido muscular y tejido conectivo. Por esto mismo, la real implicancia de cada molécula sobre cada tipo celular, se torna compleja. Para dilucidar el efecto de apoA-I e inhibidores sobre cada tejido, sería importante trabajar con cada uno de ellos por separado, en cultivos celulares. A este respecto, sería interesante investigar el efecto de apoA-I en las células musculares lisas, así como comprobar la expresión de ecto-F₁-ATPasa y otros receptores de apoA-I en ellas.

3.- En cuanto a ABCA1, glibencamida resultó ser un inhibidor muy inespecífico, el cual actúa no sólo sobre este transportador, sino sobre otros blancos en células endoteliales y en células musculares lisas. Por esto se sugiere dilucidar la real implicancia de ABCA1 en el efecto de apoA-I libre, en cultivo celular, mediante el uso de anticuerpos bloqueantes específicos para el receptor o por siRNA para ABCA1.

4.- En cuanto al ADP, falta aún por comprobar la implicancia de esta molécula a nivel endotelial en los efectos observados. Una aproximación para ello sería trabajar en cultivo celular, a fin de evitar el aporte del músculo liso en estos efectos. Por esto mismo, se torna interesante conocer los receptores purinérgicos implicados en los efectos observados, para lo

cual se podría trabajar con inhibidores para receptores P2Y₁ y P2Y₁₂, los que han sido asociados a efectos protectores a nivel endotelial.

5.- En esta tesis se trabajó a tiempos cortos de incubación con apoA-I e inhibidores (<30 min). Por este motivo, resulta interesante dilucidar si los efectos observados son similares frente a la exposición prolongada con esta proteína, tanto en vasos sanguíneos como en cultivos de células endoteliales.



ANEXOS

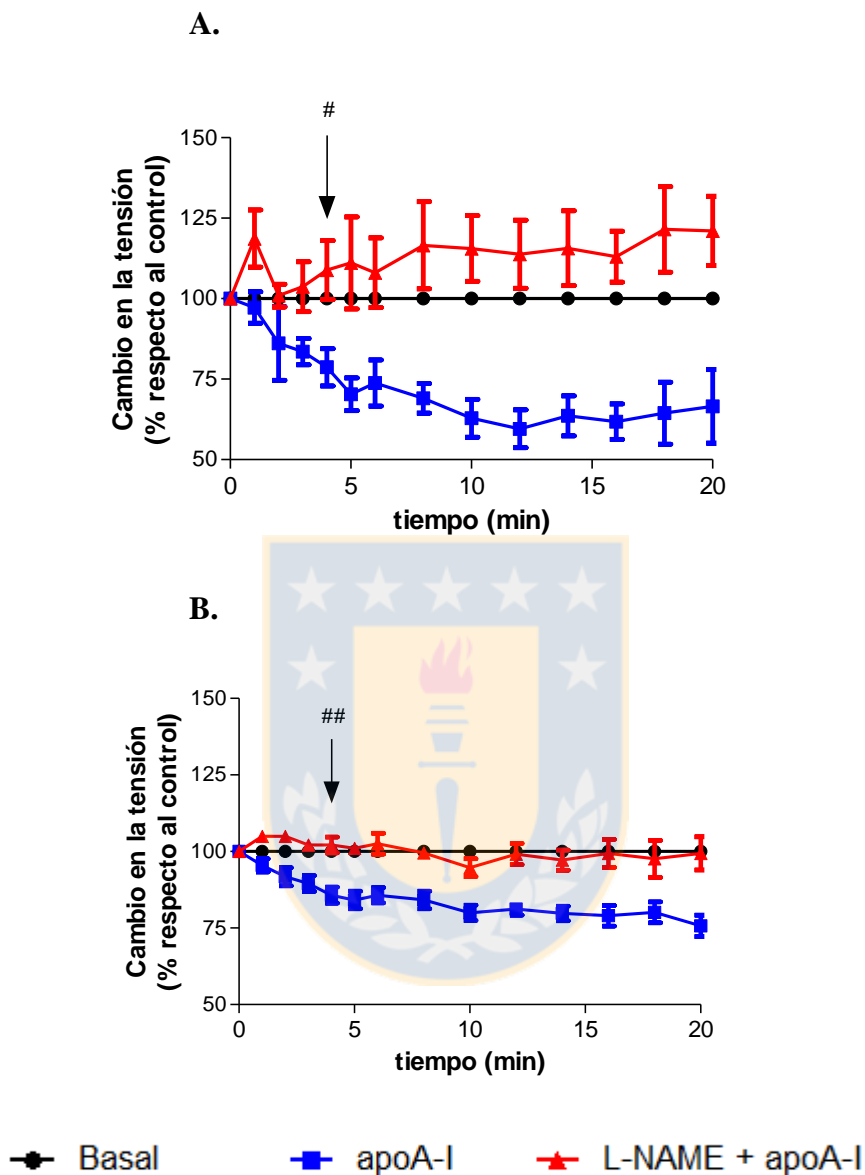
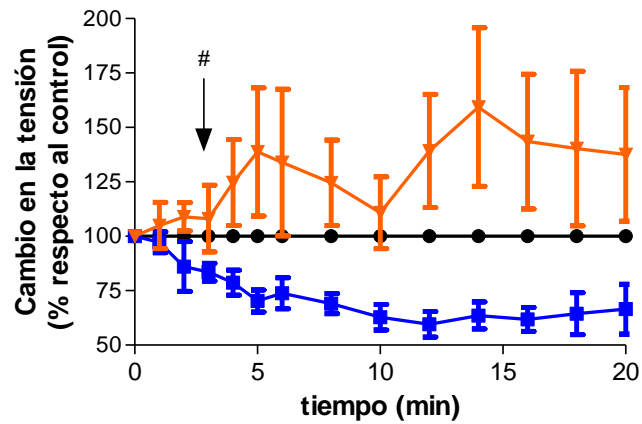


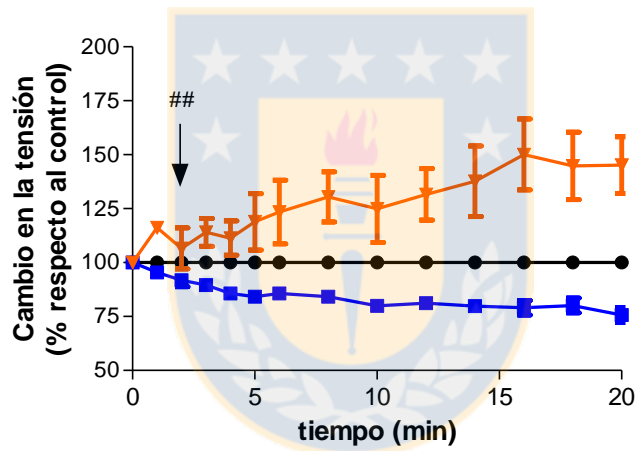
Figura anexa 1: Curvas de tiempo para el efecto de la inhibición de la eNOS, sobre la vasodilatación generada por apoA-I

Anillos venosos obtenidos desde vena umbilical humana (A) y de venas secundarias de placenta (B), fueron pre-incubados con L-NAME (200 μ M) por 45 min, luego de lo cual se agregó apoA-I 50 μ g/mL y los cambios en la contracción isométrica fueron registrados durante 20 min. Las flechas indican el tiempo desde el cual la inhibición es estadísticamente significativa en ambas venas. Los valores son expresados como el promedio \pm error estándar. $n \geq 3$ experimentos independientes. # $p < 0,05$; ## $p < 0,001$ vs apoA-I.

A.



B.



● Basal ■ apoA-I ▲ apoA-I sin endotelio

Figura anexa 2: Curvas de tiempo para el efecto de la abrasión mecánica del endotelio, sobre la vasodilatación generada por apoA-I

Anillos de vena umbilical (A) y de venas coriónicas (B) fueron sometidos a la remoción del endotelio. Luego de inducir contracción con U46619 (100 nM), se adicionó apoA-I (50 µg/mL), y los cambios en la contracción isométrica fueron registrados durante 20 min. Las flechas indican el tiempo desde el cual la inhibición es estadísticamente significativa. Los valores son expresados como el promedio ± error estándar. $n \geq 3$ experimentos independientes. # $p < 0,05$; ## $p < 0,001$ vs apoA-I.

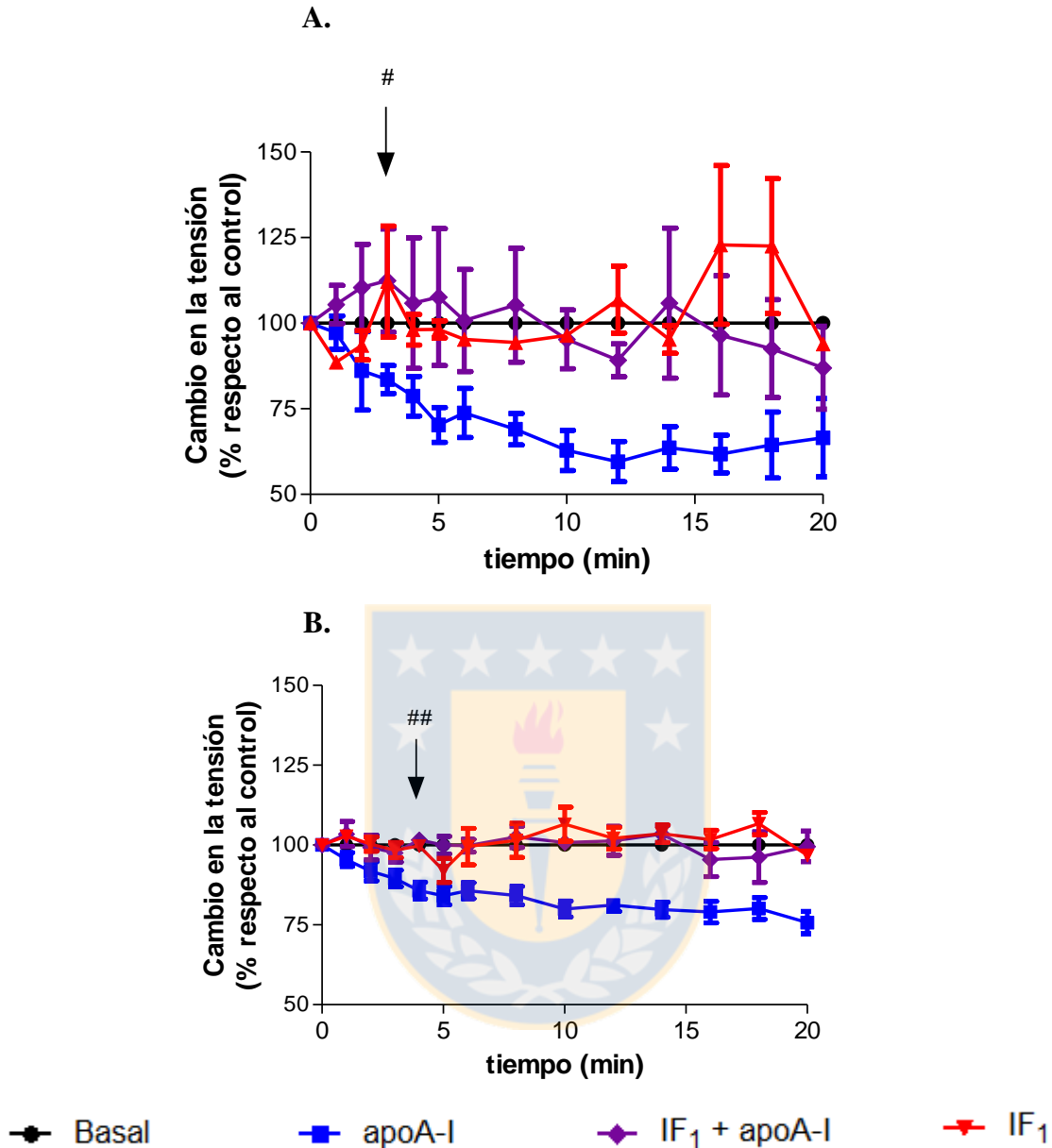


Figura anexa 3: Curva de tiempo para el efecto de la inhibición de ecto-F₁-ATPasa con IF₁, sobre la vasodilatación generada por apoA-I

Anillos de vena umbilical (A) y de vena coriónica (B) fueron incubados con IF₁ (1,8 μM), 15 min antes del tratamiento con U46619 (100 nM). Una vez alcanzada la máxima contracción con U46619, se adicionó apoA-I (50 μg/mL), y los cambios en la contracción isométrica fueron registrados durante 20 min. Las flechas indican el tiempo desde el cual la inhibición es estadísticamente significativa. Los valores son expresados como el promedio ± error estándar. n ≥ 3 experimentos independientes. #p<0,05; ##p<0,001 vs apoA-I.

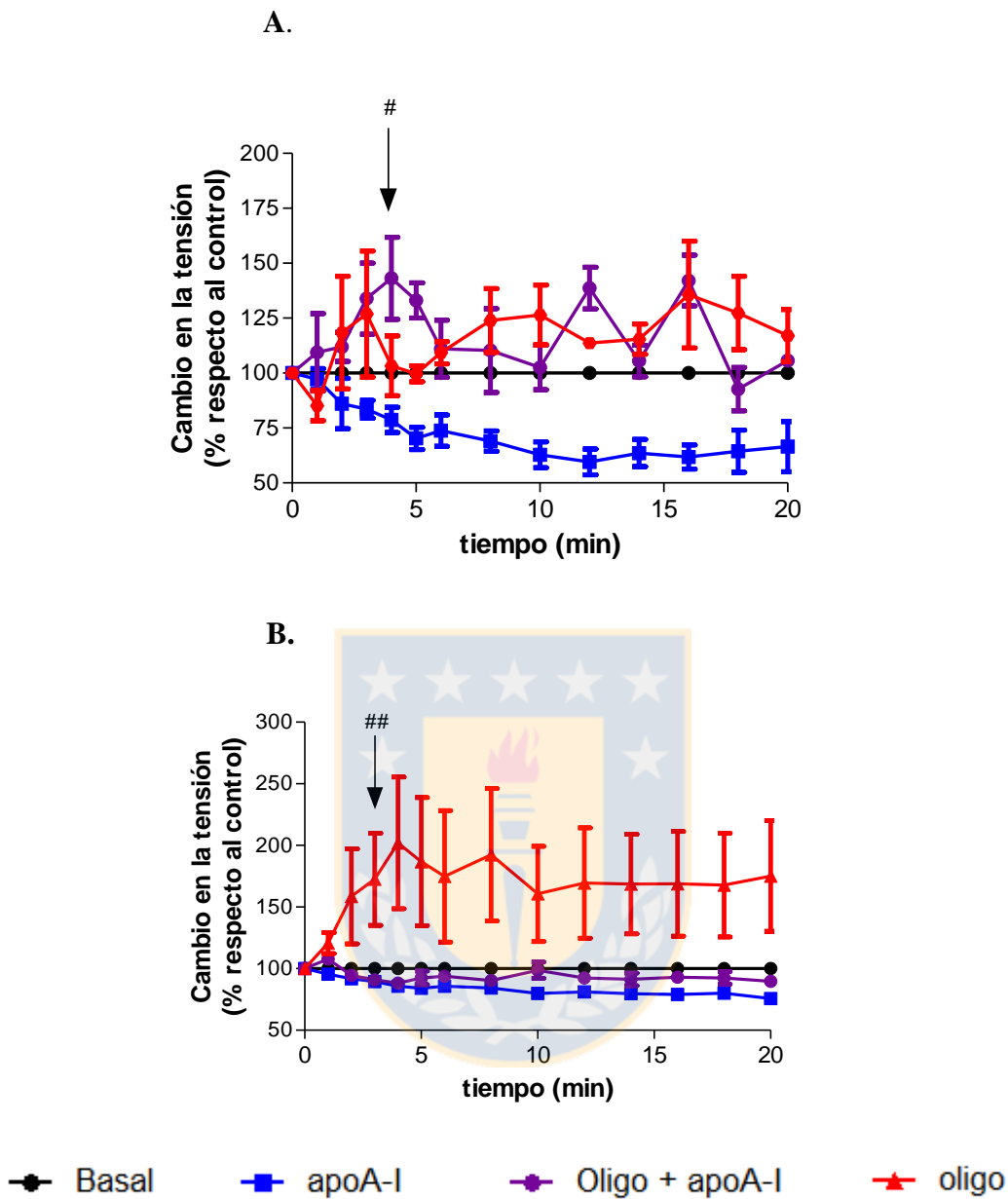


Figura anexa 4: Curva de tiempo para el efecto de la inhibición de ecto-F₁-ATPasa con oligomicina, sobre la vasodilatación generada por apoA-I

Anillos de vena umbilical (A) y de vena coriónica (B) fueron incubados con oligomicina A (oligo, 125 nM), 15 min antes del tratamiento con U46619 (100 nM). Una vez alcanzada la máxima contracción con U46619, se adicionó apoA-I (50 µg/mL) y los cambios en la contracción isométrica fueron registrados durante 20 min. Las flechas indican el tiempo desde el cual la inhibición es estadísticamente significativa. Los valores son expresados como el promedio ± error estándar. $n \geq 3$ experimentos independientes. # $p < 0,05$; ## $p < 0,005$ vs apoA-I.

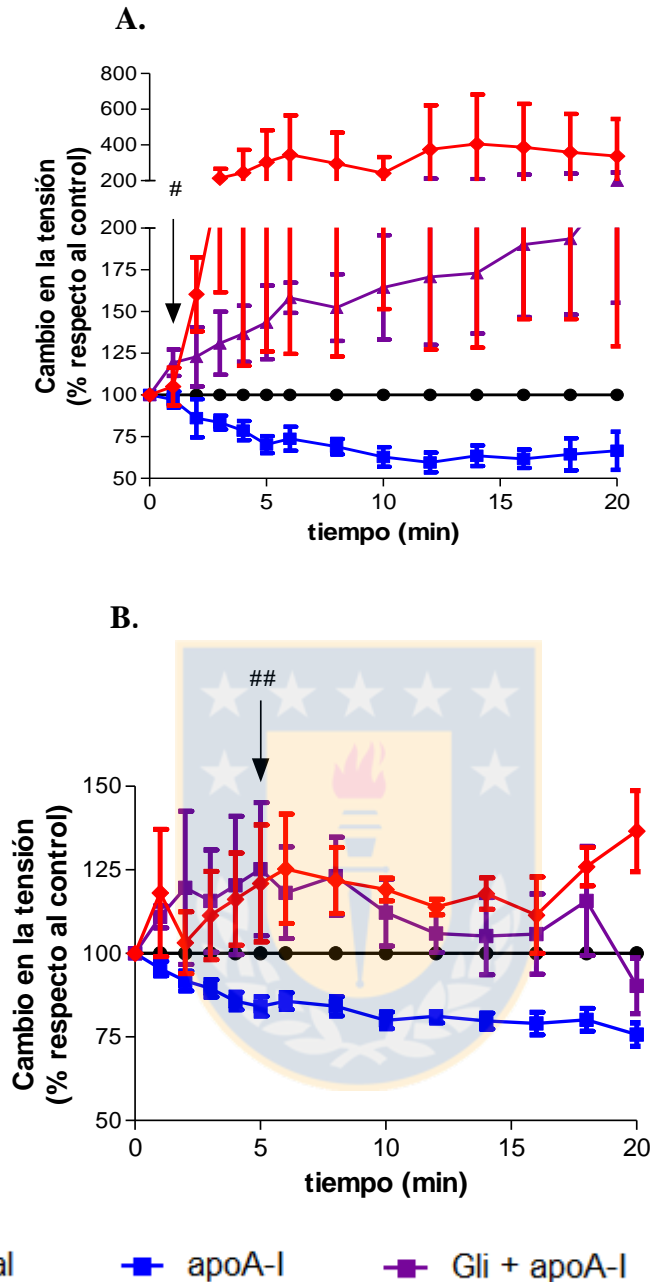
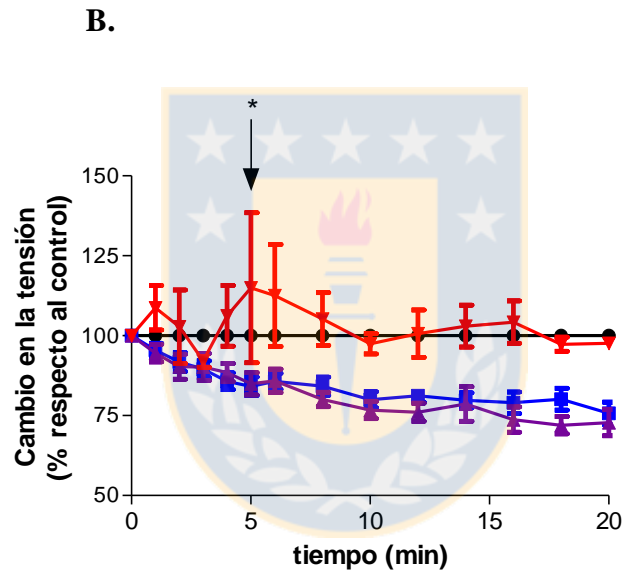
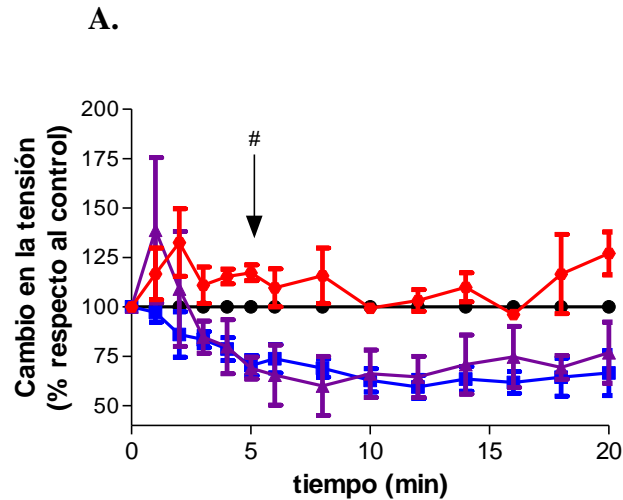


Figura anexa 5: Curva de tiempo para el efecto de la inhibición de ABCA1, sobre la vasodilatación generada por apoA-I

Anillos de vena umbilical (A) y de vena coriónica (B) fueron incubados con U46619 (100 nM). 15 min antes de la adición de apoA-I 50 μ g/mL, se agregó glibenclamida (Gli, 250 μ M). Una vez adicionada apoA-I, y los cambios en la contracción isométrica fueron registrados durante 20 min. Las flechas indican el tiempo desde el cual la inhibición es estadísticamente significativa. Los valores son expresados como el promedio \pm error estándar. $n \geq 3$ experimentos independientes. # $p < 0,05$; ## $p < 0,005$ vs apoA-I.



● Basal
 ■ apoA-I
 ▲ BLT-1 + apoA-I
 ▼ BLT-1

Figura anexa 6: Curva de tiempo para el efecto de la inhibición de SR-BI, sobre la vasodilatación generada por apoA-I

Anillos de vena umbilical (A) y de vena coriónica (B) fueron incubados con U46619 (100 nM). 15 min antes de la adición de apoA-I 50µg/mL, se agregó con BLT-1 (10 µM). Una vez adicionada apoA-I, y los cambios en la contracción isométrica fueron registrados durante 20 min. Las flechas indican el tiempo desde el cual la co-incubación de apoA-I / BLT-1 es estadísticamente significativa. Los valores son expresados como el promedio ± error estándar. n ≥ 3 experimentos independientes. *p<0,05 vs basal.

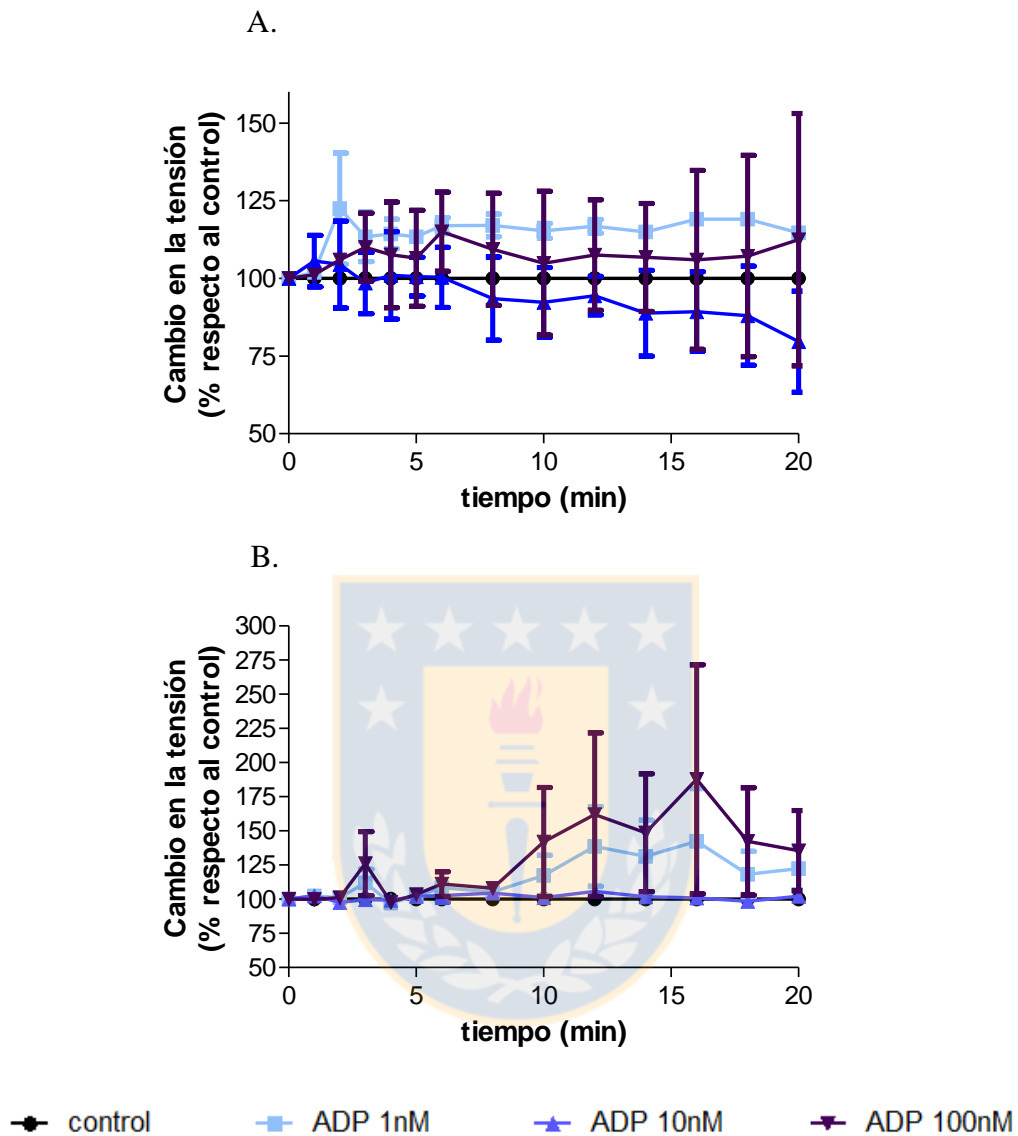


Figura anexa 7: Curva de tiempo para ADP en la tensión de vasos sanguíneos

Anillos de vena umbilical (A) y de vena coriónica (B) fueron incubados con U46619 (100 nM). Alcanzada la contracción máxima, se adicionó ADP y los cambios en la contracción isométrica fueron registrados durante 20 min. Los valores son expresados como el promedio \pm error estándar. n= 3 experimentos independientes.

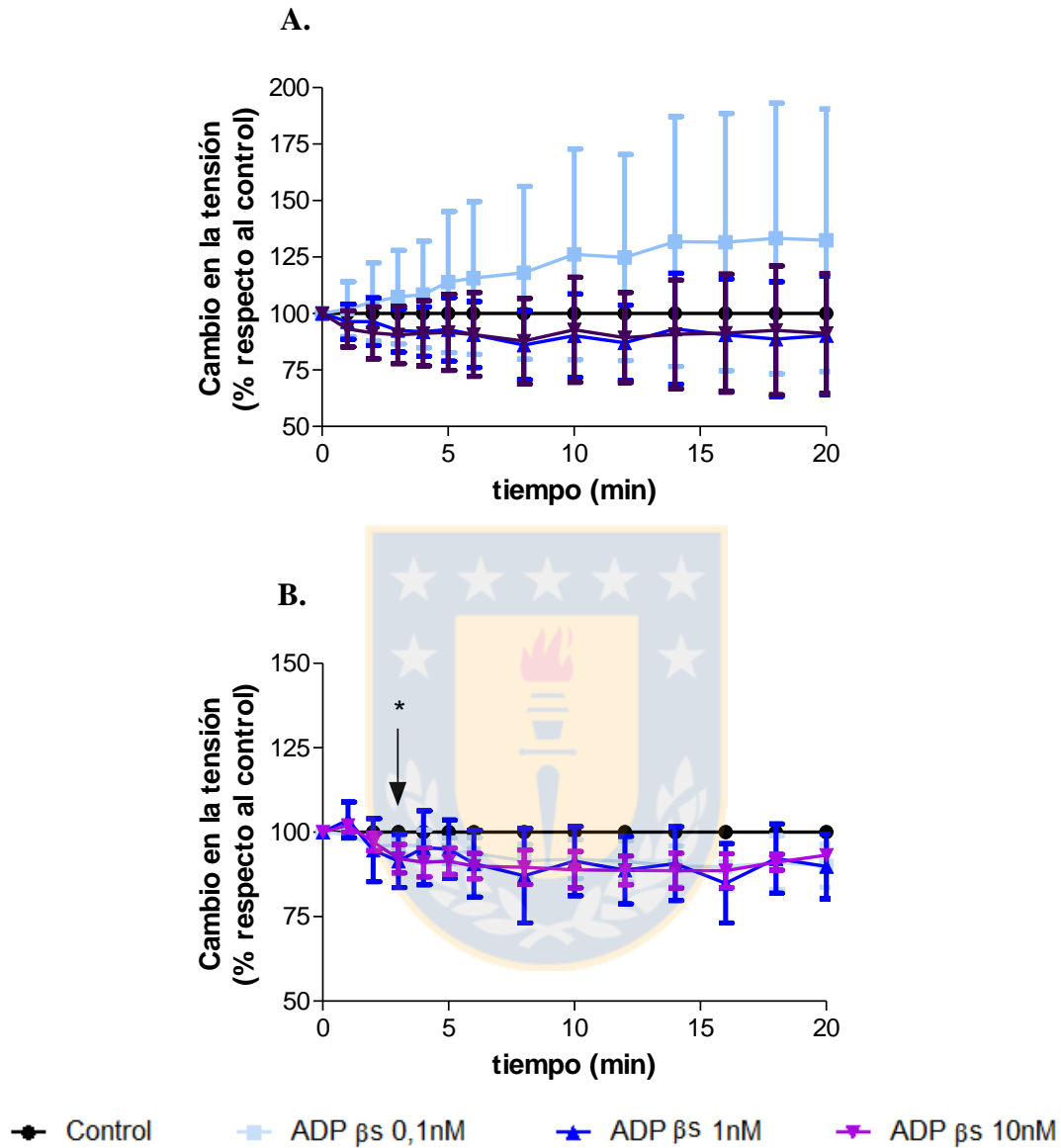


Figura anexa 8: Curva de tiempo para ADPβS en la tensión de vasos sanguíneos
 Anillos de vena umbilical (A) y de vena coriónica (B) fueron incubados con U46619 (100 nM). Alcanzada la contracción máxima, se adicionó ADPβS y los cambios en la contracción isométrica fueron registrados durante 20 min. En vena umbilical no presentan diferencia significativa con respecto al basal. La flecha indica el tiempo desde el cual la inhibición es estadísticamente significativa para ADPβS 10nM. Los valores son expresados como el promedio ± error estándar. $n \geq 3$ experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs basal.

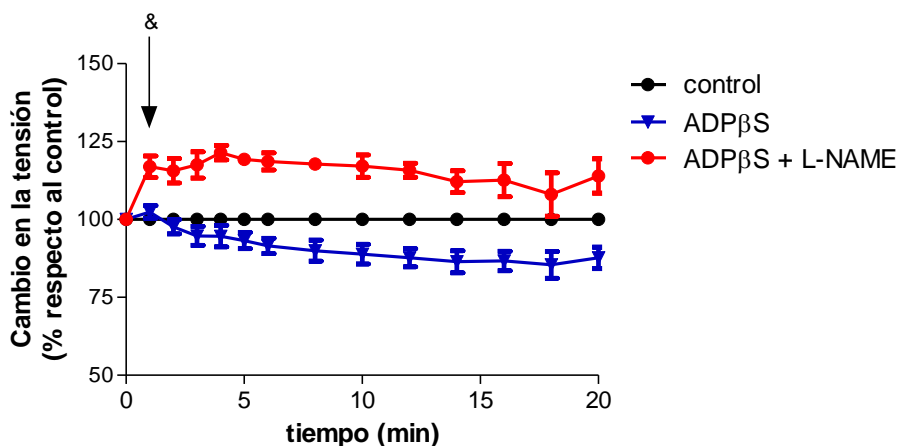
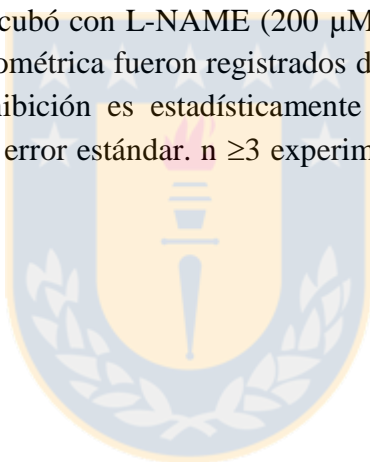


Figura anexa 9: Curva de tiempo para el efecto de la inhibición de la eNOS, sobre la vasodilatación generada por ADPβS

Anillos de vena coriónica fueron incubados con U46619 (100 nM). 45 min antes de la adición de ADPβS 10 nM, se incubó con L-NAME (200 μM). Una vez adicionado ADPβS, los cambios en la contracción isométrica fueron registrados durante 20 min. La flecha indica el tiempo desde el cual la inhibición es estadísticamente significativa. Los valores son expresados como el promedio ± error estándar. n ≥3 experimentos independientes. &p<0,05 vs ADPβS.



FINANCIAMIENTO

Este trabajo se llevó a cabo gracias a las siguientes fuentes de financiamiento:

- Innova Bio-Bio apoyo tesis de postgrado, código 13.1285-EM.TES
- FONDECYT de iniciación N°11121575
- DIUC 210.072.033-1.0



REFERENCIAS

- [1] World Health Organization, Global status report on noncommunicable diseases, (2010).
- [2] Medina E. y Kaempffer A., Enfermedades cardiovasculares en Chile. Aspectos epidemiológicos., *Revista Chilena de Cardiología* 26 (2007) 219-226.
- [3] Subsecretaría de la salud Pública. División de Prevención y Control de Enfermedades. Departamento de Ciclo Vital. Situación actual de la salud del hombre en Chile, (2011).
- [4] Ministerio de Salud Chile, Guía Clínica, (2010).
- [5] Ministerio de Salud Chile, Encuesta Nacional de Salud, (2010).
- [6] A. Acosta, J. Áñez, C. Andara, P. Valmore, F. Bermúdez, Mecanismos moleculares de la disfunción endotelial: de la síntesis a la acción del óxido nítrico, *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* 25 (2006) 54-59.
- [7] L.J. Ignarro, Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30 (1990) 535-560.
- [8] J. Davignon, P. Ganz, Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis, *Circulation* 109 (2004) III27-32.
- [9] J.R. Toppins, J.W. Antoniw, A. Maseri, Endothelin-1 is a potent constrictor in conductive and resistive coronary arteries, *J Cardiovasc Pharmacol* 13 Suppl 5 (1989) S177-179.
- [10] S.D. Brain, D.C. Crossman, T.L. Buckley, T.J. Williams, Endothelin-1: demonstration of potent effects on the microcirculation of humans and other species, *J Cardiovasc Pharmacol* 13 Suppl 5 (1989) S147-149; discussion S150.
- [11] J. Bellien, M. Iacob, L. Gutierrez, M. Isabelle, A. Lahary, C. Thuillez, R. Joannides, Crucial role of NO and endothelium-derived hyperpolarizing factor in human sustained conduit artery flow-mediated dilatation, *Hypertension* 48 (2006) 1088-1094.
- [12] R.M. Palmer, A.G. Ferrige, S. Moncada, Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature* 327 (1987) 524-526.
- [13] H.R. Lijnen, D. Collen, Endothelium in hemostasis and thrombosis, *Prog Cardiovasc Dis* 39 (1997) 343-350.
- [14] M.W. Radomski, [Vascular endothelium in the processes of hemostasis and thrombosis. The role of prostacyclin and EDRF], *Acta Physiol Pol* 40 Suppl 33 (1989) 97-109.
- [15] B.F. Becker, B. Heindl, C. Kupatt, S. Zahler, Endothelial function and hemostasis, *Z Kardiol* 89 (2000) 160-167.
- [16] P. Libby, Inflammation in atherosclerosis, *Nature* 420 (2002) 868-874.
- [17] R.R. Packard, P. Libby, Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction, *Clin Chem* 54 (2008) 24-38.
- [18] W. Risau, Development and differentiation of endothelium, *Kidney Int Suppl* 67 (1998) S3-6.

- [19] G.B. Atkins, M.K. Jain, A. Hamik, Endothelial differentiation: molecular mechanisms of specification and heterogeneity, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31 (2011) 1476-1484.
- [20] C. Nathan, Q.W. Xie, Regulation of biosynthesis of nitric oxide, *J Biol Chem* 269 (1994) 13725-13728.
- [21] R.G. Knowles, S. Moncada, Nitric oxide synthases in mammals, *Biochem J* 298 (Pt 2) (1994) 249-258.
- [22] S. Moncada, A. Higgs, The L-arginine-nitric oxide pathway, *N Engl J Med* 329 (1993) 2002-2012.
- [23] H. Li, T.L. Poulos, Structure-function studies on nitric oxide synthases, *J Inorg Biochem* 99 (2005) 293-305.
- [24] B.R. Crane, A.S. Arvai, D.K. Ghosh, C. Wu, E.D. Getzoff, D.J. Stuehr, J.A. Tainer, Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate, *Science* 279 (1998) 2121-2126.
- [25] T.O. Fischmann, A. Hruza, X.D. Niu, J.D. Fossetta, C.A. Lunn, E. Dolphin, A.J. Prongay, P. Reichert, D.J. Lundell, S.K. Narula, P.C. Weber, Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation, *Nat Struct Biol* 6 (1999) 233-242.
- [26] H. Li, C.S. Raman, C.B. Glaser, E. Blasko, T.A. Young, J.F. Parkinson, M. Whitlow, T.L. Poulos, Crystal structures of zinc-free and -bound heme domain of human inducible nitric-oxide synthase. Implications for dimer stability and comparison with endothelial nitric-oxide synthase, *J Biol Chem* 274 (1999) 21276-21284.
- [27] C.S. Raman, H. Li, P. Martasek, V. Kral, B.S. Masters, T.L. Poulos, Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center, *Cell* 95 (1998) 939-950.
- [28] C. Bogdan, Nitric oxide and the regulation of gene expression, *Trends Cell Biol* 11 (2001) 66-75.
- [29] F. U., Endothelial NO synthase as a source of NO and superoxide, *Eur J Clin Pharmacol* 62: 5–12 (2006).
- [30] J.L. Lowry, V. Brovkovich, Y. Zhang, R.A. Skidgel, Endothelial nitric-oxide synthase activation generates an inducible nitric-oxide synthase-like output of nitric oxide in inflamed endothelium, *J Biol Chem* 288 (2013) 4174-4193.
- [31] S.C. Tai, G.B. Robb, P.A. Marsden, Endothelial nitric oxide synthase: a new paradigm for gene regulation in the injured blood vessel, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (2004) 405-412.
- [32] G.K. Kolluru, J.H. Siamwala, S. Chatterjee, eNOS phosphorylation in health and disease, *Biochimie* 92 (2010) 1186-1198.
- [33] M.G. Feng, L.G. Navar, Nitric oxide synthase inhibition activates L- and T-type Ca²⁺ channels in afferent and efferent arterioles, *Am J Physiol Renal Physiol* 290 (2006) F873-879.

- [34] P. Komalavilas, T.M. Lincoln, Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase, *J Biol Chem* 269 (1994) 8701-8707.
- [35] P.K. Shireman, W.H. Pearce, Endothelial cell function: biologic and physiologic functions in health and disease, *AJR Am J Roentgenol* 166 (1996) 7-13.
- [36] D.T. Hess, A. Matsumoto, S.O. Kim, H.E. Marshall, J.S. Stamler, Protein S-nitrosylation: purview and parameters, *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (2005) 150-166.
- [37] S. Dimmeler, A.M. Zeiher, Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide, *Nitric Oxide* 1 (1997) 275-281.
- [38] S.J. Lee, K.M. Kim, S. Namkoong, C.K. Kim, Y.C. Kang, H. Lee, K.S. Ha, J.A. Han, H.T. Chung, Y.G. Kwon, Y.M. Kim, Nitric oxide inhibition of homocysteine-induced human endothelial cell apoptosis by down-regulation of p53-dependent Noxa expression through the formation of S-nitrosohomocysteine, *J Biol Chem* 280 (2005) 5781-5788.
- [39] S. Thibeault, Y. Rautureau, M. Oubaha, D. Faubert, B.C. Wilkes, C. Delisle, J.P. Gratton, S-nitrosylation of beta-catenin by eNOS-derived NO promotes VEGF-induced endothelial cell permeability, *Mol Cell* 39 (2010) 468-476.
- [40] X. Pi, Y. Wu, J.E. Ferguson, 3rd, A.L. Portbury, C. Patterson, SDF-1alpha stimulates JNK3 activity via eNOS-dependent nitrosylation of MKP7 to enhance endothelial migration, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009) 5675-5680.
- [41] G. Garcia-Cardena, P. Oh, J. Liu, J.E. Schnitzer, W.C. Sessa, Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 6448-6453.
- [42] Q. Zhang, J.E. Church, D. Jagnandan, J.D. Catravas, W.C. Sessa, D. Fulton, Functional relevance of Golgi- and plasma membrane-localized endothelial NO synthase in reconstituted endothelial cells, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 (2006) 1015-1021.
- [43] D. Fulton, R. Babbitt, S. Zoellner, J. Fontana, L. Acevedo, T.J. McCabe, Y. Iwakiri, W.C. Sessa, Targeting of endothelial nitric-oxide synthase to the cytoplasmic face of the Golgi complex or plasma membrane regulates Akt- versus calcium-dependent mechanisms for nitric oxide release, *J Biol Chem* 279 (2004) 30349-30357.
- [44] H. Ju, R. Zou, V.J. Venema, R.C. Venema, Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity, *J Biol Chem* 272 (1997) 18522-18525.
- [45] J. Dedio, P. Konig, P. Wohlfart, C. Schroeder, W. Kummer, W. Muller-Esterl, NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity, *FASEB J* 15 (2001) 79-89.
- [46] K. Schilling, N. Opitz, A. Wiesenthal, S. Oess, R. Tikkanen, W. Muller-Esterl, A. Icking, Translocation of endothelial nitric-oxide synthase involves a ternary complex with caveolin-1 and NOSTRIN, *Mol Biol Cell* 17 (2006) 3870-3880.

- [47] K. Zimmermann, N. Opitz, J. Dedio, C. Renne, W. Muller-Esterl, S. Oess, NOSTRIN: a protein modulating nitric oxide release and subcellular distribution of endothelial nitric oxide synthase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 17167-17172.
- [48] D.H. Endemann, E.L. Schiffrin, Endothelial dysfunction, *J Am Soc Nephrol* 15 (2004) 1983-1992.
- [49] T. Bachetti, L. Comini, G. Francolini, D. Bastianon, B. Valetti, M. Cadei, P. Grigolato, H. Suzuki, D. Finazzi, A. Albertini, S. Curello, R. Ferrari, Arginase pathway in human endothelial cells in pathophysiological conditions, *J Mol Cell Cardiol* 37 (2004) 515-523.
- [50] X.F. Ming, C. Barandier, H. Viswambharan, B.R. Kwak, F. Mach, L. Mazzolai, D. Hayoz, J. Ruffieux, S. Rusconi, J.P. Montani, Z. Yang, Thrombin stimulates human endothelial arginase enzymatic activity via RhoA/ROCK pathway: implications for atherosclerotic endothelial dysfunction, *Circulation* 110 (2004) 3708-3714.
- [51] T. Michel, P.M. Vanhoutte, Cellular signaling and NO production, *Pflugers Arch* 459 (2010) 807-816.
- [52] I. Fleming, R. Busse, Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284 (2003) R1-12.
- [53] F. Karantzoulis-Fegaras, H. Antoniou, S.L. Lai, G. Kulkarni, C. D'Abreo, G.K. Wong, T.L. Miller, Y. Chan, J. Atkins, Y. Wang, P.A. Marsden, Characterization of the human endothelial nitric-oxide synthase promoter, *J Biol Chem* 274 (1999) 3076-3093.
- [54] E.A. Grzybowska, A. Wilczynska, J.A. Siedlecki, Regulatory functions of 3'UTRs, *Biochem Biophys Res Commun* 288 (2001) 291-295.
- [55] P.F. Lai, F. Mohamed, J.C. Monge, D.J. Stewart, Downregulation of eNOS mRNA expression by TNF α : identification and functional characterization of RNA-protein interactions in the 3'UTR, *Cardiovasc Res* 59 (2003) 160-168.
- [56] C.D. Searles, Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression, *Am J Physiol Cell Physiol* 291 (2006) C803-816.
- [57] J.P. Cooke, Does ADMA cause endothelial dysfunction?, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 (2000) 2032-2037.
- [58] T.F. Luscher, M. Barton, Biology of the endothelium, *Clin Cardiol* 20 (1997) II-3-10.
- [59] S. Chakrabarti, J.S. Morton, S.T. Davidge, Mechanisms of estrogen effects on the endothelium: an overview, *Can J Cardiol* 30 (2014) 705-712.
- [60] A. Neukamm, A.D. Hoiseith, G. Einvik, S. Lehmann, T. Hagve, V. Soyseth, T. Omland, Rosuvastatin treatment in stable chronic obstructive pulmonary disease (RODEO): a randomized controlled trial, *J Intern Med* (2014).
- [61] A. Tran-Dinh, D. Diallo, S. Delbosc, L.M. Varela-Perez, Q.B. Dang, B. Lapergue, E. Burillo, J.B. Michel, A. Levoye, J.L. Martin-Ventura, O. Meilhac, HDL and endothelial protection, *Br J Pharmacol* 169 (2013) 493-511.

- [62] R.J. Havel, H.A. Eder, J.H. Bragdon, The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum, *J Clin Invest* 34 (1955) 1345-1353.
- [63] E.M. Tsompanidi, M.S. Brinkmeier, E.H. Fotiadou, S.M. Giakoumi, K.E. Kypreos, HDL biogenesis and functions: role of HDL quality and quantity in atherosclerosis, *Atherosclerosis* 208 (2010) 3-9.
- [64] V. Koppaka, Structural studies of discoidal lipoprotein A-I, *Cell Mol Life Sci* 58 (2001) 885-893.
- [65] K.A. Rye, C.A. Bursill, G. Lambert, F. Tabet, P.J. Barter, The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL, *J Lipid Res* 50 Suppl (2009) S195-200.
- [66] O. Gursky, Crystal structure of Delta(185-243)ApoA-I suggests a mechanistic framework for the protein adaptation to the changing lipid load in good cholesterol: from flatland to sphereland via double belt, belt buckle, double hairpin and trefoil/tetrafoil, *J Mol Biol* 425 (2013) 1-16.
- [67] V.I. Zannis, A. Chroni, M. Krieger, Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL, *J Mol Med (Berl)* 84 (2006) 276-294.
- [68] J.F. Wu, Y.Y. Tang, G.F. Zeng, C.K. Tang, [Role of apolipoprotein AI on nascent high-density lipoprotein particle formation], *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 45 (2014) 81-86.
- [69] S. Jayaraman, G. Cavigiolio, O. Gursky, Folded functional lipid-poor apolipoprotein A-I obtained by heating of high-density lipoproteins: relevance to high-density lipoprotein biogenesis, *Biochem J* 442 (2012) 703-712.
- [70] W.H. Li, M. Tanimura, C.C. Luo, S. Datta, L. Chan, The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution, *J Lipid Res* 29 (1988) 245-271.
- [71] J.I. Gordon, H.F. Sims, S.R. Lentz, C. Edelstein, A.M. Scanu, A.W. Strauss, Proteolytic processing of human preproapolipoprotein A-I. A proposed defect in the conversion of pro A-I to A-I in Tangier's disease, *J Biol Chem* 258 (1983) 4037-4044.
- [72] H.B. Brewer, Jr., T. Fairwell, A. LaRue, R. Ronan, A. Houser, T.J. Bronzert, The amino acid sequence of human APOA-I, an apolipoprotein isolated from high density lipoproteins, *Biochem Biophys Res Commun* 80 (1978) 623-630.
- [73] V.I. Zannis, S.K. Karathanasis, H.T. Keutmann, G. Goldberger, J.L. Breslow, Intracellular and extracellular processing of human apolipoprotein A-I: secreted apolipoprotein A-I isoprotein 2 is a propeptide, *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 (1983) 2574-2578.
- [74] J. Zhu, J. Gardner, C.R. Pullinger, J.P. Kane, J.F. Thompson, O.L. Francone, Regulation of apoAI processing by procollagen C-proteinase enhancer-2 and bone morphogenetic protein-1, *J Lipid Res* 50 (2009) 1330-1339.
- [75] P.G. Frank, J. Bergeron, F. Emmanuel, J.P. Lavigne, D.L. Sparks, P. Deneffe, E. Rassart, Y.L. Marcel, Deletion of central alpha-helices in human apolipoprotein A-I: effect on phospholipid association, *Biochemistry* 36 (1997) 1798-1806.

- [76] P.G. Frank, D. N'Guyen, V. Franklin, T. Neville, M. Desforges, E. Rassart, D.L. Sparks, Y.L. Marcel, Importance of central alpha-helices of human apolipoprotein A-I in the maturation of high-density lipoproteins, *Biochemistry* 37 (1998) 13902-13909.
- [77] R.T. Nolte, D. Atkinson, Conformational analysis of apolipoprotein A-I and E-3 based on primary sequence and circular dichroism, *Biophys J* 63 (1992) 1221-1239.
- [78] H.B. Brewer, Jr., S. Santamarina-Fojo, Clinical significance of high-density lipoproteins and the development of atherosclerosis: focus on the role of the adenosine triphosphate-binding cassette protein A1 transporter, *Am J Cardiol* 92 (2003) 10K-16K.
- [79] A. Ji, J.M. Wroblewski, L. Cai, M.C. de Beer, N.R. Webb, D.R. van der Westhuyzen, Nascent HDL formation in hepatocytes and role of ABCA1, ABCG1, and SR-BI, *J Lipid Res* 53 (2012) 446-455.
- [80] A. von Eckardstein, J.R. Nofer, G. Assmann, High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21 (2001) 13-27.
- [81] P.G. Frank, Y.L. Marcel, Apolipoprotein A-I: structure-function relationships, *J Lipid Res* 41 (2000) 853-872.
- [82] C. Besler, T.F. Luscher, U. Landmesser, Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease, *EMBO Mol Med* 4 (2012) 251-268.
- [83] P.J. Barter, S. Nicholls, K.A. Rye, G.M. Anantharamaiah, M. Navab, A.M. Fogelman, Antiinflammatory properties of HDL, *Circ Res* 95 (2004) 764-772.
- [84] G.W. Cockerill, K.A. Rye, J.R. Gamble, M.A. Vadas, P.J. Barter, High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15 (1995) 1987-1994.
- [85] J.H. Griffin, K. Kojima, C.L. Banka, L.K. Curtiss, J.A. Fernandez, High-density lipoprotein enhancement of anticoagulant activities of plasma protein S and activated protein C, *J Clin Invest* 103 (1999) 219-227.
- [86] D. Seetharam, C. Mineo, A.K. Gormley, L.L. Gibson, W. Vongpatanasin, K.L. Chambliss, L.D. Hahner, M.L. Cummings, R.L. Kitchens, Y.L. Marcel, D.J. Rader, P.W. Shaul, High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I, *Circ Res* 98 (2006) 63-72.
- [87] M. Sugano, K. Tsuchida, N. Makino, High-density lipoproteins protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis, *Biochem Biophys Res Commun* 272 (2000) 872-876.
- [88] I.S. Yuhanna, Y. Zhu, B.E. Cox, L.D. Hahner, S. Osborne-Lawrence, P. Lu, Y.L. Marcel, R.G. Anderson, M.E. Mendelsohn, H.H. Hobbs, P.W. Shaul, High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase, *Nat Med* 7 (2001) 853-857.
- [89] M.E. Ramet, M. Ramet, Q. Lu, M. Nickerson, M.J. Savolainen, A. Malzone, R.H. Karas, High-density lipoprotein increases the abundance of eNOS protein in human

- vascular endothelial cells by increasing its half-life, *J Am Coll Cardiol* 41 (2003) 2288-2297.
- [90] C. Mineo, I.S. Yuhanna, M.J. Quon, P.W. Shaul, High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases, *J Biol Chem* 278 (2003) 9142-9149.
- [91] A. Blair, P.W. Shaul, I.S. Yuhanna, P.A. Conrad, E.J. Smart, Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation, *J Biol Chem* 274 (1999) 32512-32519.
- [92] A. Uittenbogaard, P.W. Shaul, I.S. Yuhanna, A. Blair, E.J. Smart, High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae, *J Biol Chem* 275 (2000) 11278-11283.
- [93] C.M. Lee, C.T. Chien, P.Y. Chang, M.Y. Hsieh, H.Y. Jui, C.S. Liao, S.M. Hsu, Y.T. Lee, High-density lipoprotein antagonizes oxidized low-density lipoprotein by suppressing oxygen free-radical formation and preserving nitric oxide bioactivity, *Atherosclerosis* 183 (2005) 251-258.
- [94] B.G. Drew, N.H. Fidge, G. Gallon-Beaumier, B.E. Kemp, B.A. Kingwell, High-density lipoprotein and apolipoprotein AI increase endothelial NO synthase activity by protein association and multisite phosphorylation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 6999-7004.
- [95] M. León, Tesis de Magíster de Bioquímica Clínica e Inmunología. Participación del receptor de apolipoproteína A-I libre, ecto-F₁-ATPasa, en la regulación de la síntesis de óxido nítrico en células endoteliales humanas, No publicado (2014).
- [96] L. Briceño, Tesis de Bioquímica. Participación del Receptor Ecto-F₁-ATPasa en el Perfil de Fosforilación de la Sintasa de Óxido Nítrico Endotelial Generado por Apolipoproteína A-I Libre Datos no publicados (2014).
- [97] R. Ferre, G. Aragonés, N. Plana, J. Merino, M. Heras, C. Buixadera, L. Masana, High-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein AI levels strongly influence the reactivity of small peripheral arteries, *Atherosclerosis* 216 (2011) 115-119.
- [98] R. Flynn, K. Qian, C. Tang, N. Dronadula, J.M. Buckler, B. Jiang, S. Wen, H.L. Dichek, D.A. Dichek, Expression of apolipoprotein A-I in rabbit carotid endothelium protects against atherosclerosis, *Mol Ther* 19 (2011) 1833-1841.
- [99] O. Briand, F.M. Nizard, M. David-Dufilho, I. Six, S. Lestavel, A. Brunet, J.C. Fruchart, G. Torpier, R. Bordet, V. Clavey, P. Duriez, Human free apolipoprotein A-I and artificial pre-beta-high-density lipoprotein inhibit eNOS activity and NO release, *Biochim Biophys Acta* 1683 (2004) 69-77.
- [100] G. Lebuffe, A. Boullier, A. Tailleux, B. Delfly, B. Dupuis, J.C. Fruchart, N. Duverger, F. Emmanuel, P. Deneffe, B. Vallet, P. Duriez, Endothelial derived vasorelaxation is impaired in human APO A-I transgenic rabbits, *Biochem Biophys Res Commun* 241 (1997) 205-211.

- [101] J.R. Nofer, M. van der Giet, M. Tolle, I. Wolinska, K. von Wnuck Lipinski, H.A. Baba, U.J. Tietge, A. Godecke, I. Ishii, B. Kleuser, M. Schafers, M. Fobker, W. Zidek, G. Assmann, J. Chun, B. Levkau, HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3, *J Clin Invest* 113 (2004) 569-581.
- [102] U. Panzenboeck, Z. Balazs, A. Sovic, A. Hrzenjak, S. Levak-Frank, A. Wintersperger, E. Malle, W. Sattler, ABCA1 and scavenger receptor class B, type I, are modulators of reverse sterol transport at an in vitro blood-brain barrier constituted of porcine brain capillary endothelial cells, *J Biol Chem* 277 (2002) 42781-42789.
- [103] C. Radojkovic, A. Genoux, V. Pons, G. Combes, H. de Jonge, E. Champagne, C. Rolland, B. Perret, X. Collet, F. Terce, L.O. Martinez, Stimulation of cell surface F1-ATPase activity by apolipoprotein A-I inhibits endothelial cell apoptosis and promotes proliferation, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29 (2009) 1125-1130.
- [104] A. Rigotti, H.E. Miettinen, M. Krieger, The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues, *Endocr Rev* 24 (2003) 357-387.
- [105] C. Mineo, P.W. Shaul, Role of high-density lipoprotein and scavenger receptor B type I in the promotion of endothelial repair, *Trends Cardiovasc Med* 17 (2007) 156-161.
- [106] M.F. Luciani, F. Denizot, S. Savary, M.G. Mattei, G. Chimini, Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9, *Genomics* 21 (1994) 150-159.
- [107] D. Kielar, W. Dietmaier, T. Langmann, C. Aslanidis, M. Probst, M. Naruszewicz, G. Schmitz, Rapid Quantification of Human ABCA1 mRNA in Various Cell Types and Tissues by Real-Time Reverse Transcription-PCR, *Clin Chem* 47 (2001) 2089-2097.
- [108] C. Cavelier, L. Rohrer, A. von Eckardstein, ATP-Binding cassette transporter A1 modulates apolipoprotein A-I transcytosis through aortic endothelial cells, *Circ Res* 99 (2006) 1060-1066.
- [109] S.L. Chi, S.V. Pizzo, Cell surface F1Fo ATP synthase: a new paradigm?, *Ann Med* 38 (2006) 429-438.
- [110] P. Vantourout, C. Radojkovic, L. Lichtenstein, V. Pons, E. Champagne, L.O. Martinez, Ecto-F(1)-ATPase: a moonlighting protein complex and an unexpected apoA-I receptor, *World J Gastroenterol* 16 (2010) 5925-5935.
- [111] P.D. Boyer, The ATP synthase--a splendid molecular machine, *Annu Rev Biochem* 66 (1997) 717-749.
- [112] E. Cabezón, P.J. Butler, M.J. Runswick, J.E. Walker, Modulation of the oligomerization state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH, *J Biol Chem* 275 (2000) 25460-25464.
- [113] E. Cabezón, M.G. Montgomery, A.G. Leslie, J.E. Walker, The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1, *Nat Struct Biol* 10 (2003) 744-750.
- [114] E. Cabezón, I. Arechaga, P. Jonathan, G. Butler, J.E. Walker, Dimerization of bovine F1-ATPase by binding the inhibitor protein, IF1, *J Biol Chem* 275 (2000) 28353-28355.

- [115] T.L. Moser, M.S. Stack, I. Asplin, J.J. Enghild, P. Hojrup, L. Everitt, S. Hubchak, H.W. Schnaper, S.V. Pizzo, Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 2811-2816.
- [116] L.O. Martinez, S. Jacquet, J.P. Esteve, C. Rolland, E. Cabezon, E. Champagne, T. Pineau, V. Georgeaud, J.E. Walker, F. Terce, X. Collet, B. Perret, R. Barbaras, Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis, *Nature* 421 (2003) 75-79.
- [117] B. Das, M.O. Mondragon, M. Sadeghian, V.B. Hatcher, A.J. Norin, A novel ligand in lymphocyte-mediated cytotoxicity: expression of the beta subunit of H⁺ transporting ATP synthase on the surface of tumor cell lines, *J Exp Med* 180 (1994) 273-281.
- [118] E. Scotet, L.O. Martinez, E. Grant, R. Barbaras, P. Jenou, M. Guiraud, B. Monsarrat, X. Saulquin, S. Maillet, J.P. Esteve, F. Lopez, B. Perret, X. Collet, M. Bonneville, E. Champagne, Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I, *Immunity* 22 (2005) 71-80.
- [119] B.W. Kim, H.J. Choo, J.W. Lee, J.H. Kim, Y.G. Ko, Extracellular ATP is generated by ATP synthase complex in adipocyte lipid rafts, *Exp Mol Med* 36 (2004) 476-485.
- [120] H.E. Burrell, B. Wlodarski, B.J. Foster, K.A. Buckley, G.R. Sharpe, J.M. Quayle, A.W. Simpson, J.A. Gallagher, Human keratinocytes release ATP and utilize three mechanisms for nucleotide interconversion at the cell surface, *J Biol Chem* 280 (2005) 29667-29676.
- [121] T.L. Moser, D.J. Kenan, T.A. Ashley, J.A. Roy, M.D. Goodman, U.K. Misra, D.J. Cheek, S.V. Pizzo, Endothelial cell surface F1-F0 ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 6656-6661.
- [122] C. Cavelier, P.M. Ohnsorg, L. Rohrer, A. von Eckardstein, The beta-chain of cell surface F(0)F(1) ATPase modulates apoA-I and HDL transcytosis through aortic endothelial cells, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32 (2012) 131-139.
- [123] T. Osanai, S. Okada, K. Sirato, T. Nakano, M. Saitoh, K. Magota, K. Okumura, Mitochondrial coupling factor 6 is present on the surface of human vascular endothelial cells and is released by shear stress, *Circulation* 104 (2001) 3132-3136.
- [124] S. Sasaki, T. Osanai, H. Tomita, T. Matsunaga, K. Magota, K. Okumura, Tumor necrosis factor alpha as an endogenous stimulator for circulating coupling factor 6, *Cardiovasc Res* 62 (2004) 578-586.
- [125] H. Tomita, T. Osanai, T. Toki, S. Sasaki, N. Maeda, R. Murakami, K. Magota, M. Yasujima, K. Okumura, Troglitazone and 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 inhibit shear-induced coupling factor 6 release in endothelial cells, *Cardiovasc Res* 67 (2005) 134-141.
- [126] T. Osanai, K. Magota, M. Tanaka, M. Shimada, R. Murakami, S. Sasaki, H. Tomita, N. Maeda, K. Okumura, Intracellular signaling for vasoconstrictor coupling factor 6:

- novel function of beta-subunit of ATP synthase as receptor, *Hypertension* 46 (2005) 1140-1146.
- [127] T. Osanai, K. Magota, K. Okumura, Coupling factor 6 as a novel vasoactive and proatherogenic peptide in vascular endothelial cells, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 380 (2009) 205-214.
- [128] C. Gonzalez, M.A. Cruz, W.H. Sepulveda, M.I. Rudolph, Effects of serotonin on vascular tone of isolated human placental chorionic veins, *Gynecol Obstet Invest* 29 (1990) 88-91.
- [129] V. Gallardo, M.A. Cruz, P. Miguel, G. Carrasco, C. Gonzalez, Mechanisms of endothelin-1-induced contraction in isolated placental veins from normal full-term and preterm pregnancies, *Gen Pharmacol* 34 (2000) 295-301.
- [130] M. Gonzalez, V. Gallardo, N. Rodriguez, C. Salomon, F. Westermeier, E. Guzman-Gutierrez, F. Abarzua, A. Leiva, P. Casanello, L. Sobrevia, Insulin-stimulated L-arginine transport requires SLC7A1 gene expression and is associated with human umbilical vein relaxation, *J Cell Physiol* 226 (2011) 2916-2924.
- [131] M.J. van Raaij, G.L. Orriss, M.G. Montgomery, M.J. Runswick, I.M. Fearnley, J.M. Skehel, J.E. Walker, The ATPase inhibitor protein from bovine heart mitochondria: the minimal inhibitory sequence, *Biochemistry* 35 (1996) 15618-15625.
- [132] W.J. McConathy, P. Alaupovic, Isolation and characterization of other apolipoproteins, *Methods Enzymol* 128 (1986) 297-310.
- [133] R.J. Brace, B. Sorrenson, D. Sviridov, S.P. McCormick, A gel-based method for purification of apolipoprotein A-I from small volumes of plasma, *J Lipid Res* 51 (2010) 3370-3376.
- [134] E.A. Jaffe, R.L. Nachman, C.G. Becker, C.R. Minick, Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria, *J Clin Invest* 52 (1973) 2745-2756.
- [135] J.A. Ramos-Vara, Technical aspects of immunohistochemistry, *Vet Pathol* 42 (2005) 405-426.
- [136] V. Gonzalez-Pecchi, S. Valdes, V. Pons, P. Honorato, L.O. Martinez, L. Lamperti, C. Aguayo, C. Radojkovic, Apolipoprotein A-I enhances proliferation of human endothelial progenitor cells and promotes angiogenesis through the cell surface ATP synthase, *Microvasc Res* 98 (2015) 9-15.
- [137] D.V. Parums, J.L. Cordell, K. Micklem, A.R. Heryet, K.C. Gatter, D.Y. Mason, JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections, *J Clin Pathol* 43 (1990) 752-757.
- [138] S.M. Albelda, W.A. Muller, C.A. Buck, P.J. Newman, Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule, *J Cell Biol* 114 (1991) 1059-1068.
- [139] L.O. Martinez, S. Najib, B. Perret, C. Cabou, L. Lichtenstein, Ecto-F1-ATPase/P2Y pathways in metabolic and vascular functions of high density lipoproteins, *Atherosclerosis* 238 (2015) 89-100.

- [140] B.J. O'Connell, J. Genest, Jr., High-density lipoproteins and endothelial function, *Circulation* 104 (2001) 1978-1983.
- [141] J. Bergeron, P.G. Frank, F. Emmanuel, M. Latta, Y. Zhao, D.L. Sparks, E. Rassart, P. Deneffe, Y.L. Marcel, Characterization of human apolipoprotein A-I expressed in *Escherichia coli*, *Biochim Biophys Acta* 1344 (1997) 139-152.
- [142] K.A. McGuire, W.S. Davidson, A. Jonas, High yield overexpression and characterization of human recombinant proapolipoprotein A-I, *J Lipid Res* 37 (1996) 1519-1528.
- [143] R.O. Ryan, T.M. Forte, M.N. Oda, Optimized bacterial expression of human apolipoprotein A-I, *Protein Expr Purif* 27 (2003) 98-103.
- [144] L. Brisette, N. Cahuzac-Bec, M. Desforgues, J.L. Bec, Y.L. Marcel, E. Rassart, Expression of recombinant human apolipoprotein A-I in Chinese hamster ovary cells and *Escherichia coli*, *Protein Expr Purif* 2 (1991) 296-303.
- [145] M.Q. Feng, Q.S. Cai, D.X. Song, J.B. Dong, P. Zhou, High yield and secretion of recombinant human apolipoprotein AI in *Pichia pastoris*, *Protein Expr Purif* 46 (2006) 337-342.
- [146] R.H. Yolken, F. Lawrence, F. Leister, H.E. Takiff, S.E. Strauss, Gastroenteritis associated with enteric type adenovirus in hospitalized infants, *J Pediatr* 101 (1982) 21-26.
- [147] J.L. Bramson, F.L. Graham, J. Gauldie, The use of adenoviral vectors for gene therapy and gene transfer in vivo, *Curr Opin Biotechnol* 6 (1995) 590-595.
- [148] S.L. Brody, R.G. Crystal, Adenovirus-mediated in vivo gene transfer, *Ann N Y Acad Sci* 716 (1994) 90-101; discussion 101-103.
- [149] F.L. Graham, Adenovirus vectors for high-efficiency gene transfer into mammalian cells, *Immunol Today* 21 (2000) 426-428.
- [150] R.J. Parks, L. Chen, M. Anton, U. Sankar, M.A. Rudnicki, F.L. Graham, A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 13565-13570.
- [151] A.E. Tollefson, A. Scaria, T.W. Hermiston, J.S. Ryerse, L.J. Wold, W.S. Wold, The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells, *J Virol* 70 (1996) 2296-2306.
- [152] J.S. Kim, S.H. Lee, Y.S. Cho, Y.H. Kim, J.H. Lee, Ectopic expression of the coxsackievirus and adenovirus receptor increases susceptibility to adenoviral infection in the human cervical cancer cell line, SiHa, *Biochem Biophys Res Commun* 288 (2001) 240-244.
- [153] S.E. Panagotopoulos, S.R. Witting, E.M. Horace, J. Nicholas Maiorano, W. Sean Davidson, Bacterial expression and characterization of mature apolipoprotein A-I, *Protein Expr Purif* 25 (2002) 353-361.

- [154] E. Thorin, S.M. Shreeve, Heterogeneity of vascular endothelial cells in normal and disease states, *Pharmacol Ther* 78 (1998) 155-166.
- [155] M. Takahashi, Y. Yui, H. Yasumoto, T. Aoyama, H. Morishita, R. Hattori, C. Kawai, Lipoproteins are inhibitors of endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta, *Am J Physiol* 258 (1990) H1-8.
- [156] R.M. McAllister, D.M. Morris, C.M. Weimer, M.H. Laughlin, Effects of high-density lipoprotein on endothelium-dependent vasorelaxation, *Appl Physiol Nutr Metab* 35 (2010) 319-327.
- [157] A. American Diabetes, Treatment of hypertension in adults with diabetes, *Diabetes Care* 25 (2002) 199-201.
- [158] Ministerio de Salud Chile, Guía Clínica Hipertensión Arterial Primaria o Esencial en personas de 15 años y más, (2005).
- [159] P.E. Fielding, K. Nagao, H. Hakamata, G. Chimini, C.J. Fielding, A two-step mechanism for free cholesterol and phospholipid efflux from human vascular cells to apolipoprotein A-1, *Biochemistry* 39 (2000) 14113-14120.
- [160] K. Takahashi, Y. Kimura, N. Kioka, M. Matsuo, K. Ueda, Purification and ATPase activity of human ABCA1, *J Biol Chem* 281 (2006) 10760-10768.
- [161] W. Chan, X. Yao, W. Ko, Y. Huang, Nitric oxide mediated endothelium-dependent relaxation induced by glibenclamide in rat isolated aorta, *Cardiovasc Res* 46 (2000) 180-187.
- [162] T.J. Nieland, J.T. Shaw, F.A. Jaipuri, J.L. Duffner, A.N. Koehler, S. Banakos, V.I. Zannis, T. Kirchhausen, M. Krieger, Identification of the molecular target of small molecule inhibitors of HDL receptor SR-BI activity, *Biochemistry* 47 (2008) 460-472.
- [163] G.G. Yegutkin, T. Henttinen, S. Jalkanen, Extracellular ATP formation on vascular endothelial cells is mediated by ecto-nucleotide kinase activities via phosphotransfer reactions, *FASEB J* 15 (2001) 251-260.
- [164] E. Gendaszewska-Darmach, M. Maszewska, M. Zaklos, M. Koziolkiewicz, Degradation of extracellular nucleotides and their analogs in HeLa and HUVEC cell cultures, *Acta Biochim Pol* 50 (2003) 973-984.
- [165] L. Wang, L. Karlsson, S. Moses, A. Hultgardh-Nilsson, M. Andersson, C. Bornha, T. Gudbjartsson, S. Jern, D. Erlinge, P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells, *J Cardiovasc Pharmacol* 40 (2002) 841-853.
- [166] C.N. Hess, R. Kou, R.P. Johnson, G.K. Li, T. Michel, ADP signaling in vascular endothelial cells: ADP-dependent activation of the endothelial isoform of nitric-oxide synthase requires the expression but not the kinase activity of AMP-activated protein kinase, *J Biol Chem* 284 (2009) 32209-32224.
- [167] J. Shen, P.E. DiCorleto, ADP stimulates human endothelial cell migration via P2Y1 nucleotide receptor-mediated mitogen-activated protein kinase pathways, *Circ Res* 102 (2008) 448-456.



“POR EL DESARROLLO LIBRE DEL ESPIRITU”

