



**Universidad de Concepción
Facultad de Farmacia
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología**

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

**Vías de Señalización Involucradas en el Aumento de la
Síntesis de Óxido Nítrico por Apolipoproteína A-I
Libre, Vía el Receptor Ecto-F₁-ATPasa**

Luis Briceño García

Profesor tutor: Dra. Claudia Radojkovic Navarro

Profesores de la Comisión: Dr. Claudio Aguayo Tapia

Dr. Marcelo González Ortiz

Noviembre de 2015

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
MARCO TEÓRICO	8
El endotelio vascular	8
Óxido nítrico	8
Sintasa de óxido nítrico endotelial	10
Vías de señalización PI3K / Akt y MAPK en la síntesis de óxido nítrico	17
a) Vía de señalización PI3K/ Akt	17
b) Vía de señalización de las MAPK	20
Lipoproteínas de alta densidad, apolipoproteína A-I	22
Lipoproteínas de alta densidad, apolipoproteína A-I y síntesis de óxido nítrico	26
Receptores de apoA-I y su posible participación en la síntesis de óxido nítrico	31
a) SR-BI	31
b) ABCG1	32
c) ABCA1	32
d) Ecto-F ₁ -ATPasa	33
Ecto-F ₁ -ATPasa y síntesis de óxido nítrico	35
Receptores purinérgicos implicados en la vía de ecto-F ₁ -ATPasa	40
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	42
HIPÓTESIS	43
OBJETIVO	43
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
MATERIALES Y MÉTODOS	44
I. Obtención de ligandos de ecto-F ₁ -ATPasa	44
II. Inhibidores y anticuerpos bloqueantes	45
III. Obtención y cultivo de células HUVECs	45
IV. Biodisponibilidad de NO	46
V. Actividad de la eNOS	47

VI. Western blot para proteínas fosforiladas	47
VII. Análisis estadísticos	48
RESULTADOS	49
Obtención de apoA-I	49
Efecto de apoA-I sobre la síntesis de óxido nítrico	51
Receptores de apoA-I en la síntesis de óxido nítrico	55
Vías PI3K / Akt y ERK1/2 en la síntesis de óxido nítrico por apoA-I	60
Receptores P2Y involucrados en el efecto de apoA-I en la síntesis de NO	69
DISCUSIÓN	71
AGRADECIMIENTOS	82
REFERENCIAS	83
ANEXOS	92



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura y función de homodímeros de NOS.	11
Figura 2: Reacción de formación de NO por la eNOS.....	13
Figura 3: Residuos potenciales de fosforilación en la secuencia primaria de la eNOS.	15
Figura 4: Vías de señalización involucradas en la fosforilación de la eNOS.....	16
Figura 5: Vía PI3K/Akt.....	19
Figura 6: Vía de las MAPK ERK1/2	21
Figura 7: Organización de una lipoproteína de alta densidad	23
Figura 8: Transporte reverso del colesterol.....	25
Figura 9: ApoA-I produce vasodilatación en ensayos de miografía.	28
Figura 10: ApoA-I aumenta la fosforilación de la eNOS.....	29
Figura 11. ApoA-I activa las vías PI3K β / Akt y ERK1/2.	30
Figura 12: F ₁ F ₀ -ATP sintasa mitocondrial.....	34
Figura 13: Ecto-F ₁ -ATPasa participa en la vasodilatación generada por apoA-I.....	37
Figura 14: Ecto-F ₁ -ATPasa media el aumento de fosforilación de la eNOS en serina 1177, producido por apoA-I.....	38
Figura 15: Ecto-F ₁ -ATPasa participa en la fosforilación de Akt y ERK 1/2 provocadas por apoA-I.....	39
Figura 16: Verificación de la pureza de las HDL	50

Figura 17: ApoA-I aumenta la síntesis de NO en células HUVECs.....	52
Figura 18: ApoA-I aumenta la síntesis de NO a través de la actividad de la eNOS.....	54
Figura 19: ApoA-I aumenta la síntesis de NO, vía ecto-F ₁ -ATPasa	57
Figura 20: ABCA1 no participa en la síntesis de NO producida por apoA-I.....	58
Figura 21: SR-BI participa de manera parcial en la síntesis de NO, producida por apoA-I.....	59
Figura 22: PI3K participa en la síntesis de NO generada por apoA-I.....	61
Figura 23: Las isoformas β y γ de PI3K participan en la síntesis de NO, producida por apoA-I.....	62
Figura 24: Akt participa en la síntesis de NO generada por apoA-I.....	64
Figura 25: ERK 1/2 participa en la síntesis de NO, generada por apoA-I.	65
Figura 26: PI3K/Akt y ERK1/2 participan en conjunto en la síntesis de NO por apoA-I.	67
Figura 27: PI3K fosforila ERK1/2, en células incubadas con apoA-I.	68
Figura 28: ApoA-I aumenta la síntesis de NO, a través de la activación del receptor P2Y ₁	70
Figura 29: Modelo propuesto para la regulación de la síntesis de NO por apoA-I, vía ecto-F ₁ -ATPasa	81
Figura anexa 1: ABCA1 participa en la mayor actividad de la eNOS, generada por apoA-I.....	92
Figura anexa 2: ABCA1 participa en la fosforilación de eNOS en S1177 provocada por apoA-I.	93
Figura anexa 3: SR-BI aumenta la actividad de eNOS dado por apoA-I libre.....	94
Figura anexa 4: SR-BI participa en la fosforilación de eNOS provocada por apoA-I.....	95

ABREVIATURAS

ABCA1.- ATP <i>binding cassette</i> A1	iNOS.- sintasa de óxido nítrico inducible
ABCG1.- ATP <i>binding cassette</i> G1	LCAT.- lecitina colesterol aciltransferasa
ADMA.- dimetilarginina asimétrica	LDL.- lipoproteínas de baja densidad
Akt.- proteína quinasas B	LKB1.- quinasa hepática B1
AMPK.- quinasa activada por adenosina monofosfato	MAPK.- proteína quinasa activada por mitógenos
ApoA-I.- apolipoproteína A-I	MAPKK.- MAPK quinasa
ATP.- adenosina trifosfato	MAPKKK.-MAPKK quinasa
BAECs.- células endoteliales de aorta de bovino	MEK 1/2.- proteína quinasa quinasa activada por mitógeno
BLT-1.- bloqueador de transporte de lípidos-1	NADPH.- nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
BH ₄ .- tetrahidrobiopterina	nNOS.- sintasa de óxido nítrico neuronal
CaM.- Calmodulina	NO.- óxido nítrico
CaMKII.- proteína quinasa II dependiente de Ca ²⁺ /CaM	PDK1.-quinasa dependiente de fosfoinositol-1
CAMKK.- proteína quinasa quinasa II dependiente de calcio/calmodulina	PKA.- proteína quinasa A
CETP.- proteína de transferencia de ésteres de colesterol	PKB.- proteína quinasa B (Akt)
CF6.- factor acoplante 6	PKC.- proteína quinasa C
DDHA.- dimetilarginina dimetilhidrolasa	PKG.- proteína quinasa G
ERK 1/2.- quinasas 1/2 reguladas por señal extracelular	PI3K.- fosfoinositol 3-quinasas
eNOS.- sintasa de óxido nítrico endotelial	PIP2.- fosfoinositol difosfato
FAD.- flavina adenina dinucleótido	PIP3.- fosfoinositol trifosfato
FMN.- flavina mononucleótido	PP1.- proteínas fosfatasas 1PP2A.- proteína fosfatasa 2A
GMPc.- guanosín monofosfato cíclico	PP2B.- proteínas fosfatasas 2B
HAECs.- células endoteliales de aorta humana	PTEN.- <i>phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10</i>
HCAECs.- células endoteliales de arteria coronaria humana	P2Y: receptor purinérgico Y
HDL.- lipoproteínas de alta densidad	ROS.- especies reactivas del oxígeno
HUVECs.- células endoteliales de vena de cordón umbilical	SR-BI.- receptor <i>scavenger</i> clase B tipo I
IF ₁ : factor inhibitorio 1	TNF- α .- factor de necrosis tumoral α
	VEGF.- factor de crecimiento endotelial vascular
	VLDL.- lipoproteínas de muy baja densidad

RESUMEN

La disfunción endotelial es un evento temprano en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular, y se caracteriza por una disminución en la síntesis y/o biodisponibilidad de óxido nítrico (NO). El NO es producido por la sintasa de NO endotelial (eNOS) y una disminución en la actividad de esta enzima conlleva un déficit en la respuesta vasodilatadora. Las lipoproteínas de alta densidad (HDL), conocidas por sus propiedades antiaterogénicas, favorecen la síntesis de NO, a través de interacciones entre su proteína mayoritaria, la apolipoproteína A-I (apoA-I), y receptores de superficie; sin embargo, existe escasa información del efecto de apoA-I, en su forma libre de lípidos, sobre la síntesis de NO. Resultados preliminares de nuestro laboratorio indican que apoA-I aumenta la fosforilación de la eNOS en S1177, lo que se asocia a una mayor respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio. En células endoteliales, se ha descrito a ecto-F₁-ATPasa como el mayor receptor de apoA-I libre, unión que aumenta la actividad hidrolasa de esta enzima (conversión de ATP a ADP). El ADP interacciona con receptores purinérgicos, lo que favorece la proliferación y supervivencia celular. Ensayos preliminares sugieren que apoA-I activa las vías de señalización Akt y ERK1/2, lo cual es revertido por IF₁, un inhibidor de ecto-F₁-ATPasa.

El objetivo de esta tesis fue determinar si apoA-I aumenta la síntesis de NO a través de las vías de señalización PI3K/ Akt y ERK1/2, corriente abajo del receptor ecto-F₁-ATPasa y de receptores purinérgicos expresados en el endotelio vascular (P2Y₁ y/o P2Y₁₂).

Los resultados muestran que apoA-I aumenta significativamente la actividad de la eNOS, la biodisponibilidad de NO y la fosforilación de eNOS en S1177. Estos efectos son disminuidos significativamente con inhibidores de ecto-F₁-ATPasa, mientras anticuerpos bloqueantes anti ABCA1 o SR-BI no modifican significativamente la síntesis de NO generada por apoA-I. La co-incubación de apoA-I con los inhibidores: wortmanina (PI3K), TGX-221 (PI3Kβ), triciribine (Akt), U-0126 (ERK1/2) y MRS-2179 (P2Y₁) bloquean el efecto de apoA-I en la síntesis de NO.

Se concluye que apoA-I favorece la síntesis de NO, principalmente a través del receptor ecto-F₁-ATPasa, el cual, mediante un aumento de ADP extracelular, activa el receptor P2Y₁. Éste gatilla la vía PI3K (β), la cual activa en forma paralela Akt y ERK1/2, las que fosforilan a la eNOS en S1177, aumentando su actividad enzimática y la síntesis de NO. Estos hallazgos, aportan al conocimiento de los efectos de apoA-I en el endotelio vascular y evidencian el rol central de ecto-F₁-ATPasa en mecanismos que regulan la síntesis de NO.

ABSTRACT

Endothelial dysfunction is an early event in the development of cardiovascular disease, and is characterized by a decrease in the synthesis and/or bioavailability of nitric oxide (NO). NO is produced by the endothelial NO synthase (eNOS) and a decrease in the activity of this enzyme activity enzyme leads to a deficit in the vasodilator response. High density lipoproteins (HDL), known for their anti-atherogenic properties, favor the synthesis of NO through interactions between its major protein, apolipoprotein AI (apoA-I), and surface receptors; however, there is little information about the effect of apoA-I in its lipid-free form on the synthesis of NO. Preliminary results from our laboratory show that apoA-I increases the phosphorylation of eNOS at S1177, which is associated to a bigger vasodilator endothelium-dependent response. In endothelial cells, it has been described to ecto-F₁-ATPase as the main lipid-free apoA-I receptor. This binding increases the hydrolase activity of this enzyme (conversion of ATP to ADP). The ADP interacts with purinergic receptors, which promotes cell proliferation and cell survival. Preliminary assays suggest that apoA-I's signaling pathways activated Akt and ERK1/2, which is reversed by IF₁, an inhibitor of ecto-F₁-ATPase.

The aim of this thesis was to determine if apoA-I increases the synthesis of NO through the PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways, downstream of the receptor ecto-F₁-ATPase and the purinergic receptors expressed in vascular endothelium (P2Y₁ and/or P2Y₁₂).

Our results showed that apoA-I significantly increases the activity of eNOS, the NO bioavailability and the phosphorylation of eNOS at S1177. These effects were significantly decreased with the inhibitors of ecto-F₁-ATPase, while blocking antibodies against ABCA1 and SR-BI do not changed significantly the synthesis of NO generated by apoA-I. The co-incubation of apoA-I with the inhibitors: wortmannin (PI3K), TGX-221 (PI3K β), triciribine (Akt), U-0126 (ERK1/2) and MRS-2179 (P2Y₁) blocked the effect of apoA-I on NO synthesis.

We conclude that apoA-I promotes the synthesis of NO mainly through the receptor ecto-F₁-ATPase, which, by increasing extracellular ADP, activates the P2Y₁ receptor. This triggers PI3K (β) pathway, which activates Akt and ERK1/2, those phosphorylate eNOS at S1177, this increase its enzymatic activity and NO synthesis. These findings contribute to the knowledge of the effects of apoA-I in the vascular endothelium and demonstrate the central role of ecto-F₁-ATPase in mechanisms that regulate the synthesis of NO.

MARCO TEÓRICO

El endotelio vascular

El endotelio es una monocapa de células endoteliales que recubre el interior de los vasos sanguíneos. En un adulto, el endotelio está constituido por una cantidad aproximada de 10^{13} células endoteliales, que representan alrededor de 1 kg del peso corporal total¹. En el pasado, el endotelio era considerado una estructura inerte que sólo constituía una barrera mecánica no reactiva. Hoy, en cambio, se sabe que el endotelio es un órgano que participa activamente en la regulación de la homeostasis vascular. Como barrera mecánica, el endotelio es semipermeable y regula el paso de moléculas entre el lumen vascular y el sub-endotelio. Por otro lado, las células endoteliales desarrollan funciones metabólicas, como la producción de matriz extracelular, la síntesis de factores antitrombóticos, de factores procoagulantes, factores de crecimiento, factores vasodilatadores y vasoconstrictores, mediadores inflamatorios, y participa en el metabolismo lipídico. Por lo tanto, el endotelio ejerce efectos endocrinos, paracrinos y autocrinos que regulan la función de plaquetas, leucocitos, células musculares lisas y del propio endotelio².

La alteración deletérea de la fisiología endotelial genera **disfunción endotelial**, condición caracterizada por un estado vasoconstrictor, pro-inflamatorio y pro-trombótico, que constituye una etapa temprana y clave en el inicio, progresión y desarrollo de complicaciones en el proceso aterosclerótico y en la enfermedad cardiovascular³. La disfunción endotelial está asociada a diversos factores de riesgo cardiovascular, tales como el tabaquismo, la hipercolesterolemia, la diabetes mellitus y la hipertensión. Todos ellos tienen como común denominador un déficit en la síntesis y/o biodisponibilidad de óxido nítrico (NO), lo que determina una disminución de la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio, una característica funcional temprana de la disfunción endotelial⁴.

Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es un compuesto químico formado por un átomo de nitrógeno y un átomo de oxígeno. El NO puede encontrarse en 3 estados redox: como ion nitrosonio (NO^+), como radical libre sin carga ($\text{NO}\cdot$) y como anión nitroxilo (NO^- o HNO). A pesar de esta diversidad, se ha demostrado que el radical libre $\text{NO}\cdot$ es el que ejerce los efectos biológicos atribuidos al NO^- ⁵.

Una propiedad funcional importante del NO es su gran potencia como agente vasodilatador, cualidad que es utilizada farmacológicamente en el tratamiento de la enfermedad isquémica cardiaca, mediante el uso de precursores de NO, como la nitroglicerina⁶.

En 1980, Furchgott y Zawadzki demostraron que la relajación vascular inducida por acetilcolina era dependiente de la presencia de endotelio, y proporcionaron la primera evidencia de la liberación de un factor humoral volátil por el endotelio⁷. Esta molécula, denominada Factor Relajante Derivado de Endotelio (EDRF), fue posteriormente identificada como NO⁸.

El NO generado por el endotelio es capaz de difundir hacia las células musculares lisas de la túnica media, donde activa la guanilato ciclasa, lo que produce un incremento en la concentración de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) y una disminución de Ca²⁺ intracelular. Estos eventos provocan la relajación de la célula muscular lisa y vasodilatación⁹. Además, el NO puede alcanzar el lumen vascular, donde inhibe la agregación plaquetaria, la adhesión y la proliferación de leucocitos, mediante la activación de la guanilato ciclasa y el aumento de GMPc¹⁰. Finalmente, el NO protege al endotelio del estrés oxidativo, a través de la eliminación de radicales libres, y estimula la movilización de células progenitoras endoteliales desde médula ósea, las cuales se diferencian a células endoteliales maduras y participan de la reparación del endotelio¹¹.

La biodisponibilidad de NO puede ser afectada positiva o negativamente por distintos mecanismos, entre los que se encuentran:

- a) Alteraciones en la síntesis de NO, las que se pueden deber, por ejemplo, a la disponibilidad del precursor de NO, la L-arginina, a cambios post-traduccionales de la enzima que sintetiza el NO (la sintasa de óxido nítrico endotelial, eNOS)¹², al nivel de expresión de la eNOS¹³, a polimorfismos genéticos de esta enzima¹⁴, a la localización intracelular¹⁵, entre otros.
- b) Cambios en la velocidad de descomposición de NO, los que se relacionan principalmente con la presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS) que reaccionan con NO, disminuyendo la fracción de esta molécula disponible para ejercer los efectos biológicos antes descritos¹⁶.

Sintasa de óxido nítrico endotelial

El NO es sintetizado por las enzimas sintasa de óxido nítrico (NOS), desde un grupo guanidino del amino ácido L-arginina. En el humano, existen tres isoformas de NOS: la isoforma endotelial (eNOS), la neuronal (nNOS) y la inducible (iNOS). La eNOS y la nNOS son expresadas en forma constitutiva y su actividad requiere de la presencia de Ca^{2+} , mientras que la iNOS, presente en macrófagos y otros tejidos, es independiente de Ca^{2+} y su expresión aumenta en respuesta a citoquinas inflamatorias¹⁷.

El gen de nNOS se localiza en el cromosoma 12 y genera una proteína de 1434 aminoácidos y 161 kDa¹⁸. El gen de la iNOS se ubica en el cromosoma 17 y codifica para una proteína de 1153 residuos y 131 kDa¹⁹. El gen de la eNOS se presenta en el cromosoma 7 y la proteína expresada, de tamaño molecular de 133 kDa, está constituida por 1203 aminoácidos²⁰. A nivel aminoacídico, las NOS presentan un 51-57% de homología¹⁷.

En su estructura tridimensional, las NOS están formadas por un dominio oxigenasa en el extremo N-terminal, el cual incluye sitios de unión para el sustrato L-arginina, para el grupo prostético hemo y para el cofactor tetrahidrobiopterina (BH_4). En el extremo C-terminal, las NOS poseen un dominio reductasa, que contiene un sitio de unión para calmodulina (CaM), para nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), flavina adenina dinucleótido (FAD) y flavina mononucleótido (FMN). El dominio reductasa de las NOS permite el flujo de electrones desde NADPH hacia el grupo hemo del dominio oxigenasa, lo cual es facilitado por la unión de CaM^{17, 21}.

La enzima NOS activa es un homodímero, cuyos monómeros se orientan espacialmente de manera paralela e interaccionan a través de los dominios oxigenasa, los cuales se localizan al interior del dímero. Se ha encontrado que la interacción con BH_4 es esencial para esta asociación, ya que contribuye a la estabilización del dímero a través de fuertes interacciones hidrofóbicas. La estructura dimérica de las NOS crea sitios de unión para BH_4 , el cual secuestra dos grupos hemo, conforma el sitio de unión para L-arginina y forma un canal de electrones activo al centro de esta enzima (**Figura 1**)^{22, 23}.

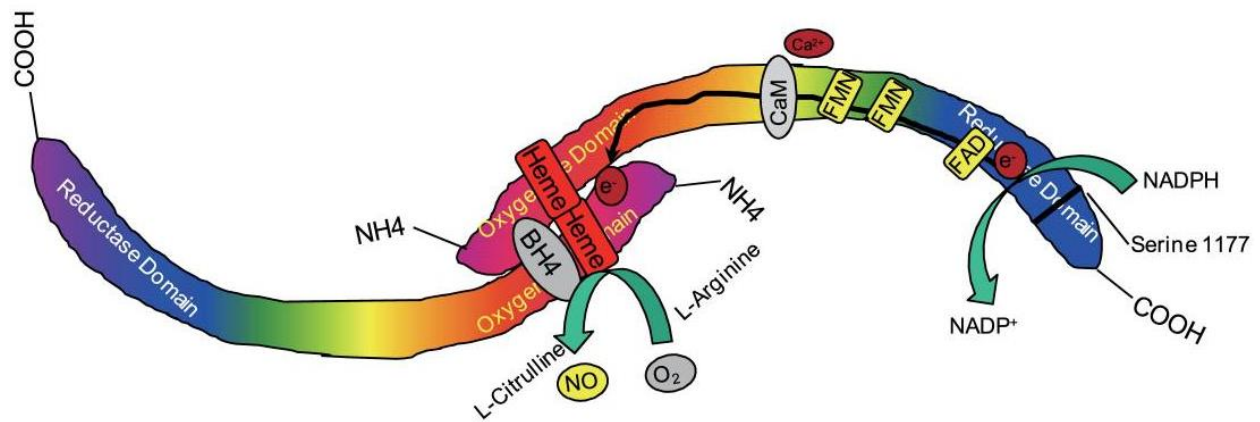


Figura 1. Estructura y función de homodímeros de NOS. Cada monómero se compone de un dominio reductasa y un dominio oxigenasa. Los cofactores flavina adenina dinucleótido (FAD) y flavina mononucleótido (FMN), en el dominio reductasa, captan electrones de adenina nicotinamida dinucleótido fosfato (NADPH) y los transportan al grupo hemo en el dominio oxigenasa ubicado al centro del homodímero. En presencia del sustrato L-arginina y del cofactor tetrahidrobiopterina (BH₄), el dímero de NOS reduce O₂ y se genera NO y L-citrulina. Peng y col, *PLoS One*, 2015,1-17.

En relación a la eNOS, es una enzima de gran importancia en la mantención del tono vascular, debido a su rol central en la producción de NO por el endotelio. Para la síntesis de NO, es necesaria la presencia de los siguientes sustratos: L-arginina, NADPH y oxígeno, además de los cofactores y coenzimas antes mencionados²⁴. El mecanismo de reacción ocurre en 2 etapas: primero, desde L-arginina se genera N^w-hidroxiarginina, un intermediario producido por la reacción de una molécula de oxígeno y una de NADPH, todo en presencia de BH₄. En la segunda etapa, se sintetiza NO y L-citrulina, producto de la oxidación de N^w-hidroxiarginina²⁵ (**Figura 2**).

La actividad de la eNOS puede ser incrementada por diversos estímulos, como: acetilcolina, bradiquinina, trombina y adenosina trifosfato (ATP), a través de la elevación de Ca²⁺ intracelular, el cual forma un complejo con CaM, que se une a la eNOS²⁶. Además, la eNOS puede ser regulada por mecanismos independientes de Ca²⁺, por ejemplo, a través de la estabilización del ARNm y/o de la proteína, por *splicing* alternativos, modificaciones covalentes, por interacción proteína-proteína y por la biodisponibilidad de sustratos y cofactores^{27, 28}.

La eNOS se localiza en las cavéolas, dominios enriquecidos en colesterol y esfingolípidos presentes en la membrana plasmática. La eNOS se asocia a las cavéolas a través de interacciones con los lípidos caveolares, para lo cual esta enzima requiere de una acilación por miristato en el residuo glicina 2 y por palmitato en los residuos cisteína 15 y cisteína 26²⁹. En las cavéolas, la eNOS se encuentra unida a caveolina-1, asociación que inhibe la actividad de esta enzima. La unión de eNOS a caveolina-1 es disociada por el complejo Ca²⁺/CaM, lo que además de liberar a la eNOS, incrementa la tasa de transferencia electrónica desde NADPH al dominio reductasa, favoreciendo la síntesis de NO³⁰.

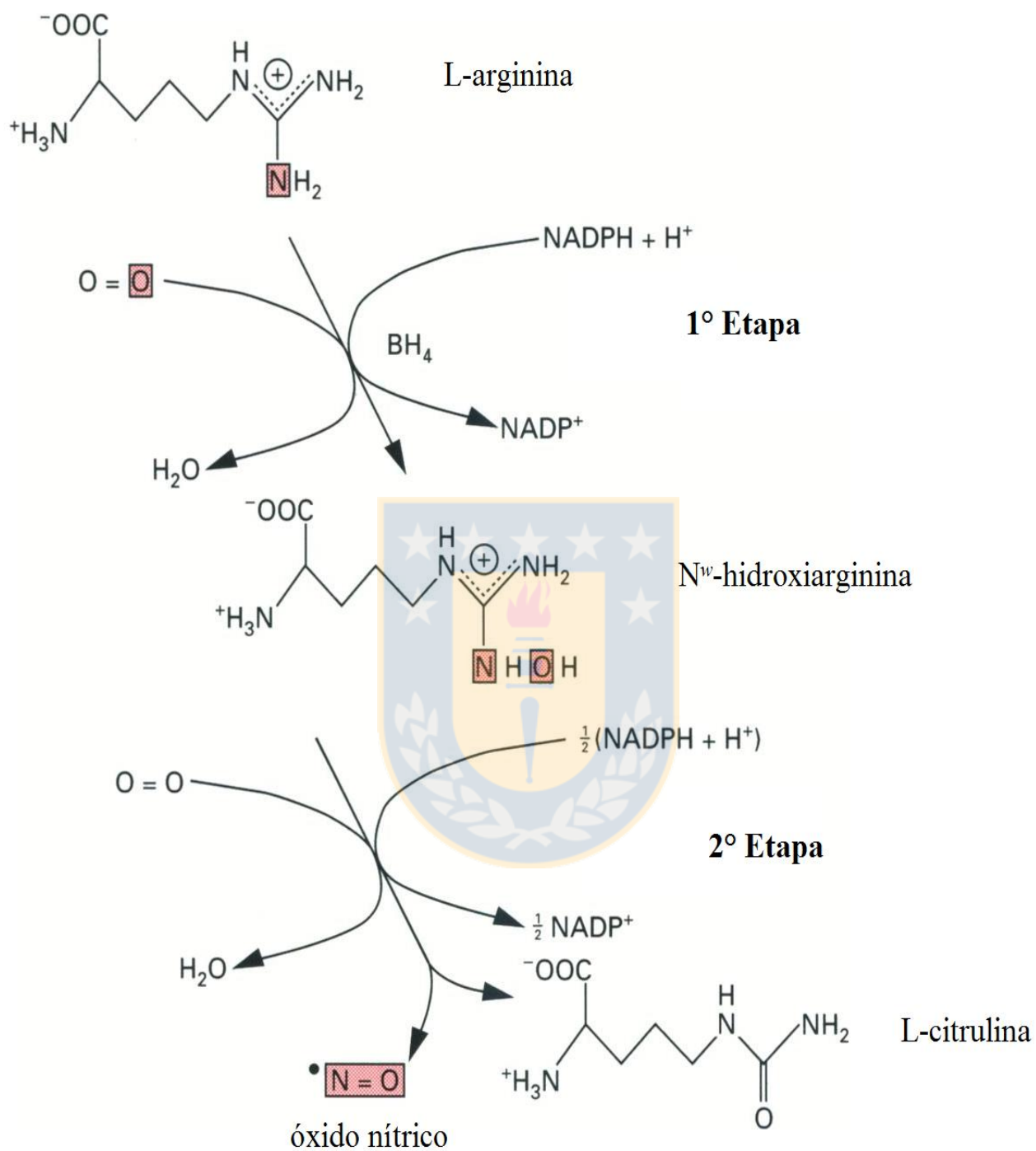


Figura 2: Reacción de formación de NO por la eNOS. En la primera etapa, L-arginina reacciona con una molécula de O_2 y NADPH, para producir agua, NADP⁺ y el intermediario N^w-hidroxiarginina. Esta última reacciona con O_2 y NADPH, generando como productos finales agua, NADP⁺, L-citrulina y NO. Knowles y col, *The Biochemical Journal*, 1994, 249-258.

Modificaciones post-traduccionales, como fosforilaciones, generan cambios rápidos en la actividad de la eNOS. En la secuencia primaria de la eNOS humana, existen cinco sitios potenciales de fosforilación: serina 114, serina 615, serina 633, serina 1177 y treonina 495 (**Figura 3**). Estudios han demostrado que la actividad de la eNOS se ve incrementada por la fosforilación en los residuos serina 1177 y serina 633, mientras la fosforilación en treonina 495 es inhibitoria. Los efectos de la fosforilación en serina 114 y en serina 615 son todavía controversiales³¹.

La fosforilación de la eNOS en serina 1177 (S1177) es la más estudiada en humanos. Esta modificación ocurre en el dominio reductasa, en el extremo C-terminal (**Figura 3**), y ha sido asociada a una mayor actividad de la eNOS, en respuesta a estímulos, tales como *shear stress*³², bradiquinina³³, insulina³⁴ y algunos fármacos, como las estatinas³⁵. El extremo C-terminal de la eNOS se ubica entre los dos monómeros de esta enzima y actúa como un dominio auto-inhibitorio, bloqueando la transferencia de electrones entre las dos unidades³⁶. Se ha propuesto que la fosforilación en S1177 genera un cambio conformacional que remueve este bloqueo, lo que permite la unión del complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ e incrementa la actividad de la eNOS³¹. La quinasa activada por adenosina monofosfato (AMPK)³⁷, las proteínas quinasas A, B y G (PKA³⁸, PKB o Akt³⁹, y PKG⁴⁰, respectivamente), el complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, la proteína quinasa II dependiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (CaMKII)⁴¹ y la proteína fosfatasa 2A (PP2A)⁴² han sido implicadas en la regulación de la fosforilación de eNOS en S1177 (**Figura 4**).

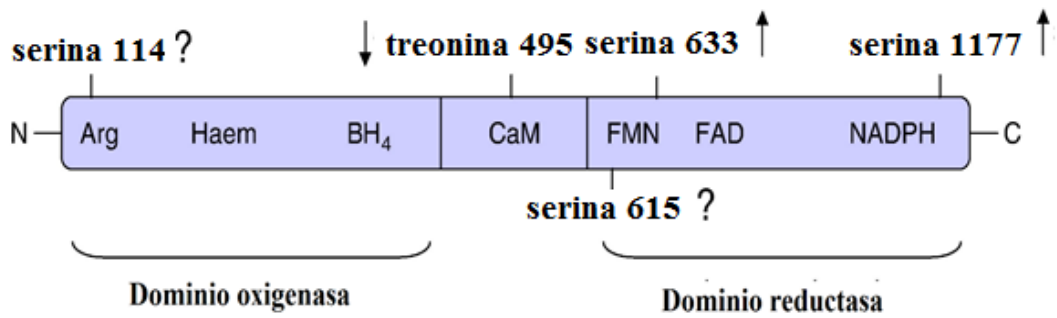


Figura 3: Residuos potenciales de fosforilación en la secuencia primaria de la eNOS. Se indica la relación con sitios de unión de cofactores y el efecto de estas fosforilaciones en la actividad de la eNOS (↑: aumento, ↓: disminución, ?: efecto aún desconocido). Arg: L-arginina, BH₄: tetrahydrobiopterina, CaM: calmodulina, FAD: flavina adenina dinucleótido, FMN: flavina mononucleótido, Haem: grupo hemo, NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido. Mount y col, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2007, 271-279.



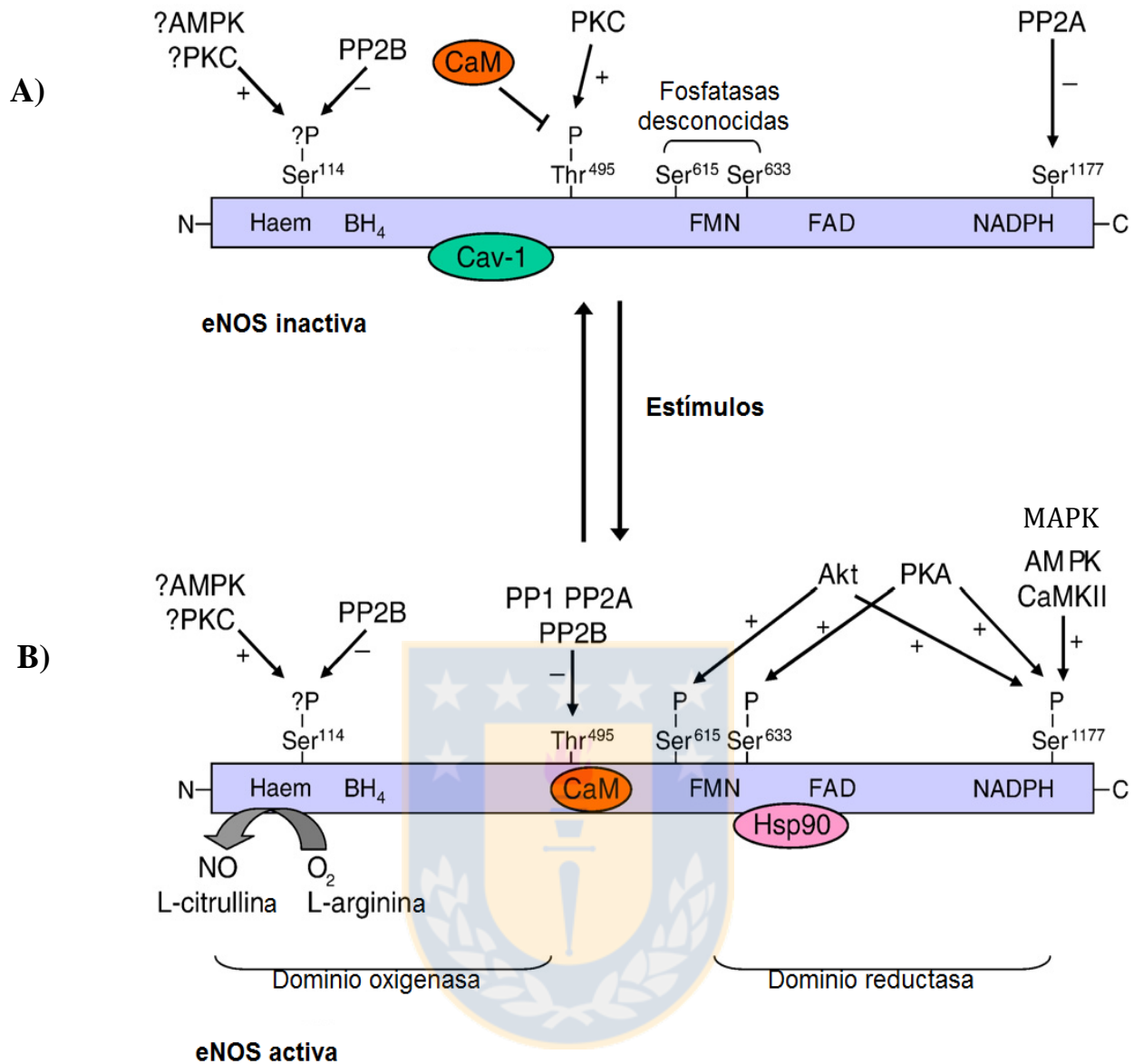


Figura 4: Vías de señalización involucradas en la fosforilación de la eNOS. Se presenta la estructura primaria de la eNOS con los potenciales sitios de fosforilación y las proteínas quinasas y fosfatasas asociadas a cada uno de ellos, tanto para una enzima inactiva (**A**) como activa (**B**). Además, se indican la relación de los sitios de fosforilación con los dominios de unión de diferentes cofactores. Akt: proteína quinasa B (PKB), AMPK: quinasa activada por adenosina monofosfato, Arg: L-arginina, BH₄: tetrahidrobiopterina, CaM: calmodulina, CAMKII: proteína quinasa II dependiente de Ca²⁺/CaM, Cav-1: caveolina 1, FAD: flavina adenina dinucleótido, FMN: flavina mononucleótido, haem: grupo hemo, Hsp90: proteína de shock térmico de 90 kDa, MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos, NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido, PKA: proteína quinasa A, PKC: proteína quinasa C, PP1: proteína fosfatasa 1, PP2: proteína fosfatasa 2A, PP2B: proteína fosfatasa 2B. Mount y col, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2007, 271-279

Vías de señalización PI3K / Akt y MAPK en la síntesis de óxido nítrico

Las vías de señalización PI3K / Akt y p44/p42 MAPK (ERK1/2) son activadas por diferentes estímulos extracelulares, como el factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento tipo insulina (IGF-1), insulina, citoquinas y estímulos ambientales^{43, 44}, y regulan, entre otras funciones, la síntesis de NO en las células endoteliales.

a) Vía de señalización PI3K/ Akt

Las fosfoinositol 3-quinasas (PI3K) constituyen una familia de proteínas que tienen como función primordial catalizar la fosforilación del anillo inositol en la posición 3 de fosfatidilinositoles. Dependiendo de los productos fosforilados, las PI3K se dividen en tres clases: PI3K I, PI3K II y PI3K III. De ellas, la más estudiada es la PI3K I, la cual se asocia a diversos eventos celulares, como proliferación, diferenciación, supervivencia, entre otros⁴⁵.

Las **PI3K clase I** catalizan la producción de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃) a partir de fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂). Pueden subdividirse en dos subclases: clase IA y clase IB, de acuerdo a la subunidad regulatoria y al receptor de membrana que la activa. La **PI3K clase IA** está compuesta por una subunidad catalítica p110 (isoformas α , β , δ) y una subunidad regulatoria p85 (variantes: p85 α , p85 β , p55 α , p55 γ y p50 α), y su activación depende principalmente de receptores asociados a tirosina quinasas. La **PI3K clase IB** está formada por la subunidad catalítica p110 γ y una subunidad regulatoria (p101 o p84) y se asocia a receptores acoplados a proteína G^{46, 47}. La **PI3K clase II** está constituida por una única proteína con actividad catalítica, de la cual existen 3 isoformas: PI3KCA2 α , PI3KCA2 β y PI3KCA2 γ . A diferencia de las de clase I, las PI3K clase II utilizan fosfatidilinositol-4-fosfato como sustrato, pero su función biológica aún no está bien caracterizada⁴⁸. Finalmente, la **PI3K clase III** presenta una subunidad catalítica denominada Vps34 (*vesicle-mediated vacuolar protein sorting 34*), y está implicada en la autofagia⁴⁹.

En relación a las PI3K clase I, su actividad enzimática produce PIP₃, el cual permite el reclutamiento y activación de la quinasa dependiente de fosfoinositol-1 (PDK1). Ésta, a su vez, fosforila a Akt en el residuo treonina 308, modificación que en conjunto con la fosforilación en Serina 473 por el complejo mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*), asegura la completa activación de Akt (**Figura 5**). Luego, un gran número de

sustratos son activados cascada abajo, entre los que se incluyen a MDM2 (*mouse double minute 2 homolog*), GSK3 β (*glycogen synthase kinase 3 beta*), FOXO (*forkhead box O transcription factor*), BAD (*Bcl-2-associated death promoter*), caspasa-9, p27, PRAS40 (*proline-rich Akt substrate of 40 kDa*) and TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*)⁵⁰. Esta cascada de señalización regula distintas rutas, como la síntesis de proteínas, proliferación celular, metabolismo (en este contexto, síntesis de NO) y supervivencia celular^{46, 51}.

La actividad de PI3K es contrarrestada por PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10*), el mayor inhibidor endógeno de PI3K, el cual desfosforila a PIP₃ en la posición D₃. PI3K y PTEN mantienen el balance de los niveles celulares de PIP₃, el cual si es desregulado por un aumento de la actividad de PI3K o por una pérdida de función de PTEN, puede desencadenar dramáticas consecuencias, como la transformación celular⁵².

En investigación, se utilizan dos inhibidores selectivos de la PI3K, que no están químicamente relacionados entre sí: wortmanina y LY294002. Puesto que estos inhibidores afectan por igual todas las isoformas de PI3K, se han diseñado moléculas, como AS-252424 (inhibidor de PI3K γ) y TGX-221 (PI3K β), que permiten identificar de manera selectiva la(s) isoformas de PI3K que participan en una vía determinada⁵³.

En relación a Akt, existen tres isoformas, denominadas α , β , y γ (también conocidas como Akt 1, 2 y 3, respectivamente). Si bien comparten un alto grado de identidad en su secuencia aminoacídica, cada isoforma genera efectos particulares. Así, por ejemplo, Akt 1 promueve el crecimiento y supervivencia celulares, Akt 2 controla la invasión celular y las características de células mesenquimales, mientras la función de Akt 3 todavía es desconocida^{50, 54}. Se ha observado que la vía de señalización dependiente de Akt incrementa la liberación de NO basal desde células endoteliales, y una deficiente activación de Akt atenúa la producción de NO, estimulado por el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF)³⁹. La actividad de Akt es inhibida de manera endógena por la fosfatasa serina-treonina, PPA2⁵⁵. Además, existen inhibidores sintéticos de Akt, como triciribine, una molécula permeable que inhibe la fosforilación, activación y señalización de todas las isoformas de Akt⁵⁶.

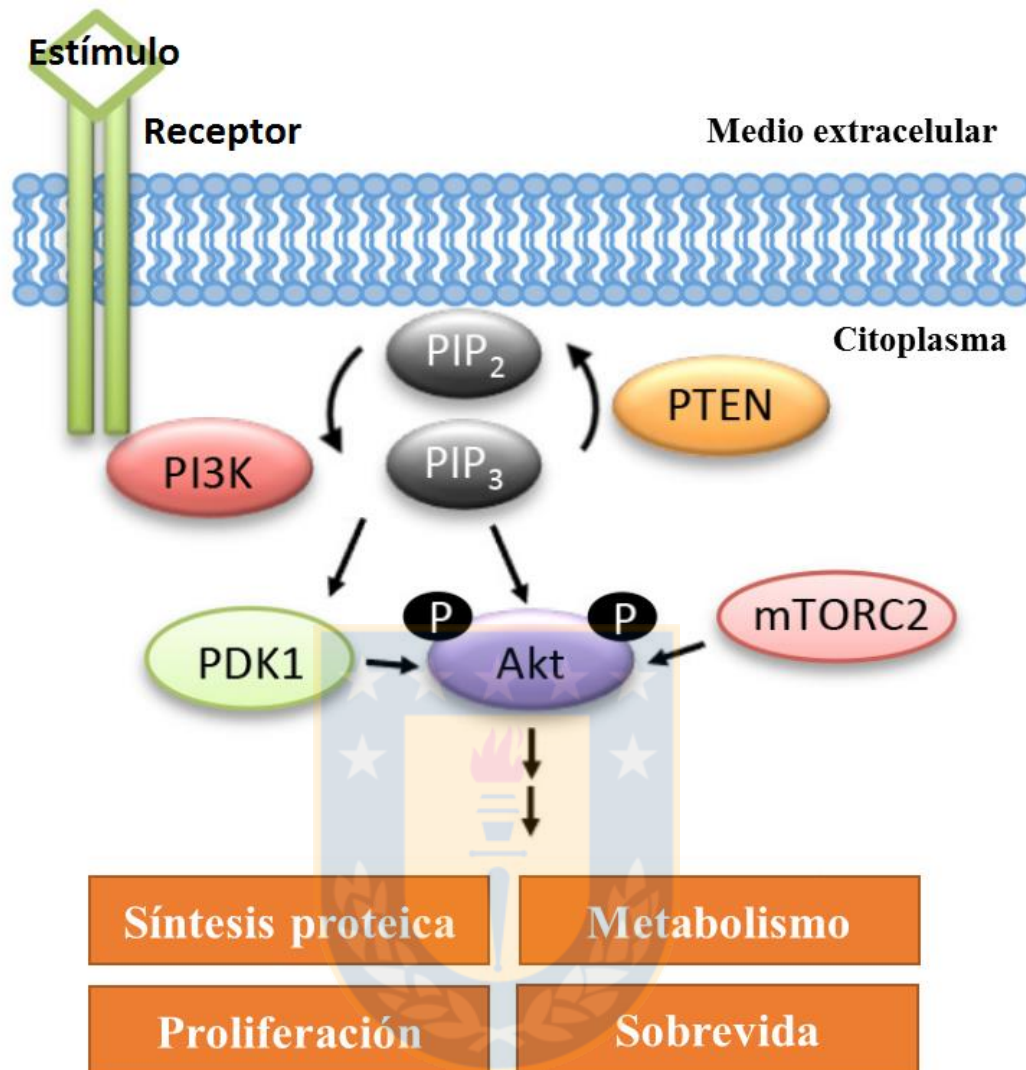


Figura 5: Vía PI3K/Akt. PI3K cataliza la formación de PIP₃, desde PIP₂, lo que es regulado por PTEN. El aumento de PIP₃, promueve la activación de Akt vía PDK1 y mTORC2, generando la activación de un gran número de efectores, que desencadenan distintos efectos celulares antes mencionados. Akt: proteína quinasa B, mTORC2: *mammalian target of rapamycin complex 2*, PDK1: quinasa dependiente de fosfoinositol-1, PIP₂: fosfoinositol di-fosfato, PIP₃: fosfoinositol tri-fosfato, PI3K: fosfoinositol 3-quinasa, PTEN: *phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10*. Kristin y col, *F1000 Prime Reports* 2015, 7:13.

b) *Vía de señalización de las MAPK*

Las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) son una familia altamente conservada de enzimas con actividad serina / treonina. Todas las células eucariotas poseen una gran variedad de MAPK, las que están involucradas en diversos procesos celulares fundamentales, como son la expresión de genes, mitosis, metabolismo, motilidad, supervivencia, apoptosis, diferenciación celular⁵⁷, y de nuestro interés, la síntesis de NO. En mamíferos se han identificado 14 MAPK, que han sido clasificadas en 7 grupos, siendo las MAPK convencionales las siguientes: quinasas 1/2 reguladas por señales extracelulares (ERK 1/2), la quinasa c-Jun amino (N)-terminal 1/2/3 (JNK 1/2/3), las isoformas de p38 (α , β , γ y δ), y ERK5⁵⁸.

Las MAPK convencionales están compuestas de un set de tres quinasas: una MAPK, MAPK quinasa (MAPKK) y MAPKK quinasa (MAPKKK). En respuesta a un estímulo extracelular que activa un receptor tirosina quinasa, se produce el reclutamiento de la proteína adaptadora Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) y los factores de intercambio de guanina SOS1/SOS2 (*Son of sevenless homolog 1 and 2*). Éstos activan una proteína unida a GTP, de la familia Ras/Rho, lo cual produce la fosforilación de MAPKKK. Estas serina / treoninas quinasas, a través de la formación de homó y heterodímeros B-RAF y C-RAF, activan a MAPKK (MEK 1/2) por fosforilación, la cual fosforila a su vez a MAPK (ERK 1/2) en residuos de treonina y serina, localizados en el *loop* de activación del dominio quinasa de la enzima (**Figura 6**)^{43, 59}.

Existe una gran variedad de inhibidores de las ERK 1/2 que se centran principalmente en la inhibición de RAF y MEK 1/2. Entre ellos destaca U-0126, un inhibidor no competitivo con respecto a ATP, selectivo para MAPK quinasa (MEK 1/2)⁶⁰.

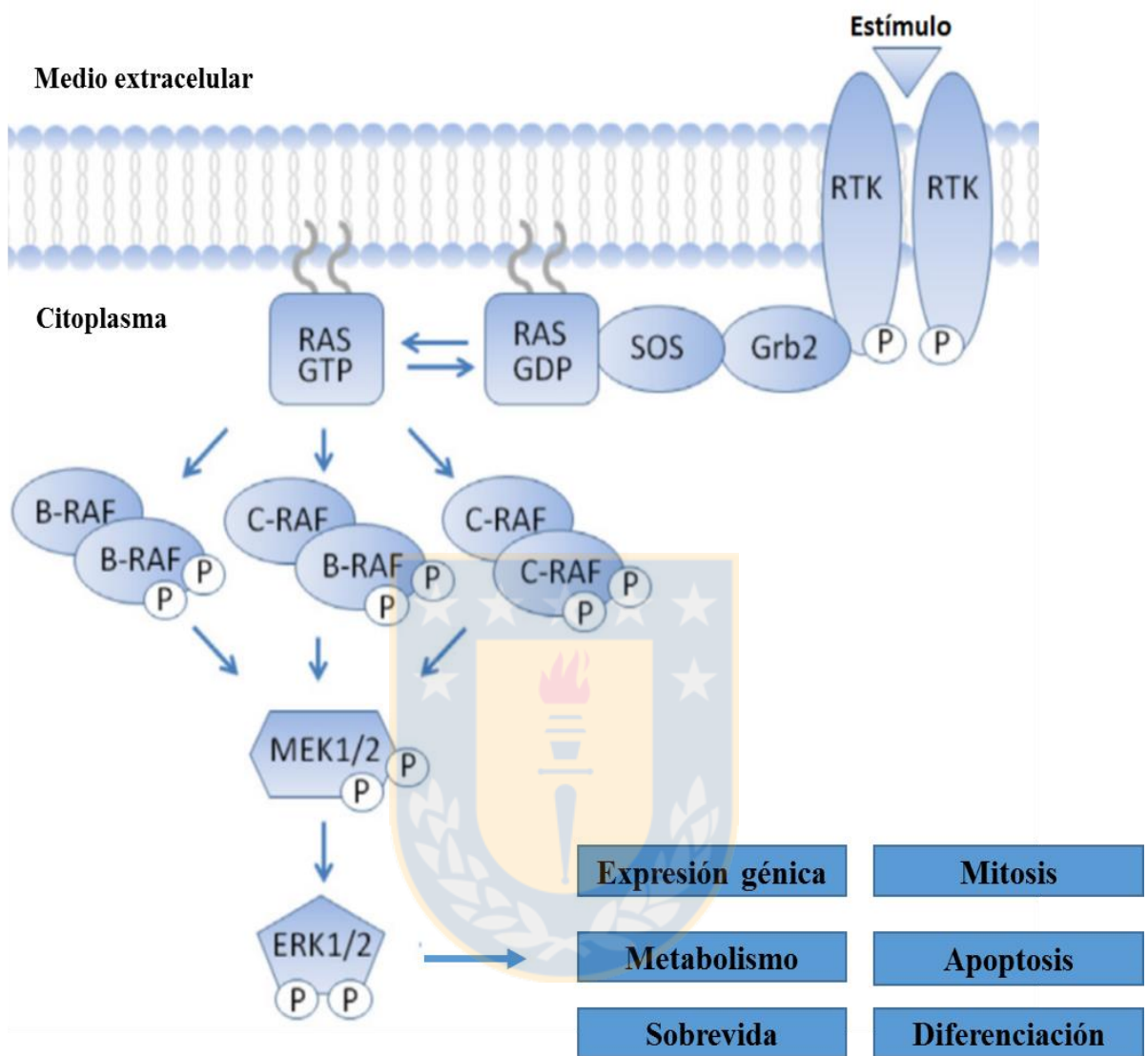


Figura 6: Vía de las MAPK ERK1/2. La activación de receptores tirosina quinasa (RTK) produce el reclutamiento de Grb2 y los factores SOS, que activan a la proteína RAS unida a GTP, la que activa a MAPKKK (RAF), ésta a MAPKK (MEK1/2) y finalmente a MAPK (ERK1/2). Esta vía de señalización favorece distintas respuestas celulares. Uehling, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2015, 4047–4056

Lipoproteínas de alta densidad y apolipoproteína A-I

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son partículas heterogéneas, compuestas de lípidos (fosfolípidos, colesterol esterificado, colesterol no esterificado y triglicéridos) y de proteínas. Más de 100 proteínas diferentes se han identificado en las HDL, sin embargo, la apolipoproteína A-I (apoA-I) es la más abundante (alrededor del 70% del contenido proteico total de las HDL)⁶¹ y desempeña un papel clave en la biogénesis y función de estas lipoproteínas⁶².

La apoA-I es una proteína de 243 aminoácidos y 28 kDa, codificada en el cromosoma 11q23-q24, en el gen de la superfamilia multigénica de las apolipoproteínas intercambiables (apoA-I, apoA-II, apoC y apoE)⁶³. La apoA-I es sintetizada en el intestino delgado y en el hígado, a la forma de pre-pro-proteína, de 267 aminoácidos. En el interior celular, la apoA-I es clivada, con lo cual pierde los primeros 18 aminoácidos del extremo N-terminal. Esta pro-proteína es secretada, y una vez en circulación sanguínea o en la linfa, es clivada nuevamente por enzimas proteolíticas, como la proteína morfogénica ósea I, con lo cual pierde 6 residuos del extremo N-terminal, generando apoA-I madura^{64, 65}. La apoA-I derivada de hígado es liberada a circulación sanguínea, ya sea en forma libre o asociada a un pequeño centro de fosfolípidos (HDL nacientes o pre- β HDL); la apoA-I sintetizada por el intestino alcanza la circulación sanguínea asociada a los quilomicrones, pero es rápidamente transferida a las HDL durante la hidrólisis de dichos complejos⁶⁶.

La gran afinidad de la apoA-I a lípidos se debe a su estructura secundaria, en particular a 8 dominios α -hélice anfipáticas, de 22 aminoácidos cada una, y a 2 dominios α -hélice anfipáticas, de 11 aminoácidos cada una⁶⁷. La asociación de apoA-I a lípidos genera partículas discoidales de HDL, las cuales son excelentes sustratos para la enzima lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT), que produce la mayor parte de colesterol esterificado en el plasma⁶⁸. El colesterol esterificado es extremadamente hidrofóbico, por lo que se localiza en el centro de las HDL, mientras lípidos polares y las apolipoproteínas rodean dicho núcleo apolar. Las HDL enriquecidas en lípidos (HDL maduras o α -HDL) adoptan una forma esférica y constituyen la estructura predominante de HDL en el plasma humano (**Figura 7**)⁶⁶.

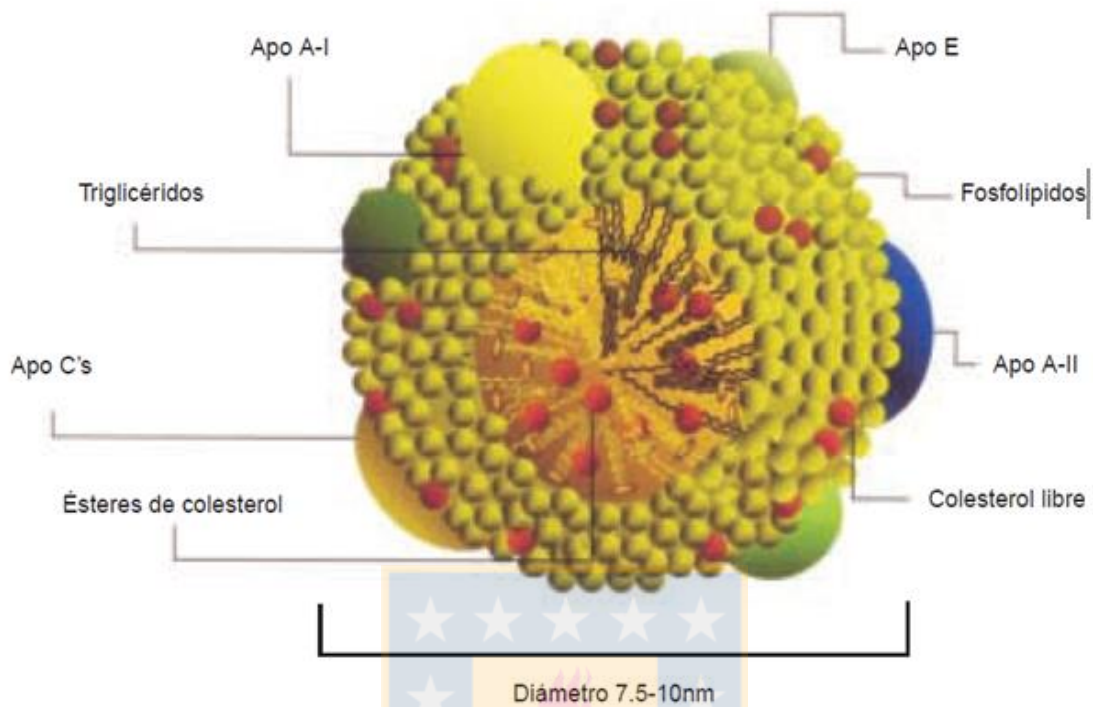


Figura 7: Organización de una lipoproteína de alta densidad. Se señalan los lípidos hidrofóbicos (triglicéridos, ésteres de colesterol) que se disponen en un núcleo apolar en las HDL y los lípidos polares (fosfolípidos, colesterol libre) que componen la capa que recubre dicho núcleo. Las apolipoproteínas se unen a los lípidos de la superficie externa por interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Méndez y Col, *Arch. Cardiol. Méx*, 2004, 53-67.

La función más descrita de las HDL es su participación en el transporte reverso de colesterol, mecanismo por el cual el colesterol no esterificado es transferido desde los tejidos periféricos, incluyendo la pared arterial, hacia el plasma y luego al hígado para su excreción a través de la bilis. Para realizar este proceso, el cual es considerado el mayor responsable de la ateroprotección atribuida a las HDL⁶⁹, el colesterol no esterificado es transferido desde tejidos periféricos a la apoA-I libre o pobremente lipídada presente en el plasma, a través del transportador *ATP binding cassette A1* (ABCA1), formando las pre- β HDL o HDL nacientes. La enzima LCAT actúa sobre estas partículas, esterificando el colesterol, lo que genera HDL esféricas pequeñas (HDL₃) y luego las HDL esféricas grandes (HDL₂). Las HDL esféricas se enriquecen de colesterol proveniente de tejidos periféricos, principalmente a través del eflujo celular mediado por *ATP binding cassette G1* (ABCG1) y por el receptor *scavenger* clase B tipo I (SR-BI). Las HDL maduras viajan en el plasma hasta el hígado, donde entregan el colesterol excedentario a través de dos vías: 1) directamente, ya sea por interacciones con SR-BI hepático, que media la captación selectiva de ésteres de colesterol, o por el receptor de la holo-partícula de HDL (HDL-R o ecto-F₁-ATPasa), o 2) indirectamente, por la cesión de lípidos a lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL y VLDL, respectivamente), mediante la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP, **Figura 8**)⁷⁰.

Es ampliamente aceptada la relación inversa entre los niveles séricos de HDL / apoA-I y el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular^{71, 72}. Esto se explica por la capacidad de estas estructuras para promover el transporte reverso de colesterol y por efectos pleiotrópicos, entre los que se encuentra la inhibición de la oxidación de las LDL⁷³, la mantención de la integridad del endotelio⁷⁴, la inhibición de la adhesión celular al endotelio vascular⁷⁵, la reducción de la agregación plaquetaria y la coagulación⁷⁶, entre otros. En este contexto, se ha descrito que las HDL pueden prevenir la disfunción endotelial y limitar la patogenia de la aterosclerosis, mediante el incremento de la relajación vascular⁷⁷. En concordancia con estos hallazgos, una disminución en los niveles plasmáticos de HDL se relaciona con el desarrollo de disfunción endotelial, uno de los primeros eventos en el desarrollo de aterosclerosis⁷².

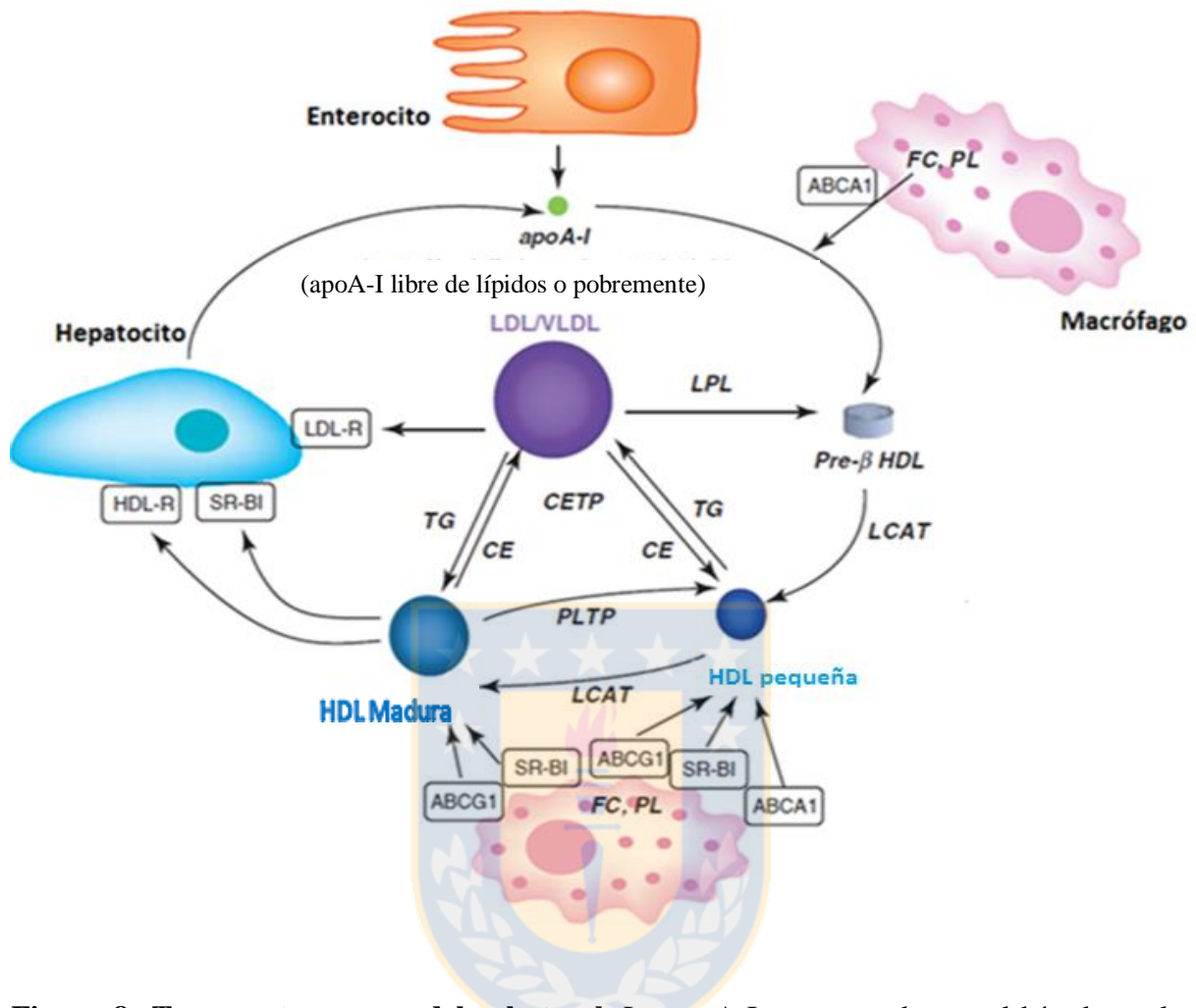


Figura 8: Transporte reverso del colesterol. La apoA-I es secretada por el hígado y el intestino, ya sea libre o asociada a algunas moléculas de fosfolípidos. La apoA-I capta fosfolípidos (PL) y colesterol libre (FC), a través de interacciones con el transportador *ATP binding cassette A1* (ABCA1) en los tejidos periféricos, lo cual genera pre-β HDL. La hidrólisis de los triglicéridos contenidos en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) o de baja densidad (LDL) por la lipoproteína lipasa (LPL) es otra fuente importante para la formación de pre-β HDL. Sobre las pre-β HDL actúa la lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT), que esterifica el colesterol libre y genera las HDL pequeñas y luego las HDL maduras. Las HDL adquieren colesterol libre y fosfolípidos por el eflujo mediado por el transportador *ATP binding cassette G1* (ABCG1) y por el receptor *scavenger* clase B tipo I (SR-BI). Las HDL transportan el colesterol hacia el hígado, donde interactúan con SR-BI y/o con HDL-R (receptor de holo-partícula de HDL) para eliminar el colesterol a través de la bilis. Además LDL/VLDL intercambian ésteres de colesterol (CE) por triglicéridos (TG) con las HDL, por acción de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP). Las LDL y las VLDL son reconocidas por el hepatocito, constituyendo otra vía de eliminación de colesterol. Camont y col, *Trends in Molecular Medicine*, 2011, 594-603.

En relación a la apoA-I, la mayor parte de esta proteína se encuentra en plasma asociada a la estructura y función de las HDL, mientras una fracción menor (5-10%, correspondiente a 50-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se encuentra libre de lípidos⁷⁸. La apoA-I libre se ha asociado a efectos protectores a nivel cardiovascular, debido a que participa en la regulación de la homeostasis del colesterol, a través del transporte reverso del colesterol. Además, en células endoteliales, se ha demostrado que apoA-I genera efectos antiapoptóticos y proliferativos, lo que favorece la mantención de la función endotelial⁷⁹.

Lipoproteínas de alta densidad, apolipoproteína A-I y síntesis de óxido nítrico

Una disminución en los niveles plasmáticos de HDL se correlaciona con un aumento en la probabilidad de sufrir enfermedad cardiovascular, esto último asociado al desarrollo de disfunción endotelial y a una disminución en la producción de NO⁸⁰. En este sentido, en trabajos con cultivos de células endoteliales, se ha observado que las HDL incrementan la abundancia de la eNOS, debido a una mayor vida media de la proteína, luego de 24 h de incubación⁸¹. Además, las HDL inducen cambios en el perfil de fosforilación de la eNOS en células endoteliales de aorta de bovino (BAECs), aumentando las fosforilación de S1179, sin modificar el residuo T497 (S1177 y T495 en humanos, respectivamente)⁸². En relación a la actividad de la eNOS, se ha demostrado que las HDL aumentan la conversión de L-arginina a L-citrulina y, por ende, la síntesis de NO⁸³. Fisiológicamente, estos efectos se traducen en una mayor vasodilatación dependiente de endotelio, como ha sido evidenciado en modelos animales⁸⁴ y en humanos⁸⁵.

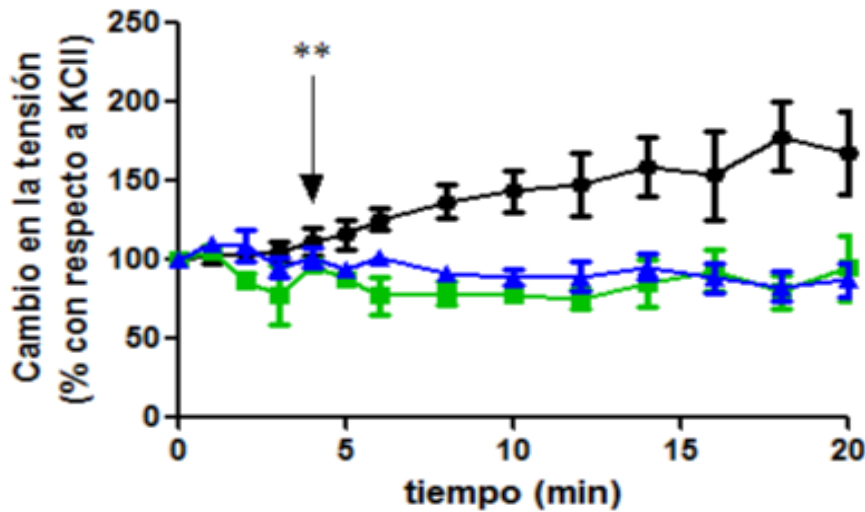
Para ejercer estos efectos, se ha demostrado la participación de distintas vías de señalización en células endoteliales, entre las cuales destacan Akt y ERK1/2, ambas dependientes de la activación de PI3K. Estas vías han sido estudiadas en diversos tipos de células endoteliales, con concentraciones de HDL entre 10-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y a tiempos cortos de incubación (<30 min)^{81, 86, 87}. También se ha evidenciado que las HDL activan la AMPK, en experimentos con células BAECs incubadas con HDL 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 30 min⁸². Otras vías de señalización activadas por HDL son: JAK/STAT, que favorecen la función endotelial, promoviendo la vasodilatación y la revascularización, y limitando la inflamación y la

expresión de moléculas de adhesión; I κ B / NF- κ B, la que se ha relacionado a una disminución de la síntesis de moléculas de adhesión y proteínas inflamatorias⁸⁶.

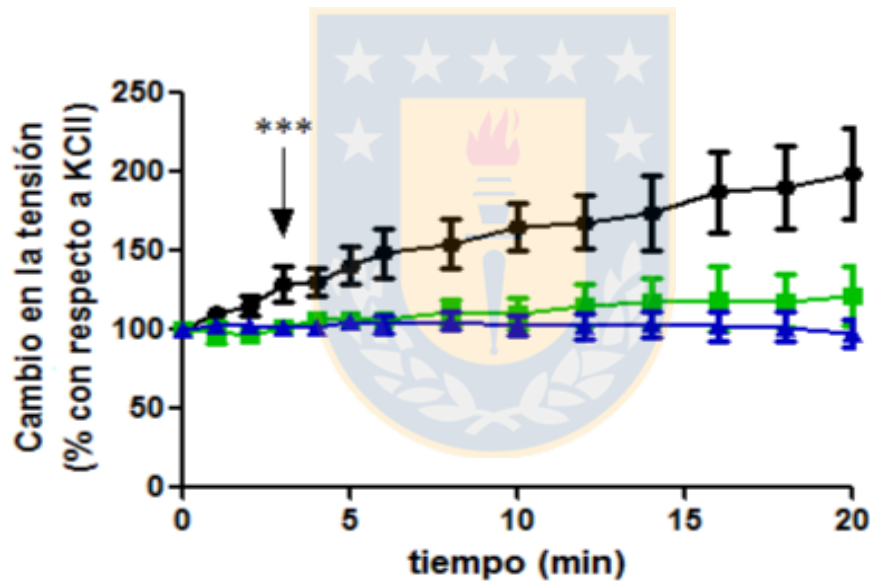
Si bien el efecto de las HDL sobre la síntesis de NO ha sido ampliamente descrito, existen pocos antecedentes sobre la acción de apoA-I libre, y éstos son controversiales. Por ejemplo, Drew y col muestran que apoA-I 40 μ g/mL, aumenta la síntesis de NO, lo cual se asocia a un aumento de la fosforilación de la eNOS en S1177 en células BAECs, a los 30 seg de incubación⁸². En concordancia con estos resultados, Ramet y col observaron que apoA-I 50 μ g/mL genera un aumento de la abundancia proteica de la eNOS en células endoteliales de aorta humana inmortalizadas, luego de 24 h de incubación⁸¹. En cambio, Yuhanna y col describen que apoA-I recombinante 10 μ g/mL, no afecta la actividad de la eNOS luego de 60 min de incubación, en células endoteliales inmortalizadas de arteria pulmonar de ovino fetal⁸³, mientras Briand y col observaron que apoA-I 100-200 μ g/mL, disminuye la liberación de NO luego de 2 h de incubación, en células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVECs) y en BAECs⁸⁸. Resultados aún no publicados de nuestro laboratorio han revelado que apoA-I 50 μ g/mL genera vasodilatación en venas coriónicas humanas y en venas de cordón umbilical (**Figura 9**). Asimismo, en cultivos de células HUVECs, apoA-I a la misma concentración produce un aumento significativo de la fosforilación de la eNOS en S1177, mientras el residuo T495 no se ve afectado por dicho estímulo (**Figura 10**).

Asociado a esta controversia, poco se sabe de los receptores de apoA-I que pudieran mediar dichos efectos y existen escasos antecedentes en relación a las vías de señalización asociadas a ellos. En el estudio conducido por Drew y col, en células BAECs, se demostró que apoA-I 50 μ g/mL genera un incremento en la fosforilación de AMPK, pero este hecho no fue relacionado a ningún efecto celular, como la actividad de la eNOS o la síntesis de NO⁸². En estudios realizados con un péptido mimético de apoA-I, denominado 5A, se observa una inactivación de la vía de señalización de NF- κ B, lo cual disminuye la inflamación y la expresión de moléculas de adhesión⁸⁹. Antecedentes preliminares de nuestro laboratorio indican que apoA-I activaría vías de señalización similares a las gatilladas por las HDL, en particular PI3K / Akt y ERK1/2, las cuales pudieran regular la síntesis de NO (**Figura 11**).

A.



B.



● Basal

■ apoA-Ihr

▲ apoA-I plasmática

Figura 9: ApoA-I produce vasodilatación en ensayos de miografía. Anillos de vena umbilical (A) y de vena coriónica (B) fueron pre-contraídos con un análogo de tromboxano A₂ (U46619). Alcanzada la máxima contracción, se adicionó apoA-Ihr (recombinante) 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. Datos no publicados, tesis de Magíster en Bioquímica Clínica e Inmunología, Srta. Paula Honorato V, 2015.

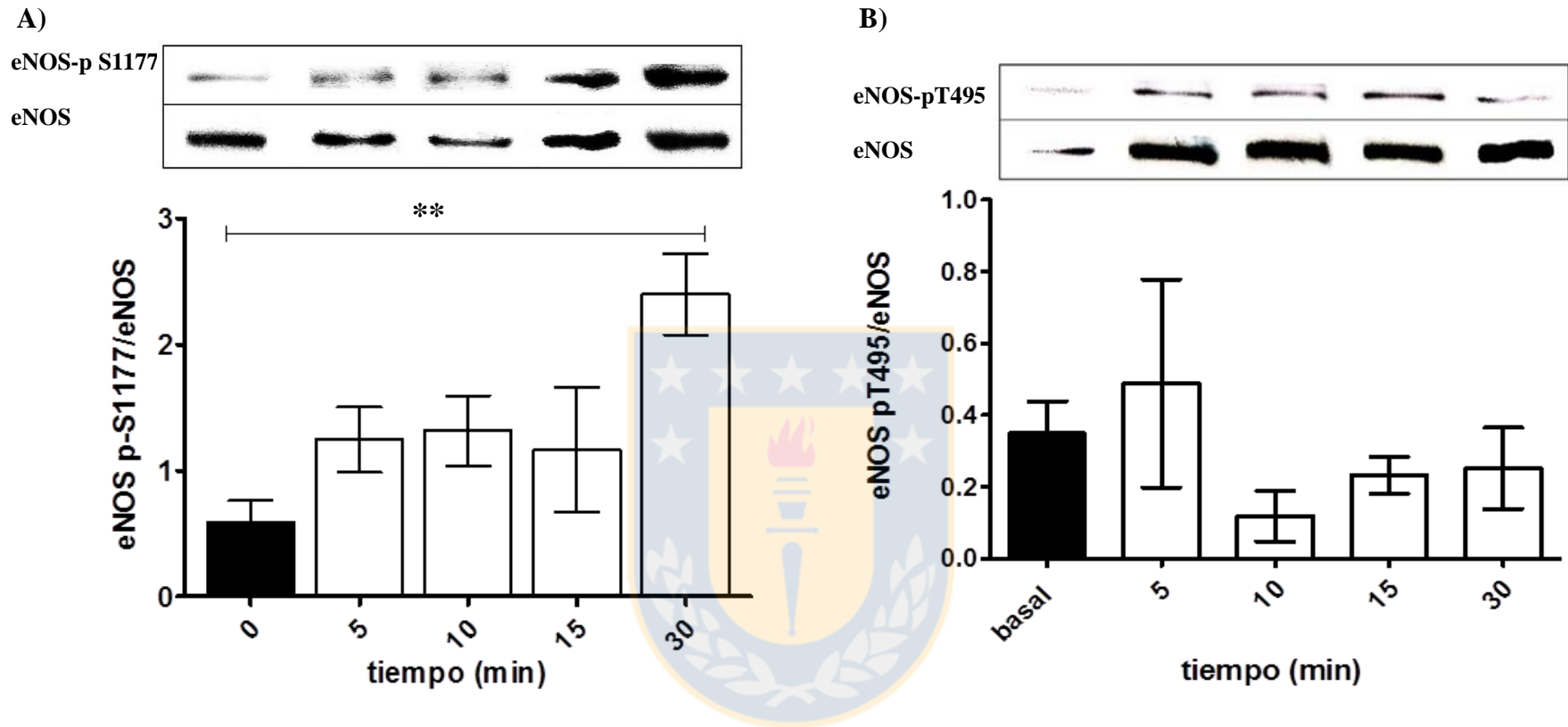
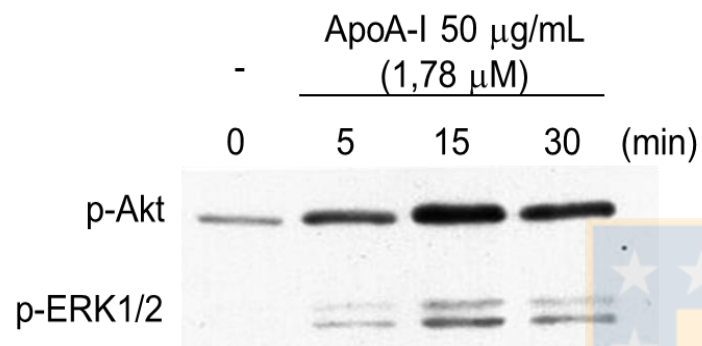


Figura 10: ApoA-I aumenta la fosforilación de la eNOS. La fosforilación de la eNOS en S1177 (A) y en T495 (B) fue determinada por western blots, en HUVECs, al cabo de 30 min de incubación con apoA-I 50 $\mu\text{g/mL}$. $n = 4$ experimentos para S1177, $n = 3$ experimentos para T495. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, con respecto a la condición basal. Datos no publicados, tesis de pregrado de Bioquímica, Sr. Luis Briceño G, 2013.

A)



B)

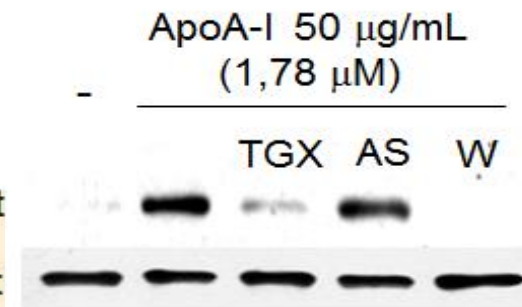


Figura 11. ApoA-I activa las vías PI3K β / Akt y ERK1/2. La fosforilación de Akt y ERK1/2 fue evaluada en células HUVECs tratadas con apoA-I 50 µg/mL. **A)** Curva de tiempo. n= 1 experimento. **B)** Efecto de TGX-221 (TGX, inhibidor de PI3K β), AS-605240 (AS, inhibidor de PI3K γ) en la fosforilación de Akt y ERK1/2, luego de 30 min de incubación. n= 1 experimento. Datos no publicados.

Receptores de apoA-I y su posible participación en la síntesis de óxido nítrico

En células endoteliales, existen diferentes receptores para apoA-I, tanto en su forma lipidada (en HDL) como libre de lípidos. Entre ellos destacan el receptor *scavenger* clase B tipo I (SR-BI), los ATP *binding cassette transporters* A1 (ABCA1) y G1 (ABCG1) y la ecto-F₁-ATPasa. Todos estos receptores pueden unir apoA-I y ser potenciales candidatos para gatillar vías de señalización que regulen la síntesis de NO en el endotelio vascular. A continuación se describirán brevemente cada uno de ellos, con particular énfasis en ecto-F₁-ATPasa.

SR-BI

Es un receptor multiligando y fue el primer receptor identificado para HDL. Es miembro de la superfamilia de los receptores CD36 y une HDL a través de interacciones de alta afinidad con apoA-I⁹⁰. Esta unión permite el flujo de lípidos a favor de gradiente, lo cual promueve el eflujo de colesterol en tejidos periféricos y la captación selectiva de ésteres de colesterol a nivel hepático⁹¹.

SR-BI es expresado por el endotelio vascular, donde media el flujo de lípidos a favor de gradiente⁹². Se ha demostrado que las HDL aumentan la actividad de la eNOS y favorecen su localización en las cavéolas, lo cual depende de su interacción con SR-BI⁹³. El grupo de Mineo y col determinó que la unión de HDL a SR-BI provoca la activación de las vías de señalización Src / PI3K, que lleva a la fosforilación en forma paralela de Akt y MAPK, y ambas convergen en la fosforilación de la eNOS en el residuo S1179 (1177 en humanos), en células endoteliales de ovino. Esto genera un aumento de la actividad de la eNOS, determinando una mayor producción de NO^{76, 94}. También se ha evidenciado que PI3K y Rac1 son activadas por SR-BI a través de LKB1 (serina / treonina quinasa 1) y CAMKK (proteína quinasa dependiente de Ca²⁺/ CaM), por la estimulación de AMPK, promoviendo la vasodilatación^{95, 96}. En estos efectos, la interacción entre la apoA-I presente en las HDL y SR-BI es crucial⁸³.

ABCG1

Este transportador, de gran homología con ABCA1, es expresado principalmente en macrófagos, donde regula el eflujo de colesterol y fosfolípidos hacia HDL, pero no hacia apoA-I pobre en lípidos⁹⁷.

En relación a la síntesis de NO por el endotelio, Terasaka y col, utilizando células endoteliales de aorta humana (HAECs), observaron que la sobrecarga de colesterol aumenta la asociación de la eNOS a caveolina-1, resultando en una inhibición de la actividad de esta enzima. Estos efectos son revertidos por HDL, lo cual dependería del eflujo de colesterol desde la membrana plasmática hacia estas lipoproteínas. Luego de silenciar la expresión de ABCG1, los efectos generados por HDL fueron completamente inhibidos, lo cual comprueba que esta acción era mediada por este transportador⁹⁸. Sin embargo, otros trabajos cuestionan estos hallazgos, debido a que la participación de ABCG1 en el eflujo de colesterol hacia HDL es controversial⁹⁹.

ABCA1

El transportador ABCA1 presenta alta afinidad por apoA-I libre de lípidos o pobremente lipidada. Dada esta característica, ABCA1 media el eflujo de colesterol desde tejidos periféricos, como macrófagos, hacia apoA-I plasmática, pero no hacia HDL¹⁰⁰.

La expresión de ABCA1 es baja en células endoteliales, por lo cual se le ha atribuido una escasa contribución a la homeostasis del metabolismo lipídico a nivel vascular¹⁰¹. Sin embargo, la sobreexpresión de ABCA1, utilizando LDL nativa, incrementa el eflujo de colesterol en células endoteliales HUVECs y HAECs¹⁰². ABCA1 favorece el transporte trans-endotelial de apoA-I, lo que permite a esta proteína mediar efectos protectores directamente en el espacio sub-endotelial¹⁰³.

Según literatura, ABCA1 no participa en la regulación de la síntesis de NO en células incubadas con apoA-I; sin embargo, Tabet y col sugieren una regulación indirecta de la biodisponibilidad de NO. En este estudio, el péptido mimético de apoA-I 5A, disminuye la inflamación aguda y el estrés oxidativo en carótidas de conejo y células endoteliales de arteria

coronaria humana (HCAECs), a través de la inhibición de la síntesis de TNF- α , de ROS y de moléculas de adhesión, efectos dependientes de la inactivación del factor NF- κ B. Esta vía es totalmente abolida al silenciar ABCA1. Por lo tanto, la menor síntesis de ROS aumentaría la biodisponibilidad de NO, lo que conllevaría a un aumento indirecto de la relajación vascular por apoA-I vía ABCA1⁸⁹.

En relación a vías de señalización, se ha evidenciado en células HUVECs que ABCA1, a través del eflujo de colesterol hacia apoA-I libre, estimula la activación de JAK2, lo que activa la ciclooxygenasa 2 y la liberación de prostaglandina I-2. Estos efectos son dependientes de p38 MAPK y ERK1/2, y constituiría un nuevo mecanismo de vasodilatación dependiente de apoA-I¹⁰⁴.

Ecto-F₁-ATPasa

Ecto-F₁-ATPasa es un complejo enzimático de superficie, que se encuentra relacionado estructuralmente con la F₁F₀-ATP sintasa mitocondrial, enzima final de la cadena de fosforilación oxidativa y encargada de la síntesis de ATP.

F₁F₀-ATP sintasa está compuesta en células eucariotas por 16 subunidades, organizadas en dos dominios principales: un dominio soluble F₁ (subunidades α , β , γ , δ , ϵ) y un dominio anclado en la membrana interna de la mitocondria, denominado F₀ (subunidades c, a, e, f, g, A6L, b, F6, d y OSCP). F₁F₀-ATP sintasa posee un rotor (subunidades γ , δ , ϵ y el anillo c) y un estator (subunidades a, e, f, g, A6L, b, F6, d y OSCP) que mantienen los heterodímeros $\alpha\beta$ unidos al resto de la enzima (**Figura 12**). El dominio F₁ posee la actividad catalítica, y el dominio F₀ es un canal que permite el paso de protones desde el espacio intermembrana hacia la matriz mitocondrial. Este proceso produce la rotación del rotor central, que a su vez genera un cambio de conformación en los tres heterodímeros $\alpha\beta$, lo que conduce a la rotación de esta unidad y la síntesis de ATP, a partir de ADP y fósforo inorgánico¹⁰⁵.

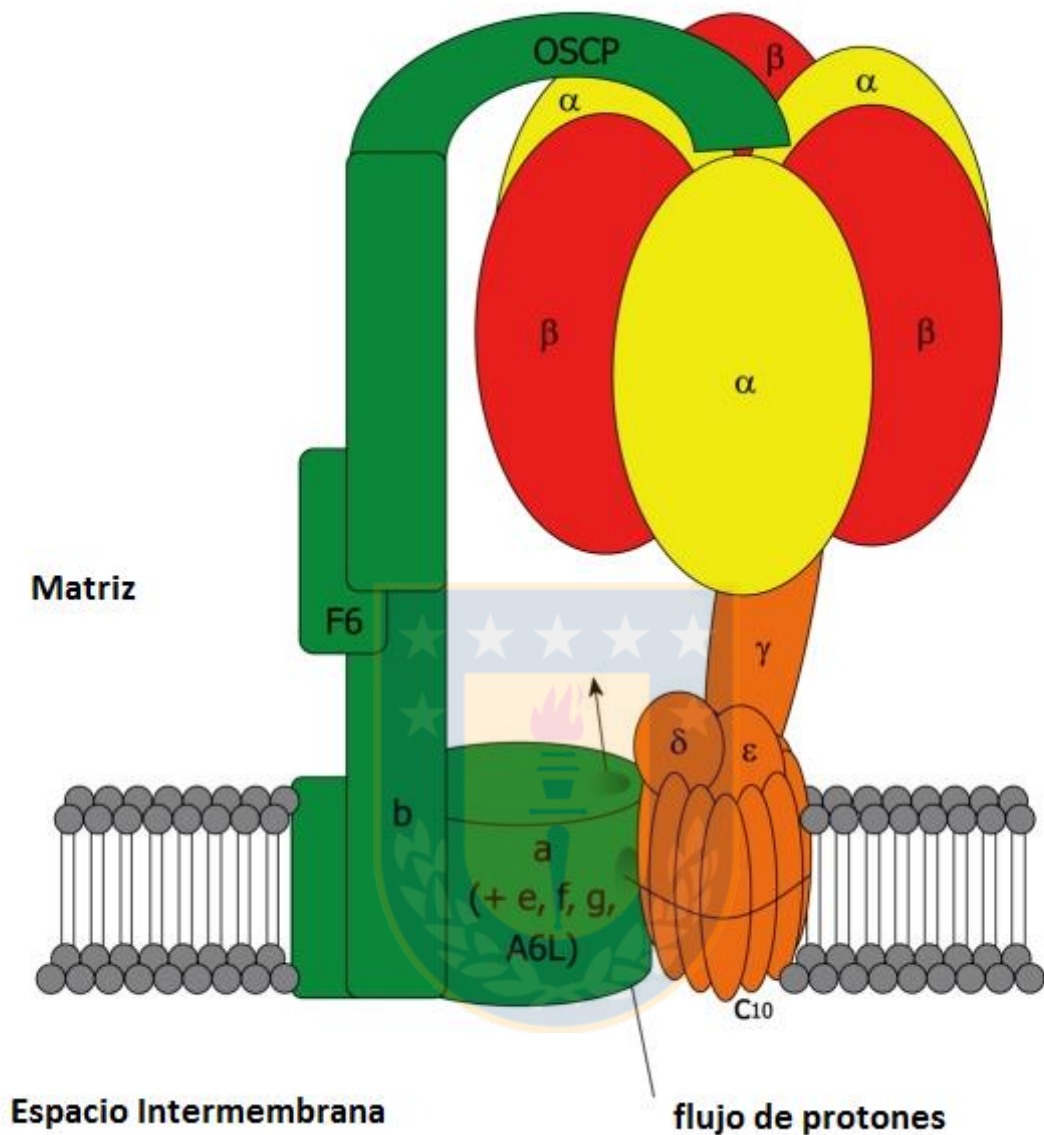


Figura 12: F₁F_o-ATP sintasa mitocondrial. En células eucariotas, F₁F_o-ATP sintasa es un complejo motor molecular compuesto por 16 sub-unidades, que se distribuyen en una unidad catalítica (dominio F₁ soluble, subunidades α , β , γ , δ , ϵ), un rotor (en color naranja, subunidades γ , δ , ϵ y el anillo c), un estator (en verde, subunidades a, e, f, g, A6L, b, F6, d y OSCP) y un dominio F_o asociado a la membrana (canal de protones, subunidades c, a, e, f, g, A6L, b, F6, d y OSCP). Vantourout P. y col, *World J Gastroenterol*, 2010, 485-492.

Cuando la célula es privada de oxígeno, F₁F_o-ATP sintasa cambia su actividad de síntesis de ATP a hidrólisis. Este efecto es inhibido por IF₁ (factor inhibitorio 1), una proteína de 84 aminoácidos presente en la matriz mitocondrial. A pH ácido, IF₁ dimeriza y se une al dominio F₁ de dos ATP sintasas contiguas, evitando la rotación de estas unidades. Al restablecerse las condiciones de pH, IF₁ se disocia de las ATP sintasas y forma tetrámeros inactivos, restableciéndose la actividad sintasa de esta enzima¹⁰⁶.

Además de la localización de la ATP sintasa en la mitocondria, este complejo ha sido descrito en la superficie de distintos tipos celulares, donde ejerce diferentes funciones biológicas. Se ha descrito que la ATP sintasa de superficie cataliza la hidrólisis de ATP; esto, sumado a la detección ectópica de componentes del dominio catalítico, ha llevado a su denominación de ecto-F₁-ATPasa¹⁰⁷. En hepatocitos, esta enzima une con alta afinidad apoA-I libre, interacción que gatilla la endocitosis de la holo-partícula de HDL madura, a través de un receptor de baja afinidad distinto de SR-BI¹⁰⁷.

La presencia de la ATP sintasa también fue descrita en la superficie de células endoteliales, donde su inhibición por antagonistas, como la angiostatina, genera efectos antiangiogénicos¹⁰⁸. Al igual que en hepatocitos, esta ecto-enzima presenta actividad hidrolasa de ATP (ecto-F₁-ATPasa) en las células endoteliales y constituye el principal receptor de apoA-I libre, ya que ensayos de competencia demuestran que une aproximadamente el 70% de apoA-I asociada a la superficie celular, mientras ABCA1 aporta el 30% restante⁷⁹. La unión entre apoA-I y ecto-F₁-ATPasa, considerada de alta afinidad (Kd = 1,6 µg/mL), aumenta la actividad hidrolasa de esta enzima, generando ADP extracelular, el cual inhibe la apoptosis y promueve la proliferación de las células endoteliales a través de receptores no indentificados⁷⁹.

Ecto-F₁-ATPasa y síntesis de óxido nítrico

Si bien ha sido descrito que la actividad de ecto-F₁-ATPasa favorece la mantención de la función endotelial, no existen publicaciones que demuestren la relación de esta ecto-enzima con el aumento de la síntesis de NO producido por apoA-I. La única evidencia que asocia ecto-F₁-ATPasa y NO es la publicada por Osanai y col en 2005, en la cual se utilizó

el factor de acoplamiento 6 (CF6). Este péptido, compuesto por 76 aminoácidos, es parte del estator de la ATP sintasa y recientemente ha sido detectado en plasma¹⁰⁹. La forma soluble de CF6 es ligando de ecto-F₁-ATPasa en células endoteliales, unión que genera un aumento de la actividad hidrolasa de esta enzima y acidosis intracelular¹¹⁰. Estos eventos desencadena una mayor síntesis de dimetilarginina asimétrica (ADMA) y una disminución de su catabolismo, al reducir la expresión y actividad de la enzima dimetilarginina dimetilhidrolasa (DDHA). Por lo cual CF6, a través del aumento de ADMA, un inhibidor competitivo endógeno de la eNOS, disminuye la síntesis de NO¹¹¹. Además, CF6 inhibe la expresión génica y proteica de la molécula-1 de adhesión celular plaquetaria / endotelial (PECAM-1) en células endoteliales a través de la activación de Src, lo que atenúa la fosforilación de eNOS en el residuo S1177 y la liberación de NO, producto del *shear stress*¹¹². En concordancia con estos hallazgos, CF6 fue encontrado en altas concentraciones en el plasma de ratas hipertensas¹¹³, y la inyección intravenosa de CF6 recombinante incrementa la presión sanguínea en ratas normotensas^{113, 114}.

Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que la vasodilatación y la fosforilación de la eNOS en S1177, producidas por apoA-I, son revertidas por completo en presencia de inhibidores de ecto-F₁-ATPasa (**Figuras 13 y 14**). Sumado a ello, en ensayos preliminares, se observó que apoA-I (50 µg/mL) genera un aumento de la fosforilación de Akt y ERK 1/2, aproximadamente a los 15 y 30 min de incubación, lo cual es revertido con dosis crecientes de IF₁ (**Figura 15**). Esta fosforilación también fue disminuida en presencia de TGX-221, inhibidor de PI3K β (**Figura 11B**). Por lo tanto, los resultados obtenidos en nuestro laboratorio apoyan la hipótesis que apoA-I, a través de una mayor actividad hidrolasa de ecto-F₁-ATPasa, promovería la síntesis de NO. En este mecanismo, las vías PI3Kβ / Akt y ERK1/2 estarían involucradas.

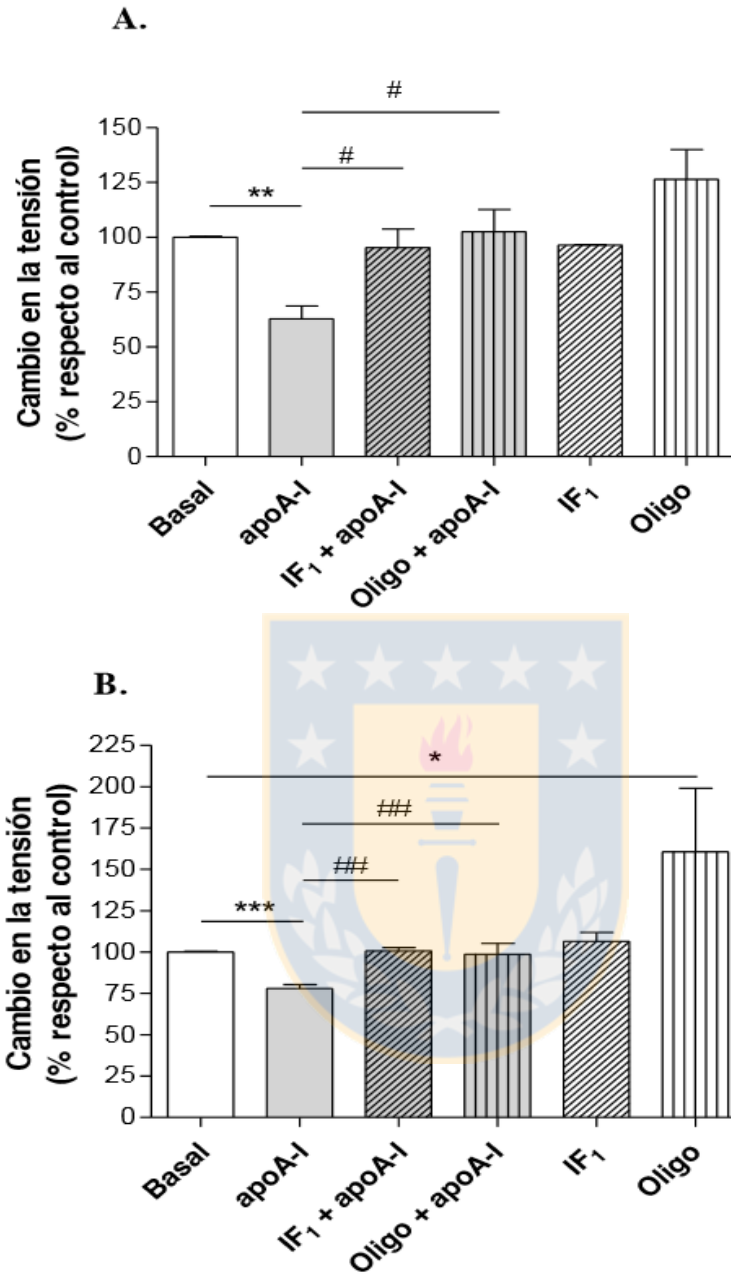


Figura 13: Ecto-F₁-ATPasa participa en la vasodilatación generada por apoA-I. (A) Anillos de vena umbilical y (B) anillos de vena placentaria fueron incubados con IF₁ (1,8 μ M) u oligomicina A (oligo, 125 nM), por 45 min, luego se indujo vasoconstricción con un análogo de tromboxano A2 (U46619 100 nM) y una vez alcanzada máxima contracción, se adicionó apoA-I (50 μ g/mL). Los resultados muestran el efecto a los 10 min post-adición de apoA-I. Los valores son expresados como el promedio \pm 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. Datos no publicados, tesis de Magíster en Bioquímica Clínica e Inmunología, Srta. Paula Honorato V, 2015.

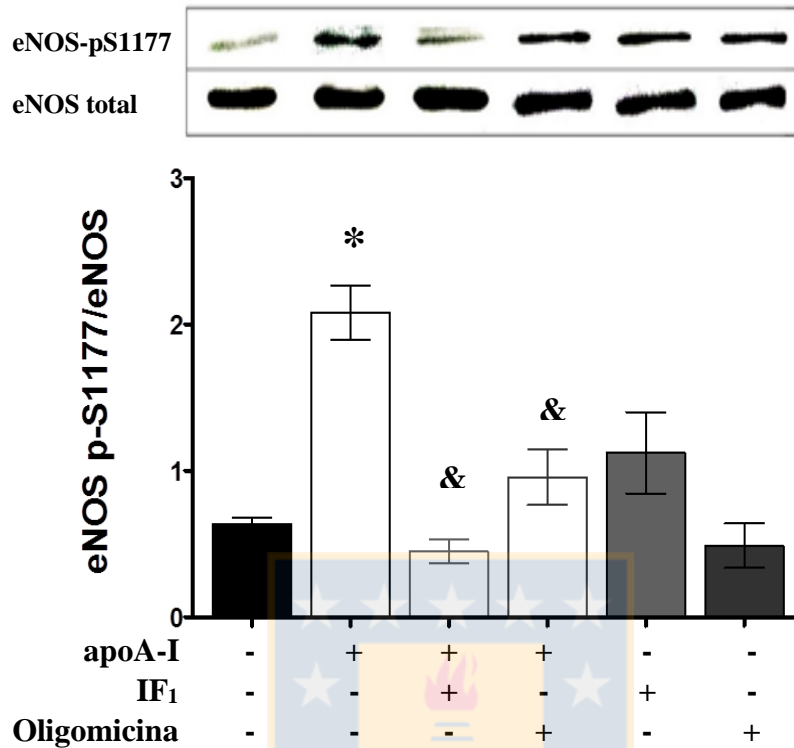


Figura 14: Ecto-F₁-ATPasa media el aumento de fosforilación de la eNOS en serina 1177, producido por apoA-I. Las células HUVECs fueron incubadas por 30 min con apoA-I libre (50 µg/mL) en presencia de IF₁ (1,8 µM) u oligomycin (125 nM). n=4 experimentos. **p<0,01 con respecto al basal; &p<0,05 con respecto al efecto de apoA-I. Datos no publicados, tesis de pregrado de Bioquímica, Luis Briceño G, 2013.

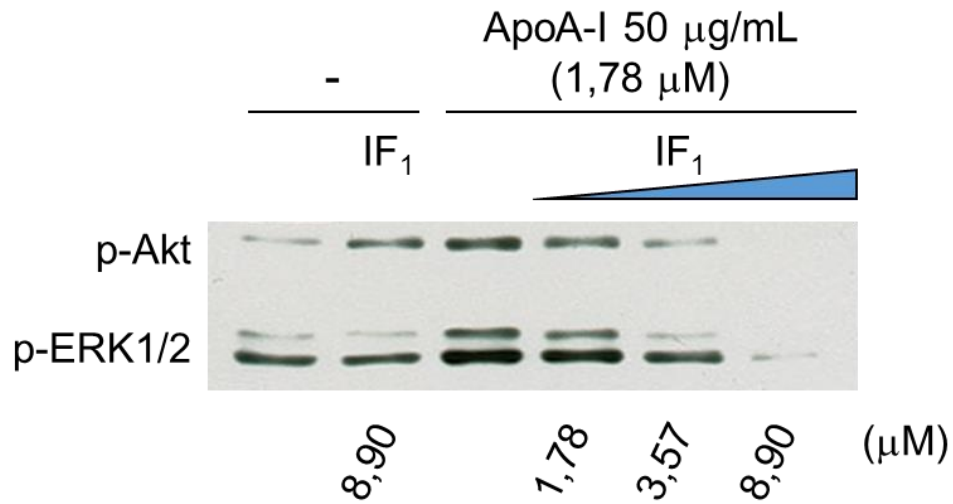


Figura 15: Ecto-F₁-ATPasa participa en la fosforilación de Akt y ERK 1/2 provocadas por apoA-I. Las células HUVECs fueron expuestas a apoA-I, en presencia de concentraciones crecientes de IF₁, durante 30 min. N= 1 experimento. Datos no publicados.



Receptores purinérgicos implicados en la vía de ecto-F₁-ATPasa

Como se mencionó anteriormente, el ADP producido por la actividad de la ecto-F₁-ATPasa en el medio extracelular es considerado el mediador que gatilla los efectos celulares asociados a este receptor.

La presencia de nucleótidos en el medio extracelular ha sido descrita en diversos tejidos, y se postula esta localización como consecuencia de lisis celular, de permeabilización selectiva y de exocitosis¹¹⁵. Además, distintas enzimas expresadas en la superficie celular, como ecto-F₁-ATPasa, catalizan la conversión de nucleótidos en el medio extracelular¹¹⁶. Los nucleótidos han sido reconocidos como actores claves en funciones intracelulares, en la síntesis de ácidos nucleicos y en el metabolismo energético. También se ha demostrado que ejercen funciones fisiológicas de forma autocrina y paracrina, entre ellas, la regulación de la homeostasis vascular, a través de la activación de receptores purinérgicos en plaquetas, células endoteliales y células de músculo liso¹¹⁷. Estas acciones son mediadas a través de la activación de dos familias de receptores de membrana, denominados P2X y P2Y. Los receptores P2X son canales iónicos regulados por ATP, mientras que los receptores P2Y pertenecen a la superfamilia de receptores tipo rodopsina, acoplados a proteína G. Los receptores P2Y presentan siete dominios transmembrana, y son activados selectivamente por distintos nucleótidos^{118,119}.

Se ha evidenciado que distintos receptores P2Y son expresados en diferentes tipos de células en el sistema cardiovascular, como también en cardiomiocitos, células musculares lisas y en células endoteliales^{120, 121}. Específicamente, en células HUVECs, se han encontrado los siguientes receptores P2Y: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₁₁ y P2Y₁₂, siendo P2Y₁ y P2Y₁₂ activados preferentemente por ADP, mientras P2Y₁₁ presenta mayor afinidad por ATP^{116, 121, 122}. P2Y₁ se asocia a proteína G $\alpha_{q/11}$ y $\beta\gamma$ (G_q + G_o), mientras que P2Y₁₂ esta asociado a una proteína G $\beta\gamma$ (G_{i/o})¹²³.

Se ha demostrado que el ADP en el medio extracelular promueve la fosforilación de la eNOS en S1179 (S1177 en humanos) en células BAECs, y que este efecto es dependiente del receptor purinérgico P2Y₁, como fue confirmado con el inhibidor selectivo MRS-2179 y por *knockdown* de este receptor. Además, se observó que AMPK y CAMKK β aumentan su

expresión en respuesta a ADP, aunque esta activación no es necesaria para la fosforilación de la eNOS¹¹⁷.

En relación a la vía apoA-I / ecto-F₁-ATPasa, se ha descrito en células BAECs que el ADP extracelular generado por la actividad hidrolasa de esta enzima, promueve la transcitosis de HDL y de apoA-I a través de las células endoteliales, lo cual depende de la activación del receptor purinérgico P2Y₁₂¹²⁴. Sin embargo, se desconoce la vía de señalización asociada a este efecto en este tipo celular.



PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

A partir de los antecedentes experimentales y de las evidencias descritas en literatura, se establece que:

- 1) El principal receptor de apoA-I libre en células endoteliales es ecto-F₁-ATPasa.
- 2) La unión de apoA-I a ecto-F₁-ATPasa aumenta la hidrólisis extracelular de ATP a ADP. Este último gatilla respuestas celulares, mediante la activación de receptores purinérgicos presentes en la superficie celular.
- 3) Concentraciones fisiológicas de apoA-I reducen el tono vascular en venas de cordón umbilical y venas placentarias humanas, lo cual depende de ecto-F₁-ATPasa.
- 4) Concentraciones fisiológicas de apoA-I aumentan la fosforilación de la eNOS en S1177, a través de ecto-F₁-ATPasa, en cultivos de células endoteliales.
- 5) ApoA-I activa las vías de señalización PI3K / Akt y ERK1/2, en células endoteliales.

Por lo tanto, apoA-I, a través de ecto-F₁-ATPasa, aumenta la respuesta vasodilatadora, lo cual se asocia a la fosforilación de la eNOS en S1177, sugerente de una mayor síntesis de NO. Este mecanismo podría depender de la activación de receptores P2Y y de las vías de señalización PI3K / Akt y ERK 1/2. En consecuencia, surge la siguiente interrogante:

¿Dependerá la síntesis de NO, generada por apoA-I a través de ecto-F₁-ATPasa, de los receptores P2Y (P2Y₁ y/o P2Y₁₂) y de las vías de señalización PI3K / Akt y/o ERK1/2?

HIPÓTESIS

La interacción de apoA-I con el receptor ecto-F₁-ATPasa aumenta la síntesis extracelular de ADP, el cual activa receptores purinérgicos (P2Y₁ y/o P2Y₁₂), y las vías de señalización PI3K/Akt y/o MAPK (ERK 1/2), lo que produce un aumento en la síntesis de NO, en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs).

OBJETIVO

Determinar si el aumento de la síntesis de NO generado por la interacción de apoA-I con el receptor ecto-F₁-ATPasa en células HUVECs depende de las vías de señalización PI3K/Akt y/o MAPK (ERK 1/2) y de receptores purinérgicos sensibles a ADP (P2Y₁ y/o P2Y₁₂).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar la participación de ecto-F₁-ATPasa, con respecto a otros receptores de apoA-I, en la síntesis de NO, en células HUVECs.
- 2) Evaluar la implicancia de las vías de señalización PI3K/Akt y ERK1/2 en el aumento de la síntesis de NO, producido por apoA-I, en células HUVECs.
- 3) Establecer la participación de los receptores purinérgicos P2Y₁ y P2Y₁₂ en el aumento de la síntesis de NO, causado por apoA-I en células HUVECs.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Obtención de ligandos de ecto-F₁-ATPasa

a) Factor inhibitorio 1 (IF₁)

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

b) ApoA-I humana

La apoA-I humana fue obtenida desde HDL, las que fueron aisladas a partir de plasma humano de voluntarios jóvenes sanos (20-25 años), utilizando el método de ultracentrifugación con ajuste de densidad¹²⁵. Los voluntarios que aceptaron participar de este proyecto firmaron un consentimiento informado, el cual fue previamente aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Concepción (**ver anexo**). Las muestras de sangre fueron obtenidas en ayuno, por punción venosa, y se recolectaron en tubos con EDTA 1 mg/mL. Con las muestras se formó un *pool* de plasmas, el que fue centrifugado a 146.682 x g por 20 h, con el fin de aislar las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). A continuación, se ajustó la densidad del infranadante a 1,063 g/L con KBr y se centrifugó, bajo las mismas condiciones, para obtener el anillo de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Luego de retirar esta fracción, se ajustó nuevamente la densidad a 1,210 g/L con KBr y se centrifugó a 185.643 x g por 48 h para aislar las HDL, las que fueron dializadas contra PBS 10 mM pH 7,4, y cuantificadas con el kit BCA Protein (Thermo Scientific). La pureza de estas lipoproteínas se confirmó mediante electroforesis en gel SDS-PAGE 15%.

Las HDL fueron delipidadas según el protocolo de McConathy y col¹²⁶, con una mezcla de cloroformo / metanol, en proporción 1:1, bajo agitación por 30 min. La muestra fue centrifugada a 3.300 x g por 20 min a 4°C, para obtener un precipitado de proteínas, el cual fue lavado dos veces más, siguiendo el mismo procedimiento. Finalmente, el precipitado fue secado bajo corriente de nitrógeno y después fue resuspendido en tampón Tris-EDTA-salino (Tris 0,1 M, EDTA 27 mM, NaCl 1,54 M, pH 8).

La apoA-I fue aislada desde el *pool* de proteínas, usando el método descrito por Brace y col¹²⁷. Para ello, las proteínas fueron denaturadas con tampón Laemmli (Tris-HCL 31,3

mM, SDS 1,5%, azul de bromofenol 0,15%, glicerol 25% y β -mercaptoetanol 5%) y calentadas por 10 min a ebullición. Las muestras fueron separadas por SDS-PAGE 12% (100 mV, por 90 min aprox.), y se recuperó el gel a nivel de la migración de la apoA-I, según marcador de peso molecular y un patrón de apoA-I teñido con Azul de Coomasie. La apoA-I fue eluida desde el gel, mediante incubación en agua nanopure, toda la noche, a temperatura ambiente, bajo agitación. La solución obtenida fue dializada en tampón PBS a 4°C y concentrada con polietilenglicol de peso molecular mayor a 20.000. La concentración de proteínas se determinó con el kit Pierce BCA Protein. La apoA-I fue congelada a -20°C, hasta su uso en los ensayos que se describen a continuación.

II. Inhibidores y anticuerpos bloqueantes

Los inhibidores utilizados para evaluar las vías de señalización fueron: wortmanina 0,1 μ M (PI3K), triciribine 1,0 μ M (Akt), U-0126 10 μ M (ERK1/2), AS-252424 20 μ M (PI3K isoforma γ), TGX-221 100 nM (PI3K isoforma β), todos ellos distribuidos por Cayman; MRS-2179 10 μ M (P2Y₁), de Tocris Bioscience; Cangrelor 1 μ M (P2Y₁₂), proporcionado por el Dr. Laurent Martínez; N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 nM, inhibidor de la eNOS) distribuido por Sigma Aldrich. Los anticuerpos bloqueantes utilizados fueron: anti ABCA1 (1-2 mg/mL, NB400-105)¹²⁸, anti SR-BI (1-2 mg/mL, NB400-113) y control isotipo (1-2 mg/mL, NB810-56910), todos de Novus Biological.

III. Obtención y cultivo de células HUVECs

Los cordones umbilicales fueron obtenidos desde partos fisiológicos y cesáreas de mujeres gestantes sin patología ni tratamiento farmacológico, en el Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Regional de Concepción. Todas las donantes que aceptaron participar de este estudio firmaron un consentimiento informado, el cual fue previamente revisado y aprobado por el Comité Ético Científico del Hospital Regional de Concepción (**ver anexo**). Los cordones umbilicales fueron trasladados al Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, en contenedores cerrados y estériles, utilizando PBS 10 mM pH 7,4 como medio de transporte.

Las HUVECs fueron recuperadas desde la vena umbilical, mediante digestión con colagenasa (0,33 mg/mL) por 10 min a 37°C, según lo descrito previamente¹²⁹. La suspensión celular fue centrifugada por 10 min a 1.900 x g y el *pellet* se resuspendió en medio M-199 suplementado con EGM-2 *Bullekit* (Lonza). Las células se distribuyeron en placas de cultivo de 25 cm² recubiertas con gelatina 1% y se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% CO₂, hasta obtener una confluencia de 90%. Los trasposos celulares fueron realizados con tripsina / EDTA 0,1%. La suspensión celular fue centrifugada como se mencionó y, una vez resuspendido el *pellet*, se evaluó la cantidad y viabilidad celular con Azul de Tripán, mediante observación al microscopio óptico. Las HUVECs fueron distribuidas en placas de 6, 12, o 96 pocillos, según correspondiera, recubiertos con gelatina 1%, para realizar los ensayos posteriores.

IV. Biodisponibilidad de NO

La biodisponibilidad de NO se determinó con la sonda 4-amino-5-metilamino-2'-7'-difluorosceínadiacetato (DAF-FM-DA, Life Technologies). Esta sonda, permeable a la membrana celular, reacciona con NO, formando un derivado de benzotriazol fluorescente.

Las HUVECs, distribuidas en placas de 96 pocillos, fueron incubadas hasta obtener 90% de confluencia. Los cultivos se incubaron en medio M-199 con suero fetal bovino (SFB) 2%, durante 4 h. Luego, se adicionó la sonda DAF-FM-DA 5 µM en PBS 10 mM pH 7,4, por 45 min, y al final de este tiempo se agregó apoA-I, HDL o histamina, según cada ensayo. Inmediatamente, se detectó la producción de NO en el fluorímetro Sinergy 2 (Biotek), utilizando longitudes de onda de excitación / emisión de 495 / 515 nm, por un tiempo máximo de 45 min posterior al estímulo. Para los ensayos con inhibidores o anticuerpos neutralizantes, éstos fueron agregados luego de 15 min de incubación con la sonda, antes de adicionar la apoA-I, y se mantuvieron en cultivo hasta el final de los experimentos.

Los resultados fueron normalizados con respecto al promedio de los valores de la condición basal (sin estímulo ni inhibidores) y fueron expresados como veces de cambio de la biodisponibilidad de NO, a los 30 min de adicionada la apoA-I. Cada condición en cada experimento fue realizada en triplicado.

V. Actividad de la eNOS

La actividad de la eNOS fue evaluada mediante la formación de L-citrulina a partir de L-arginina, la cual es considerada un índice directo de la síntesis de NO por esta enzima. Para realizar estos experimentos, se utilizaron células HUVECs cultivadas en placas de 24 pocillos, las que fueron incubadas con medio M-199 SFB 2% por 4 h. Posteriormente, las células fueron incubadas durante 30 min con apoA-I (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), en una mezcla compuesta por L-[^3H]-arginina (4 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$) y L-arginina no marcada (100 μM), en PBS. Cumplido este tiempo, se lisaron las células con KOH 0,5 N. En los ensayos que requirieron inhibidores o anticuerpos neutralizantes, las células fueron incubadas con estas moléculas durante los 30 min previos a la adición de apoA-I, en PBS, y se mantuvieron en cultivo hasta la lisis celular.

Las proteínas totales fueron cuantificadas con el kit BCA Protein (Thermo Scientific), en 25 μL de lisado. El volumen restante de cada muestra fue sometido a una cromatografía de intercambio catiónico Dowex 50W (50X8-200), utilizando agua como fase móvil. El total de los eluatos de la fracción no retenida (L-[^3H]-citrulina) fue mezclado con 3 mL de líquido de centelleo Ecoscint GL (National Diagnostic) y la radiactividad fue detectada en un contador de centelleo (LS 6500, BECKMAN), en el Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Los resultados fueron expresados como formación L-[^3H] Citrulina $\text{pmol} \times (\text{mg proteína})^{-1}$. Cada condición de cada experimento fue realizada en triplicado.

VI. Western blot para proteínas fosforiladas

Las HUVECs fueron cultivadas en placas de 6 pocillos, bajo condiciones estándares, hasta 90% de confluencia. Luego de 4 h con medio M-199 SFB 2%, se incubó con apoA-I (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en PBS, por 30 min. En los ensayos con inhibidores o anticuerpos neutralizantes, éstos fueron adicionados en los últimos 30 min antes de agregar apoA-I, en PBS, y se mantuvieron hasta el final del experimento. Las células fueron lisadas con 40 μL por pocillo de tampón Laemmli, sonicadas, y los lisados fueron calentados a ebullición por 10 min.

Alrededor de 1/3 del volumen de cada lisado fue sometido a una electroforesis SDS-PAGE 8% para los análisis de eNOS fosforilada, o 12% para ERK1/2 fosforilada. La electrotransferencia hacia membranas de nitrocelulosa se realizó en cámara húmeda, a

corriente constante de 250 mA por 105 min. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada 5% por 1 h a temperatura ambiente y luego se incubaron toda la noche a 4°C con un anticuerpo anti eNOS fosforilada en S1177 (dilución 1/500, Abcam, ab75639), anti eNOS total (1/1000, BD Biosciences, 610296), anti ERK1/2 fosforilada (1/1000, Cell Signaling, 4376) o anti ERK1/2 total (1/2000, Santa Cruz Biotechnology, sc-94), según corresponda, en PBS Tween 20 0,05% con leche descremada 1%. Transcurrida esta etapa, se incubaron con un anticuerpo dirigido contra inmunoglobulina G de conejo (1/1000, Sigma, A6154) o de ratón (1/1000, BD Biosciences, 550402) conjugados a peroxidasa, según corresponda, y finalmente se revelaron con el sustrato quimioluminiscente ECL (Thermo Scientific), utilizando films fotográficos para su detección. La intensidad de las bandas proteicas fue analizada con el *software* Image Studio (LI-COR) y se comparó la relación entre las proteínas fosforiladas y la correspondiente proteína total. Cada condición fue cotejada con la incubación basal (sin estímulo). En cada experimento, se consideró un n de 3 para cada condición.

VII. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos fueron analizados con el *software* GraphPAD Prism (San Diego CA, USA). El análisis de las significancias estadísticas se realizó mediante el test Kruskal-Wallis para un grupo de datos y el test Mann-Whitney para la comparación entre dos condiciones. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm error estándar y se consideró $p < 0,05$ para designar diferencias estadísticamente significativas.

RESULTADOS

Obtención de apoA-I

Las HDL fueron aisladas desde el plasma de voluntarios sanos, mediante el método de ultracentrifugación con ajuste de densidad. Luego de dializar las HDL, se realizó la cuantificación de proteínas totales, obteniéndose una concentración promedio de alrededor de 15 mg/mL en las distintas purificaciones efectuadas en esta tesis.

Para confirmar la pureza de las HDL se realizó una electroforesis SDS-PAGE 12%. Como controles se utilizó albúmina humana (67 KDa), principal contaminante de este método de aislamiento, y apoA-II (17 KDa), segundo constituyente proteico mayoritario de las HDL, después de la apoA-I. Como se observa en la **Figura 16**, el carril con HDL presenta una gran banda cercana a los 25 kDa, la cual corresponde a apoA-I (28 kDa); además, se observan algunas bandas minoritarias que representan otras proteínas de las HDL, como apoA-II, apoE (39 kDa) y apoC (6,5 kDa)⁶⁶. Las HDL presentaron una alta pureza, como lo demuestra la escasa presencia de albúmina. Por lo tanto, es posible afirmar que el aislamiento de las HDL fue realizado con éxito, obteniéndose una alta concentración de lipoproteínas, de gran pureza.

Luego de delipidar las HDL, se procedió a realizar una separación de proteínas en SDS-PAGE 12%, para recuperar la fracción de apoA-I, la cual fue eluída desde el gel, según el protocolo de Brace y col¹²⁷. Considerando que la apoA-I constituye entre el 70-80% de la fracción proteica de las HDL, es posible estimar que mediante este procedimiento se recuperó alrededor de un 90% de apoA-I. Cabe señalar que la apoA-I así obtenida es funcional (datos no mostrados), coincidiendo con lo observado previamente en el laboratorio (**Figura 9**) y con lo descrito por el grupo de Brace y col¹²⁷.

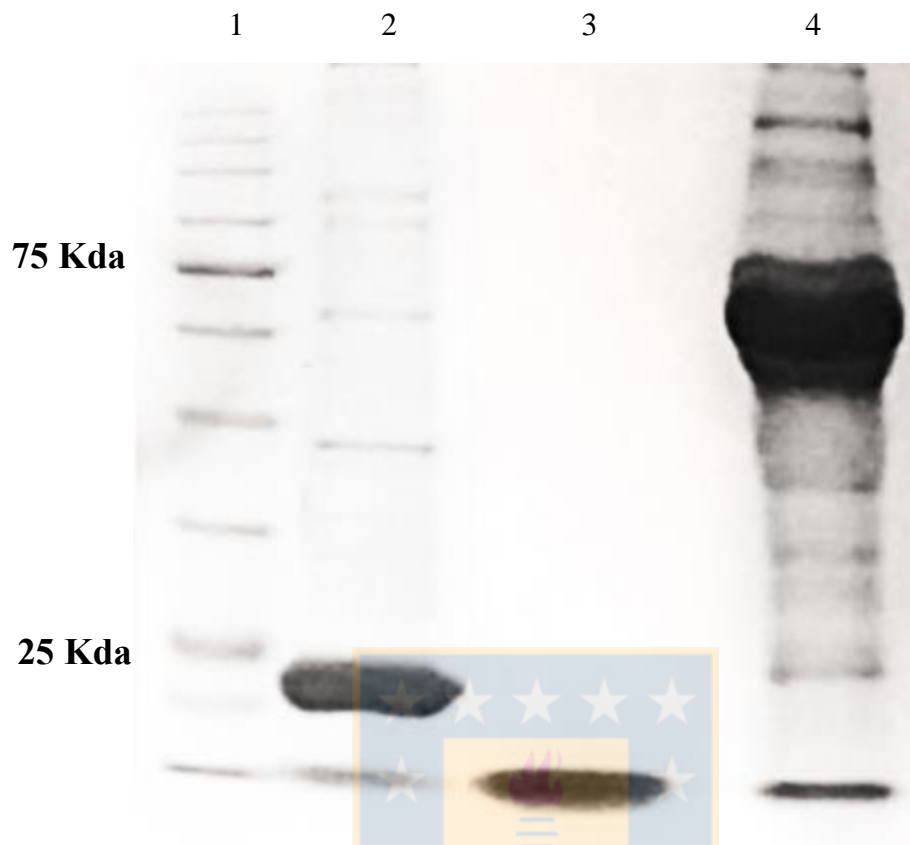


Figura 16: Verificación de la pureza de las HDL, mediante electroforesis SDS-PAGE 12%. Se presenta un gel teñido con Azul de Coomasie. Carril 1: patrón de peso molecular, carril 2: HDL, carril 3: patrón de apoA-II, carril 4: patrón de albúmina humana. Cantidad de proteína por carril = 50 μ g. Imagen representativa de los distintos aislamientos de HDL.

Efecto de apoA-I sobre la síntesis de óxido nítrico

La síntesis de NO fue evaluada mediante dos aproximaciones: a través de la conversión de L-[³H]-arginina en L-[³H]-citrulina, un indicador de la actividad enzimática de la eNOS, y por la detección de NO, utilizando la sonda DAF-FM-DA.

Estudios realizados previamente en el laboratorio demostraron que apoA-I 50 µg/mL aumenta la fosforilación de la eNOS en S1177 (**Figura 10**), lo que se correlaciona con un efecto vasodilatador en ensayos de miografías (**Figura 9**). Estos hallazgos fueron complementados en esta tesis, obteniéndose que apoA-I 50 µg/mL produce un aumento de alrededor del 50% ($p < 0,001$) en la actividad de la eNOS, a los 30 min de incubación. Se observa, además, que el efecto de apoA-I fue similar al generado por histamina 1 mM (control positivo, **Figura 17A**).

Con respecto a la biodisponibilidad de NO, apoA-I produce un efecto dosis-dependiente, el cual fue estadísticamente significativo en todo el rango de concentraciones ensayadas (**Figura 17B**). A diferencia de lo observado en la actividad de la eNOS, el efecto de apoA-I 50 µg/mL sobre la biodisponibilidad de NO fue discreto (sólo un 7% de aumento), mientras a concentraciones de 100 y 200 µg/mL se observa un aumento considerable (25 y 50%, respectivamente), siendo este último similar al control positivo de histamina. Esta discrepancia entre las técnicas se puede deber a que la biodisponibilidad de NO es afectada por factores que no sólo modifican la síntesis de NO, sino también su vida media. Además, la técnica de DAF-FM-DA es menos sensible que la conversión de L-[³H]-arginina, por lo cual se requiere una mayor dosis de apoA-I para observar un efecto. Por lo tanto, para estudios posteriores de biodisponibilidad de NO, se utilizó apoA-I a concentración 100 µg/mL.

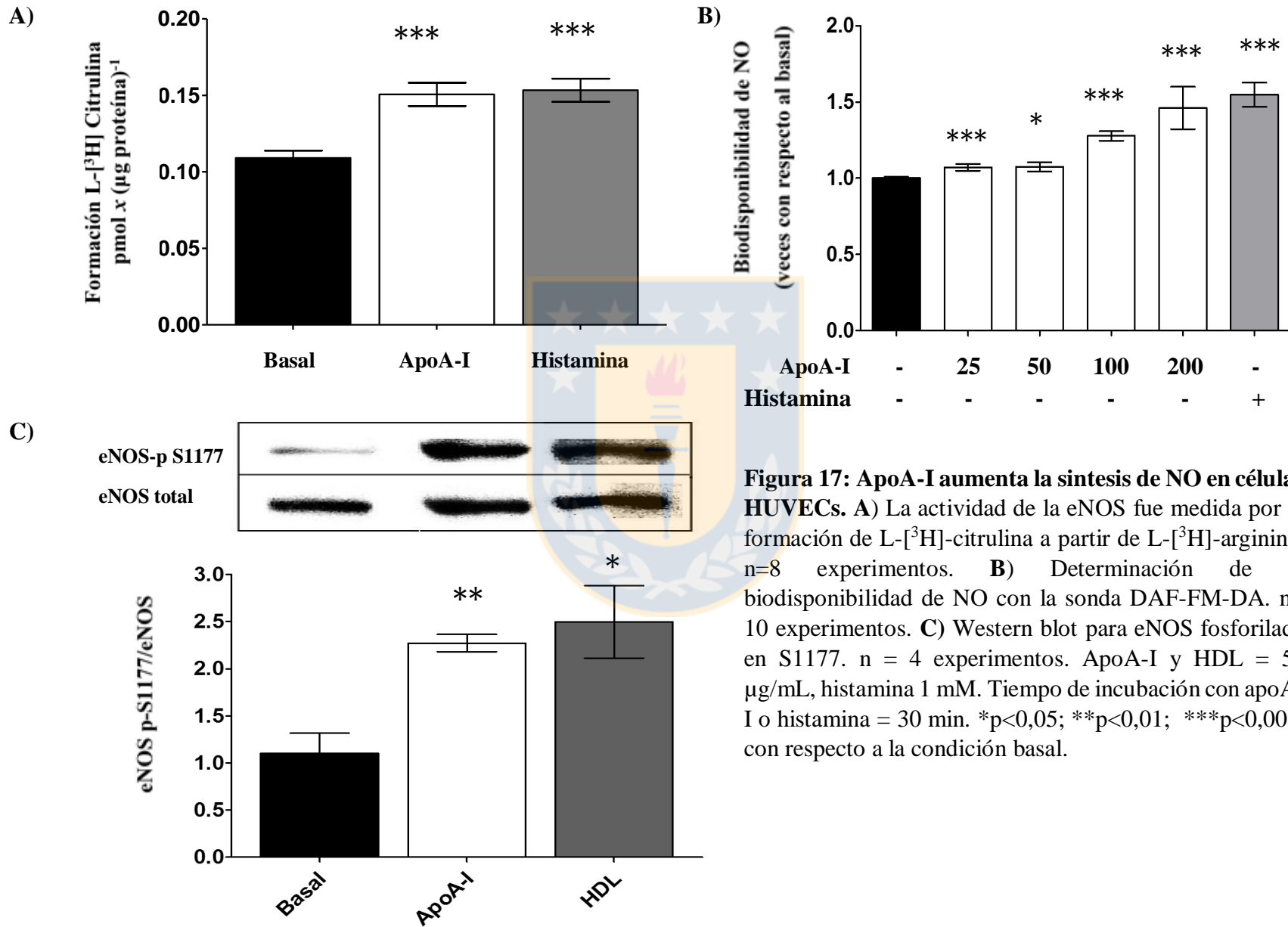


Figura 17: ApoA-I aumenta la síntesis de NO en células HUVECs. **A)** La actividad de la eNOS fue medida por la formación de L-[³H]-citrulina a partir de L-[³H]-arginina. n=8 experimentos. **B)** Determinación de la biodisponibilidad de NO con la sonda DAF-FM-DA. n=10 experimentos. **C)** Western blot para eNOS fosforilada en S1177. n = 4 experimentos. ApoA-I y HDL = 50 µg/mL, histamina 1 mM. Tiempo de incubación con apoA-I o histamina = 30 min. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001, con respecto a la condición basal.

Se ha descrito que la fosforilación de la eNOS en S1177 se correlaciona con una mayor actividad enzimática³¹. Por este motivo, se evaluó si apoA-I 50 µg/mL, concentración que produjo un aumento en la actividad de la eNOS, generaba una mayor fosforilación de este residuo en células HUVECs. A partir de análisis de western blot, se obtuvo que apoA-I aumenta alrededor de 4,4 veces ($p < 0,01$) la fosforilación de la eNOS, con respecto a la condición basal, efecto de magnitud similar al producido por HDL 50 µg/mL (**Figura 17C**).

Estos resultados demuestran que apoA-I aumenta la actividad de la eNOS y la biodisponibilidad de NO, lo cual se correlaciona con una mayor fosforilación de la eNOS en S1177. Estos resultados son concordantes con otras publicaciones^{81, 82}, y con los trabajos realizados en nuestro laboratorio (**Figuras 9 y 10**).

Con el fin de demostrar que el efecto de apoA-I en la mayor síntesis de NO es dependiente de la eNOS, se usó el inhibidor L-NAME, el cual compite con L-arginina por el sitio de unión a esta enzima

En cuanto a la actividad de la eNOS, se observa que L-NAME inhibe totalmente ($p < 0,05$) la conversión de L-arginina a L-citrulina producida por apoA-I 50 µg/mL (**Figura 18A**). De la misma manera, se demostró que L-NAME inhibe en un 64% ($p < 0,05$) la biodisponibilidad de NO, al co-incubarlo con apoA-I 100 µg/mL (**Figura 18B**). En ambos ensayos, el control con L-NAME no modificó la síntesis basal de NO. De esta manera, se confirma que la síntesis de NO en células HUVECs por apoA-I es dependiente de la actividad de la eNOS.

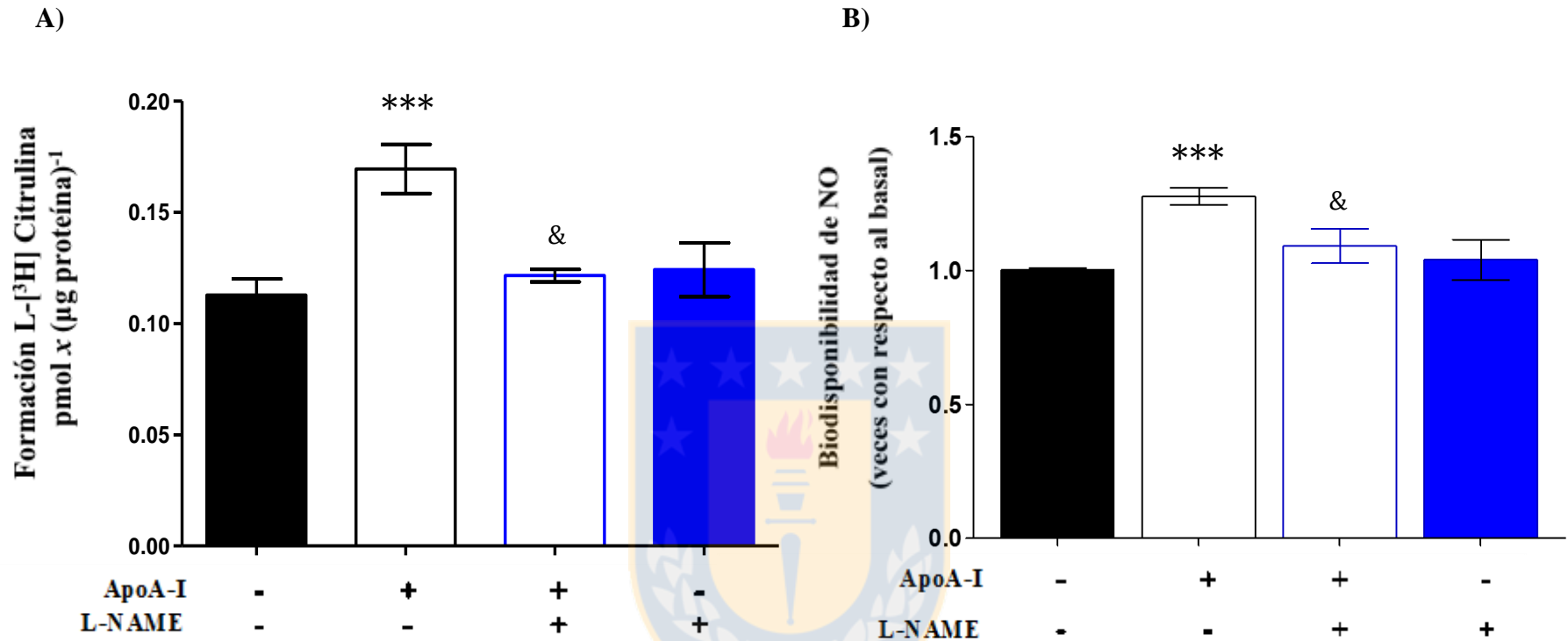


Figura 18: ApoA-I aumenta la síntesis de NO a través de la actividad de la eNOS. **A)** La actividad de la eNOS fue medida en HUVECs por la formación de L-[³H]-citrulina a partir de L-[³H]-arginina. ApoA-I = 50 µg/mL, n = 3 experimentos. **B)** Determinación de la biodisponibilidad de NO con la sonda DAF-FM-DA. ApoA-I = 100 µg/mL, n= 3 experimentos. Tiempo de incubación con apoA-I = 30 min. L-NAME = 100 nM en ambos ensayos. *** p<0,001 con respecto a la condición basal; &p<0,05 con respecto al efecto de apoA-I.

Receptores de apoA-I en la síntesis de óxido nítrico

Como se mencionó anteriormente, existen diferentes receptores de apoA-I en la superficie celular. ABCA1 y ecto-F₁-ATPasa presentan alta afinidad por apoA-I libre de lípidos, mientras que SR-BI reconoce apoA-I sólo en el contexto de las HDL. Experimentos anteriores de nuestro laboratorio demuestran que la vasodilatación y la fosforilación de la eNOS en S1177, producidas por apoA-I, son revertidas utilizando IF₁ (1,8 µM, p<0,01) y oligomicina (125 nM, p<0,05, **Figuras 13 y 14**).

Nuestros ensayos coinciden con dichos hallazgos: IF₁ y oligomicina, a las mismas concentraciones mencionadas, revierten significativamente (70%, p<0,01, y 50%, p<0,05, respectivamente) la mayor actividad de la eNOS, observada en presencia de apoA-I (**Figura 19A**). Asimismo, se evidenció que el efecto de apoA-I en la biodisponibilidad de NO fue revertido completamente por IF₁ (p<0,001) y parcialmente (50%) por oligomicina (**Figura 19B**). Si bien la tendencia a la inhibición es clara con oligomicina, este efecto no alcanzó significancia estadística. A partir de estos resultados, es posible sugerir que apoA-I, a través de ecto-F₁-ATPasa, aumenta la síntesis de NO.

Para confirmar esta premisa, fue necesario evaluar la participación de ABCA1 y SR-BI, lo cual fue realizado con anticuerpos bloqueantes para cada una de estas proteínas. Como se muestra en la **Figura 20**, la presencia del anticuerpo anti ABCA1 no modificó el efecto de apoA-I en la actividad de la eNOS ni en la biodisponibilidad de NO, demostrando que este transportador no estaría involucrado en la síntesis de NO producida por apoA-I en células HUVECs. Por otra parte, al co-incubar apoA-I con un anticuerpo neutralizante de SR-BI, la actividad de la eNOS disminuyó alrededor de un 50%, comparado con el efecto individual de apoA-I, pero este cambio no fue estadísticamente significativo (**Figura 21A**). Como control se observa que este mismo anticuerpo bloquea completa y significativamente el efecto de HDL en la actividad de la eNOS. En los ensayos de biodisponibilidad, al incubar el anticuerpo anti SR-BI con apoA-I, se observa un aumento significativo (3 a 4 veces con las diluciones 1/1.000 y 1/500, respectivamente, p<0,001), con respecto a la condición basal. Lo mismo ocurrió en la incubación de este anticuerpo con HDL. Este efecto responde a la presencia del anticuerpo anti SR-BI, ya que los controles con dicho anticuerpo generaron un aumento significativo de 2,5 y 3,5 veces, con respecto a la condición basal (p<0,001), hecho

que no ocurre con el control de isotipo (**Figura 21B**). Este resultado discrepa con lo observado en la conversión de L-arginina, y posiblemente se debe a un efecto del anticuerpo anti SR-BI sobre la fluorescencia de la sonda, lo cual no se correlaciona necesariamente con una mayor síntesis de NO.

Por lo tanto, a partir de estos resultados, es posible establecer que ABCA1 no participa en el efecto de apoA-I producido en la síntesis de NO, mientras que SR-BI está involucrado de manera parcial, pero no significativa. En consecuencia, ecto- F_1 -ATPasa es el receptor más directamente implicado en la síntesis de NO producida por apoA-I en células HUVECs.



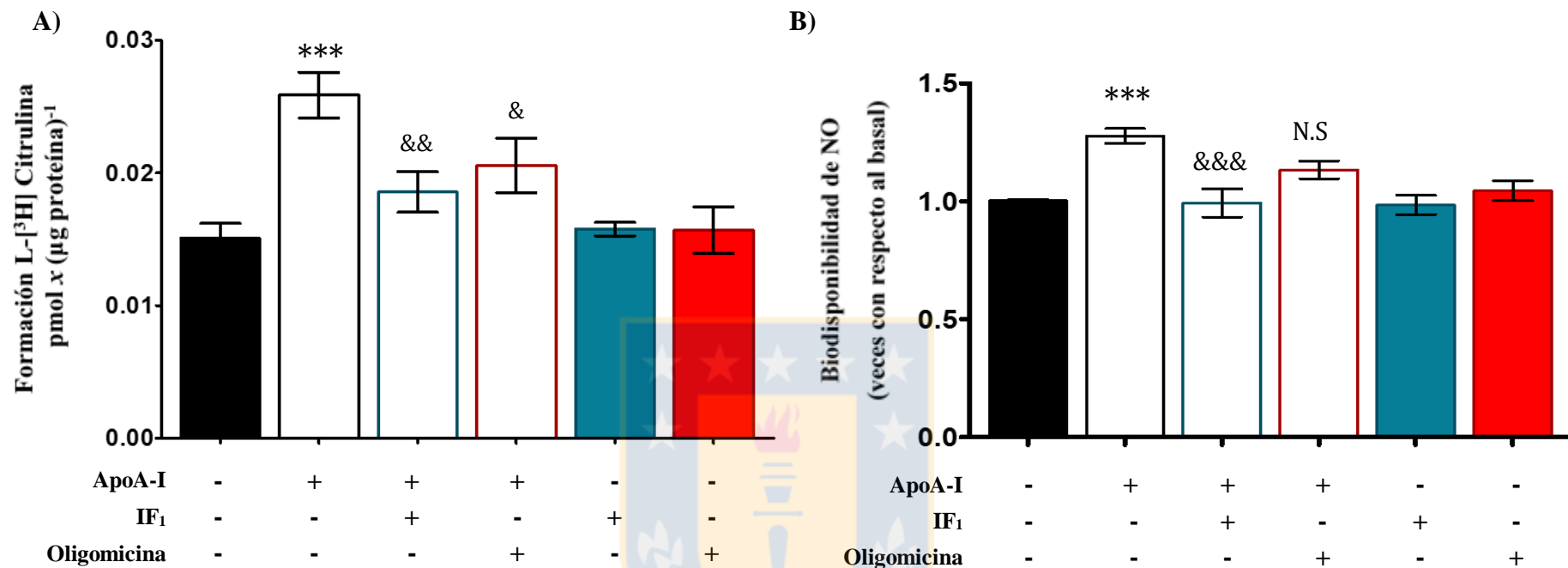
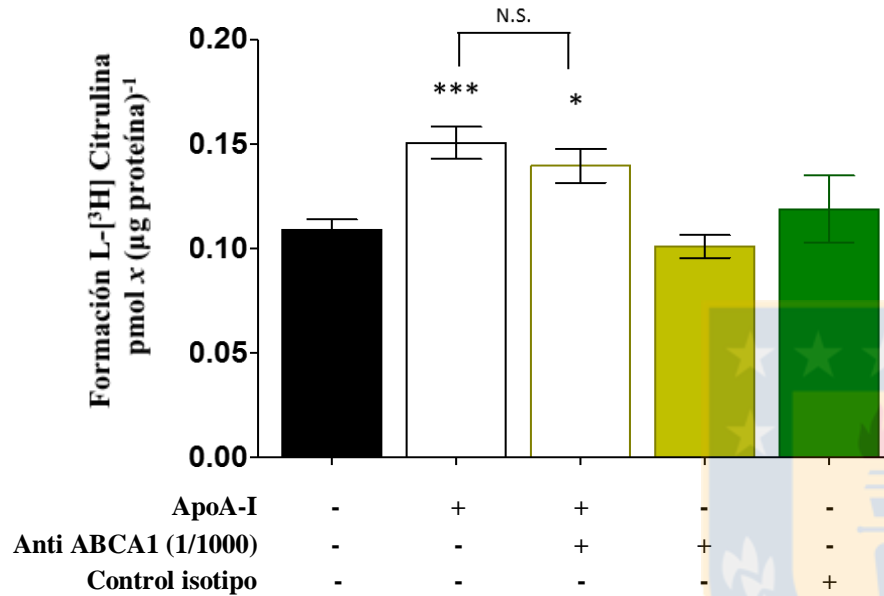


Figura 19: ApoA-I aumenta la síntesis de NO, vía ecto-F₁-ATPasa. **A)** La actividad de la eNOS fue medida en HUVECs por la formación de L-[³H]-citrulina a partir de L-[³H]-arginina. ApoA-I = 50 μg/mL, n= 4 experimentos (resultados proporcionados por MSc. Marcelo León Muñoz). **B)** Determinación de la biodisponibilidad de NO con la sonda DAF-FM-DA. ApoA-I = 100 μg/mL, n= 3 experimentos. Tiempo de incubación con apoA-I = 30 min. IF₁ = 1,8 μM, Oligomycin = 125 nM. *** p<0,001 con respecto a la condición basal; &p<0,05, &&p<0,01, &&&p<0,001 con respecto al efecto de apoA-I. N.S. = no significativo.

A)



B)

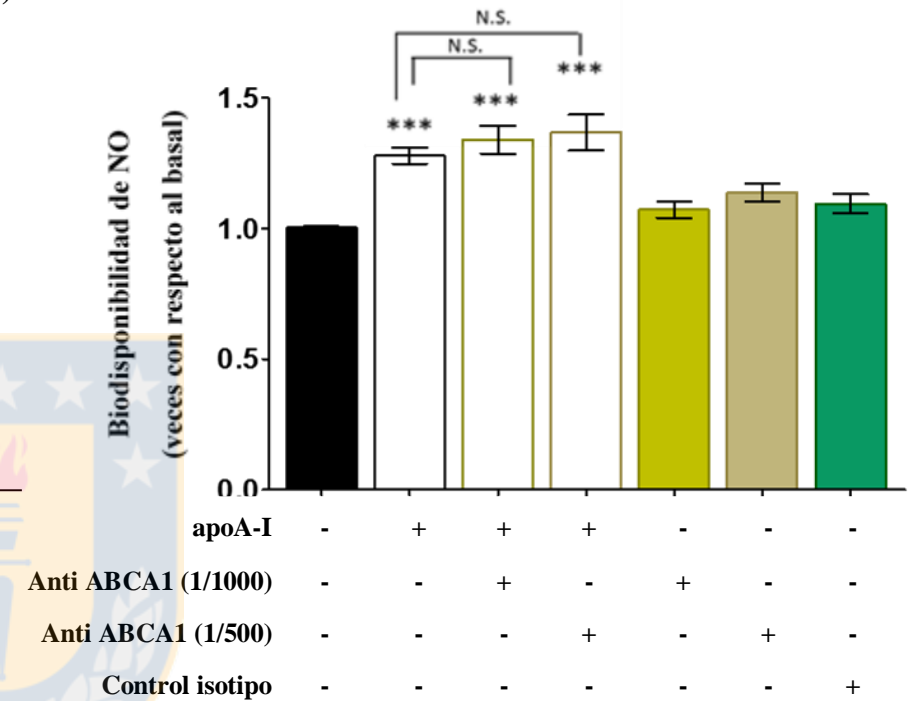


Figura 20: ABCA1 no participa en la síntesis de NO producida por apoA-I. A) La actividad de la eNOS fue medida en HUVECs por la formación de L-[³H]-citrulina a partir de L-[³H]-arginina. ApoA-I = 50 µg/mL, n= 4 experimentos. B) Determinación de la biodisponibilidad de NO con la sonda DAF-FM-DA. ApoA-I = 100 µg/mL, n= 4 experimentos. Control isotipo = dilución 1/500 en ambos ensayos. Tiempo de incubación con apoA-I = 30 min. *p<0,05, ***p<0,001 con respecto a la condición basal, N.S. = no significativo.

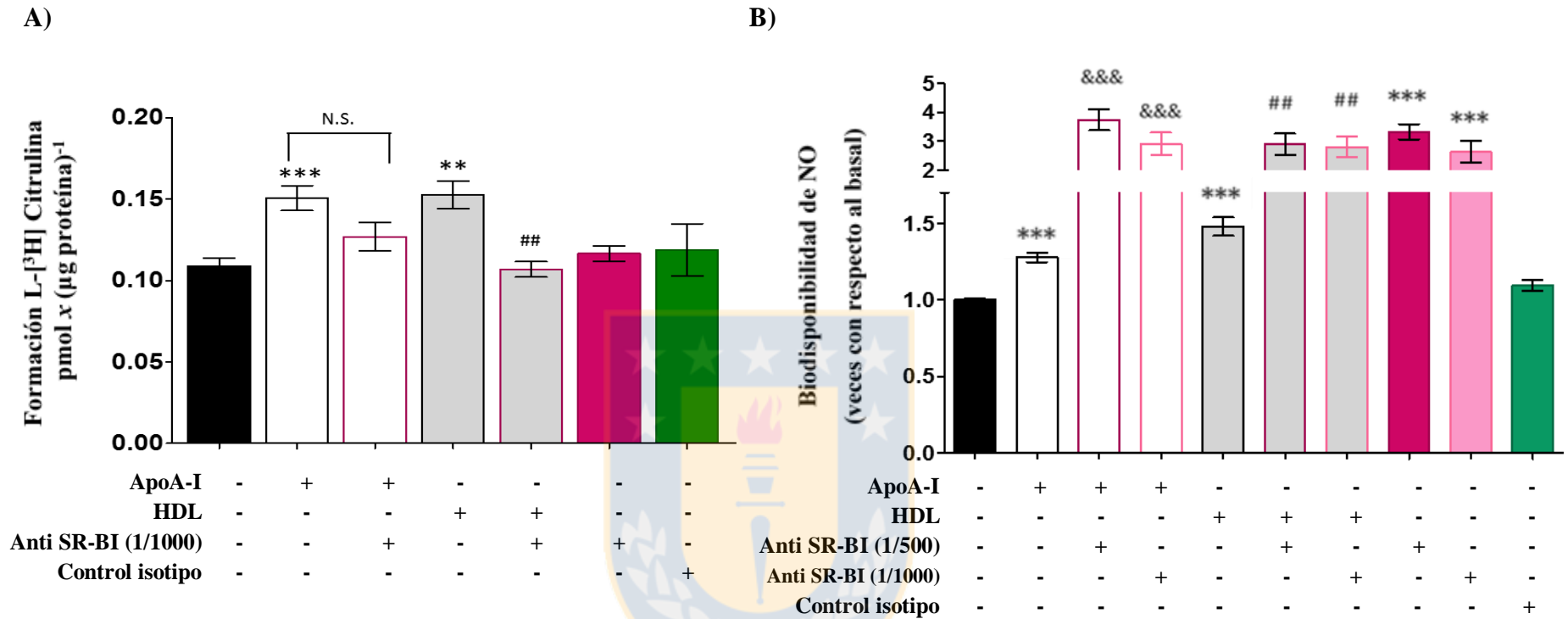


Figura 21: SR-BI participa de manera parcial en la síntesis de NO, producida por apoA-I. **A)** La actividad de la eNOS fue medida en HUVECs por la formación de L-[³H]-citrulina a partir de L-[³H]-arginina. ApoA-I = 50 µg/mL, n= 3 experimentos. **B)** Determinación de la biodisponibilidad de NO con la sonda DAF-FM-DA. ApoA-I = 100 µg/mL, n= 4 experimentos. HDL = 50 µg/mL, control isotipo = dilución 1/500 en ambos ensayos. Tiempo de incubación con apoA-I o HDL = 30 min. **p<0,01, ***p<0,001 con respecto a la condición basal; &&&p<0,001 con respecto al efecto de apoA-I; #p<0,01 con respecto al efecto de HDL, N.S. = no significativo.

Vías PI3K / Akt y ERK1/2 en la síntesis de óxido nítrico por apoA-I

Para evaluar la participación de las vías de señalización PI3K, Akt y ERK1/2 en la síntesis de NO, observada en células HUVECs incubadas con apoA-I, se utilizó los inhibidores wortmanina 0,1 μ M, triciribine 1 μ M y U-0126 10 μ M, respectivamente.

En relación a PI3K, su inhibición con wortmanina bloqueó completamente la actividad de la eNOS, en células incubadas con apoA-I 50 μ g/mL ($p < 0,01$, **Figura 22A**), de manera similar a lo observado en la fosforilación de la eNOS en S1177 ($p < 0,01$, **Figura 22C**). Para la biodisponibilidad de NO, se observó una tendencia a la disminución (-36%), pero este efecto no alcanzó significancia estadística (**Figura 22B**). En ninguna de estas técnicas, el control de wortmanina generó un efecto diferente a la condición basal.

Como se describió anteriormente, las PI3K clase IA están formadas por 2 subunidades: una reguladora (p85), y una catalítica, denominada p110. Esta última presenta 3 isoformas: α , β y δ , entre las cuales, la isoforma β se ha relacionado con la vía de señalización activada por apoA-I (**Figura 11B**, datos no publicados). La PI3K clase IB está formada por la subunidad catalítica p110 γ y una subunidad regulatoria, y no parece estar involucrada en los efectos de apoA-I a nivel endotelial (**Figura 11B**). En los ensayos de actividad de la eNOS, se observó una disminución significativa del efecto de apoA-I al coincubar con TGX-221 o con AS252424, inhibidores de PI3K β y PI3K γ , respectivamente, alcanzando valores similares a la condición basal ($p < 0,001$, **Figura 23A**). La incubación de TGX-221 con apoA-I generó una disminución significativa de la biodisponibilidad de NO (-71,4 %, $p < 0,001$), comparado con apoA-I, mientras que AS-252424 lo redujo en un 50%, efecto que no fue estadísticamente significativo (**Figura 23B**). Se observa que en ambas técnicas, los inhibidores por sí solos, no produjeron un efecto significativo con respecto a la condición basal.

A partir de estos resultados, es posible establecer que ambas isoformas de PI3K (β y γ) estarían implicadas en los efectos de apoA-I sobre la síntesis de NO en células endoteliales.

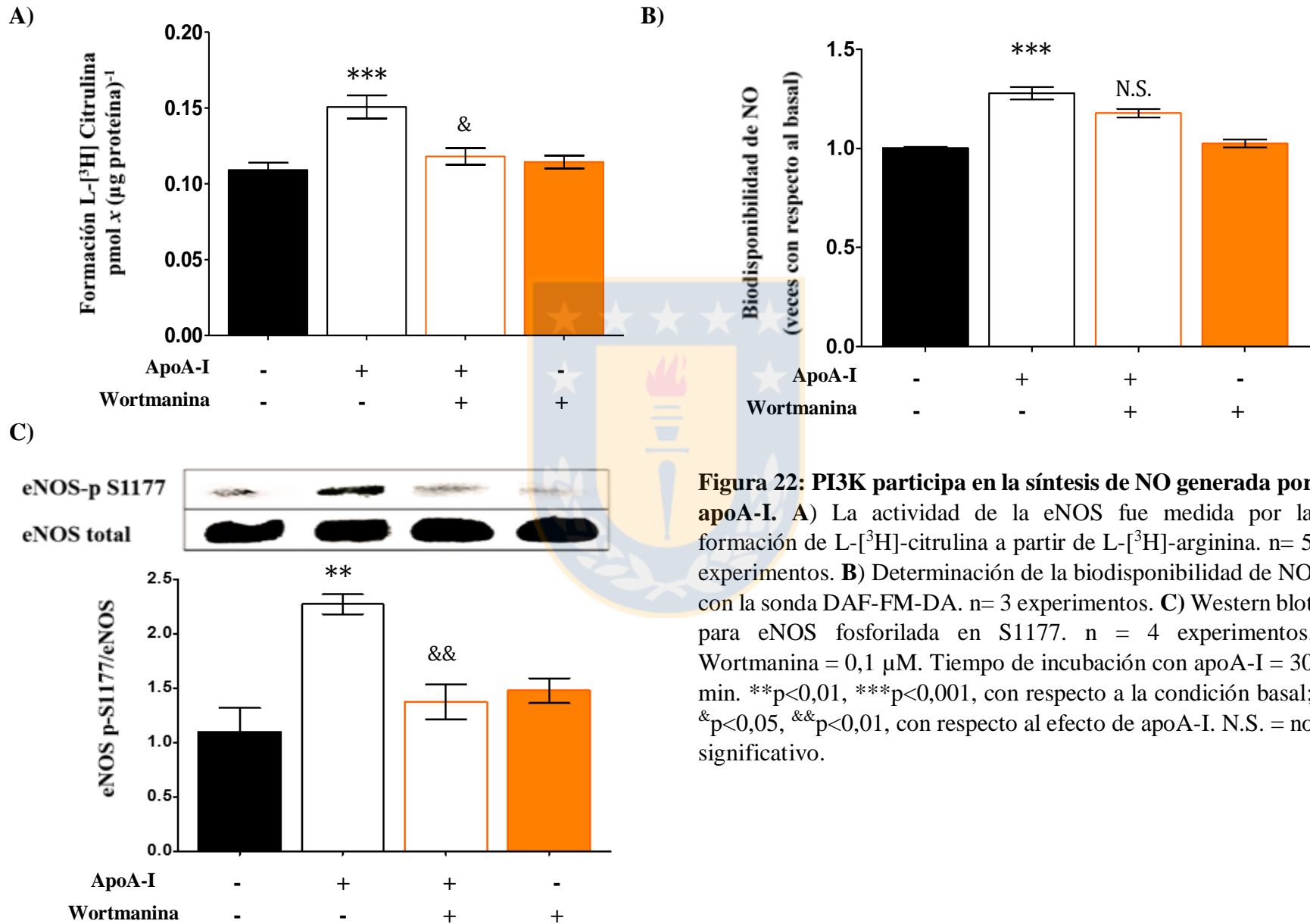


Figura 22: PI3K participa en la síntesis de NO generada por apoA-I. **A)** La actividad de la eNOS fue medida por la formación de L-[³H]-citrulina a partir de L-[³H]-arginina. n= 5 experimentos. **B)** Determinación de la biodisponibilidad de NO con la sonda DAF-FM-DA. n= 3 experimentos. **C)** Western blot para eNOS fosforilada en S1177. n = 4 experimentos. Wortmanina = 0,1 µM. Tiempo de incubación con apoA-I = 30 min. **p<0,01, ***p<0,001, con respecto a la condición basal; &p<0,05, &&p<0,01, con respecto al efecto de apoA-I. N.S. = no significativo.

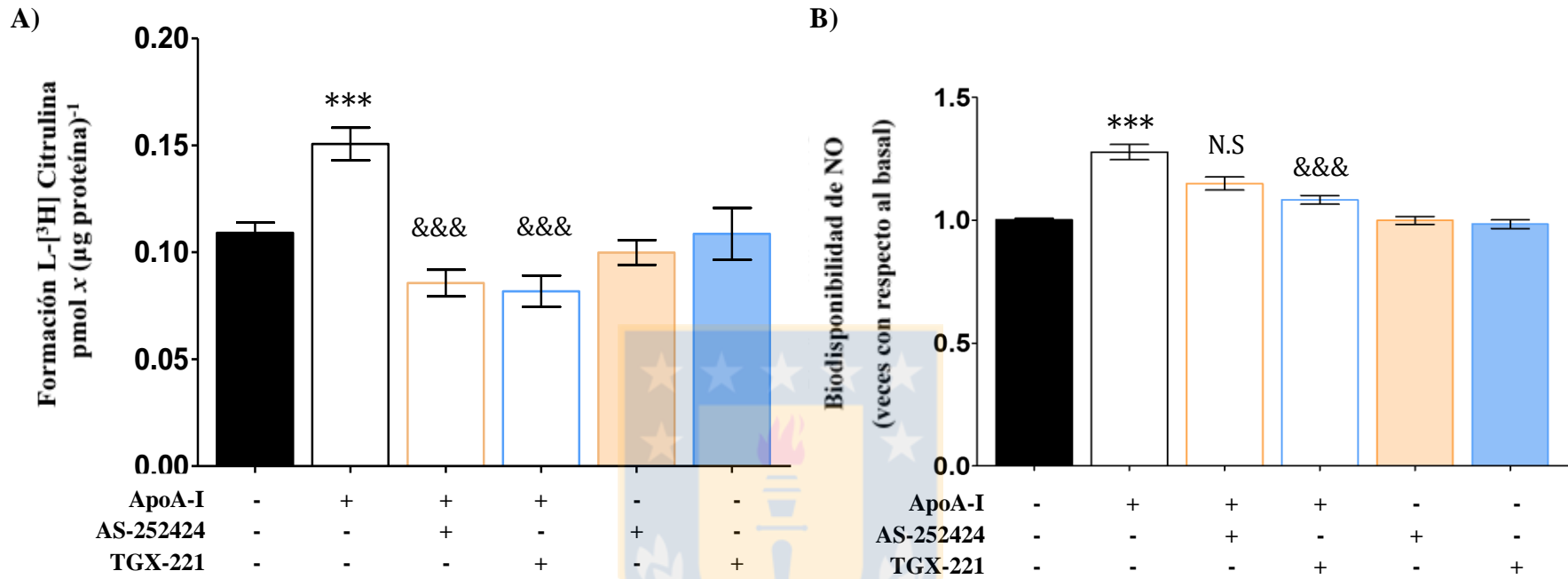
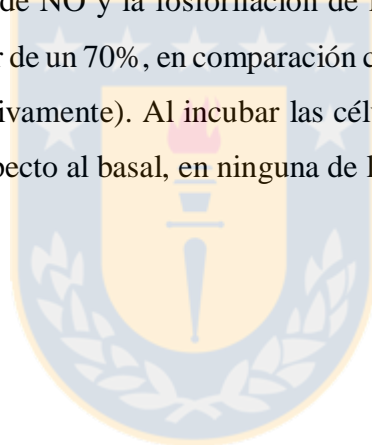


Figura 23: Las isoformas β y γ de PI3K participan en la síntesis de NO, producida por apoA-I. **A)** La actividad de la eNOS fue medida en HUVECs por la formación de L-[³H]-citrulina a partir de L-[³H]-arginina. ApoA-I = 50 µg/mL, n= 3 experimentos. **B)** Determinación de la biodisponibilidad de NO con la sonda DAF-FM-DA. ApoA-I = 100 µg/mL, n= 4 experimentos. AS-252424 = 20 µM, TGX-221 = 100 nM, tiempo de incubación con apoA-I = 30 min. ***p<0,001 con respecto a la condición basal., &&&p<0,001 con respecto al efecto de apoA-I, N.S. = no significativo.

En cuanto a Akt, al usar el inhibidor triciribine junto con apoA-I, se observó que la actividad de la eNOS disminuyó significativamente en alrededor de un 80% ($p < 0,05$, **Figura 24A**), al compararlo con apoA-I. Una situación similar se observó en la fosforilación de la eNOS, donde triciribine redujo en un 52,3% el efecto de apoA-I ($p < 0,05$, **Figura 24C**). En relación a la biodisponibilidad de NO producida por apoA-I, ésta tendió a disminuir en un 53,6% en presencia de triciribine (**Figura 24B**), sin embargo, este efecto no alcanzó significancia estadística. En ninguna de estas técnicas se observó que triciribine por sí solo generara un efecto significativo con respecto a la condición basal. Estos resultados demuestran que Akt participa en la vía de señalización intracelular que regula la síntesis de NO, en respuesta a apoA-I.

Con respecto a ERK1/2, al incubar U-0126 con apoA-I, se obtuvo que la actividad de la eNOS, la biodisponibilidad de NO y la fosforilación de la eNOS en S1177 se redujeron significativamente en alrededor de un 70%, en comparación con el efecto individual de apoA-I (**Figura 25A, B y C**, respectivamente). Al incubar las células con U-0126, no se observó un efecto significativo con respecto al basal, en ninguna de los ensayos realizados.



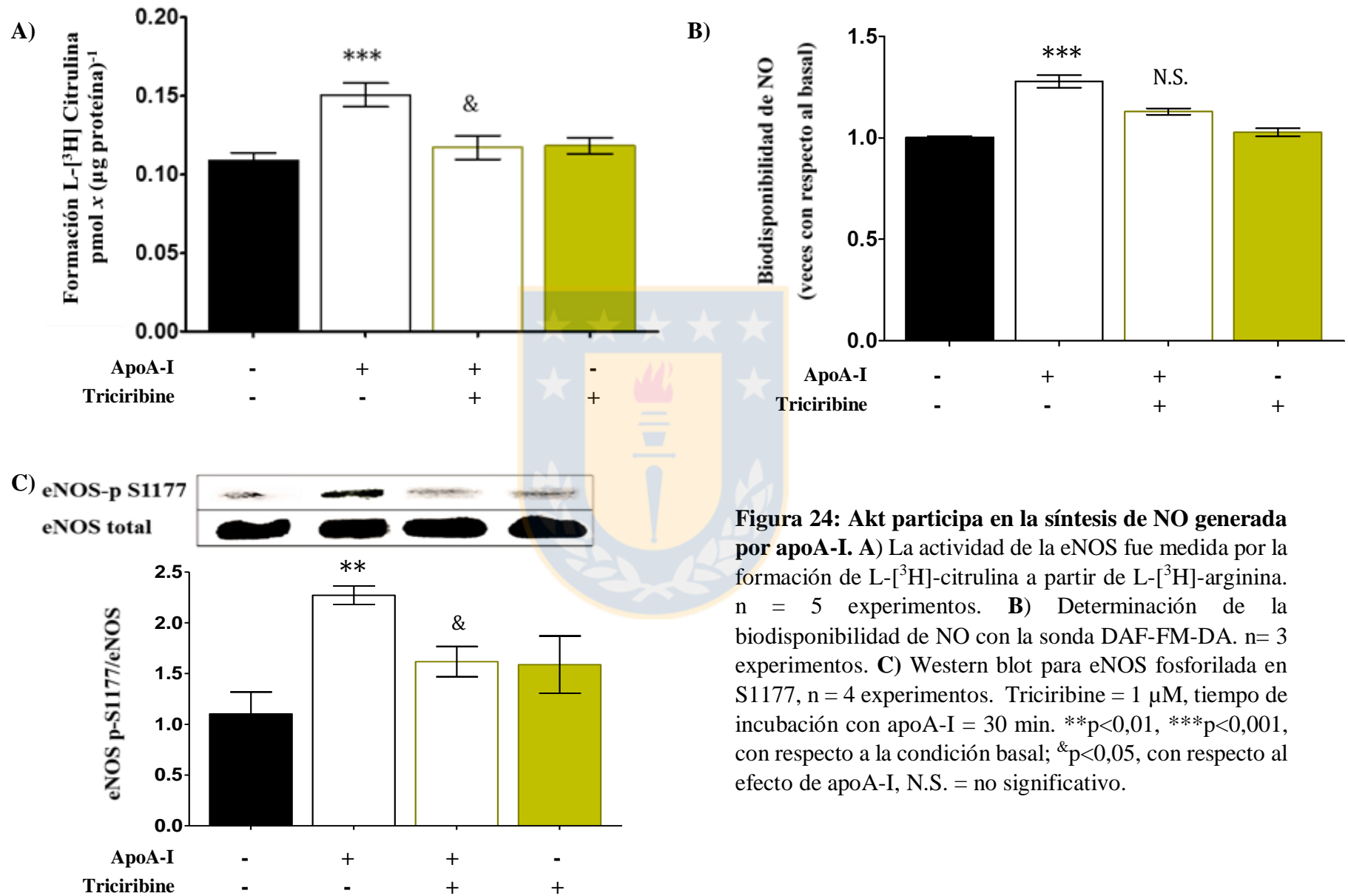


Figura 24: Akt participa en la síntesis de NO generada por apoA-I. **A)** La actividad de la eNOS fue medida por la formación de L-[³H]-citrulina a partir de L-[³H]-arginina. n = 5 experimentos. **B)** Determinación de la biodisponibilidad de NO con la sonda DAF-FM-DA. n = 3 experimentos. **C)** Western blot para eNOS fosforilada en S1177, n = 4 experimentos. Triciribine = 1 µM, tiempo de incubación con apoA-I = 30 min. **p<0,01, ***p<0,001, con respecto a la condición basal; &p<0,05, con respecto al efecto de apoA-I, N.S. = no significativo.

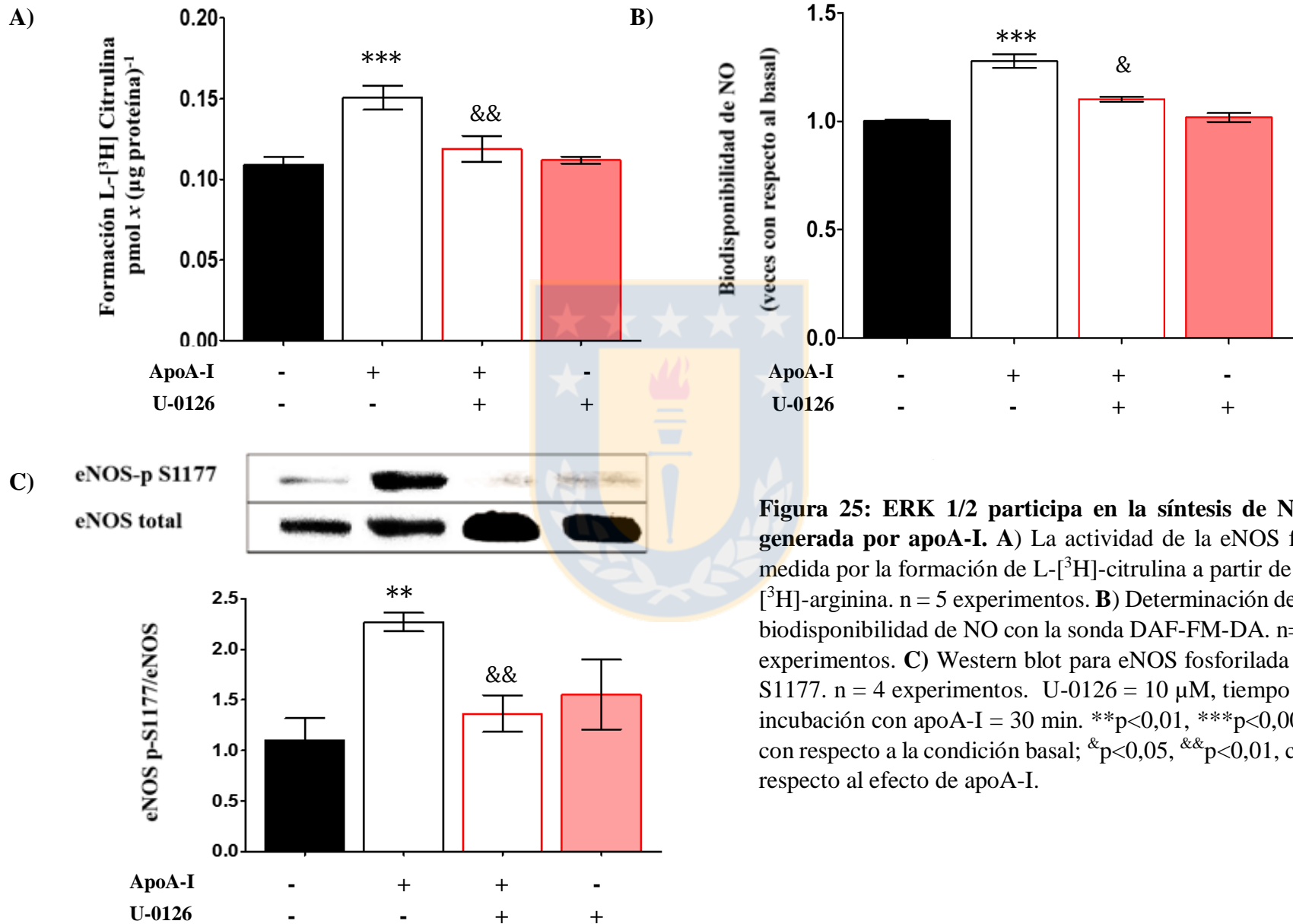


Figura 25: ERK 1/2 participa en la síntesis de NO, generada por apoA-I. **A)** La actividad de la eNOS fue medida por la formación de L-[³H]-citrulina a partir de L-[³H]-arginina. n = 5 experimentos. **B)** Determinación de la biodisponibilidad de NO con la sonda DAF-FM-DA. n = 3 experimentos. **C)** Western blot para eNOS fosforilada en S1177. n = 4 experimentos. U-0126 = 10 µM, tiempo de incubación con apoA-I = 30 min. **p<0,01, ***p<0,001, con respecto a la condición basal; &p<0,05, &&p<0,01, con respecto al efecto de apoA-I.

Además de incubar estos inhibidores de forma individual, se procedió a realizar co-incubaciones de wortmanina y triciribine, y de wortmanina con U-0126, para determinar si existe un efecto sumatorio al combinar estas moléculas. Con la presencia de wortmanina y triciribine junto a apoA-I, se observó que la actividad de la eNOS retornó a los niveles basales, revirtiendo completamente el efecto de apoA-I. De manera similar, la mezcla de wortmanina y U-0126 redujo de manera significativa (-82%, $p < 0,05$) la actividad de la eNOS generada por apoA-I (**Figura 26A**). La acción de la mezcla de inhibidores fue similar en magnitud a lo observado para cada uno de ellos, probablemente debido a que la inhibición producida de manera individual ya era considerable y significativa para la actividad de la eNOS (**Figuras 22-25**).

Para la biodisponibilidad de NO, ésta disminuyó significativamente al incubar apoA-I con las mezclas de inhibidores: -82% ($p < 0,001$) en presencia de wortmanina y triciribine, y -98% ($p < 0,001$) para la combinación de wortmanina y U-0126 (**Figura 26B**). En este caso se observa un efecto aditivo de la acción de cada inhibidor, para ambas combinaciones. Estos resultados nos permiten comprobar que ambas vías de señalización, PI3K/Akt y ERK 1/2, participan en el efecto de apoA-I sobre la síntesis de NO en células endoteliales.

Para verificar si la activación de ERK1/2 es controlada por PI3K, se realizó western blots para ERK1/2 fosforilada. En primer lugar, se confirma la activación de esta proteína quinasa por apoA-I en células HUVECs, determinado por una mayor fosforilación en los residuos T202 y Y204 (**Figura 27**). Al utilizar wortmanina en conjunto con apoA-I, estas fosforilaciones disminuyen con respecto a la condición con apoA-I, generando bandas de intensidad similar a la condición basal o al control con U-0126 (**Figura 27**). Por lo tanto, a partir de estos resultados, es posible establecer que PI3K activa Akt y ERK1/2 de forma paralela, y ambas vías convergen en la síntesis de NO.

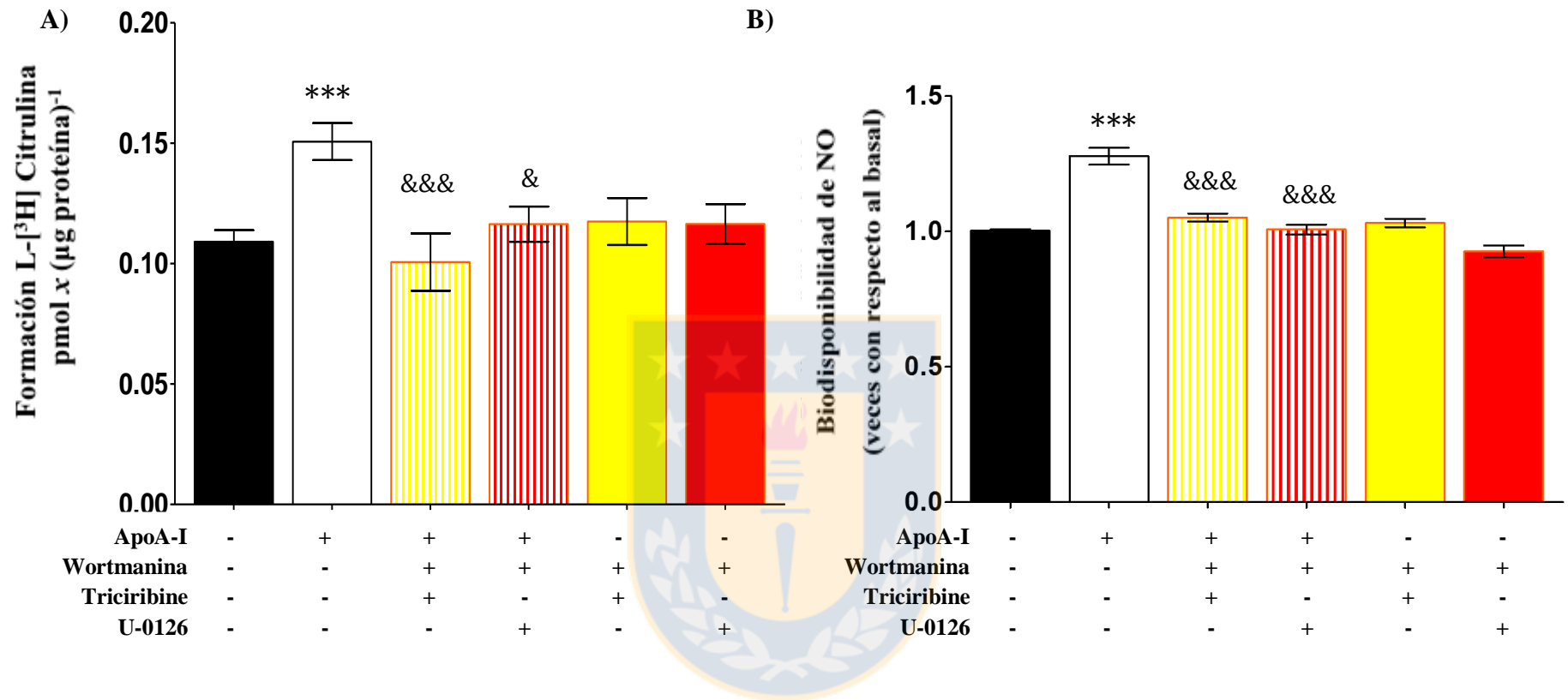


Figura 26: PI3K/Akt y ERK1/2 participan en conjunto en la síntesis de NO por apoA-I. **A)** La actividad de la eNOS fue medida en HUVECs por la formación de L-[³H]-citrulina a partir de L-[³H]-arginina. ApoA-I = 50 µg/mL, nv= 4 experimentos. **B)** Determinación de la biodisponibilidad de NO con la sonda DAF-FM-DA. ApoA-I = 100 µg/mL, n = 4 experimentos. Wortmanina = 0,1 µM, U-0126 = 10 µM. Tiempo de incubación con apoA-I = 30 min. ***p<0,001 con respecto a la condición basal., &p<0,05, &&p<0,01, con respecto al efecto de apoA-I.

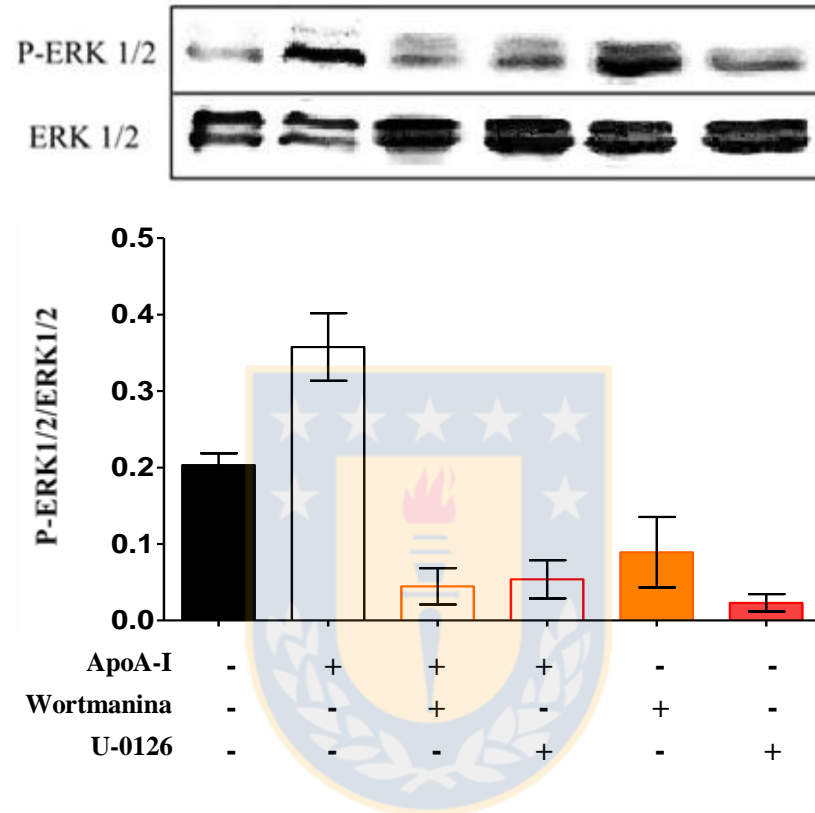


Figura 27: PI3K fosforila ERK1/2, en células incubadas con apoA-I. Las células endoteliales fueron incubadas por 30 min con los inhibidores wortmanina (0,1 μ M) o U-0126 (10 μ M), y luego durante 30 min con apoA-I 50 μ g/mL. Se presentan los resultados de fosforilación de ERK1/2 en los residuos activadores T202/Y204 de ERK1 y T185/Y187 de ERK2. n = 2 experimentos independientes.

Receptores P2Y involucrados en el efecto de apoA-I en la síntesis de NO

Para complementar la identificación de los receptores y vías de señalización implicadas en la síntesis de NO generada por apoA-I, se evaluó la participación de los receptores purinérgicos P2Y₁ y P2Y₁₂, los cuales son activados selectivamente por ADP, y son expresados por células endoteliales¹²⁴.

Para este objetivo, se utilizaron las moléculas MRS-2179 (10 µM) y cangrelor (1 µM), inhibidores de P2Y₁ y P2Y₁₂, respectivamente. Al co-incubar las células HUVECs con apoA-I y MRS-2179, se observa que la actividad de la eNOS no difiere del control basal, lo que indica una total reversión del efecto generado por apoA-I (**Figura 28A**). Además, se observó que MRS-2179 por sí solo disminuye de manera significativa la actividad de la eNOS (-40%, p<0,01), lo que sugiere que el receptor P2Y₁ regula la actividad basal de la eNOS. Por otra parte, al co-incubar las células con apoA-I y cangrelor, la actividad de la eNOS disminuyó en un 43,1%, con respecto a este parámetro en presencia de apoA-I, pero este efecto no fue estadísticamente significativo.

En relación a la biodisponibilidad de NO, la incubación de apoA-I con MRS-2179 produjo un aumento significativo, con respecto a la condición basal (+45%, p<0,001) y al efecto de apoA-I (+25%, p<0,01, **Figura 28B**). De igual manera, la incubación individual de MRS-2179 generó un aumento significativo de la biodisponibilidad basal de NO (+15%, p<0,001). Este resultado difiere de lo esperado y puede sugerir que MRS-2179 controla otras vías que regulan la biodisponibilidad de NO, o bien, que su presencia afecta la fluorescencia generada por las células, de manera independiente de la síntesis de NO o del bloqueo del receptor P2Y₁. En relación a la incubación con cangrelor, se obtuvo una disminución no significativa de un 32% en la biodisponibilidad de NO, con respecto al efecto de apoA-I. Cangrelor por sí solo no afectó la biodisponibilidad basal de NO (**Figura 28B**).

Por lo tanto, a partir de esta información, se puede concluir que el principal receptor purinérgico implicado en la síntesis de NO por apoA-I es P2Y₁. Este hallazgo refuerza la hipótesis que postula que apoA-I aumenta la actividad de ecto-F₁-ATPasa, lo que incrementa la concentración de ADP extracelular.

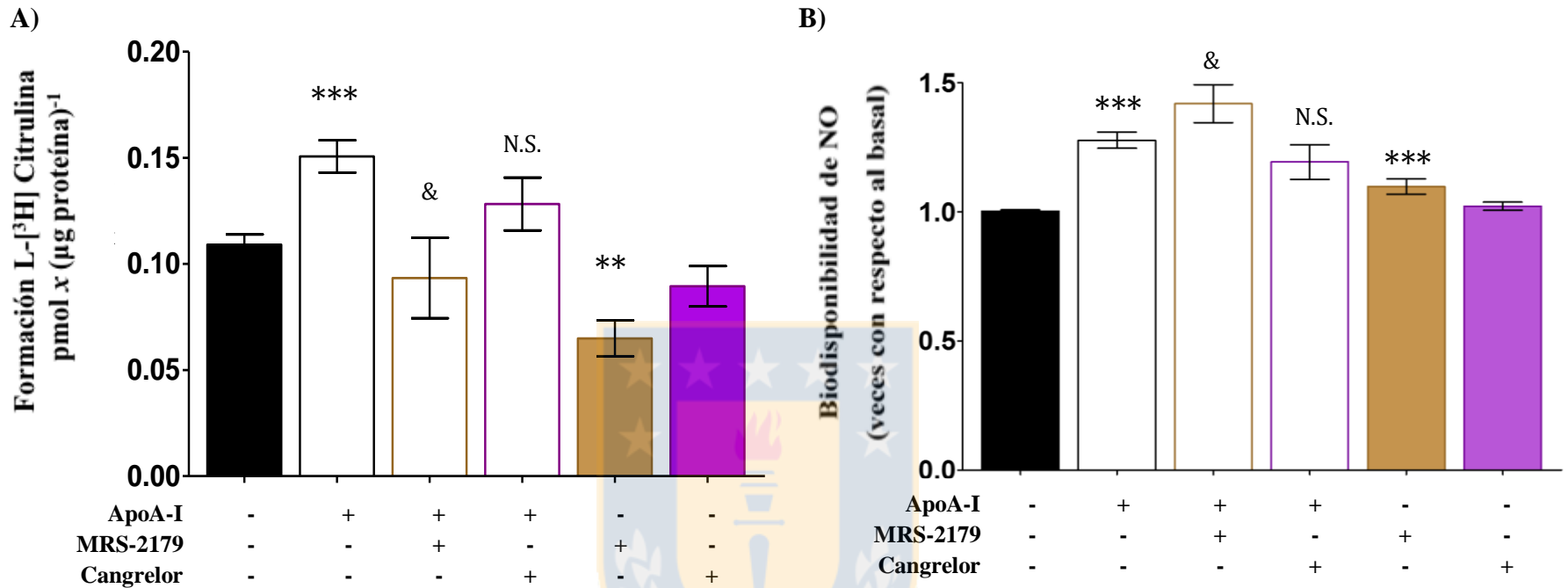


Figura 28: ApoA-I aumenta la síntesis de NO, a través de la activación del receptor P2Y₁. **A)** La actividad de la eNOS fue medida en HUVECs por la formación de L-[³H]-citrulina a partir de L-[³H]-arginina. ApoA-I = 50 µg/mL, n = 3 experimentos. **B)** Determinación de la biodisponibilidad de NO con la sonda DAF-FM-DA. ApoA-I = 100 µg/mL, n = 4 experimentos. MRS-2179 = 10 µM (P2Y₁), Cangrelor = 1 µM (P2Y₁₂), tiempo de incubación con apoA-I = 30 min. **p<0,01, ***p<0,001 con respecto a la condición basal. &p<0,05, con respecto al efecto de apoA-I, N.S. = no significativo.

DISCUSIÓN

La regulación del tono vascular es un aspecto importante en la mantención de la homeostasis vascular, y es coordinada principalmente por el endotelio, a través de la síntesis de NO. Una alteración en la función endotelial (conocida como disfunción endotelial) determina una reducción de la respuesta vasodilatadora y se correlaciona con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. En consecuencia, los factores que aumenten la producción de NO cobran un interés particular, para contrarrestar el inicio y desarrollo de la disfunción endotelial.

Esta tesis se centró en la apoA-I, la principal proteína que conforma las HDL. Si bien la función de las HDL sobre la síntesis de NO en el endotelio es bastante conocida, los efectos de apoA-I son aún poco claros y existe controversia entre distintos autores^{81-83, 88}. Una de las principales dificultades de trabajar con apoA-I es su obtención y purificación, ya que es necesario realizar ultracentrifugación por varios días, seguida de la delipidación de las HDL y la separación de sus componentes proteicos. Inicialmente, en nuestro laboratorio se purificaba apoA-I desde el pool de HDL, mediante cromatografía de exclusión, utilizando como fase estacionaria Sephadex G-150. Debido a la discontinuación de este producto en el mercado, fue necesario recurrir a otros métodos de purificación, entre los cuales se seleccionó la elución desde gel SDS-PAGE 12%, indicado por Brace y col¹²⁷. Éste es un método fácil de realizar, rápido y de bajo costo, que genera apoA-I pura y funcional. En nuestros ensayos, el rendimiento fue de alrededor de 90%, lo cual es considerado óptimo. Este protocolo permite trabajar con apoA-I obtenida desde plasma humano, lo cual otorga gran valor y significado biológico a los resultados obtenidos.

Esta tesis abordó la participación de ecto-F₁-ATPasa, receptores purinérgicos (P2Y₁ y P2Y₁₂) y vías de señalización (PI3K / Akt y ERK1/2) en el efecto de apoA-I en la síntesis de NO. Para ello, se utilizó células endoteliales HUVECs como modelo de estudio, el cual fue seleccionado debido a las siguientes razones: 1) las HUVECs son células endoteliales humanas de cultivo primario, de fácil obtención; 2) estas células expresan todos los elementos de interés en esta tesis^{79, 121, 130}; 3) existen evidencias experimentales que sustentan la validez

de la vía de estudio (apoA-I / ecto-F₁-ATPasa / eNOS) en este tipo celular⁷⁹ (datos no publicados).

Para evaluar la síntesis de NO, dos técnicas principales fueron utilizadas: la conversión del sustrato L-[³H]-arginina a L-[³H]-citrulina, una medida directa de la actividad de la eNOS, y la detección de NO biodisponible, mediante fluorescencia, utilizando la sonda DAF-FM-DA. Estas técnicas fueron complementadas con la evaluación de la fosforilación del residuo S1177 de la eNOS, cuyo aumento se asocia a una mayor actividad enzimática³¹. Con apoA-I 50 µg/mL, se obtuvo un aumento significativo en la actividad y la fosforilación de la eNOS (**Figuras 17 A y C**). Esta concentración fue elegida puesto que trabajos realizados con anterioridad en nuestro laboratorio demostraron que promovía de manera significativa la actividad de la eNOS y la fosforilación de S1177, en este mismo modelo celular¹³¹. Al adicionar apoA-I a los cultivos celulares, se observó un efecto dosis-dependiente en la biodisponibilidad de NO, a concentraciones de 25-200 µg/mL (**Figura 17B**), consideradas dentro de los niveles fisiológicos (rango de referencia en plasma: 50-200 µg/mL⁶⁶). Como se mencionó en los resultados, a 100 y 200 µg/mL de apoA-I se obtuvo un aumento significativo en la determinación de la biodisponibilidad de NO, concentración mayor a la utilizada en las otras técnicas. Esta discrepancia en las concentraciones de apoA-I requeridas para observar efectos biológicamente significativos es atribuible a la menor sensibilidad y especificidad de la sonda DAF-FM-DA, con respecto a la conversión de L-arginina y a los western blots, puesto que: 1) la biodisponibilidad de NO se ve afectada por factores, como la presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS), que disminuyen la fracción de NO detectable; 2) la vida media del NO es de sólo algunos segundos, por lo que su determinación exacta es dificultosa. De esta manera, para lograr un efecto considerable y significativo, es necesario usar una mayor concentración de apoA-I en los ensayos de biodisponibilidad de NO que en las otras técnicas mencionadas. Por lo tanto, se decidió utilizar 100 µg/mL de apoA-I para realizar los posteriores ensayos en la determinación de la biodisponibilidad de NO, mientras la actividad y fosforilación de la eNOS fue evaluada a 50 µg/mL.

A pesar de las diferencias de sensibilidad de cada técnica, nuestros resultados avalan la mayor producción de NO en células tratadas con concentraciones fisiológicas de apoA-I, y apoyan los hallazgos obtenidos por Drew y col⁸², quienes observaron que apoA-I 40 µg/mL,

aumenta la biodisponibilidad de NO y modifica el perfil de fosforilaciones de eNOS hacia una enzima de mayor actividad, en células endoteliales de aorta de bovino (BAECs). Además, nuestros resultados respaldan los hallazgos obtenidos previamente en el laboratorio, en los cuales apoA-I 50 $\mu\text{g/mL}$ aumenta la fosforilación de la eNOS en S1177, mientras que no modifica la fosforilación en T495, perfil asociado a una mayor actividad enzimática, en células HUVECs luego de 30 min de incubación¹³² (**Figura 10**). Todos estos resultados se condicen con el efecto vasodilatador observado en ensayos de miografías con venas placentarias y con venas de cordón umbilical, utilizando apoA-I 50 $\mu\text{g/mL}$ ¹³³ (**Figura 9**). La controversia encontrada en literatura, en relación a la acción de apoA-I en la síntesis de NO, podría deberse a distintos factores en el diseño y desarrollo de los experimentos, como por ejemplo:

- a) El origen de las células endoteliales utilizadas en los ensayos, ya que es sabido que el sistema vascular está formado por distintos tipos de células endoteliales, según el lecho desde el cual se aíslan¹³⁴. Esto cobra aún mayor relevancia al considerar que algunos autores trabajan con células de distintas especies (bovino, humano, ovino, porcino, etc.).
- b) El porcentaje de suero presente en los ensayos. En nuestro caso, las células fueron incubadas en medio bajo en suero (2%) durante 4 h, previa la adición de apoA-I, y posteriormente se trabajó con PBS, todo ello con la finalidad de disminuir la síntesis basal de NO y posibilidad de la formación de partículas de HDL, producto de la lipidación de apoA-I en el medio. Otros autores incluyen suero en el medio de cultivo^{81-83, 87, 88}, lo cual puede generar distintas respuestas celulares, debidas a los componentes propios del suero (proteínas y lípidos).
- c) El tiempo de incubación con apoA-I, dado que las respuestas celulares pueden variar si un estímulo es agudo o crónico. En nuestro caso, se consideró tiempos de incubación cortos (máximo 30 min). Otros autores utilizaron tiempos menores⁸², iguales⁹⁴ o muy superiores (hasta 24h)^{81, 83, 88}.
- d) La concentración de apoA-I utilizada en los ensayos, ya que según lo publicado en literatura, concentraciones de apoA-I fuera del rango de referencia^{83, 88}, no ejercen efecto o producen respuestas celulares diferentes a las presentadas en este trabajo.

- e) La técnica utilizada puede afectar los resultados, debido a las características propias del método (límite de detección, rango de linealidad) o a la presencia de factores que alteren las características de detección de la técnica (por ejemplo, la disminución de la detección de NO por la presencia de ROS).

En esta tesis, el uso de dos técnicas diferentes otorgaron resultados similares para la hipótesis planteada: apoA-I aumenta la actividad de la eNOS, lo que se condice con la mayor biodisponibilidad de NO. Se comprobó que los efectos de apoA-I eran dependientes de la actividad de la eNOS, al utilizar el inhibidor L-NAME (**Figura 18**), el cual compite con L-arginina por sus sitios de unión en dicha enzima¹³⁵.

En relación a los receptores de apoA-I, al menos cuatro de ellos han sido descritos en células endoteliales: SR-BI y ABCG1, que reconocen apoA-I en el contexto de las HDL⁹¹, y ABCA1 y ecto-F₁-ATPasa, que unen apoA-I en su forma libre de lípidos^{100, 107}. En relación a los últimos, en ensayos de *binding* se demostró que el 70% de apoA-I unida a la superficie celular es mediante ecto-F₁-ATPasa, unión de gran afinidad y baja capacidad (K_d = 1,6 µg/mL y B_{max} = 58,7 ng de apoA-I/mg), mientras el 30% restante de apoA-I interacciona con ABCA1, con una K_d aparente de 7,0 nM y una B_{max} de 3 ng de apoA-I/mg^{79, 136, 137}. Dados estos antecedentes, el principal candidato para mediar la síntesis de NO producida por apoA-I en células HUVEC es ecto-F₁-ATPasa. Además de estos receptores, se consideró evaluar SR-BI, ya que ha sido ampliamente descrito su rol central en la síntesis de NO producida por las HDL⁸⁷. ABCG1 no fue incluido en esta tesis, puesto que no parece participar en la regulación de la síntesis de NO, y reconoce apoA-I sólo en el contexto de HDL⁹⁷.

Para evaluar la participación de ecto-F₁-ATPasa en el efecto de apoA-I sobre la síntesis de NO, se utilizó IF₁ y oligomicina. IF₁ inhibe la actividad enzimática, por la unión simultánea a dos dominios F₁-ATP sintasas contiguas, previniendo así la rotación de las unidades catalíticas¹⁰⁶. En estos experimentos se utilizó la secuencia mínima inhibitoria de IF₁ (residuos del 10-47), las que no dimerizan, pero si se unen a los sitios catalíticos de ecto-F₁-ATPasa¹³⁸. Oligomicina es un antibiótico que bloquea el paso de protones por la unidad F₀ de la ecto-F₁-ATPasa¹³⁹. En nuestros experimentos, se observó que tanto IF₁ como oligomicina disminuyen significativamente la actividad de la eNOS y la biodisponibilidad de NO generada por apoA-I en las células HUVEC (**Figuras 13 y 19**). En ambos casos, el efecto inhibitorio de IF₁ fue

mayor (alrededor de 70-100% vs 50%), lo cual se puede explicar en base a partir de los diferentes mecanismos de inhibición. Estos resultados se correlacionan con el rol central de ecto-F₁-ATPasa en la unión de apoA-I en la superficie celular.

En estudios preliminares de nuestro laboratorio, se observó que al usar glibenclamida, un inhibidor de ABCA1, el efecto de apoA-I 50 µg/mL sobre la actividad y la fosforilación de la eNOS en S1177 disminuía significativamente, alcanzando niveles similares a la condición basal (**Figuras anexas 1 y 2**). Estos resultados sugerían la participación central de ABCA1 en el aumento de la síntesis de NO llevado a cabo por apoA-I, lo cual era inesperado, debido a la baja expresión de ABCA1 en las células endoteliales¹⁰¹ y a su participación minoritaria en la unión de apoA-I a la superficie celular. En literatura, se describe que glibenclamida, a la concentración utilizada para inhibir ABCA1 (250 µM), también puede bloquear canales de potasio, lo que generaría un aumento en la fosforilación de la eNOS^{140, 141}. Por esta razón, en esta tesis se decidió utilizar un anticuerpo neutralizante dirigido contra ABCA1, el cual fue descrito en literatura como un bloqueador del eflujo de colesterol mediado por ABCA1 (dilución 1/1000, 1 µg/mL)¹²⁸. En nuestros ensayos, la presencia de este anticuerpo no produjo cambios en el efecto de apoA-I en la conversión de L-[³H]-arginina y en la biodisponibilidad de NO, en ninguna de las diluciones utilizadas (1/1000 y 1/500, **Figura 20**), por lo que ABCA1 no estaría participando en el efecto de apoA-I sobre la síntesis de NO en las células endoteliales. Para confirmar estos hallazgos, se podría utilizar células *knockdown* para ABCA1, de manera de inhibir la expresión de esta proteína. El gran problema de este método es lograr una eficiencia de transfección óptima para el desarrollo de estos ensayos. Lamentablemente, es conocida la dificultad que presenta realizar una óptima transfección en células de cultivo primario como las HUVECs, y que luego de ésta exista una sobrevivencia celular que permita el desarrollo de los experimentos. En esta tesis se trabajó en la estandarización de la generación de células HUVEC *knockdown* para ABCA1, mediante electroporación con siRNA; sin embargo, por limitantes de tiempo, no se logró realizar los ensayos con apoA-I en las células transfectadas.

Además, se evaluó la participación del receptor SR-BI que, como se mencionó, une apoA-I inmersa en el contexto de las HDL (K_d = 50 nM, B_{max} 282 ng/mg)¹⁴², interacción que genera efectos positivos sobre la síntesis de NO en el endotelio⁸³. Puesto que en nuestros experimentos se utilizó apoA-I delipídada, era esperable que este receptor no participara en la

síntesis de NO en células expuestas a apoA-I libre. Sin embargo, en experimentos previos realizados en nuestro laboratorio, se observó que al utilizar un inhibidor específico para SR-BI (BLT-1), los efectos provocados por apoA-I en la fosforilación de eNOS en S1177 fueron revertidos significativamente, mientras que la actividad de eNOS no se modificó de manera sustancial (**Figuras anexas 3 y 4**). Debido a esta discordancia, se decidió utilizar en este trabajo un anticuerpo anti SR-BI que bloquea el eflujo de colesterol (Novus Biological). Según los resultados obtenidos en la actividad de la eNOS, la presencia del anticuerpo anti SR-BI genera una disminución parcial del efecto de apoA-I (alrededor de 50%), la cual no fue estadísticamente significativa. Se comprobó la utilidad de este anticuerpo para bloquear SR-BI utilizando HDL, con la cual la inhibición de la actividad de la eNOS fue total y significativa (**Figura 21**). Estos resultados sugieren que apoA-I podría estar siendo lipídada, probablemente a partir de los propios lípidos de la membrana celular, lo que puede generar HDL pequeñas capaces de interactuar con SR-BI, esto como consecuencia de la alta afinidad por lípidos que presenta apoA-I⁶⁷. En los ensayos de biodisponibilidad de NO, se obtuvieron resultados inesperados, puesto que el anticuerpo anti SR-BI por sí solo aumentó entre un 300 y 400 % la biodisponibilidad de NO, con respecto a la condición basal, lo cual también fue observado en las co-incubaciones con apoA-I, generando un efecto mucho mayor que apoA-I o HDL; por el contrario, el control de isotipo presentó un comportamiento similar a la condición basal (**Figura 21**). Estos resultados sugieren que la presencia específica del anticuerpo anti SR-BI produce un aumento en la señal fluorescente emitida por la sonda, ya sea asociada o no a una mayor síntesis de NO. Por ejemplo, puede ser que la presencia del anticuerpo modifique la permeabilidad de la membrana plasmática al bloquear el receptor SR-BI, puesto que se ha descrito que SR-BI media el flujo de colesterol a favor de gradiente, en la membrana celular⁹¹. Dado que DAF-FM-DA ingresa a la célula por difusión pasiva, un aumento en la permeabilidad de la membrana podría determinar una mayor entrada de sonda a la célula, lo que se asociaría a mayores valores de fluorescencia en aquellas condiciones que presenten el anticuerpo, independiente de la síntesis de NO. Un factor técnico que pudiera afectar la fluorescencia de la sonda es la presencia de componentes del suero. Según la información técnica de la sonda, tampones que contengan albúmina de suero bovino (BSA), pueden aumentar la fluorescencia emitida por la célula. Como se mencionó anteriormente, los ensayos fueron realizados en ausencia de suero; sin embargo, el anticuerpo anti SR-BI

corresponde a un suero inmune de conejo, no purificado, por lo que puede contener albúmina y otros componentes que produzcan una fluorescencia inespecífica (no relacionada a mayor síntesis de NO). De esta manera, los resultados de biodisponibilidad de NO debieran ser confirmados utilizando otra técnica, como la determinación de nitritos o el uso de un electrodo sensible a cambios de NO. Por tanto, a partir de estos resultados se puede concluir que la síntesis de NO generada por apoA-I depende principalmente del receptor ecto-F₁-ATPasa, y que SR-BI aportaría de manera parcial, debido a la lipidación de apoA-I en el cultivo celular. ABCA1 no participaría de estos efectos.

El segundo objetivo de esta tesis fue determinar las vías de señalización que median la síntesis de NO en células tratadas con apoA-I. El estudio de estas vías se basó en lo descrito para las HDL, ya que sabe que su interacción con SR-BI desencadena la activación de las vías Src / PI3K, esta última activa Akt y MAPK, las que finalmente convergen en un aumento en la fosforilación de la eNOS en S1179 (S1177 en humanos)¹³⁵. Estudios preliminares realizados en el laboratorio demuestran que apoA-I (50 µg/mL) es capaz de fosforilar Akt y ERK 1/2 en células HUVECs (**Figura 11**). Todos estos antecedentes permitieron postular que apoA-I, a través de PI3K / Akt y ERK1/2, aumenta la síntesis de NO en células HUVEC. Esta hipótesis fue abordada utilizando los inhibidores wortmanina (PI3K), triciribine (Akt) y U-0126 (ERK 1/2). La co-incubación de estos inhibidores con apoA-I disminuyó significativamente la actividad de la eNOS y la fosforilación del residuo S1177, comparado con el efecto de apoA-I (**Figuras 22-25**). En los ensayos de biodisponibilidad de NO, sólo el efecto inhibitorio de U-0126 alcanzó significancia estadística, mientras wortmanina y triciribine produjeron una tendencia a la disminución (**Figuras 22-24**). La menor acción de estos inhibidores en la biodisponibilidad de NO se puede deber a la menor especificidad y sensibilidad de la técnica, como se explicó anteriormente, y no se contradicen necesariamente con los resultados obtenidos en la actividad y la fosforilación de la eNOS. Esto queda demostrado al utilizar la mezcla de inhibidores, donde se alcanza una reversión total del efecto de apoA-I (**Figura 26**).

Es sabido que Akt es el principal sustrato de PI3K⁴⁶; ERK1/2 puede ser activada por distintas quinasas, entre ellas PI3K. Nuestros resultados preliminares demostraron que en células HUVECs tratadas con apoA-I, la activación de ERK1/2 depende de PI3K (**Figura 27**).

Si bien estos ensayos deben ser confirmados, los resultados hasta ahora obtenidos permiten postular que PI3K activaría de manera paralela Akt y ERK1/2, lo que convergería en la mayor actividad de la eNOS, similar a lo descrito para HDL por otros autores⁸⁷. Por otra parte, se debería verificar si la fosforilación de Akt es dependiente de las MAPK, como ha sido descrito para otros estímulos¹⁴³. Esto se puede realizar por western blot para Akt fosforilada, en células tratadas con apoA-I y un inhibidor de ERK1/2, como U-0126. Estos resultados constituyen la primera evidencia que demuestra la activación de las PI3K / Akt y ERK1/2 por apoA-I, en la regulación de la síntesis de NO, y complementan hallazgos publicados por otros grupos, en relación a vías de señalización activadas por apoA-I^{82, 89}.

Además de demostrar la implicancia de PI3K, se evaluó las isoformas de esta proteína quinasa que participarían en el efecto de apoA-I sobre el endotelio. Para ello se consideró las subclases PI3K IA, representadas por la isoforma β , y PI3K IB (PI3K γ), lo cual fue establecido sobre la base de resultados preliminares (**Figura 11B**). Estas isoformas se asocian principalmente con receptores tirosin quinasa (PI3K β) y receptores acoplados a proteína G (PI3K γ)⁴⁷. En nuestros ensayos, se demostró que la isoforma β juega un rol central en los efectos de apoA-I sobre el endotelio, como lo evidencia la disminución de la actividad de la eNOS y de la biodisponibilidad de NO generadas por el inhibidor TGX-221 (**Figura 23**). En cuanto a los resultados obtenidos con AS-252424 (inhibidor de PI3K γ), si bien se observa una inhibición total del efecto de apoA-I tanto en la actividad de la eNOS como en la biodisponibilidad de NO, no es posible concluir su real implicación en ellos, debido a la alta concentración de inhibidor utilizada (20 μ M), la cual puede también inhibir las isoformas α y β de PI3K. Por lo tanto, este resultado deberá ser repetido, usando la concentración que permita inhibir selectivamente a PI3K γ (30-100 nM).

Sobre la base de los resultados de inhibición de receptores de apoA-I, se estableció que ecto-F₁-ATPasa es el que mayormente está implicado en la síntesis de NO, por lo cual se asume que activa las vías de señalización PI3K β / Akt y ERK1/2; esta premisa fue demostrada en resultados previos en nuestro laboratorio, en los cuales se observó que apoA-I aumenta la fosforilación de Akt y ERK1/2, lo cual es inhibido de manera dosis-dependiente con IF₁ (**Figura 15**). Estos experimentos están siendo confirmados, para obtener resultados representativos y realizar un correcto análisis estadístico.

Por último, se evaluó la participación de receptores purinérgicos P2Y, que pudiesen estar interviniendo en el efecto de apoA-I sobre la síntesis de NO en las células endoteliales. Como se mencionó, apoA-I, al unirse a ecto-F₁-ATPasa, incrementa la actividad hidrolasa de ATP de esta enzima, lo que aumenta el ADP extracelular que, subsecuentemente, genera efectos protectores en la función endotelial⁷⁹. Sobre la base de estas evidencias, los principales candidatos a ejercer estos efectos son receptores purinérgicos, como los P2Y, y entre ellos, aquéllos sensibles al ADP. En células HUVECs, se han descrito los siguientes receptores P2Y: P2Y₁, y P2Y₂, P2Y₁₁ y P2Y₁₂^{121, 122}, de los cuales P2Y₁ y P2Y₁₂ son sensibles a ADP¹¹⁶. En células endoteliales de aorta de bovino (BAECs) se ha demostrado que la vía de ecto-F₁-ATPasa, a través del ADP extracelular, promueve la transcitosis de HDL y de apoA-I, lo cual depende de la activación de P2Y₁₂¹²⁴. Además, se ha evidenciado que el ADP agregado de manera exógena a cultivos de células BAECs, aumenta la fosforilación de la eNOS en S1179 (S1177 en humanos), lo cual es revertido con el inhibidor MRS-2179 (inhibidor de P2Y₁) y en células *knockdown* para P2Y₁. También se observó que ADP fue capaz de aumentar la expresión de AMPK y CAMKKβ, pero no activarlas¹¹⁷. En nuestros resultados se observa que la presencia de un inhibidor de P2Y₁ (MRS-2179), revierte completamente la síntesis de NO en células incubadas con apoA-I; además, este inhibidor incubado de manera individual, disminuye de manera significativa la actividad de la eNOS (**Figura 28**). Esto sugiere que P2Y₁ tiene una función importante en la producción basal de NO, la cual dependería de la producción extracelular de ADP, producto de la conversión de nucleótidos por ecto-enzimas, como las nucleótidos tri y difosfohidrolasas (NTPDasas), las ecto-fosfodiesterasas (E-NPP) y las ecto-5'-nucleotidasas^{144, 145}. En relación a la biodisponibilidad de NO, MRS-2179 no modifica el efecto de apoA-I (**Figura 28**). De manera interesante, la biodisponibilidad basal de NO se ve aumentada al incubar este inhibidor por sí solo, resultados que en su conjunto se contradicen con lo obtenido en la actividad de la eNOS. Al igual que lo mencionado anteriormente, estas diferencias entre actividad enzimática y síntesis de NO se pueden explicar por las diferencias intrínsecas de las técnicas, siendo la medición de actividad de la eNOS mucho más específica de la síntesis de NO que la cuantificación de la fracción de NO disponible. Por lo cual, los ensayos de biodisponibilidad de NO debieran ser repetidos con otra técnica, usando un siRNA o un anticuerpo bloqueante para P2Y₁, que permitan confirmar la real participación de este receptor purinérgico. En

relación a P2Y₁₂, nuestros resultados de actividad de la eNOS y de biodisponibilidad de NO sugieren que este receptor tendría una participación minoritaria en los efectos de apoA-I, en comparación a P2Y₁ (**Figura 28**). Estos antecedentes se condicen con estudios de expresión de estos receptores en células endoteliales, donde la expresión de P2Y₁ es mayoritaria¹²². A partir de estos resultados y de antecedentes previos, se puede concluir que P2Y₁ es el receptor purinérgico más directamente involucrado en la regulación de la síntesis de NO, corriente abajo de la actividad de ecto-F₁-ATPasa.

En conclusión, el conjunto de los resultados de esta tesis respaldan la hipótesis de trabajo, la cual postula que apoA-I se une a ecto-F₁-ATPasa, lo cual genera un aumento de la síntesis extracelular de ADP, el cual activa el receptor P2Y₁. Este receptor activa PI3K β , que fosforila Akt y ERK1/2 en forma paralela, las que convergen en un aumento en la fosforilación de eNOS en S1177, que genera un aumento en la actividad de eNOS y la síntesis de NO (**Figura 29**). Resta por dilucidar: 1) si las vías de señalización estudiadas en esta tesis son activadas usando como estímulos ADP y ADP no hidrolizable; 2) si existe interacción de P2Y₁ con la proteína G, lo cual conlleve a la activación de las vías de señalización estudiadas; 3) otras vías de señalización que puedan estar implicadas en el aumento de la síntesis de NO, en respuesta a apoA-I; 4) si las vías de señalización estudiadas, controlan otros procesos celulares donde se ha visto implicada la participación de apoA-I en células endoteliales.

Estos resultados constituyen una nueva vía de regulación de la síntesis de NO en el endotelio, por lo cual son de gran importancia para la comprensión de mecanismos que controlan la respuesta vasodilatadora, abriendo nuevas dianas farmacológicas para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, cuya base común es un déficit de la síntesis y/o biodisponibilidad de NO.

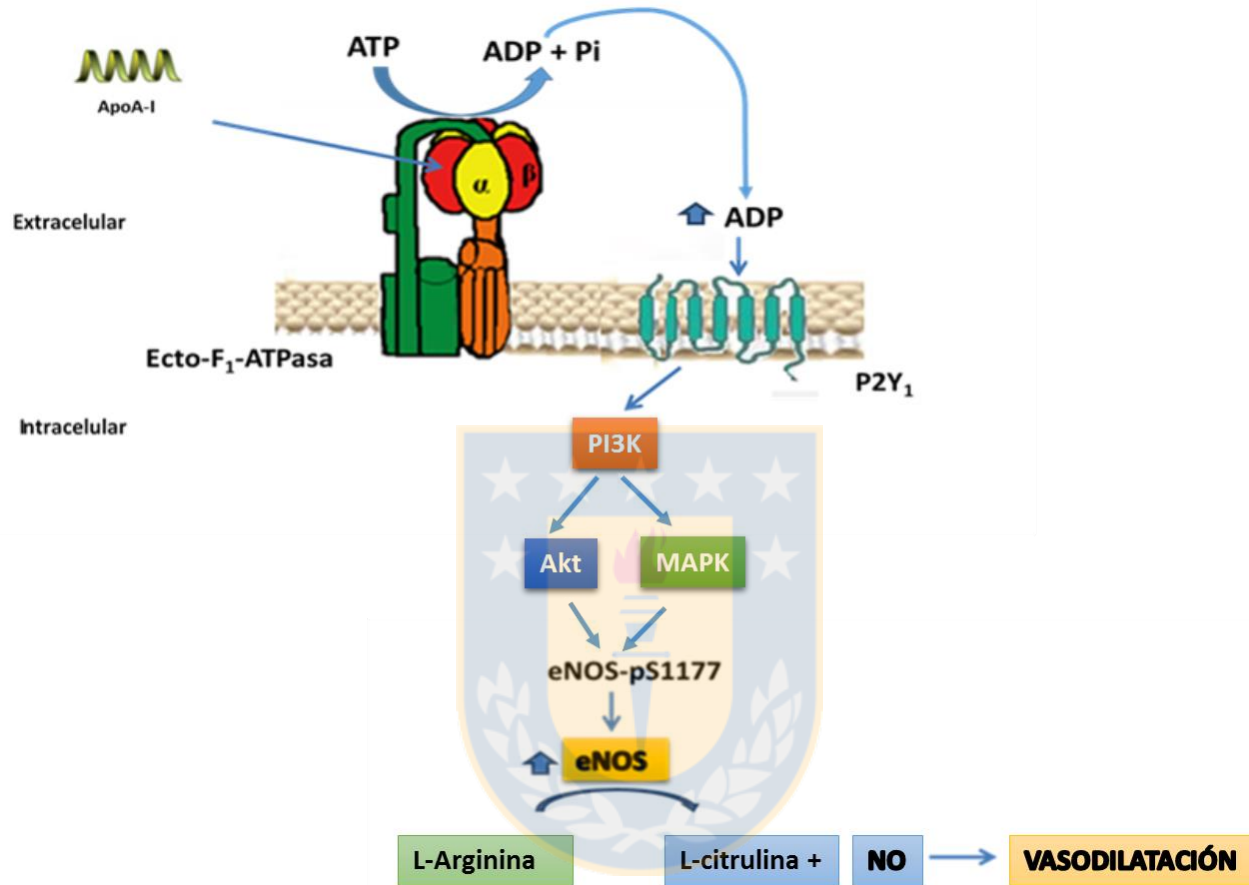


Figura 29: Modelo propuesto para la regulación de la síntesis de NO por apoA-I, vía ecto-F₁-ATPasa. En la superficie endotelial, apoA-I se une al receptor ecto-F₁-ATPasa, lo que genera un aumento de la hidrólisis de ATP, aumentando el ADP extracelular. El ADP activa al receptor purinérgico P2Y₁, y éste a su vez, desencadena la activación paralela de las vías de señalización Akt y MAPK a través de PI3Kβ. Estas vías culminan en un aumento de la actividad de la eNOS, la cual aumenta la síntesis de NO, promoviendo la vasodilatación.

AGRADECIMIENTOS

-Proyectos: DIUC N°210.072.033-1.0 y FONDECYT de Iniciación N°11121575.

-CONICYT-PCHA / Magíster Nacional 2014-22140854.

-Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología.

-Dra. Claudia Radojkovic.

-Familiares y amigos.



Dedicado a la memoria de Fabian Briceño García.

REFERENCIAS

1. Triggle, C. R., Samuel, S. M., Ravishankar, S., Marei, I., Arunachalam, G., and Ding, H. (2012) The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways, *Canadian journal of physiology and pharmacology* 90, 713-738.
2. Galley, H. F., and Webster, N. R. (2004) Physiology of the endothelium, *British journal of anaesthesia* 93, 105-113.
3. Ross, R., and Harker, L. (1976) Hyperlipidemia and atherosclerosis, *Science* 193, 1094-1100.
4. Park, K. H., and Park, W. J. (2015) Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches, *J Korean Med Sci* 30, 1213-1225.
5. Stamler, J. S., Singel, D. J., and Loscalzo, J. (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms, *Science* 258, 1898-1902.
6. Botker, H. E., and Moller, N. (2013) ON NO--the continuing story of nitric oxide, diabetes, and cardiovascular disease, *Diabetes* 62, 2645-2647.
7. Furchgott, R. F., and Zawadzki, J. V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature* 288, 373-376.
8. Palmer, R. M., Ferrige, A. G., and Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature* 327, 524-526.
9. Farrell, A. J., and Blake, D. R. (1996) Nitric oxide, *Annals of the rheumatic diseases* 55, 7-20.
10. Branislava Dobutovi, K. S., Sanja Soski, Hans-Dirk Dungen and Esmá R. Isenovi. (2011) Nitric Oxide and its Role in Cardiovascular Diseases, In *The Open Nitric Oxide Journal*, pp 65-71.
11. Gielen, S., Sandri, M., Erbs, S., and Adams, V. (2011) Exercise-induced modulation of endothelial nitric oxide production, *Current pharmaceutical biotechnology* 12, 1375-1384.
12. Scotland, R. S., Morales-Ruiz, M., Chen, Y., Yu, J., Rudic, R. D., Fulton, D., Gratton, J. P., and Sessa, W. C. (2002) Functional reconstitution of endothelial nitric oxide synthase reveals the importance of serine 1179 in endothelium-dependent vasomotion, *Circulation research* 90, 904-910.
13. Bouloumie, A., Schini-Kerth, V. B., and Busse, R. (1999) Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells, *Cardiovascular research* 41, 773-780.
14. Hibi, K., Ishigami, T., Tamura, K., Mizushima, S., Nyui, N., Fujita, T., Ochiai, H., Kosuge, M., Watanabe, Y., Yoshii, Y., Kihara, M., Kimura, K., Ishii, M., and Umemura, S. (1998) Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction, *Hypertension* 32, 521-526.
15. Liu, J., García-Cardena, G., and Sessa, W. C. (1996) Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: implications for caveolae localization, *Biochemistry* 35, 13277-13281.
16. Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., Martasek, P., Hogg, N., Masters, B. S., Karoui, H., Tordo, P., and Pritchard, K. A., Jr. (1998) Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 9220-9225.
17. Alderton, W. K., Cooper, C. E., and Knowles, R. G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition, *The Biochemical journal* 357, 593-615.
18. Hall, A. V., Antoniou, H., Wang, Y., Cheung, A. H., Arbus, A. M., Olson, S. L., Lu, W. C., Kau, C. L., and Marsden, P. A. (1994) Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1), *The Journal of biological chemistry* 269, 33082-33090.

19. Sherman, P. A., Laubach, V. E., Reep, B. R., and Wood, E. R. (1993) Purification and cDNA sequence of an inducible nitric oxide synthase from a human tumor cell line, *Biochemistry* 32, 11600-11605.
20. Marsden, P. A., Schappert, K. T., Chen, H. S., Flowers, M., Sundell, C. L., Wilcox, J. N., Lamas, S., and Michel, T. (1992) Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase, *FEBS letters* 307, 287-293.
21. Carnicer, R., Crabtree, M. J., Sivakumaran, V., Casadei, B., and Kass, D. A. (2013) Nitric oxide synthases in heart failure, *Antioxid Redox Signal* 18, 1078-1099.
22. Crane, B. R., Arvai, A. S., Ghosh, D. K., Wu, C., Getzoff, E. D., Stuehr, D. J., and Tainer, J. A. (1998) Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate, *Science* 279, 2121-2126.
23. Fischmann, T. O., Hruza, A., Niu, X. D., Fossetta, J. D., Lunn, C. A., Dolphin, E., Prongay, A. J., Reichert, P., Lundell, D. J., Narula, S. K., and Weber, P. C. (1999) Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation, *Nature structural biology* 6, 233-242.
24. Rafikov, R., Fonseca, F. V., Kumar, S., Pardo, D., Darragh, C., Elms, S., Fulton, D., and Black, S. M. (2011) eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity, *J Endocrinol* 210, 271-284.
25. Knowles, R. G., and Moncada, S. (1994) Nitric oxide synthases in mammals, *The Biochemical journal* 298 (Pt 2), 249-258.
26. Kuchan, M. J., and Frangos, J. A. (1994) Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells, *The American journal of physiology* 266, C628-636.
27. Endemann, D. H., and Schiffrin, E. L. (2004) Endothelial dysfunction, *J Am Soc Nephrol* 15, 1983-1992.
28. Weber, M., Hagedorn, C. H., Harrison, D. G., and Searles, C. D. (2005) Laminar shear stress and 3' polyadenylation of eNOS mRNA, *Circulation research* 96, 1161-1168.
29. Liu, J. W., Hughes, T. E., and Sessa, W. C. (1997) The first 35 amino acids and fatty acylation sites determine the molecular targeting of endothelial nitric oxide synthase into the Golgi region of cells: A green fluorescent protein study, *Journal of Cell Biology* 137, 1525-1535.
30. Ju, H., Zou, R., Venema, V. J., and Venema, R. C. (1997) Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity, *The Journal of biological chemistry* 272, 18522-18525.
31. Mount, P. F., Kemp, B. E., and Power, D. A. (2007) Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation, *J Mol Cell Cardiol* 42, 271-279.
32. Boo, Y. C., Sorescu, G., Boyd, N., Shiojima, I., Walsh, K., Du, J., and Jo, H. (2002) Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A, *The Journal of biological chemistry* 277, 3388-3396.
33. Harris, M. B., Ju, H., Venema, V. J., Liang, H., Zou, R., Michell, B. J., Chen, Z. P., Kemp, B. E., and Venema, R. C. (2001) Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation, *The Journal of biological chemistry* 276, 16587-16591.
34. Montagnani, M., Chen, H., Barr, V. A., and Quon, M. J. (2001) Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca²⁺ but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179), *The Journal of biological chemistry* 276, 30392-30398.
35. Harris, M. B., Blackstone, M. A., Sood, S. G., Li, C., Goolsby, J. M., Venema, V. J., Kemp, B. E., and Venema, R. C. (2004) Acute activation and phosphorylation of endothelial nitric oxide

- synthase by HMG-CoA reductase inhibitors, *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 287, H560-566.
36. Lane, P., and Gross, S. S. (2002) Disabling a C-terminal autoinhibitory control element in endothelial nitric-oxide synthase by phosphorylation provides a molecular explanation for activation of vascular NO synthesis by diverse physiological stimuli, *The Journal of biological chemistry* 277, 19087-19094.
 37. Chen, Z. P., Mitchelhill, K. I., Michell, B. J., Stapleton, D., Rodriguez-Crespo, I., Witters, L. A., Power, D. A., Ortiz de Montellano, P. R., and Kemp, B. E. (1999) AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase, *FEBS letters* 443, 285-289.
 38. Michell, B. J., Harris, M. B., Chen, Z. P., Ju, H., Venema, V. J., Blackstone, M. A., Huang, W., Venema, R. C., and Kemp, B. E. (2002) Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635, *J Biol Chem* 277, 42344-42351.
 39. Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T. F., Papapetropoulos, A., and Sessa, W. C. (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt, *Nature* 399, 597-601.
 40. Butt, E., Bernhardt, M., Smolenski, A., Kotsonis, P., Fröhlich, L. G., Sickmann, A., Meyer, H. E., Lohmann, S. M., and Schmidt, H. H. (2000) Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases, *J Biol Chem* 275, 5179-5187.
 41. Fleming, I., Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Kemp, B. E., and Busse, R. (2001) Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity, *Circulation research* 88, E68-75.
 42. Michell, B. J., Chen, Z., Tiganis, T., Stapleton, D., Katsis, F., Power, D. A., Sim, A. T., and Kemp, B. E. (2001) Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase, *The Journal of biological chemistry* 276, 17625-17628.
 43. Cargnello, M., and Roux, P. P. (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases, *Microbiol Mol Biol Rev* 75, 50-83.
 44. Peltier, J., O'Neill, A., and Schaffer, D. V. (2007) PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation, *Dev Neurobiol* 67, 1348-1361.
 45. Akinleye, A., Avvaru, P., Furqan, M., Song, Y., and Liu, D. (2013) Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics, *J Hematol Oncol* 6, 88.
 46. Wymann, M. P., Zvelebil, M., and Laffargue, M. (2003) Phosphoinositide 3-kinase signalling-which way to target?, *Trends Pharmacol Sci* 24, 366-376.
 47. Rüdke, T., Schwarz, M. K., and Rommel, C. (2006) PI3Kgamma inhibition: towards an 'aspirin of the 21st century'?, *Nat Rev Drug Discov* 5, 903-918.
 48. Falasca, M., and Maffucci, T. (2007) Role of class II phosphoinositide 3-kinase in cell signalling, *Biochem Soc Trans* 35, 211-214.
 49. Herman, P. K., and Emr, S. D. (1990) Characterization of VPS34, a gene required for vacuolar protein sorting and vacuole segregation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Cell Biol* 10, 6742-6754.
 50. Faes, S., and Dormond, O. (2015) PI3K and AKT: Unfaithful Partners in Cancer, *Int J Mol Sci* 16, 21138-21152.
 51. Franke, T. F. (2008) Intracellular signaling by Akt: bound to be specific, *Sci Signal* 1, pe29.
 52. Cully, M., You, H., Levine, A. J., and Mak, T. W. (2006) Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis, *Nat Rev Cancer* 6, 184-192.

53. Foster, F. M., Traer, C. J., Abraham, S. M., and Fry, M. J. (2003) The phosphoinositide (PI) 3-kinase family, *J Cell Sci* **116**, 3037-3040.
54. Woodgett, J. R. (2005) Recent advances in the protein kinase B signaling pathway, *Curr Opin Cell Biol* **17**, 150-157.
55. Brazil, D. P., Park, J., and Hemmings, B. A. (2002) PKB binding proteins. Getting in on the Akt, *Cell* **111**, 293-303.
56. Yang, L., Dan, H. C., Sun, M., Liu, Q., Sun, X. M., Feldman, R. I., Hamilton, A. D., Polokoff, M., Nicosia, S. V., Herlyn, M., Sebti, S. M., and Cheng, J. Q. (2004) Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells overexpressing Akt, *Cancer Res* **64**, 4394-4399.
57. Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., and Johnson, G. L. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human, *Physiol Rev* **79**, 143-180.
58. Chen, Z., Gibson, T. B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., and Cobb, M. H. (2001) MAP kinases, *Chem Rev* **101**, 2449-2476.
59. Uehling, D. E., and Harris, P. A. (2015) Recent progress on MAP kinase pathway inhibitors, *Bioorg Med Chem Lett* **25**, 4047-4056.
60. Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feeser, W. S., Van Dyk, D. E., Pitts, W. J., Earl, R. A., Hobbs, F., Copeland, R. A., Magolda, R. L., Scherle, P. A., and Trzaskos, J. M. (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase, *J Biol Chem* **273**, 18623-18632.
61. Vaisar, T. (2012) Proteomics investigations of HDL: challenges and promise, *Current vascular pharmacology* **10**, 410-421.
62. Davidson, W. S., and Thompson, T. B. (2007) The structure of apolipoprotein A-I in high density lipoproteins, *The Journal of biological chemistry* **282**, 22249-22253.
63. Cheung, P., Kao, F. T., Law, M. L., Jones, C., Puck, T. T., and Chan, L. (1984) Localization of the structural gene for human apolipoprotein A-I on the long arm of human chromosome 11, *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 508-511.
64. Sviridov, D. (2009) Maturation of apolipoprotein A-I: unrecognized health benefit or a forgotten rudiment?, *J Lipid Res* **50**, 1257-1258.
65. Zhu, J., Gardner, J., Pullinger, C. R., Kane, J. P., Thompson, J. F., and Francone, O. L. (2009) Regulation of apoA-I processing by procollagen C-proteinase enhancer-2 and bone morphogenetic protein-1, *J Lipid Res* **50**, 1330-1339.
66. Rye, K. A., Bursill, C. A., Lambert, G., Tabet, F., and Barter, P. J. (2009) The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL, *Journal of lipid research* **50 Suppl**, S195-200.
67. Pollard, R. D., Fulp, B., Samuel, M. P., Sorci-Thomas, M. G., and Thomas, M. J. (2013) The Conformation of Lipid-Free Human Apolipoprotein A-I in Solution, *Biochemistry* **52**, 9470-9481.
68. Jonas, A. (2000) Lecithin cholesterol acyltransferase, *Biochimica et biophysica acta* **1529**, 245-256.
69. Khera, A. V., Cuchel, M., de la Llera-Moya, M., Rodrigues, A., Burke, M. F., Jafri, K., French, B. C., Phillips, J. A., Mucksavage, M. L., Wilensky, R. L., Mohler, E. R., Rothblat, G. H., and Rader, D. J. (2011) Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis, *The New England journal of medicine* **364**, 127-135.
70. Camont, L., Chapman, M. J., and Kontush, A. (2011) Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease, *Trends in molecular medicine* **17**, 594-603.

71. Gordon, D. J., and Rifkind, B. M. (1989) High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies, *N Engl J Med* 321, 1311-1316.
72. Sharrett, A. R., Ballantyne, C. M., Coady, S. A., Heiss, G., Sorlie, P. D., Catellier, D., Patsch, W., and Atherosclerosis Risk in Communities Study, G. (2001) Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein(a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, *Circulation* 104, 1108-1113.
73. Negre-Salvayre, A., Dousset, N., Ferretti, G., Bacchetti, T., Curatola, G., and Salvayre, R. (2006) Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells, *Free radical biology & medicine* 41, 1031-1040.
74. Tso, C., Martinic, G., Fan, W. H., Rogers, C., Rye, K. A., and Barter, P. J. (2006) High-density lipoproteins enhance progenitor-mediated endothelium repair in mice, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 1144-1149.
75. Murphy, A. J., Woollard, K. J., Hoang, A., Mukhamedova, N., Stirzaker, R. A., McCormick, S. P., Remaley, A. T., Sviridov, D., and Chin-Dusting, J. (2008) High-density lipoprotein reduces the human monocyte inflammatory response, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28, 2071-2077.
76. Mineo, C., Deguchi, H., Griffin, J. H., and Shaul, P. W. (2006) Endothelial and antithrombotic actions of HDL, *Circ Res* 98, 1352-1364.
77. Calabresi, L., Gomaschi, M., and Franceschini, G. (2003) Endothelial protection by high-density lipoproteins: from bench to bedside, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23, 1724-1731.
78. Frank, P. G., and Marcel, Y. L. (2000) Apolipoprotein A-I: structure-function relationships, *J Lipid Res* 41, 853-872.
79. Radojkovic, C., Genoux, A., Pons, V., Combes, G., de Jonge, H., Champagne, E., Rolland, C., Perret, B., Collet, X., Terce, F., and Martinez, L. O. (2009) Stimulation of cell surface F1-ATPase activity by apolipoprotein A-I inhibits endothelial cell apoptosis and promotes proliferation, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29, 1125-1130.
80. Spieker, L. E., Sudano, I., Hurlimann, D., Lerch, P. G., Lang, M. G., Binggeli, C., Corti, R., Ruschitzka, F., Luscher, T. F., and Noll, G. (2002) High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men, *Circulation* 105, 1399-1402.
81. Ramet, M. E., Ramet, M., Lu, Q., Nickerson, M., Savolainen, M. J., Malzone, A., and Karas, R. H. (2003) High-density lipoprotein increases the abundance of eNOS protein in human vascular endothelial cells by increasing its half-life, *Journal of the American College of Cardiology* 41, 2288-2297.
82. Drew, B. G., Fidge, N. H., Gallon-Beaumier, G., Kemp, B. E., and Kingwell, B. A. (2004) High-density lipoprotein and apolipoprotein AI increase endothelial NO synthase activity by protein association and multisite phosphorylation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 6999-7004.
83. Yuhanna, I. S., Zhu, Y., Cox, B. E., Hahner, L. D., Osborne-Lawrence, S., Lu, P., Marcel, Y. L., Anderson, R. G., Mendelsohn, M. E., Hobbs, H. H., and Shaul, P. W. (2001) High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase, *Nature medicine* 7, 853-857.
84. Gong, M., Wilson, M., Kelly, T., Su, W., Dressman, J., Kincer, J., Matveev, S. V., Guo, L., Guerin, T., Li, X. A., Zhu, W., Uittenbogaard, A., and Smart, E. J. (2003) HDL-associated estradiol stimulates endothelial NO synthase and vasodilation in an SR-BI-dependent manner, *J Clin Invest* 111, 1579-1587.

85. Müller, U., Matsuo, Y., Lauber, M., Walther, C., Oberbach, A., Schuler, G., and Adams, V. (2013) Correlation between endothelial function measured by finger plethysmography in children and HDL-mediated eNOS activation -- a preliminary study, *Metabolism* 62, 634-637.
86. Prosser, H. C., Ng, M. K., and Bursill, C. A. (2012) The role of cholesterol efflux in mechanisms of endothelial protection by HDL, *Curr Opin Lipidol* 23, 182-189.
87. Mineo, C., Yuhanna, I. S., Quon, M. J., and Shaul, P. W. (2003) High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases, *J Biol Chem* 278, 9142-9149.
88. Briand, O., Nizard, F. M., David-Dufilho, M., Six, I., Lestavel, S., Brunet, A., Fruchart, J. C., Torpier, G., Bordet, R., Clavey, V., and Duriez, P. (2004) Human free apolipoprotein A-I and artificial pre-beta-high-density lipoprotein inhibit eNOS activity and NO release, *Biochim Biophys Acta* 1683, 69-77.
89. Tabet, F., Remaley, A. T., Segaliny, A. I., Millet, J., Yan, L., Nakhla, S., Barter, P. J., Rye, K. A., and Lambert, G. (2010) The 5A apolipoprotein A-I mimetic peptide displays antiinflammatory and antioxidant properties in vivo and in vitro, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30, 246-252.
90. Acton, S. L., Scherer, P. E., Lodish, H. F., and Krieger, M. (1994) Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor, *The Journal of biological chemistry* 269, 21003-21009.
91. Ji, Y., Jian, B., Wang, N., Sun, Y., Moya, M. L., Phillips, M. C., Rothblat, G. H., Swaney, J. B., and Tall, A. R. (1997) Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux, *The Journal of biological chemistry* 272, 20982-20985.
92. Marsche, G., Levak-Frank, S., Quehenberger, O., Heller, R., Sattler, W., and Malle, E. (2001) Identification of the human analog of SR-BI and LOX-1 as receptors for hypochlorite-modified high density lipoprotein on human umbilical venous endothelial cells, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15, 1095-1097.
93. Uittenbogaard, A., Shaul, P. W., Yuhanna, I. S., Blair, A., and Smart, E. J. (2000) High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae, *The Journal of biological chemistry* 275, 11278-11283.
94. Mineo, C., and Shaul, P. W. (2003) HDL stimulation of endothelial nitric oxide synthase: a novel mechanism of HDL action, *Trends in cardiovascular medicine* 13, 226-231.
95. Kimura, T., Tomura, H., Sato, K., Ito, M., Matsuoka, I., Im, D. S., Kuwabara, A., Mogi, C., Itoh, H., Kurose, H., Murakami, M., and Okajima, F. (2010) Mechanism and role of high density lipoprotein-induced activation of AMP-activated protein kinase in endothelial cells, *J Biol Chem* 285, 4387-4397.
96. Seetharam, D., Mineo, C., Gormley, A. K., Gibson, L. L., Vongpatanasin, W., Chambliss, K. L., Hahner, L. D., Cummings, M. L., Kitchens, R. L., Marcel, Y. L., Rader, D. J., and Shaul, P. W. (2006) High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I, *Circ Res* 98, 63-72.
97. Wang, N., Ranalletta, M., Matsuura, F., Peng, F., and Tall, A. R. (2006) LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 1310-1316.
98. Terasaka, N., Westerterp, M., Koetsveld, J., Fernández-Hernando, C., Yvan-Charvet, L., Wang, N., Sessa, W. C., and Tall, A. R. (2010) ATP-binding cassette transporter G1 and high-density lipoprotein promote endothelial NO synthesis through a decrease in the interaction of caveolin-1 and endothelial NO synthase, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 2219-2225.

99. O'Connell, B. J., Denis, M., and Genest, J. (2004) Cellular physiology of cholesterol efflux in vascular endothelial cells, *Circulation* 110, 2881-2888.
100. Schmitz, G., Langmann, T., and Heimerl, S. (2001) Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism, *J Lipid Res* 42, 1513-1520.
101. Kielar, D., Dietmaier, W., Langmann, T., Aslanidis, C., Probst, M., Naruszewicz, M., and Schmitz, G. (2001) Rapid quantification of human ABCA1 mRNA in various cell types and tissues by real-time reverse transcription-PCR, *Clin Chem* 47, 2089-2097.
102. Liao, H., Langmann, T., Schmitz, G., and Zhu, Y. (2002) Native LDL upregulation of ATP-binding cassette transporter-1 in human vascular endothelial cells, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 22, 127-132.
103. von Eckardstein, A., and Rohrer, L. (2009) Transendothelial lipoprotein transport and regulation of endothelial permeability and integrity by lipoproteins, *Current opinion in lipidology* 20, 197-205.
104. Liu, D., Ji, L., Tong, X., Pan, B., Han, J. Y., Huang, Y., Chen, Y. E., Pennathur, S., Zhang, Y., and Zheng, L. (2011) Human apolipoprotein A-I induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I-2 release in endothelial cells through ATP-binding cassette transporter A1, *Am J Physiol Cell Physiol* 301, C739-748.
105. Vantourout, P., Radojkovic, C., Lichtenstein, L., Pons, V., Champagne, E., and Martinez, L. O. (2010) Ecto-F(1)-ATPase: a moonlighting protein complex and an unexpected apoA-I receptor, *World journal of gastroenterology : WJG* 16, 5925-5935.
106. Cabezon, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (2003) The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1, *Nature structural biology* 10, 744-750.
107. Martinez, L. O., Jacquet, S., Esteve, J. P., Rolland, C., Cabezon, E., Champagne, E., Pineau, T., Georgeaud, V., Walker, J. E., Terce, F., Collet, X., Perret, B., and Barbaras, R. (2003) Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis, *Nature* 421, 75-79.
108. Moser, T. L., Stack, M. S., Asplin, I., Enghild, J. J., Hojrup, P., Everitt, L., Hubchak, S., Schnaper, H. W., and Pizzo, S. V. (1999) Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 2811-2816.
109. Fu, Y., and Zhu, Y. (2010) Ectopic ATP synthase in endothelial cells: a novel cardiovascular therapeutic target, *Curr Pharm Des* 16, 4074-4079.
110. Osanai, T., Magota, K., Tanaka, M., Shimada, M., Murakami, R., Sasaki, S., Tomita, H., Maeda, N., and Okumura, K. (2005) Intracellular signaling for vasoconstrictor coupling factor 6 - Novel function of beta-subunit of ATP synthase as receptor, *Hypertension* 46, 1140-1146.
111. Tanaka, M., Osanai, T., Murakami, R., Sasaki, S., Tomita, H., Maeda, N., Satoh, K., Magota, K., and Okumura, K. (2006) Effect of vasoconstrictor coupling factor 6 on gene expression profile in human vascular endothelial cells: enhanced release of asymmetric dimethylarginine, *Journal of hypertension* 24, 489-497.
112. Kumagai, A., Osanai, T., Katoh, C., Tanaka, M., Tomita, H., Morimoto, T., Murakami, R., Magota, K., and Okumura, K. (2008) Coupling factor 6 downregulates platelet endothelial cell adhesion molecule-1 via c-Src activation and acts as a proatherogenic molecule, *Atherosclerosis* 200, 45-50.
113. Osanai, T., Kamada, T., Fujiwara, N., Katoh, T., Takahashi, K., Kimura, M., Satoh, K., Magota, K., Kodama, S., Tanaka, T., and Okumura, K. (1998) A novel inhibitory effect on prostacyclin synthesis of coupling factor 6 extracted from the heart of spontaneously hypertensive rats, *J Biol Chem* 273, 31778-31783.

114. Osanai, T., Tanaka, M., Kamada, T., Nakano, T., Takahashi, K., Okada, S., Sirato, K., Magota, K., Kodama, S., and Okumura, K. (2001) Mitochondrial coupling factor 6 as a potent endogenous vasoconstrictor, *Journal of Clinical Investigation* 108, 1023-1030.
115. Motte, S., Communi, D., Piroton, S., and Boeynaems, J. M. (1995) Involvement of multiple receptors in the actions of extracellular ATP: the example of vascular endothelial cells, *Int J Biochem Cell Biol* 27, 1-7.
116. Martinez, L. O., Najib, S., Perret, B., Cabou, C., and Lichtenstein, L. (2015) Ecto-F1-ATPase/P2Y pathways in metabolic and vascular functions of high density lipoproteins, *Atherosclerosis* 238, 89-100.
117. Hess, C. N., Kou, R., Johnson, R. P., Li, G. K., and Michel, T. (2009) 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, 32209-32224.
118. Communi, D., Janssens, R., Suarez-Huerta, N., Robaye, B., and Boeynaems, J. M. (2000) Advances in signalling by extracellular nucleotides. the role and transduction mechanisms of P2Y receptors, *Cell Signal* 12, 351-360.
119. von Kügelgen, I., and Wetter, A. (2000) Molecular pharmacology of P2Y-receptors, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362, 310-323.
120. Vassort, G. (2001) Adenosine 5'-triphosphate: a P2-purinergic agonist in the myocardium, *Physiol Rev* 81, 767-806.
121. Wang, L., Karlsson, L., Moses, S., Hultgårdh-Nilsson, A., Andersson, M., Borna, C., Gudbjartsson, T., Jern, S., and Erlinge, D. (2002) P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells, *J Cardiovasc Pharmacol* 40, 841-853.
122. Shanker, G., Kontos, J. L., Eckman, D. M., Wesley-Farrington, D., and Sane, D. C. (2006) Nicotine upregulates the expression of P2Y12 on vascular cells and megakaryoblasts, *J Thromb Thrombolysis* 22, 213-220.
123. Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., Knight, G. E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K. A., and Weisman, G. A. (2006) International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy, *Pharmacol Rev* 58, 281-341.
124. Cavelier, C., Ohnsorg, P. M., Rohrer, L., and von Eckardstein, A. (2012) The β -chain of cell surface F(0)F(1) ATPase modulates apoA-I and HDL transcytosis through aortic endothelial cells, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 131-139.
125. HAVEL, R. J., EDER, H. A., and BRAGDON, J. H. (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum, *J Clin Invest* 34, 1345-1353.
126. McConathy, W. J., and Alaupovic, P. (1986) Isolation and characterization of other apolipoproteins, *Methods Enzymol* 128, 297-310.
127. Brace, R. J., Sorrenson, B., Sviridov, D., and McCormick, S. P. (2010) A gel-based method for purification of apolipoprotein A-I from small volumes of plasma, *J Lipid Res* 51, 3370-3376.
128. Lee, T. S., Pan, C. C., Peng, C. C., Kou, Y. R., Chen, C. Y., Ching, L. C., Tsai, T. H., Chen, S. F., Lyu, P. C., and Shyue, S. K. (2010) Anti-atherogenic effect of berberine on LXRA α -ABCA1-dependent cholesterol efflux in macrophages, *J Cell Biochem* 111, 104-110.
129. Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., and Minick, C. R. (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria, *The Journal of clinical investigation* 52, 2745-2756.

130. McQuillan, L. P., Leung, G. K., Marsden, P. A., Kostyk, S. K., and Kourembanas, S. (1994) Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms, *Am J Physiol* 267, H1921-1927.
131. León, M. (2014) Participación del receptor de apolipoproteína A-I libre, ecto-F1-ATPasa, en la regulación de la síntesis de óxido nítrico en células endoteliales humanas, In *Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología*, Universidad de Concepción, Facultad de Farmacia.
132. Briceño, L. (2014) Participación del Receptor Ecto-F1-ATPasa en el Perfil de Fosforilación de la Sintasa de Óxido Nítrico Endotelial Generado por Apolipoproteína A-I Libre., In *Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología*, p 57, Universidad de Concepción, UDEC.
133. Honorato, P. (2015) Participación del Receptor de Apolipoproteína A-I, Ecto-F1-ATPasa, en la Vasodilatación Mediada por Óxido Nítrico, In *Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología*, p 131, Universidad de Concepción, Facultad de Farmacia.
134. Garlanda, C., and Dejana, E. (1997) Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 1193-1202.
135. Moore, P. K., Wallace, P., Gaffen, Z., Hart, S. L., and Babbedge, R. C. (1993) Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitro indazole and related indazoles: antinociceptive and cardiovascular effects, *Br J Pharmacol* 110, 219-224.
136. Vedhachalam, C., Ghering, A. B., Davidson, W. S., Lund-Katz, S., Rothblat, G. H., and Phillips, M. C. (2007) ABCA1-induced cell surface binding sites for ApoA-I, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 1603-1609.
137. Fitzgerald, M. L., Morris, A. L., Chroni, A., Mendez, A. J., Zannis, V. I., and Freeman, M. W. (2004) ABCA1 and amphipathic apolipoproteins form high-affinity molecular complexes required for cholesterol efflux, *J Lipid Res* 45, 287-294.
138. Cabezon, E., Butler, P. J., Runswick, M. J., and Walker, J. E. (2000) Modulation of the oligomerization state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH, *J Biol Chem* 275, 25460-25464.
139. Kagawa, Y., and Racker, E. (1966) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. 8. Properties of a factor conferring oligomycin sensitivity on mitochondrial adenosine triphosphatase, *J Biol Chem* 241, 2461-2466.
140. de Moura, R. S., and de Lemos Neto, M. (1996) Effects of potassium channel modulators cromakalim, tetraethylammonium and glibenclamide on the contractility of the isolated human ureter, *J Urol* 156, 276-280.
141. Gaete, P. S., Lillo, M. A., Ardiles, N. M., Pérez, F. R., and Figueroa, X. F. (2012) Ca²⁺-activated K⁺ channels of small and intermediate conductance control eNOS activation through NAD(P)H oxidase, *Free Radic Biol Med* 52, 860-870.
142. Nieland, T. J., Xu, S., Penman, M., and Krieger, M. (2011) Negatively cooperative binding of high-density lipoprotein to the HDL receptor SR-BI, *Biochemistry* 50, 1818-1830.
143. Aksamitiene, E., Kiyatkin, A., and Kholodenko, B. N. (2012) Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance, *Biochem Soc Trans* 40, 139-146.
144. Gisela Rangel-Yescas, T. G., Rogelio Arellano. (2007) ATP as extracellular chemical transmitter, pp 276-285, *Rev Mex Neuroci*.
145. Joseph, S. M., Buchakjian, M. R., and Dubyak, G. R. (2003) Colocalization of ATP release sites and ecto-ATPase activity at the extracellular surface of human astrocytes, *J Biol Chem* 278, 23331-23342.

ANEXOS

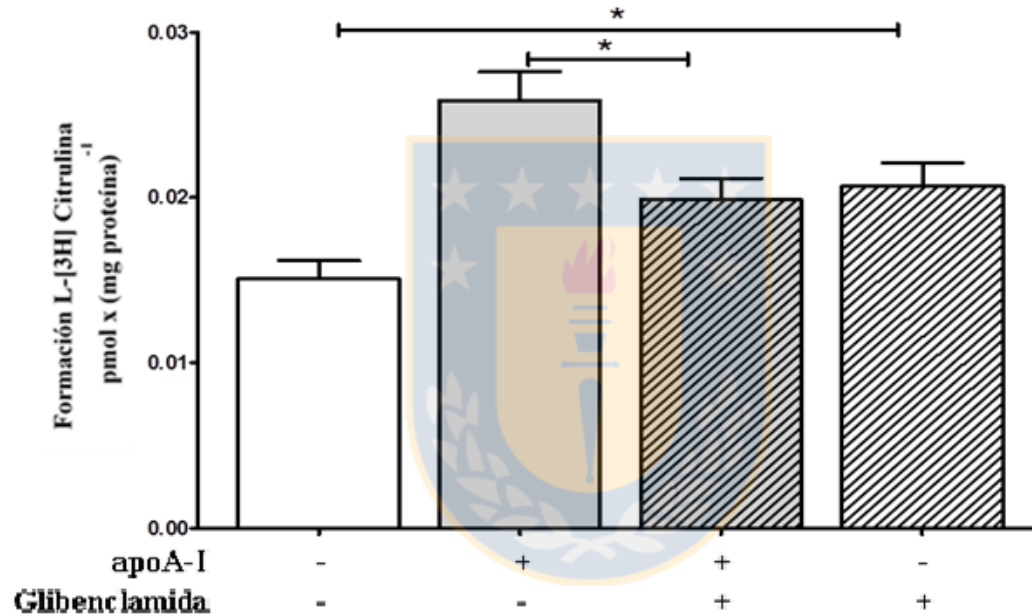


Figura anexa 1: ABCA1 participa en la mayor actividad de la eNOS, generada por apoA-I. La actividad de la eNOS fue medida por la formación de L-[³H]-citrulina, en células tratadas por 30 min con apoA-I libre 50 µg/mL y/o un inhibidor de ABCA1 (glibenclamida 250 µM). Condición basal: L-[³H] arginina (4 µCi/mL, 5 µM) y L-arginina no marcada (100 µM). Los valores corresponden al promedio ± error estándar. n = 4 experimentos en triplicado. * p<0,05. Tesis Magíster en Bioquímica Clínica e Inmunología, León M, 2014. Datos no publicados.

eNOS-p S1177

eNOS total

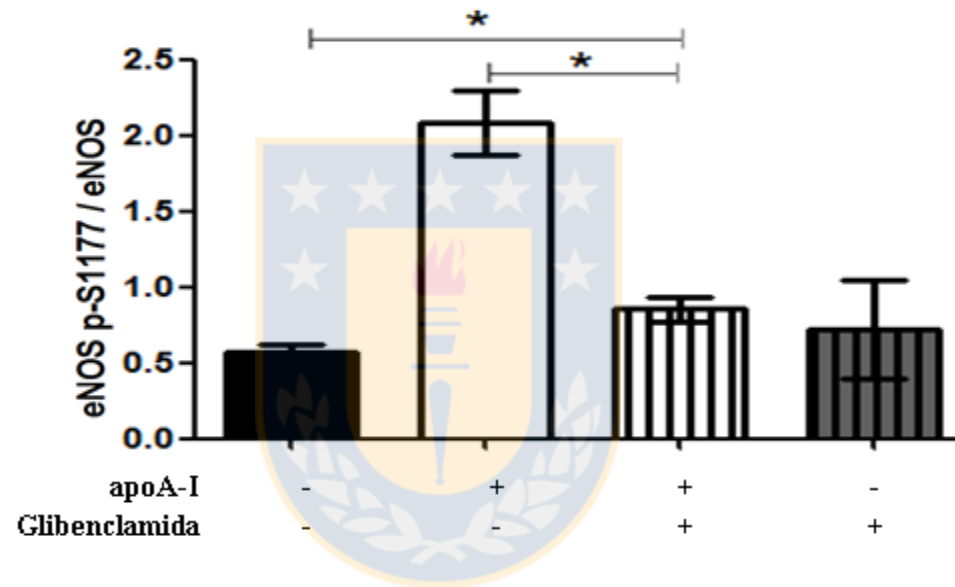
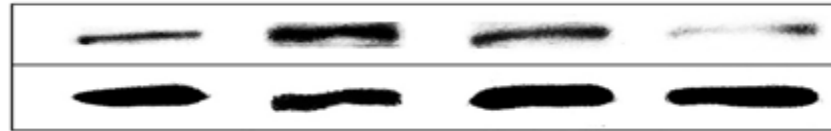


Figura anexa 2: ABCA1 participa en la fosforilación de eNOS en S1177 provocada por apoA-I. Las células HUVECs fueron incubadas por 30 min con apoA-I libre (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y/o glibenclamida (250 μM). n=4 experimentos. *, p<0,05. Tesis de pregrado título de Bioquímico, Briceño L, 2014. Datos no publicados.

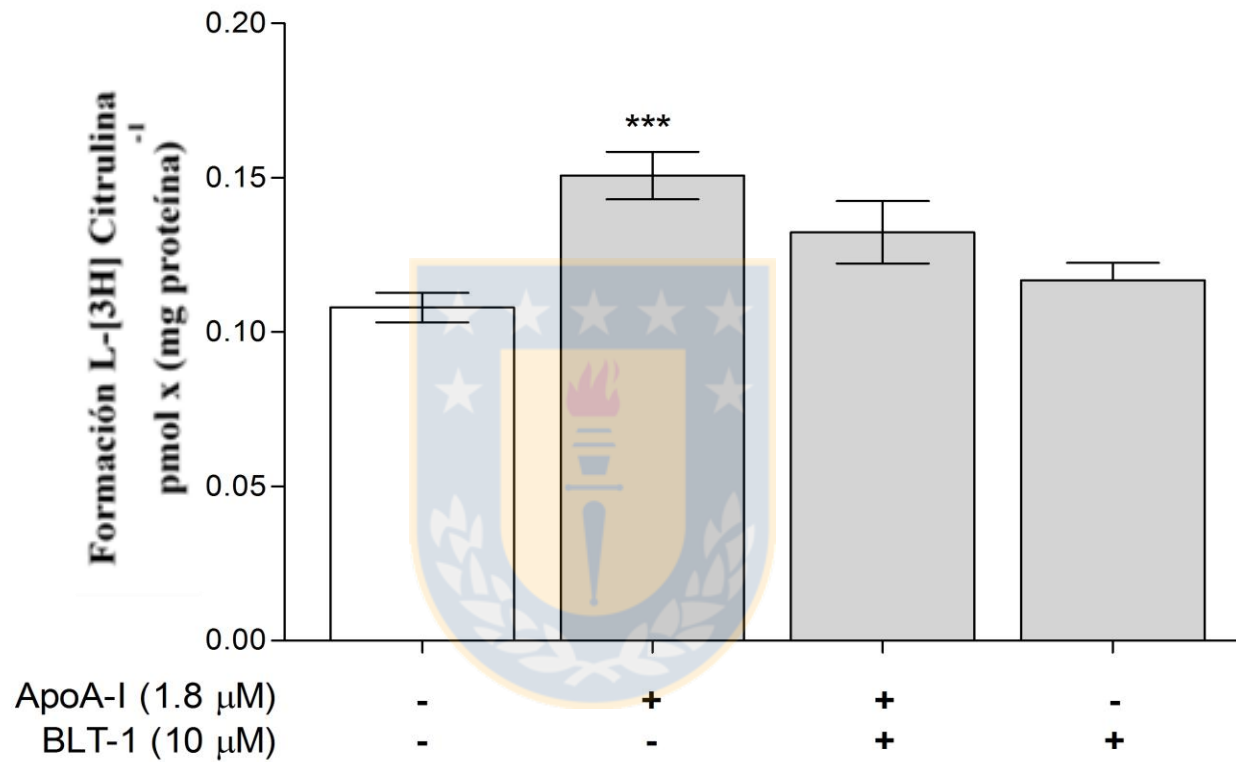


Figura anexa 3: Efecto de la inhibición de SR-BI en el aumento de actividad de eNOS dado por apoA-I libre. La actividad de la eNOS fue medida por la formación de L- [³H] citrulina al cabo de 30 min de incubación, en células tratadas con apoA-I 50 μ g/mL y/o un inhibidor de SR-BI (BLT-1 10 μ M). Condición basal: L-[³H] arginina (4 μ Ci/mL, 5 μ M) y L-arginina no marcada (100 μ M). Los valores corresponden al promedio \pm error estándar. n = 4 experimentos en triplicado. *** p<0,001. Tesis Magíster en Bioquímica Clínica e Inmunología, León M, 2014. Datos no publicados.

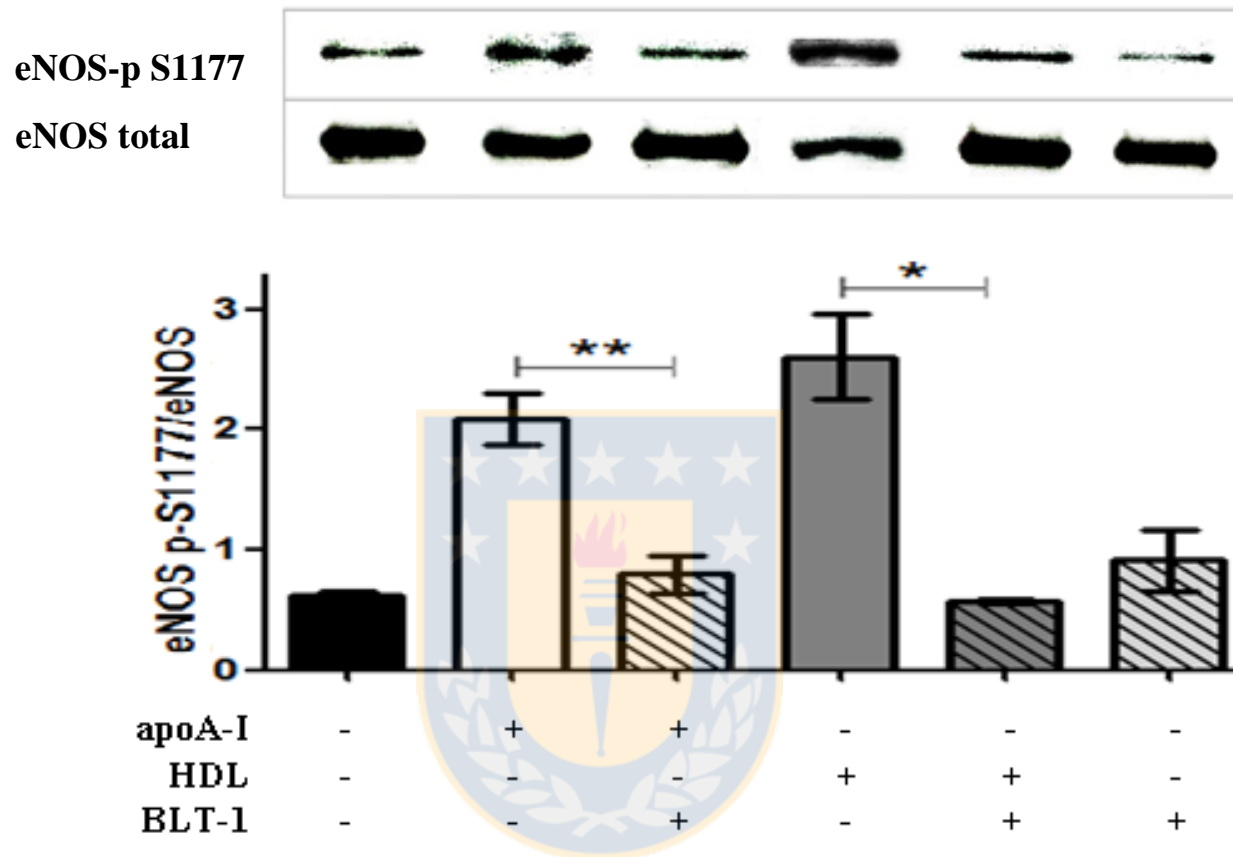


Figura anexa 4: SR-BI participa en la fosforilación de la eNOS provocada por apoA-I. Las células HUVECs fueron incubadas por 30 min con apoA-I libre (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o HDL (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), en presencia y ausencia de BLT-1 (10 μM). n=3 experimentos. *, p<0,05, **, p<0,01. Tesis de pregrado título de Bioquímico, Briceño L, 2014. Datos no publicados.

HOJA DE INFORMACIÓN PARA LA PARTICIPANTE

Título de la investigación: *Vías de señalización involucradas en el efectos de apolipoproteína A-I sobre la sintasa de óxido nítrico endotelial, vía el receptor de superficie ecto-F₁- ATPasa.*

Proyecto financiado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT), Iniciación 2012.

Mediante el presente documento, la invito a participar de una investigación de la Universidad de Concepción, que busca estudiar una nueva proteína localizada en el interior de los vasos sanguíneos. Esta proteína participa en la regulación de la presión arterial (presión sanguínea) y pudiera ser utilizada a futuro para el control de las alzas de presión en seres humanos.

En qué consiste

Si Usted está de acuerdo en participar, su placenta y su cordón umbilical serán utilizados para este estudio, con cuyos resultados esperamos aumentar el conocimiento médico sobre enfermedades cardiovasculares que afectan a la población chilena. **Su participación es voluntaria**, negarse a participar no cambiará en modo alguno el cuidado médico recibido por Usted o por su hijo recién nacido.

En este estudio:

- Su placenta y su cordón umbilical serán obtenidos **después del parto o cesárea**. Por lo tanto, la toma de estas muestras **no involucra en ningún sentido un riesgo para Usted ni para su hijo recién nacido**, puesto que las muestras no serán tomadas directamente del cuerpo de la madre ni del cuerpo del recién nacido, sino de la placenta y del cordón umbilical que habitualmente se desechan.
- El personal del Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Regional Guillermo Grant Benavente guardará su placenta y su cordón umbilical según un protocolo definido y se resguardará su traslado hacia la Universidad de Concepción siguiendo normas de Bioseguridad y Ética establecidas.
- Su placenta y su cordón umbilical serán utilizados **sólo para los fines de investigación descritos, sin relacionarlos a su persona**, manteniendo en privado su identidad, sus datos clínicos y los de su hijo recién nacido. **Las muestras obtenidas no serán bajo ninguna circunstancia almacenadas, congeladas o utilizadas para otro fin que no sea el expuesto en este estudio.**

- Una vez estudiada su placenta y su cordón umbilical, el resto del **material biológico será desechado**, siguiendo las normas de Bioseguridad y Manejo de Residuos Biológicos estipulados por la Universidad de Concepción.
- Los resultados obtenidos en este estudio serán publicados en revistas y conferencias científicas para ampliar el conocimiento sobre el funcionamiento y regulación de la presión sanguínea. Por lo tanto, **esta investigación generará nuevo conocimiento de utilidad para el mundo científico y la salud humana.**
- El presente consentimiento será firmado en dos ejemplares, quedando uno a disposición de la investigación y otro en su poder.
- Cualquier consulta respecto de este estudio podrá hacerla a: Dra. Claudia Radojkovic, Dpto. de Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, teléfonos 2204439-2203451.
- Ante cualquier duda con respecto a sus derechos como participante en este estudio, puede consultar al Comité Ético Científico del Hospital Guillermo Grant Benavente, teléfono 2722745.



DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

**ANTES DE OTORGAR SU CONSENTIMIENTO, ACLARE SUS DUDAS
CON EL MÉDICO O LA MATRONA TRATANTE**

Declaro que he sido informada por el médico o la matrona tratante acerca de este estudio.

Estoy **satisfecha** con la información recibida y mis dudas han sido aclaradas.

En consecuencia, doy mi consentimiento para participar.....

.....



HOJA DE FIRMAS

Nombre y firma del médico o matrona tratante

Nombre y firma de la participante

Nombre y firma del Delegado de la Dirección

Concepción,.....de.....de.....



CONSENTIMIENTO INFORMADO SANGRE VENOSA

Procedimiento a realizar: Toma de muestra de sangre venosa

Mediante el presente documento, le invito a participar del estudio titulado “**Vías de señalización involucradas en el efectos de apolipoproteína A-I sobre la sintasa de óxido nítrico endotelial, vía el receptor de superficie ecto-F₁- ATPasa**”. Esta investigación estudiará una nueva molécula localizada en el interior de los vasos sanguíneos, en un tejido llamado endotelio, la cual participa en la regulación de la presión arterial (presión sanguínea) y pudiera ser utilizada para el control de la hipertensión en seres humanos.

En qué consiste

El donante será sometido a un procedimiento de extracción de sangre venosa por personal capacitado, bajo procedimiento estandarizado. Se tomarán 40 mL de sangre desde una vena superficial del antebrazo, los cuales serán distribuidos en dos tubos con EDTA (anticoagulante).

Riesgos del procedimiento

Los inconvenientes, riesgos y/o complicaciones de la toma de muestra de sangre venosa involucran en algunos casos sensación de mareo. Casualmente puede haber un leve sangramiento que deberá pasar dentro de los primeros minutos y, en muy pocos casos, existe riesgo leve de formar un pequeño moretón que pasará en dos días, aproximadamente. Puede quedar una sensación de dolor que pasará en los primeros minutos.

Riesgos personalizados

Donantes que indiquen desmayos anteriores, serán tratados con mayor cuidado con personal de asistencia.

Las alternativas posibles son:

En aquellos casos que la muestra sea insuficiente, se tomará un volumen menor de sangre. Si la punción es dificultosa en el brazo, se consultará si el paciente accede a tomar la muestra con mariposa en las venas de la mano; si el paciente no accede, no se tomará la muestra.

**ANTES DE OTORGAR SU CONSENTIMIENTO, ACLARE SUS DUDAS CON LOS
PROFESIONALES ENCARGADOS DE LA TOMA DE MUESTRA Y/O EL
INVESTIGADOR RESPONSABLE DEL PROYECTO**

=

Declaro que he sido informado acerca del procedimiento y sus riesgos, que me han explicado las posibles alternativas y que sé que puedo revocar mi consentimiento antes que sea realizado.

Estoy **satisfecho** con la información recibida y mis dudas han sido aclaradas.

En consecuencia, doy mi consentimiento para realizar
.....
.....

Firma del donante
RUT:

Firma del investigador responsable
RUT:

DENEGACIÓN O REVOCACIÓN

Yo, Don/a....., RUT,
después de ser informado/a de la naturaleza y riesgos del procedimiento propuesto, manifiesto de forma libre y conciente mi denegación / revocación (táchese lo que no proceda) para su realización y asumo ante el equipo del proyecto de investigación que soy el único responsable de esta decisión y de las consecuencias se deriven de la misma.

Firma del donante
RUT:

Firma del investigador responsable
RUT:

Concepción,.....de.....de.....

Si Usted desea conocer los resultados obtenidos con esta investigación, por favor indique su correo electrónico o teléfono. Al término del estudio le contactaremos para invitarle a participar de una charla informativa.

Correo electrónico o teléfono:

