



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Farmacia – Programa de Magíster en Bioquímica Clínica e
Inmunología

**Regulación de la funcionalidad de células progenitoras
endoteliales humanas tempranas a través del receptor
ecto-F₁-ATPasa, vía síntesis de óxido nítrico**

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

NICOL ESTER PARADA CORTÉS
CONCEPCIÓN-CHILE
2017

Profesor Guía: Dra. Claudia Radojkovic Navarro
Dpto. de Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

A mis padres y hermano por todo su amor, paciencia y sacrificio en este camino.
A Fabián por ser compañero eterno.



TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ABREVIACIONES	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUCCIÓN	1
1. <i>Enfermedad cardiovascular en Chile y el mundo</i>	1
2. <i>Endotelio vascular, óxido nítrico y aterosclerosis</i>	2
3. <i>Células progenitoras endoteliales</i>	11
4. <i>Rol del óxido nítrico en la funcionalidad de células progenitoras endoteliales</i>	20
5. <i>Lipoproteínas de alta densidad, apolipoproteína A-I y EPC</i>	22
5.1 Efectos de HDL y apoA-I sobre el endotelio	26
5.2 Efectos de HDL y apoA-I en las EPC	26
6. <i>EPC y receptores de HDL y apoA-I</i>	30
6.1 Receptor scavenger clase B tipo I	30
6.2 Transportador ATP-binding cassette subfamilia A miembro 1	33
6.3 Ecto-F ₁ -ATPasa	34
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	40
HIPÓTESIS	40
OBJETIVO GENERAL	40
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS	43
RESULTADOS	52
1. <i>Obtención de apoA-I humana</i>	52
1.1 Obtención HDL desde plasma humano	52
1.2 Obtención de apoA-I	54
1 <i>Obtención y cultivo de hEPC</i>	57
2 <i>Determinación del efecto de apoA-I sobre hEPC tempranas</i>	59
2.2 Proliferación de hEPC tempranas	59
2.3 Angiogénesis mediada por hEPC tempranas	63

3 Contribución de la eNOS en el efecto de apoA-I sobre la angiogénesis mediada por hEPC tempranas.....	69
4 Rol del receptor ecto-F ₁ -ATPasa en el efecto de apoA-I sobre la angiogénesis mediada por hEPC tempranas.....	73
5 Efecto de apoA-I sobre la síntesis de óxido nítrico en hEPC tempranas	81
6 Rol del receptor ecto-F ₁ -ATPasa en la síntesis de NO en hEPC tempranas ...	84
DISCUSIÓN	88
AGRADECIMIENTOS	110
BIBLIOGRAFÍA.....	111
ANEXO 1	120



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura y función de la eNOS	5
Figura 2: Formación de la placa aterosclerótica	9
Figura 3: Contribución de EPC tempranas y tardías en el proceso de re- endotelización	16
Figura 4: Transporte reverso de colesterol	25
Figura 5: Estructura de la ATP sintasa	36
Figura 6: Verificación de la pureza de HDL	53
Figura 7: Gel representativo de la obtención de apoA-I desde HDL	55
Figura 8: Confirmación de la obtención de apoA-I	56
Figura 9: Obtención y cultivo de hEPC tempranas	58
Figura 10: Estandarización de las condiciones para evaluar proliferación de hEPC tempranas	61
Figura 11: Efecto de apoA-I sobre la proliferación de hEPC tempranas	62
Figura 12: Ensayos tiempo y dosis de apoA-I sobre la angiogénesis <i>in vitro</i> generada por ECV-304	65
Figura 13: Ensayos tiempo y dosis de apoA-I en la angiogénesis <i>in vitro</i> en el co- cultivo de ECV-304 y hEPC	67
Figura 14: Efecto de apoA-I en la angiogénesis <i>in vitro</i>	68
Figura 15: Expresión relativa de eNOS en hEPC tempranas	71
Figura 16: Contribución de la eNOS en la angiogénesis <i>in vitro</i> producida por apoA-I	72
Figura 17: Rol del receptor ecto-F ₁ -ATPasa en el efecto de apoA-I sobre la angiogénesis <i>in vitro</i>	75
Figura 18: Detección de ABCA1 en hEPC tempranas	78
Figura 19: Participación del transportador ABCA1 en el efecto de apoA-I sobre la angiogénesis <i>in vitro</i>	79
Figura 20: Contribución del receptor SR-BI en el efecto de apoA-I sobre la angiogénesis <i>in vitro</i>	80

Figura 21: Efecto de apoA-I sobre la síntesis de NO	83
Figura 22: Rol de ecto-F ₁ -ATPasa en la síntesis de NO	85
Figura 23: Contribución del transportador ABCA1 en la síntesis de NO	86
Figura 24: Participación del receptor SR-BI en la síntesis de NO	87
Figura 25: Modelo propuesto para la angiogénesis mediada por hEPC tempranas en respuesta a apoA-I	109



ABREVIACIONES

ABCA1. ATP <i>binding cassette</i> subfamilia A miembro 1	de cordón umbilical humano
ABCG1. ATP- <i>binding cassette</i> subfamilia G miembro 1	ICAM-1. <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
ADMA. Dimetilarginina asimétrica	IDL. Lipoproteína de densidad intermedia
Akt. Proteína quinasa B	IL-8. Interleuquina 8
AMI. Infarto agudo al miocardio	LCAT. Colesterol acetiltransferasa
ApoA-I. Apolipoproteína A-I	L-NAME. L-nitroargininametil éster
BAEC. Células endoteliales de aorta de bovino	LDL. Lipoproteínas de baja densidad
BH ₄ . Tetrabiopterina	LDLox. Lipoproteína de baja densidad oxidada
BLT-1. Bloqueador del transporte de lípidos 1	MAPK. <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
CaM. Calmodulina	MMP. Metaloproteasas
CETP. Proteína de transferencia de ésteres de colesterol	NO. Óxido nítrico
cGMP. Guanosin monofosfato cíclico	NADPH. Adenina nicotidamida dinucleótido fosfato
ECV. Enfermedad cardiovascular	PBMC. Células mononucleares de sangre periférica
eNOS. Óxido nítrico sintasa endotelial	PGI ₂ . Prostaciclina
EPC. Células progenitoras endoteliales	PI3K. Fosfatilinositol 3 kinasa
ERK. <i>Extracellular Signal-Regulated Kinases</i>	PKG. Proteína kinasa G
FAD. Flavina adenina dinucleótido	rEPC. Células progenitoras endoteliales de ratón
FMN. Flavina mononucleótido	SDF-1. Factor 1 derivado de estroma
G-CSF. Factor estimulante de colonias de granulocitos	sGC. Guanilil ciclasa soluble
GM-CSF. Factor estimulante de colonias de granulocito y monocitos	SR-BI. Receptor <i>scavenger</i> clase B tipo 1
GTP. Guanosin trifosfato	VCAM-1. <i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
HDL. Lipoproteína de alta densidad	VEGF. Factor de crecimiento endotelial vascular
hEGF. Factor de crecimiento epidermal humano	
hEPC. Células progenitoras endoteliales humanas	
HUVEC. Células endoteliales de vena	

RESUMEN

Las células progenitoras endoteliales humanas (hEPC) son una población celular presentes en circulación sanguínea, capaces de diferenciarse a células endoteliales maduras bajo ciertos estímulos, jugando un rol fundamental en la mantención de la integridad endotelial. Se ha descrito que miméticos de apolipoproteína A-I (apoA-I) aumentan la funcionalidad de las hEPC, a través de la síntesis de óxido nítrico (NO). En estos efectos el receptor SR-BI participa de forma parcial, sugiriendo el aporte de otros receptores aún no descritos.

Nuestro equipo ha demostrado que ecto-F₁-ATPasa, un receptor de apoA-I, aumenta la proliferación y la angiogénesis *in vitro* de hEPC tempranas de 3 días de cultivo. En células endoteliales maduras, este receptor media el aumento de la síntesis de NO, generada por apoA-I.

El objetivo de esta tesis fue determinar la participación del receptor ecto-F₁-ATPasa en el aumento de la funcionalidad de hEPC tempranas de 7 días, tratadas con apoA-I, y si este efecto depende de la síntesis de NO.

Los resultados obtenidos demuestran que apoA-I incrementa la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y la biodisponibilidad de NO, efectos que se correlacionaron con una mayor angiogénesis *in vitro* mediada por hEPC. En estos efectos, ecto-F₁-ATPasa juega un rol central, siendo el único receptor involucrado. Estos resultados otorgan conocimiento de relevancia para generar nuevas alternativas que promuevan el aumento de la funcionalidad de las hEPC y, por ende, su potencial uso en terapia celular.

ABSTRACT

Human endothelial progenitor cells (hEPC) are a subtype of mammalian stem cells present in peripheral blood that differentiate to mature endothelial cells, under certain conditions, playing a pivotal role in endothelial integrity maintenance. It has been described that apoA-I mimetic peptides derived from apolipoprotein-AI (apoA-I) enhance hEPC functionality through the synthesis of nitric oxide (NO). In this effect SR-BI is partially involved, suggesting the participation of other receptors not yet described.

Our group has shown that ecto-F₁-ATPase, an apoA-I receptor, increases the proliferation and the *in vivo* angiogenic capacity of early hEPC after 3 days of culture. On mature endothelial cells, this receptor mediates the apoA-I dependent increase of NO synthesis.

The aim of this thesis was to determinate the contribution of ecto-F₁-ATPase in the increase of early hEPC (7 days of culture) functionality when treated with apoA-I and if this effect depends on NO synthesis.

Our results showed that apoA-I enhances the activity of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and NO bioavailability, wich correlated with an increased hEPC-mediated angiogenesis *in vitro*. In these effects, ecto-F₁-ATPas plays a pivotal role, being the only receptor involved. These results provide relevant knowledge to generate new alternatives to promote the functionality of the hEPC and therefore, their potential use in cellular therapy.

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad cardiovascular en Chile y el mundo

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un conjunto de patologías relacionados con el corazón y los vasos sanguíneos, entre las que se incluyen las cardiopatías coronarias, enfermedades cerebrovasculares, trombosis venosas profundas, embolias pulmonares, entre otras [1]. Estas enfermedades son la primera causa de muerte en Chile y el mundo. En el año 2015, el 31,1% de los 56,4 millones de defunciones registradas a nivel mundial fue atribuido a ECV, seguido por las neoplasias malignas con un 15,5% [2]. En Chile el panorama es similar y las ECV lideran las tasas de defunciones desde el año 1969. El Departamento de Estadísticas e Información de Salud (DEIS) del Ministerio de Salud de Chile indicó que en el año 2009 el 27% de los fallecimientos fueron atribuidos a ECV, correspondiendo a una tasa de 146,7 por 100.000 habitantes, que para el año 2014 aumentó a 157,5 por 100.000 habitantes, evidenciando un incremento progresivo de las muertes por estas causas en nuestro país [3]. Además, desde el 2007, las ECV son la tercera causa de Pérdida de Años de Vida por Discapacidad y Muerte Prematura en el rango etario desde los 20 hasta los 74 años, proyectándose la misma tendencia hasta el año 2020 [4].

Por lo anterior, surgió la necesidad de implementar medidas a nivel nacional, como el Examen de Medicina Preventivo (EMP) el año 2008 y el programa 'Elige Vivir Sano' en el año 2010, con la finalidad de prevenir y monitorear la aparición de las ECV, a través de exámenes gratuitos de amplio acceso y promover hábitos y estilos de vida saludables, para disminuir los factores y conductas de riesgo asociados a las

ECV, todo lo cual contribuye a aumentar la sobrevida de los pacientes post evento cardio o cerebrovascular [5]

En este contexto, cobra relevancia la identificación de mecanismos fisiológicos involucrados en el inicio, progresión y tratamiento de ECV que permitan desarrollar nuevas terapias, que complementen las alternativas disponibles, con la finalidad de intervenir precozmente las ECV y sus factores de riesgo, disminuir la mortalidad asociada a estas patologías y mejorar la calidad de vida de pacientes en prevención secundaria.

2. Endotelio vascular, óxido nítrico y aterosclerosis

El endotelio vascular es un órgano que recubre el sistema circulatorio y constituye una barrera entre la pared y el lumen vascular. Está constituido por células endoteliales, que en el adulto corresponden aproximadamente a 10 trillones (10^{13}) de células y representan cerca del 1,5% de la masa corporal total [6]. El endotelio es una barrera semipermeable y metabólicamente activa, capaz de responder a diferentes estímulos y regular funciones fisiológicas, como la activación plaquetaria, la respuesta inflamatoria, la proliferación y migración de las células del músculo liso y la mantención del tono vascular y el flujo sanguíneo [7]. Para ello, el endotelio sintetiza y libera diferentes factores vasoactivos: los *endothelium-derived relaxed factors* (EDRF), como óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI₂), que promueven la vasodilatación, y los *endothelium-derived contracting factors* (EDCF), como endotelina-1, prostanoides vasoconstrictores, angiotensina II, entre otros, que ejercen el efecto contrario [6].

El NO es el principal factor vasoactivo producido por el endotelio, el cual es importante tanto por su capacidad de aumentar la vasodilatación a través de efectos en el músculo liso subyacente, como por las acciones que genera en otros blancos, como la inhibición de la agregación plaquetaria, la disminución de la proliferación de las células del músculo liso, de la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio, y de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), entre otros [8], jugando un rol importante en la mantención de la homeostasis vascular. En los mamíferos, la síntesis de NO está a cargo principalmente de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), de la cual existen 4 isoformas: óxido nítrico sintasa neuronal (nNOs o NOS tipo I), inducible (iNOS o NOS tipo II), endotelial (eNOS o NOS tipo III) y mitocondrial (mtNOS o NOS tipo IV) [9, 10]. A nivel endotelial, la eNOS está expresada constitutivamente, su actividad es dependiente de calcio y es la principal responsable de la síntesis de NO a partir de L-arginina, produciendo NO y L-citrulina [10].

En el humano, el gen de la eNOS está ubicado en la región q35–36 del cromosoma 7 y comprende 26 exones y 25 intrones que codifican para una proteína de 133 kDa [10, 11]. La proteína madura es sintetizada como monómero, pero debe formar homodímeros para ser activa. Estructuralmente cada monómero cuenta con un dominio reductasa (C-terminal) y uno oxidasa (N-terminal) y funcionalmente necesita de la interacción del dominio reductasa de un monómero con el oxidasa del otro [12]. Para la síntesis de NO (figura 1), utiliza L-arginina como sustrato y oxígeno molecular, más adenina nicotidamida dinucleótido fosfato (NADPH) como co-sustrato y tetrabiopterina (BH₄), flavina adenina dinucleótido (FAD), flavina mononucleótido (FMN), calmodulina (CaM) y un grupo hemo como co-factores [8, 13]. Este proceso se lleva a cabo a través de dos pasos principales: primero la hidroxilación de L-arginina

a N^ω-hidroxi-L-arginina y luego la oxidación de este intermediario, formando L-citrulina y NO [14]. Para ello, se produce un flujo de electrones desde NADPH a través de FAD y FMN, en el dominio reductasa hasta el dominio oxidasa, transferencia dependiente de CaM. En el sitio hemo del dominio oxidasa, los electrones transferidos son utilizados para reducir el O₂, oxidar la N^ω-hidroxi-L-arginina y formar NO (figura 1) [14-16]. La unión de los dímeros a BH₄ y L-arginina es esencial para la síntesis de NO y evitar una condición conocida como desacoplamiento de la eNOS, donde se genera anión superóxido en vez de NO [17].



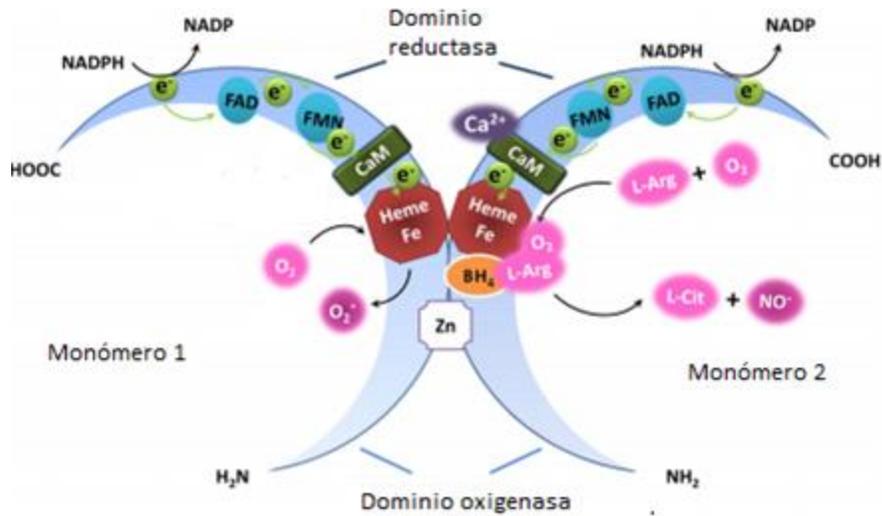


Figura 1. Estructura y función de la eNOS. Cada monómero de la eNOS cuenta con un dominio reductasa y un dominio oxidasa y debe formar homodímeros para su funcionamiento. En el dominio reductasa comienza un flujo de electrones desde adenina nicotidamida dinucleótido fosfato (NADPH) pasando por flavina adenina dinucleótido (FAD) y flavina mononucleótido (FMN), flujo que es facilitado por la unión de calmodulina (CaM). En el monómero de la derecha se detalla como en el grupo hemo se lleva a cabo la oxidación de N^{ω} -hidroxi-L-arginina, formando NO y L-citrulina, en presencia del co-factor tetrahipteroína (BH_4). En el monómero de la izquierda se describe el desacoplamiento de la eNOS, condición generada por la disminución de L-arginina y BH_4 , en la que se genera anión superóxido en vez de NO. Modificado de [8]

En el endotelio, el NO puede difundir hacia el músculo liso subyacente y/o al lumen vascular, ejerciendo diferentes funciones. Su principal vía de acción es la activación de la guanilil ciclasa soluble (sGC) que convierte guanosin trifosfato (GTP) a guanosin monofosfato cíclico (cGMP). Este segundo mensajero modula la actividad de quinasas, canales iónicos y fosfodiesterasas dependientes de cGMP, destacándose la proteína quinasa G (PKG) que fosforila otros diferentes efectores [8, 18]. Además, el NO *per se* interacciona con grupos tioles para formar proteínas S-nitrosiladas, y facilita la S-glutathionilación de otras proteínas intracelulares [8]. En caso del músculo liso, el aumento del cGMP produce una disminución del calcio intracelular, debido a un aumento en la captación por retículo sarcoplásmico, provocando la relajación de la célula vascular y la vasodilatación [8]. En células endoteliales se ha descrito que NO aumenta la activación de fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) / proteína quinasa B (PKB o Akt), de manera cGMP dependiente, aumentando la funcionalidad de estas células [19].

Una variedad de estímulos fisiológicos regulan la actividad y la expresión de la eNOS. Entre ellos se encuentran productos de la agregación plaquetaria como setoronina y adenosin difosfato (ADP) [20] y otros como acetilcolina, braquidina e histamina. Éstos que aumentan la concentración intracelulares de calcio, lo que promueve la unión de CaM a la eNOS y, por tanto, la síntesis de NO [8, 15]. Sin embargo, el más potente y fisiológicamente importante activador de la eNOS corresponde al *shear stress* que aumenta la transcripción y la estabilidad del ARN mensajero de la eNOS, además de activar la vía dependiente de Akt, la cual promueve la fosforilación de la eNOS en residuos activadores (principalmente serina-1177),

produciendo la disociación de interacciones inhibitorias proteína-proteína (como con caveolina-1) entre otros [8, 13].

Alteraciones en la síntesis y/o biodisponibilidad de NO son características principales de la disfunción endotelial, condición caracterizada por un estado pro-inflamatorio, proliferativo, oxidante y pro-coagulante asociado a diferentes factores de riesgo de ECV y al desacoplamiento de eNOS [21]. Este estado es reconocido como la etapa temprana y aún reversible del proceso ateromatoso [22]. Estudios en grupos de pacientes con diferentes niveles de estenosis arterial, muestran que una vasodilatación dependiente de endotelio (mediada por NO) anormal ocurre en etapas tempranas, intermedias y avanzadas del proceso ateromatoso [23]. Asimismo, en pacientes con factores de riesgo de ECV, cuyas arterias son normales (sin lesión) según estudios angiográficos, se observa una respuesta vasodilatadora anormal [24], indicando la importancia de la función endotelial y la síntesis de NO en las etapas iniciales de la aterosclerosis.

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio multifactorial, crónico y progresivo, caracterizado por el engrosamiento de la íntima vascular en grandes arterias (figura 2). A grandes rasgos, factores de riesgo de ECV (hábito tabáquico, hipertensión, diabetes mellitus, hiperlipidemia, entre otros) disminuyen la producción y/o biodisponibilidad de NO, que constituye una causa y un signo de la disfunción endotelial [22]. En este estado, el endotelio es más permeable al paso de diferentes elementos sanguíneos al espacio subendotelial, entre los que destaca la extravasación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y su retención y oxidación en la íntima vascular [25]. Las LDL oxidadas (LDLox) poseen una serie de propiedades pro-aterogénicas: promueven la migración y proliferación de células del músculo liso,

la quimioataxis de monocitos y células T, además de generar la activación del endotelio y la expresión de moléculas pro-inflamatorias, como moléculas de adhesión (P-selectinas, ICAM y VCAM), factores de crecimiento (factor estimulante de colonias de macrófagos) y quimioquinas (CCL2 y CCL5) [26]. Este estado favorece el reclutamiento, adhesión, *rolling* y trans migración de monocitos a la íntima vascular donde se diferencian a macrófagos, reconocen y endocitan a las LDLox, transformándose en '*foam cells*' o células de espuma. Esta primera lesión es conocida como 'estría grasa' y aún es reversible [27]. En la progresión de la lesión ateromatosa, se observa la migración y proliferación de células del músculo liso desde la media hasta la íntima de la arteria y la producción de componentes de la matriz extracelular, como colágeno, elastina y proteoglicanos, que recubren la lesión, formando un *cap* fibroso [28]. La muerte de macrófagos por apoptosis y eferocitosis ineficiente libera en la íntima el contenido lipídico y restos celulares generando lo que se conoce como *core* o núcleo necrótico [29]. Se ha descrito que mientras más grueso es el *cap* fibroso y menor el núcleo necrótico, más estable es la placa aterosclerótica y menos vulnerable a posibles rupturas [30]. La neovascularización, que ocurre en placas más avanzadas, permite un mayor flujo de monocitos a la lesión promoviendo el crecimiento del núcleo necrótico y por lo tanto la desestabilización de la placa [30, 31]. Las posibles complicaciones producidas por esta lesión abarcan desde la estenosis de vasos sanguíneos, por la disminución del lumen vascular, hasta la ruptura, erosión o fisura de la placa y la formación de trombos o émbolos que obstruyen total o parcialmente el flujo sanguíneo en grandes arterias o en arterias periféricas [32].

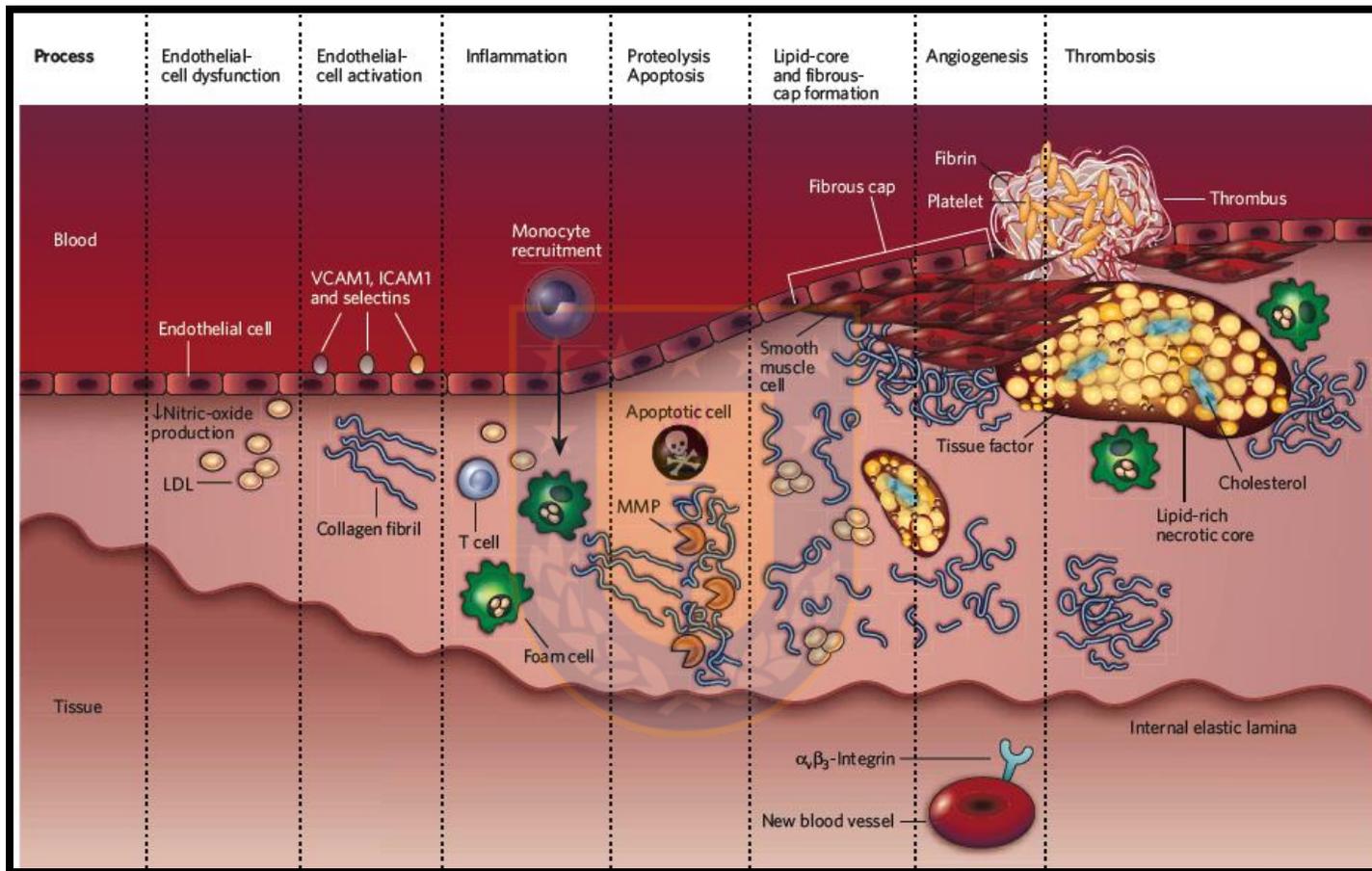


Figura 2: Formación de la placa aterosclerótica. De izquierda a derecha se observa un vaso sanguíneo sano hasta la formación del trombo, debido a la ruptura de la placa. Se observa inicialmente la disfunción endotelial, condición en la que disminuye la síntesis y/o biodisponibilidad de NO y aumenta la acumulación de LDL en la íntima. Una mayor expresión de moléculas de adhesión genera el reclutamiento de monocitos que alcanzan la íntima, donde se diferencian a macrófagos y luego se transforman en *foam cells* o células de espuma. La muerte de las células de espuma por apoptosis o feroctosis ineficiente forma el *core* o núcleo lipídico. Por otro lado, las células del músculo liso migran a la íntima y secretan componentes de la matriz extracelular, formando el *cap* fibroso que recubre la lesión. La neovascularización que se describe en placas más avanzadas favorece el flujo de monocitos a la lesión, aumentando el núcleo lipídico y favoreciendo la formación de una placa más inestable. En la lesión pueden ocurrir rupturas que permiten la formación de trombos, los que pueden obstruir parcial o totalmente el flujo sanguíneo. Modificado de [33].

Para contrarrestar el desarrollo de la lesión, existen factores fisiológicos anti-aterogénicos, entre los que se encuentran las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y su proteína mayoritaria, la apolipoproteína A-I (apoA-I). Se ha documentado que niveles plasmáticos de HDL menores a los 35 mg/dL aumentan más de 8 veces el riesgo relativo de sufrir enfermedad coronaria [33], y bajos niveles de apoA-I (<1g/L) aumentan el riesgo en un 65% [34]. Esta relación se mantiene en pacientes que reciben estatinas, en los cuales las HDL son fuertes predictores independientes de enfermedades coronarias en prevención secundaria [35].

Además de las HDL y la apoA-I, las células progenitoras endoteliales humanas (hEPC), que se describirán más adelante, son consideradas un factor protector contra el desarrollo de aterosclerosis [36]. Éstas corresponden a un *pool* heterogéneo de células presentes en circulación sanguínea capaces de diferenciarse a células endoteliales maduras, jugando un rol importante en la mantención de la integridad del endotelio, a través de diferentes procesos [37]. Los factores de riesgo de ECV y la enfermedad ya establecida disminuyen el número y funcionalidad de esta población celular en circulación. Estudios en pacientes sanos, pero con factores de riesgo de ECV, muestran una disminución de unidades formadoras de colonias *in vitro* de estas células, que se relaciona directamente con la vasodilatación dependiente de endotelio (vía NO) [38]. Lo anterior se complementa con estudios realizados en pacientes con síndrome metabólico, sin ECV establecida, en los cuales se describió una disminución significativa de hEPC en circulación, que funcionalmente presentan una menor capacidad migratoria y angiogénica *in vitro*, comparado con las células de los sujetos control [39]. Por otro lado, estudios en pacientes con enfermedad coronaria determinada por angiografía, muestran que el número de hEPC en circulación es un

predictor independiente de sufrir un evento cardiovascular y su disminución aumenta más de 3 veces el riesgo de morir por ECV [40, 41]. Al evaluar *in vitro* la funcionalidad de estas células, se describió una disminución en la capacidad migratoria con respecto a sujetos controles, efecto relacionado directamente con los factores de riesgo de ECV, en particular con la hipertensión [42]. Por lo tanto, el número y la funcionalidad de las EPC son factores importantes en la mantención de la función endotelial, y estos parámetros son influenciados negativamente por la presencia de factores de riesgo de ECV.

Como se describirá más adelante, las HDL y la apoA-I aumentan el número y la funcionalidad de las EPC, por lo tanto, la relación entre estos 3 elementos constituye un eje de interés para la protección contra el desarrollo de ECV.

3. Células progenitoras endoteliales

La vasculogénesis es el proceso de formación de vasos sanguíneos en el embrión desde los precursores endoteliales en el mesodermo [43, 44] mientras que en el adulto comprende la movilización de progenitores endoteliales, principalmente desde médula ósea [45]; la angiogénesis, por su parte, se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos desde otros pre-existentes [44, 46]. Durante mucho tiempo se pensó que en el adulto la neovascularización, tanto fisiológica como patológica, y la re-endotelización posterior a denudación o injuria del endotelio, eran sinónimos de angiogénesis y correspondía al resultado de la migración y proliferación de células endoteliales maduras residentes en el vaso sanguíneo. Este concepto cambió en 1997 cuando Asahara y col [47] lograron aislar desde sangre periférica

humana células mononucleares CD34⁺ y Flk-1⁺ capaces de diferenciarse *in vitro* hacia el fenotipo endotelial y de incorporarse *in vivo* a nuevos vasos sanguíneos en sitios de isquemia [47, 48]. Estos hallazgos permitieron postular que la neovascularización y el proceso de re-endotelización en el adulto presentan un componente tanto angiogénico como vasculogénico.

Desde entonces, se describen las células progenitoras endoteliales (EPC) o angioblastos como un *pool* heterogéneo de células en circulación sanguínea, provenientes principalmente de médula ósea y otros tejidos adultos [37]. Estas células corresponden a un 1-5% de todas las células presentes en la médula ósea y a menos de 0,0001-0,01% de las células mononucleares en circulación sanguínea [49]. Se caracterizan por presentar una alta tasa de proliferación y su capacidad de diferenciarse al fenotipo endotelial en medios suplementados con factores de crecimiento endotelial [37, 50], participando en procesos importantes para la mantención de la integridad del endotelio, como son la angiogénesis y la re-endotelización de vasos injuriados [36].

Con respecto a su origen, se han documentado 5 fuentes diferentes de EPC. El primero, y más estudiado, es desde una población de células madre hematopoyéticas presentes en médula ósea, denominadas hemangioblastos [36]; también pueden originarse desde células mieloides derivadas de médula ósea [36, 50], células mesenquimales residentes en médula ósea [51], células madre residentes en tejidos (como cardíaco y adiposo [37]), y desde células endoteliales maduras que se desprenden de la monocapa endotelial [36, 50].

Al constituir las EPC un *pool* heterogéneo de células con diferentes orígenes, no existe un único marcador para su identificación ni una única forma de obtención. El protocolo más comúnmente usado para aislar EPC es desde células mononucleares de sangre periférica (PBMC), que son cultivadas sobre una matriz de fibronectina con medios suplementados con factores de crecimiento endoteliales. Este protocolo permite seleccionar las EPC por su adherencia a la placa. Otra alternativa de aislamiento es a través de marcaje con anticuerpos dirigidos a proteínas de superficie, como CD34⁺ o el receptor 2 para el factor de crecimiento endotelio vascular, con los cuales se tratan PBMC, sangre de cordón umbilical o tejidos como hígado fetal [52]. *In vitro* es posible distinguir dos poblaciones de EPC derivadas de médula ósea: EPC tempranas y EPC tardías [53]. Estas células difieren en los marcadores de superficie, tiempo de aparición en cultivo, morfología y funciones *in vivo* como se describe a continuación.

- a) **EPC tempranas:** esta población se obtiene luego de 4 a 7 días de cultivo, en placas recubiertas con fibronectina y en presencia de un medio suplementado con factores que favorecen la diferenciación de células hacia el fenotipo endotelial, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEFG) y el factor de crecimiento epidermal humano (hEGF), entre otros [47, 53, 54]. Esta subpoblación presenta morfología redondeada, marcadores de superficie de célula endotelial, como CD31 y KDR (receptor de VEGF), y marcadores mieloides y hematopoyéticos, como son CD45, CD34, CD133 [53, 55], predominando estos últimos sobre los primeros. Con respecto a su función, las EPC tempranas poseen menor capacidad proliferativa que las EPC tardías y no forman estructuras tipo capilares por sí solas [49, 50, 56]. A diferencia de

las tardías, las EPC tempranas se caracterizan por secretar factores angiogénicos como VEGF, interleuquina 8 (IL-8), Metaloproteasa 9 (MMP-9), entre otros [49, 50], los que favorecen el reclutamiento de precursores inmaduros en el sitio de injuria y promueven la proliferación de células endoteliales residentes en el endotelio [53]. Debido a esa capacidad de estimular la angiogénesis es que las EPC tempranas son denominadas “células angiogénicas circulantes” [54].

b) EPC tardías: estas células se disponen en forma de empedrado y se observan luego de 2 a 3 semanas en cultivo [50, 53, 55]. Expresan marcadores de célula endotelial madura, como KDR, CD31, E-selectina, VE-caderina, factor de von Willebrand, y en mucha menor magnitud marcadores hematopoyéticos, como CD34 [53, 55]. A diferencia de las tempranas, las EPC tardías poseen mayor capacidad proliferativa y de formación de estructuras tipo capilares *in vitro* por sí mismas [53, 56]. Esta subpoblación participa proveyendo el *pool* de células suficientes para llevar a cabo el proceso de reparación del endotelio [53], razón por la cual se les denominan ‘células endoteliales formadoras de colonias’ [54].

Ambas sub-poblaciones de EPC, están presentes en circulación sanguínea, donde se ha descrito que cumplen funciones diferentes y complementarias en los procesos de neovascularización y de re-endotelización. En condiciones normales las células madres hematopoyéticas se encuentran en médula ósea en un estado quiescente, asociadas a células estromales [55]. Frente a una injuria o isquemia, las células endoteliales residentes en el endotelio liberan una serie de citoquinas, como VEGF, factor 1 derivado de estroma (SDF-1), factor estimulante de colonias de

granulocitos (G-CSF) y eritropoyetina, entre otros [49], que alcanzan la médula ósea y aumentan la liberación de los progenitores endoteliales a circulación. A grandes rasgos, el mecanismo de acción de estas citoquinas se relaciona con la interferencia en las interacciones entre los progenitores endoteliales y las células estromales de la médula ósea, a través de la activación de proteasas, como elastasa, catepsina-G y MMP [45, 55]. Estas enzimas clivan matriz extracelular o moléculas de adhesión presentes en membranas celulares, responsables de la unión de EPC a las células estromales [55]. Se ha descrito que MMP-9 cliva la proteína de membrana mKitL, presente en las células estromales, generando sKitL el cual interacciona con el receptor c-kit presente en los precursores de los progenitores endoteliales promoviendo su salida a circulación sanguínea [57]. Desde allí, estas células son guiadas por el gradiente de concentración de citoquinas hacia el sitio de injuria, donde las EPC tempranas secretan IL-8, VEGF, G-CSF, factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos (GM-CSF), entre otros [58, 59]. Estos factores actúan de forma autocrina estimulando la secreción de más citoquinas, y paracrina sobre las EPC tardías reclutadas en la zona de injuria y sobre el endotelio, aumentando la proliferación y migración celular [56, 60, 61] (figura 2). Cabe destacar que la población de EPC tardías presentes en el sitio de la lesión, corresponde a EPC tardías como tal y la EPC tempranas que se diferenciaron en respuesta a estímulos de citoquinas angiogénicas [55].

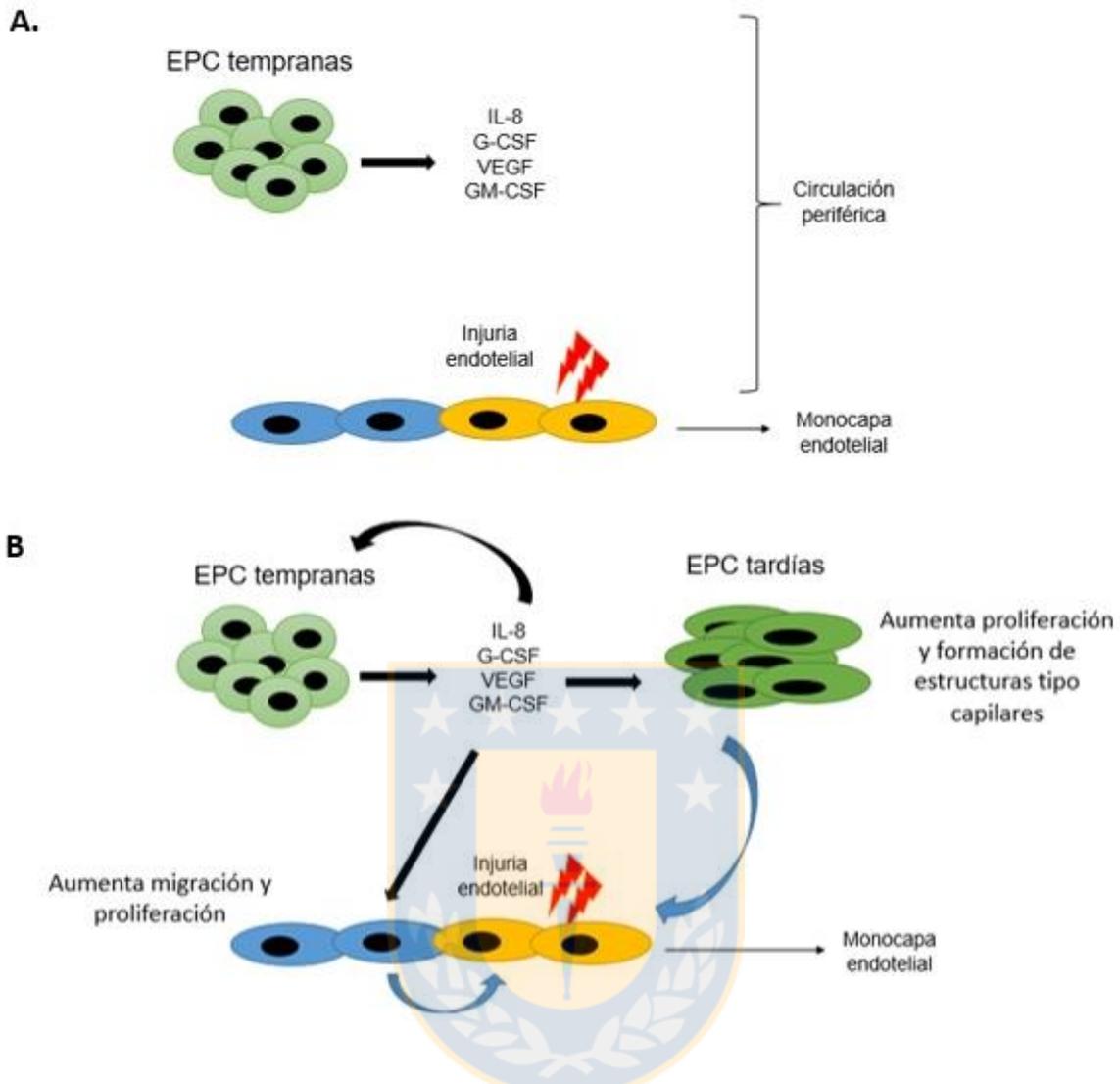


Figura 3. Contribución de EPC tempranas y tardías en el proceso de re-endothelialización. A. En respuesta a una injuria endotelial, las EPC tempranas son reclutadas en el sitio de lesión y secretan diferentes citoquinas **B.** Estas citoquinas actúan de forma autocrina y paracrina sobre poblaciones de EPC tardías circulantes, aumentando su proliferación y la capacidad de formar estructuras tipo capilares, y además sobre el endotelio maduro, aumentando su proliferación y migración. Tanto las EPC tardías como las células endoteliales residentes son estimuladas para repoblar las zonas denudadas del endotelio dañado. IL-8: Interleuquina 8, G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial, GM-CSF: factor estimulante de colonia de granulocitos y monocitos. Fuente: elaboración propia.

Debido a la activa participación de ambas poblaciones de EPC en los procesos de reparación y mantención de la función endotelial, el estudio de mecanismos que permitan modular su número y función es central para su posible aplicación en terapia celular, por ejemplo, en ECV y patologías isquémicas. Con respecto a esto, se han descrito factores endógenos y exógenos que regulan el número y funcionalidad de las EPC. Entre los que favorecen estos parámetros destacan el ejercicio físico, altos niveles de estrógenos, HDL, eritropoyetina y el uso de estatinas, y entre los factores que los disminuyen se puede mencionar diabetes mellitus, hábito tabáquico, edad avanzada, altas concentraciones de proteína C reactiva [55].

A pesar del rol anti-aterogénico que cumplen las EPC en condiciones fisiológicas, el uso de estas células para el tratamiento de la aterosclerosis aún es controversial. Un estudio en ratones apoE^{-/-}, un modelo de aterosclerosis, a los cuales se le inyectó intravenosamente EPC de ratón (rEPC) a razón de 1×10^6 células por dosis, con 3 dosis dos veces por semana, muestran un aumento en el área de la placa aterosclerótica, observándose mayor presencia de marcadores de inestabilidad, como un núcleo lipídico mayor y *cap* fibroso más pequeño, que en los ratones sin tratar [62]. Estos resultados se pueden atribuir a una mayor neovascularización de la placa aterosclerótica, que se relaciona con una mayor infiltración de monocitos en la lesión, lo que promueve el crecimiento del núcleo lipídico y, por ende, aumenta la vulnerabilidad de la placa [30, 63]. Por otro lado, existe evidencia que células humanas CD34⁺ / CD133⁺ / KDR⁺, extraídas desde sangre de cordón umbilical, e inyectadas intravenosamente (1 dosis semanal de 1×10^5 células hasta por 12 semanas) no tiene efecto en el inicio, progresión y estabilidad de la placa aterosclerótica en ratones

apoE^{-/-} inmunodeficientes [64]. Por lo anterior, el efecto que tendrían las EPC en tratamientos a largo plazo sobre placas ateroscleróticas no es claro y no existen ejemplos de tratamientos similares en humanos.

Sin embargo, se ha descrito la gran utilidad de las EPC en tratamientos post-infarto, tanto en animales como en humanos, utilizando una única dosis de estas células. Por ejemplo, en un estudio con ratas se generó isquemia al miocardio mediante la ligación de la arteria coronaria izquierda, y luego se les administró vía intravenosa células CD34⁺ (fracción enriquecida de hEPC, obtenida *in vitro* luego de tratamiento con G-CSF) 48 horas post-isquemia [65]. Luego de 2 semanas se observó un aumento en la neovascularización de la zona infartada, asociada a una disminución de la apoptosis de cardiomiocitos, reducción del depósito de colágeno y de la formación de cicatriz en el corazón infartado. Todo lo anterior llevó a una preservación de la función cardíaca, evaluada a las 2 y 15 semanas post-inyección. Al analizar la neovascularización, se observó que ésta fue consecuencia de procesos vasculogénicos por parte de las células inyectadas que se ubicaron exclusivamente en la zona infartada y angiogénicos por parte de las células del propio ratón en el borde de la zona isquémica [65]. Resultados comparables se obtuvieron en ratas utilizando la misma metodología de isquemia al miocardio, tratadas con una única dosis de hEPC de 7 días, 3 horas post-infarto. Luego de 28 días, se observó un aumento en la neovascularización del corazón isquémico, disminución de la fibrosis y conservación de la función cardíaca, con respecto a las ratas controles [66]. Por otro lado, la inyección de EPC directamente en el miocardio ha mostrado los mismos resultados en estudios en cerdos que recibieron tratamiento autólogo con células CD31⁺ y en ratones inyectados con células CD34⁺ obtenidas desde humanos [67].

En humanos, el aislamiento, cultivo *in vitro* y posterior re-infusión de hEPC es un procedimiento eficiente y seguro que no genera inflamación ni mayor daño isquémico en pacientes que han sufrido infarto agudo al miocardio (IAM) [68-70]. En el estudio TOPCARE-AMI (por sus siglas en inglés de *Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction*) se extrajo sangre periférica de pacientes, 24 horas post-infarto. Las células mononucleares obtenidas fueron cultivadas en medio suplementado con VEGF por 3 días e inyectadas al cuarto día en forma de infusión intracoronaria, por medio de un catéter en la arteria reperfundida [68]. En la evaluación a los 4 meses se observó una mejora en la función del ventrículo izquierdo (mayor fracción de eyección y reducción del volumen al término de la sístole) y en la función contráctil, y una disminución de la zona infartada en los pacientes tratados, sugiriendo una mejora en los procesos de remodelación post-infarto, comparado con pacientes que no recibieron hEPC [68, 69]. Lo anterior asociado a un restablecimiento del flujo normal de la arteria infartada y un aumento en la viabilidad del miocardio en el área isquémica [68]. Estos efectos favorables, tanto en la función ventricular como el área de la zona infartada, aumentaron aún más en un seguimiento a los 12 meses y luego de 5 años [70, 71]. De forma interesante, al evaluar la migración *in vitro* de las células de los pacientes tratados con hEPC (fracción obtenida antes de ser re-inyectadas), se determinó que la capacidad migratoria, y no el número de células utilizadas, es un predictor independiente de la reducción del área infartada y ésta a su vez se correlaciona con mejoras en la función del ventrículo izquierdo [69].

Los mecanismos por los cuales las EPC favorecen la funcionalidad del corazón infartado son difíciles de estudiar en pacientes; sin embargo, estudios en animales

sugieren que la neovascularización sería la responsable de preservar la función cardiaca [65, 66]. Para lo anterior, el número y la funcionalidad de las EPC son importantes [38, 69], por lo que la identificación de nuevos blancos que permitan mejorar estos parámetros *in vitro* es importante para optimizar los resultados observados hasta ahora en el tratamiento de IAM.

4. Rol del óxido nítrico en la funcionalidad de células progenitoras endoteliales

Se ha descrito que el NO juega un rol central en el número y función de las EPC. Así, la expresión de la eNOS es necesaria para la movilización de estas células desde la médula ósea [72], como se ha demostrado en ratones deficientes en eNOS estimulados con VEGF en comparación a los ratones *wild type*. Esto se debe a que la activación de MMP-9, por parte de VEGF en las células estromales de médula ósea, es dependiente de la síntesis de NO, por lo tanto la disminución de la expresión de la eNOS disminuye la liberación de los progenitores a circulación [72]. Por otro lado, se considera a la eNOS un marcador de los progenitores endoteliales, puesto que se expresa tanto en los estadios tempranos como tardíos de la diferenciación de hEPC [49, 53, 73]. Sin embargo, la actividad de esta enzima y la biodisponibilidad de NO son significativamente mayores en hEPC tardías (14 días) comparadas con hEPC tempranas (3 días), sin documentarse aún estos parámetros en estadios intermedios de diferenciación [53, 74]. Estímulos como el *shear stress* [75], las estatinas [76] y las HDL [77] son algunos de los factores que aumentan tanto la expresión de la eNOS como su funcionalidad, como se describirá en detalle más adelante.

La expresión de la eNOS y la síntesis de NO tienen repercusiones funcionales, pues en rEPC tempranas de 7 días, se describe una disminución de la proliferación, la capacidad angiogénica y la migración *in vitro* en presencia de L-nitroargininametiloéster (L-NAME), un inhibidor de la eNOS, en comparación con los controles no tratados [78]. Por otro lado, la dimetilarginina asimétrica (ADMA), inhibidor endógeno de la eNOS, disminuye la cantidad de unidades formadoras de colonias y la inclusión de hEPC tempranas a estructuras tipo capilares, efecto que se observa en pacientes con enfermedad coronaria, en los cuales la concentración de ADMA constituye un fuerte predictor independiente de la población de células CD34⁺ / CD133⁺ circulantes [79]. En concordancia con estos antecedentes, la sobre-expresión de la eNOS aumenta la proliferación y la síntesis de NO *in vitro* en rEPC de 7 días, disminuyendo la hiperplasia de la neoíntima y mejorando la vasodilatación dependiente de endotelio *in vivo* [80]. Por otro lado, en arterias de conejo cuyo endotelio es removido por el método del balón, muestran que el trasplante de EPC tempranas, que sobre-expresan eNOS, potencia el efecto de re-endotelización y la disminución de la hiperplasia de la íntima descrito para EPC [81], lo que demuestra el importante rol de la eNOS y del NO en la funcionalidad de estas células.

Con respecto a los posibles mecanismos llevados a cabo por el NO, se sabe que su principal vía de activación se relaciona con cGMP / PKG, además de la posible S-nitrosilación o S-glutacionilación de proteínas intracelulares, lo que lleva a diferentes efectos biológicos [8]. Específicamente en la angiogénesis, se ha descrito que el tratamiento de células de glioblastoma humano con moléculas dadoras de NO, como SNAP y NOR3, aumenta la expresión y la estabilidad del ARN mensajero de VEGF, de forma cGMP dependiente, e incrementado la expresión de esta proteína [82];

efectos que se condicen con estudios realizados en células de músculo liso de ratas donde la síntesis endógena de NO, a través de la sobre-expresión de la eNOS, aumenta tanto el ARN mensajero como la síntesis de VEGF [83]. Por lo tanto, NO podría estar actuando directamente en las EPC, sobre células endoteliales o del músculo liso, aumentando la secreción de citoquinas angiogénicas que podrían actuar de forma autocrina, paracrina y endocrina, favoreciendo el proceso de reparación endotelial.

5. Lipoproteínas de alta densidad, apolipoproteína A-I y EPC

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL, por su sigla en inglés *High Density Lipoproteins*) son un grupo heterogéneo de lipoproteínas con propiedades antiaterogénicas, que difieren en estructura, composición lipídica y actividad biológica [84]. Mediante ultra-centrifugación, con ajuste de densidad, es posible separar dos subpoblaciones: HDL₂ y HDL₃. Las primeras (densidad 1,063–1,125 g/mL) son más grandes, menos densas y enriquecidas en lípidos, y las HDL₃ (densidad 1,125–1,210 g/mL) son más pequeñas, densas y ricas en proteínas [85]. Las HDL maduras están compuestas en un 44-55% (% en masa) de apolipoproteínas, 26-32% de fosfolípidos, 15-20% de colesterol esterificado, 3-5% de colesterol libre y aproximadamente un 5% de triglicéridos [86]. Su rol anti-aterogénico ha sido clásicamente atribuido a su función central en el transporte reverso de colesterol, proceso por el cual los lípidos acumulados en los tejidos periféricos son transportados en el plasma hacia el hígado para su excreción [87]. Además del transporte reverso de colesterol, las HDL producen un efecto ateroprotector a través de acciones en el endotelio, como la inhibición de la expresión de moléculas de adhesión, aumento en la expresión de la eNOS y síntesis

de NO, aumento en la migración y proliferación de las células endoteliales y disminución de apoptosis frente a un estímulo citotóxico, entre otros [88].

La principal proteína de las HDL es la apolipoproteína A-I (apoA-I), que juega un rol fundamental en la biosíntesis de las HDL, en el transporte reverso de colesterol y en las propiedades anti-aterogénicas de esta lipoproteína [89, 90]. La apoA-I es una proteína codificada por el gen *APOA1* ubicado en el cromosoma 11q23-q24 en el humano y consta de 4 exones y 3 intrones [91]. Es sintetizada en hepatocitos como pre-pro-proteína, dentro del citoplasma es clivada de un péptido de 18 aminoácidos y es secretada como pro-apoA-I [92]. En circulación, por acción de diferentes enzimas, pierde un péptido de 6 aminoácidos, convirtiéndose en la proteína madura de 243 aminoácidos y 28 kDa [92, 93]. La apoA-I madura presenta 10 dominios anfipáticos dispuestos en α -hélices anti-paralelas: 8 de 22 aminoácidos cada una y 2 de 11 residuos [94]. Estas α -hélices son importantes para la interacción de apoA-I con lípidos y receptores, destacándose las α -hélices comprendidas entre los aminoácidos 44-65 y 210-241 como las de mayor afinidad a lípidos e importantes para las primeras interacciones con éstos [93, 95]. Además de la síntesis hepática, que contribuye con alrededor del 70 % de apoA-I plasmática, esta proteína es sintetizada por el intestino (cerca del 30%) [96], deriva también de la remodelación metabólica de HDL maduras [97] y de la hidrólisis de lipoproteínas ricas en triglicéridos por la lipoprotein lipasa [98]. En circulación sanguínea, la apoA-I se encuentra mayormente unida a HDL (cerca del 90%), y entre un 5-10% está presente a la forma libre de lípidos o muy pobremente lipidada [97]. Si bien esta fracción es muy pequeña, se ha demostrado que genera efectos benéficos ateroprotectores al igual que las HDL [34, 99]

El transporte reverso de colesterol (figura 4) comienza con la interacción de apoA-I con el receptor *ATP binding cassette* subfamilia A tipo I (ABCA1). Esta unión produce el eflujo de fosfolípidos y colesterol no esterificado hacia la apoA-I, generando apoA-I pobremente lipidada que da origen a HDL nacientes o pre- β HDL [100]. Esta partícula discoidal es sustrato para la enzima lecitina colesterol acetiltransferasa (LCAT) que esterifica el colesterol libre, generando el *core* hidrofóbico necesario para formar las HDL esféricas [89, 101]. Para esta esterificación es necesaria la presencia de apoA-I en las HDL, ya que es el principal activador fisiológico de LCAT [100]. El eflujo de colesterol y fosfolípidos desde los diferentes tejidos, incluida la pared vascular, hacia las HDL ocurre principalmente vía *ATP-binding cassette* subfamilia G tipo I (ABCG1) [89]. En el humano, los ésteres de colesterol y el colesterol no esterificado pasan de las HDL al hígado, para su excreción, por dos vías: la directa y la indirecta. La primera es a través de la interacción de las HDL con el receptor *scavenger* clase B tipo I (SR-BI) y a través de la endocitosis de holopartículas de HDL por el receptor ecto-F₁-ATPasa; y la indirecta, a través del traspaso de colesterol desde las HDL a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL), lo cual es facilitado por la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP por su sigla en inglés). Estas lipoproteínas son posteriormente captadas por el hígado a través del receptor de LDL [102, 103].

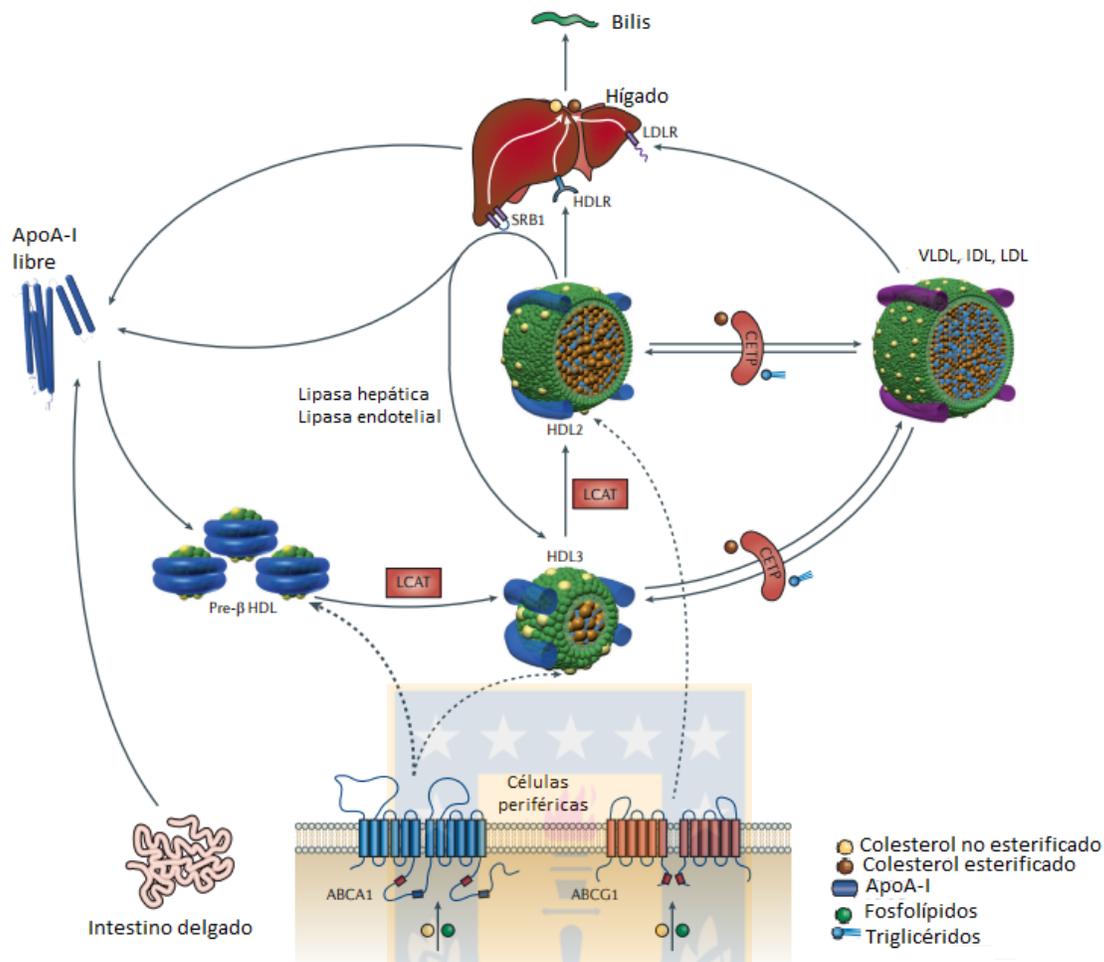


Figura 4. Transporte reverso de colesterol. La apoA-I, primer eslabón del transporte reverso de colesterol, es secretada por el intestino delgado y el hígado, además es generada por el remodelamiento de lipoproteínas en circulación. La apoA-I, a través de la interacción con ATP-binding cassette subfamilia A tipo I (ABCA1), comienza a captar colesterol no esterificado y fosfolípidos efluídos desde tejidos periféricos, formando la pre-β- HDL. El colesterol libre contenido en estas lipoproteínas es esterificado por acción de lecitina colesterol acetiltransferasa (LCAT), generando partículas esféricas. Estas HDL aceptan colesterol no esterificado y fosfolípidos a través de la interacción con ATP-binding cassette subfamilia G tipo 1 (ABCG1). El colesterol llega al hígado a través de la interacción de HDL con el receptor scavenger clase B tipo I (SR-BI), con el receptor ecto-F₁-ATPasa (HDLR) que media la endocitosis de holopartículas de HDL, y a través del traspaso de colesterol esterificado a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de intermedia densidad (IDL) o lipoproteínas de baja densidad (LDL), vía proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), y su posterior interacción con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLr). Modificado de [102].

Además de la participación central en el transporte reverso de colesterol, la apoA-I y las HDL producen efectos benéficos a nivel de endotelio y en EPC. Estos aspectos se revisarán a continuación.

5.1 Efectos de HDL y apoA-I sobre el endotelio

Los niveles elevados de HDL han sido ampliamente relacionados con efectos anti-inflamatorios y anti-oxidantes sobre el endotelio [104, 105], que se basan en: la inhibición de la expresión de moléculas de adhesión, el aumento de la actividad de la eNOS [106], la estabilización de esta proteína [107], el aumento en la migración de células endoteliales [90] y la síntesis de PGI₂ [108]. Se ha demostrado que apoA-I libre también se relaciona con efectos protectores en el endotelio, que promueven la re-*endotelización* y el retardo en el desarrollo de aterosclerosis [90, 109]. Ensayos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que apoA-I aumenta la actividad de la eNOS en células endoteliales, acción que se correlaciona con un aumento en la fosforilación en el residuo activador ser-1177 [110].

5.2 Efectos de HDL y apoA-I en las EPC

El *pool* de EPC circulantes es dinámico y responde a la presencia de factores endógenos y exógenos, los que pueden favorecer o disminuir el número y función de estas células como ya se describió [55].

Con respecto a las HDL, se han descrito diferentes efectos sobre la población de EPC. Por un lado se ha reportado que estas lipoproteínas aumentan tanto el ARN mensajero como la proteína eNOS en hEPC tempranas de 7 días, utilizando diferentes concentraciones de HDL (10-1000 µg/mL) y tiempos de tratamiento (desde 24 horas

a 7 días) [111, 112]. Con respecto a la funcionalidad de estas células, en ensayos *in vitro* realizados con hEPC de 7 días, se observa que HDL 50 µg/mL revierte a niveles basales la actividad de caspasa-3, luego del tratamiento con homocisteína como inductor de la apoptosis [112]. Estudios realizados en rEPC de 7 días, muestran que HDL (37,5 µg/mL) aumenta la proliferación, la migración y formación de estructuras tipo capilares, entre un 70 y 80%, luego de 8 horas de tratamiento [113], observándose resultados comparables en hEPC de 7 días [111]. Estos efectos fueron completamente revertidos al utilizar inhibidores de PI3K y Akt, sugiriendo la contribución de esta vía de señalización [113]. Además, se ha demostrado en rEPC de 7 días tratadas con HDL (100 µg/mL) incrementa la migración de estas células de forma NO y *extracellular signal-regulated kinases* (ERK) dependiente [77].

Los resultados obtenidos *in vitro* con HDL se relacionan con efectos *in vivo*. En un estudio realizado por Noor y col, que consideró pacientes con enfermedad cerebrovascular y sujetos control, se evaluó la relación entre diferentes factores de riesgo y el número de colonias de hEPC. Se observó que la concentración de HDL fue un predictor independiente del número de hEPC en estos sujetos [112]. Por otro lado, estudios en ratones alimentados con una dieta rica en colesterol, muestran una disminución de alrededor del 50% en la población Flk-1 (KDR en humanos) y CD34⁺ en circulación, correspondiente a EPC tempranas, con respecto a los ratones tratados con dieta normal. Al cultivar las rEPC se observó una menor expresión de la eNOS en los ratones con dieta hipercolesterolémica con respecto a los ratones control (-40%). Luego de 3 inyecciones intravenosas de HDL humana (18 mg/kg), en un lapso de 32 horas, se observó que el recuento de células Flk-1⁺ / CD34⁺ y la expresión de la eNOS aumentaron significativamente en ratones con dieta rica en colesterol, igualando los

valores correspondientes en ratones con dieta normal [113]. En complemento a estos experimentos, un grupo de animales hipercolesterolémicos fue sometido a una abrasión mecánica del endotelio, utilizando la metodología del balón. En ellos se observó que la proporción íntima/media aumentaba significativamente con respecto a ratones normolipémicos. Este efecto fue revertido al tratar a estos animales hipercolesterolémicos con inyecciones de HDL, como se describió anteriormente [113]. Por otro lado, en ratones apoE^{-/-}, un modelo de aterosclerosis, la administración intravenosa de lipopolisacáridos (LPS) como agente injuriante del endotelio, produce un aumento en células Sca-1⁺ / c-kit⁺ / flk-1⁺ en el endotelio de la aorta, indicando la presencia de progenitores endoteliales a las 18 horas post-inyección, consistente con un proceso de reparación endotelial. Luego de una inyección de HDL reconstituida (rHDL), 10 mg apoA-I/kg, cuya única apolipoproteína es apoA-I y cuyo único componente lipídico es 1-palmitoil-2-oleoil fosfatidilcolina, se observa un aumento de la presencia de células Sca-1⁺ desde un 35 ± 8% a un 79 ± 7% en el endotelio de la aorta. Este efecto se correlacionó con una disminución de estas células en circulación sanguínea, sugiriendo que las HDL y la apoA-I favorecen el reclutamiento de EPC en sitios de injuria [114].

En relación a la apoA-I libre de lípidos, existen antecedentes en literatura que sugieren que esta apoproteína ejerce efectos positivos sobre el número y la funcionalidad de las EPC. Pacientes con diabetes mellitus tipo 2, tratados con 80 mg/kg de rHDL (compuesta de apoA-I y fosfatidilcolina en proporción 1:150) mostraron un aumento significativo en la población de células CD34⁺ / KDR⁺ (desde 480 ± 85 a 1060 ± 347 células por mL de sangre), luego de 7 post-tratamiento lo que estaría sugiriendo un efecto de apoA-I en el aumento de esta población celular, ya sea por

aumento en el reclutamiento desde médula ósea o por aumento de la supervivencia de estas células [115]. Ensayos *in vitro* muestran que hEPC de 3 días, tratadas con apoA-I libre (50 µg/mL), extraída desde donantes sanos, aumentan la proliferación (+14,5%) y potencia el efecto angiogénico de estas células (+30%) [116], mostrando el rol importante que jugaría esta apoproteína en parámetros funcionales de las EPC.

Como una estrategia farmacológica para imitar las propiedades anti-inflamatorias y anti-aterogénicas descritas para apoA-I, se han sintetizado diferentes péptidos miméticos de esta proteína, que están basados en la conformación de α -hélice anfipática clase A y sus propiedades [117, 118]. Entre estos péptidos, uno de los más estudiados es el D-4F, que está formado por 18 de los 22 aminoácidos que constituyen la α -hélice clase A en la proteína nativa; en esta secuencia fueron incluidos 4 residuos de fenilalaninas (F) en la cara no polar de la α -hélice, todos estos residuos de conformación D [118]. La primera evidencia *in vivo* de la capacidad anti-aterogénica de D-4F fue documentada por Navab y col [119], quienes demostraron que la administración oral de este péptido en un modelo murino de aterogénesis (LDL R^{-/-}), disminuye en un 75% el área de las lesiones ateroscleróticas, con respecto a los ratones que no recibieron tratamiento, sin observar diferencia significativa en los niveles plasmáticos de HDL. Desde entonces, una serie de estudios avalan las propiedades antiaterogénicas de estos péptidos, en especial D-4F.

Específicamente en hEPC, Zhang y col [120] demostraron que D-4F (25 µg/mL) aumenta la proliferación (+100%), la migración (+150%) y la adhesión (+250%) de hEPC de 7 días, y que estos efectos son revertidos al inhibir la actividad de la eNOS con L-NAME. Además, D-4F aumenta la síntesis de NO, la expresión de la eNOS y su

fosforilación en el residuo ser-1177, luego de 24 horas de incubación, sugiriendo que la mayor funcionalidad de las hEPC observada en respuesta a D-4F dependería de la síntesis de NO [120]. Estudios posteriores en rEPC tardías tratadas con un mimético de apoA-I de secuencia reversa a D-4F (50 µg/mL) demostraron que la proliferación, migración, formación de estructuras tipo capilares y síntesis de NO es realizado vía PI3K / Akt / eNOS / NO [121]. Al tratar las hEPC con un anticuerpo neutralizante para SR-BI, se observa una disminución parcial de los efectos de D-4F en la migración [120], sugiriendo la participación de éste y otros receptores en estos efectos.

6. EPC y receptores de HDL y apoA-I

Si bien en literatura los efectos de apoA-I y HDL en las EPC están documentados, existe escasa evidencia que relacione receptores, transportadores, enzimas, u otras moléculas con estos efectos. En células endoteliales maduras, existen antecedentes de receptores para HDL y apoA-I que median diferentes acciones y es probable que alguno(s) de ellos fuera el responsable en los efectos descritos en las EPC. A continuación se describirán brevemente los receptores de apoA-I expresados en células endoteliales y EPC, y las evidencias en la literatura que puedan vincularlos a los efectos protectores de HDL y apoA-I en estas últimas células.

6.1 Receptor *scavenger* clase B tipo I

El receptor *scavenger* clase B tipo 1 (SR-BI) corresponde a una glicoproteína de 509 aminoácidos y de aproximadamente 82 kDa, cuyo gen se ubica en el brazo largo del cromosoma 12, contiene 13 exones y 12 intrones [122]. La proteína madura

consta de dos dominios transmembrana, 2 dominios citoplasmáticos (N y C terminal) y un *loop* extracelular que contiene múltiples sitios para N-glicosilación [123]. Está expresado en varios tipos celulares (macrófagos, células endoteliales, plaquetas entre otros), destacando en hígado y células esteroideogénicas [124]. SR-BI une diferentes ligandos, como fosfolípidos aniónicos, LDL modificadas y nativas, HDL y células apoptóticas [125], sin embargo su principal función se asocia a la capacidad de captar selectivamente ésteres de colesterol desde las HDL en el hígado y de mediar el paso de colesterol libre y fosfolípidos desde las células periféricas hacia las HDL. El flujo de colesterol consta de 3 pasos: interacción de la lipoproteína rica en ésteres de colesterol con el *loop* extracelular de SR-BI, transferencia de lípidos a la membrana y liberación de la lipoproteína, ahora pobre en colesterol, hacia la circulación [124]. La interacción entre las HDL y SR-BI se lleva a cabo gracias a las α hélices de apoA-I [126], lo que da acceso a un 'canal' o 'túnel' por el cual difunden, a favor de gradiente, las moléculas de colesterol esterificado [127, 128]. La interacción de HDL con SR-BI en los hepatocitos, es uno de los mecanismos por el que las HDL generan ateroprotección, ya que forma parte del último paso del transporte reverso de colesterol [125].

En células endoteliales SR-BI se ubica en las cavéolas [129]. Este receptor, junto con ABCG1 y ecto-F₁-ATPasa, participa en la unión y transcitosis de las HDL a través del endotelio [130, 131] y estimula la expresión de la eNOS, en células de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) sometidas a *shear stress* [132]. Además, HDL mediante la interacción con SR-BI, aumentan la actividad de la eNOS en cultivos celulares y la vasodilatación en ensayos de reactividad vascular en aorta de ratón [106]. La vía de señalización involucrada corresponde a PI3K que induce la activación

paralela, de Akt y *mitogen-activated protein kinases* (MAPK), las cuales fosforilan a la eNOS en el residuo ser-1177 [133]. Esta activación tiene repercusiones funcionales, demostradas en células endoteliales de aorta de bovino (BAEC) estimuladas con HDL. A través de su interacción con SR-BI, HDL aumenta la migración *in vitro* de forma NO dependiente, vía activación de PIK3 y MAPK [90]. Por otro lado, en células endoteliales humanas inmortalizadas (ECV-304), la unión de HDL con SR-BI promueve la liberación de PGI₂ y la expresión de la ciclooxigenasa 2, vía PI3K / Akt / eNOS [108].

Con respecto a las EPC, se ha descrito la presencia de SR-BI en células cultivadas por 4 días [77]. Estudios realizados en rEPC de 7 días obtenidas desde médula ósea de ratones *wild type* y SR-BI^{-/-} muestran que, frente al estímulo de HDL, hay un aumento en la migración y la biodisponibilidad de NO en las células *wild type*, no así en las rEPC SR-BI^{-/-} [77]. Los efectos observados en células *wild type* fueron completamente revertidos al inhibir la eNOS y la vía de las ERK, determinando que HDL ejercería sus efectos a través de esta señalización, corriente abajo de SR-BI [77]. Por otro lado, en hEPC de 7 días, se ha observado que D-4F aumenta la migración celular, efecto que disminuye parcialmente al inhibir SR-BI con un anticuerpo neutralizante [120]. Asimismo, en hEPC de 3 días, el efecto angiogénico generado por apoA-I libre depende parcialmente de SR-BI [116]. Si bien apoA-I libre no es buen ligando de SR-BI, la lipidación de esta apoproteína (o mimético) con suero disponible en el medio de cultivo o con lípidos de membrana plasmática explicaría estos resultados [116, 120]

6.2 Transportador *ATP-binding cassette* subfamilia A miembro 1

Este transportador, denominado ABCA1, es una proteína de membrana codificada por el gen *ABCA1*, ubicado en el cromosoma 9 en el humano, el cual contiene 50 exones y 49 intrones [134]. La proteína madura la constituyen 2.261 aminoácidos, distribuidos en 12 dominios transmembrana de α -hélices, 2 dominios de unión a nucleótidos intracelulares y 2 grandes *loops* extracelulares [135]. ABCA1 forma parte de la superfamilia de transportadores *ATP-binding cassette* (ABC) que requieren ATP para transportar metabolitos a través de la membrana [136]. ABCA1 está ampliamente expresado en el organismo, destacándose en hígado, placenta, pulmones e intestino delgado [137]. Su principal función es promover el eflujo de colesterol, fosfolípidos y otras moléculas lipofílicas hacia apoproteínas pobremente lipidadas (apoA-I, apoA-II, entre otras), pero no hacia HDL maduras [138]. Estudios han demostrado que las hélices anfipáticas de estas apoproteínas son el principal motivo de interacción con ABCA1 [137, 139].

Con respecto a otras funciones en el endotelio, se ha descrito que ABCA1 jugaría un rol en la transición endotelio-mesenquimal, proceso que está involucrado en la progresión de la aterosclerosis [140]. Este cambio en el fenotipo tiene repercusiones funcionales, ya que se observa una disminución en la angiogénesis *in vitro* generada por estas células [141]. Estos efectos son revertidos completamente al co-incubar las células endoteliales con apoA-I recombinante humana (50 $\mu\text{g/mL}$), describiéndose una inhibición en la vía de señalización del factor de crecimiento transformante β 1, principal citoquina involucrada en el inicio de la transición endotelio-mesenquimal [141]. Esta inhibición producida por apoA-I, se pierde cuando las células

son tratadas con un siRNA para ABCA1, demostrando la participación de este transportador en este proceso [141]. Por otra parte, estudios realizados en células endoteliales de arteria coronaria humana con el mimético de apoA-I 5A reconstituido con 1-palmitoil-2-linoleoil fosfatidilcolilina muestran que este péptido (1 mg/mL) disminuye la expresión de las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 y la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS), inducidos por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). Estos efectos no son detectados en células *knock down* para ABCA1 [142]. Estos resultados se correlacionan con estudios realizados en HUVEC, en las cuales el mimético de apoA-I, D-4F (20 μ g/mL), inhibe la expresión de moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1, y la apoptosis generada por LDL-ox, además de aumentar la proliferación y migración de HUVEC a través de la vía PI3K / Akt y MAPK y la síntesis de NO. Estos efectos son abolidos en células silenciadas para ABCA1 [143]. Por lo tanto, estos hallazgos indican que ABCA1 participa en los efectos protectores generados por apoA-I y sus miméticos a nivel endotelial, los cuales serían mediados por la síntesis de NO.

A pesar de lo descrito en células endoteliales, la presencia de este transportador aún no ha sido demostrada en ningún estadio de maduración de EPC, por lo tanto, hasta el momento, su participación en los parámetros de funcionalidad de estas células no ha sido evaluada.

6.3 Ecto-F₁-ATPasa

La ecto-F₁-ATPasa es una entidad similar a la ATP sintasa mitocondrial, expresada de manera ectópica en la membrana celular, cuya actividad ha sido relacionada con la función endotelial.

La ATP sintasa es un complejo proteico localizado en la membrana interna de la mitocondria en células eucariontes, en la membrana del tilacoide en el cloroplasto y en algunas bacterias [144], y corresponde al último complejo de la cadena transportadora de electrones. La ATP sintasa está compuesta por dos dominios, F_1 y F_0 , que en total conforman 16 sub-unidades. F_1 es el dominio catalítico, encargado de la síntesis de ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico (P_i) y está formado por 3 heterodímeros $\alpha\beta$ y las sub-unidades γ , δ y ϵ . El dominio F_0 corresponde a un canal de protones de membrana, que sostiene a F_1 , y que utiliza el gradiente de protones generado por los demás complejos de la cadena respiratoria como motor biológico para cambiar la conformación de los heterodímeros $\alpha\beta$, lo que lleva a la síntesis de ATP. F_0 está conformado por las sub-unidades a, e, f, g, A6L, b, F6, d y OSCP (figura 5) [145]. Frente a un colapso del gradiente electroquímico en el espacio intermembrana, por ejemplo en hipoxia, la ATP sintasa mitocondrial cambia su actividad catalítica hacia la hidrólisis de ATP en ADP y P_i . Para evitar la pérdida de ATP, la proteína endógena denominada factor inhibidor 1 (IF_1 por su sigla en inglés) censa la caída de pH y cambia su estructura tetramérica a dimérica, que le permite interactuar con los heterodímeros $\alpha\beta$, en presencia de ATP, inhibiendo la actividad hidrolasa cerca de un 85-90% en condiciones óptimas de pH= 6,5 [146-148].

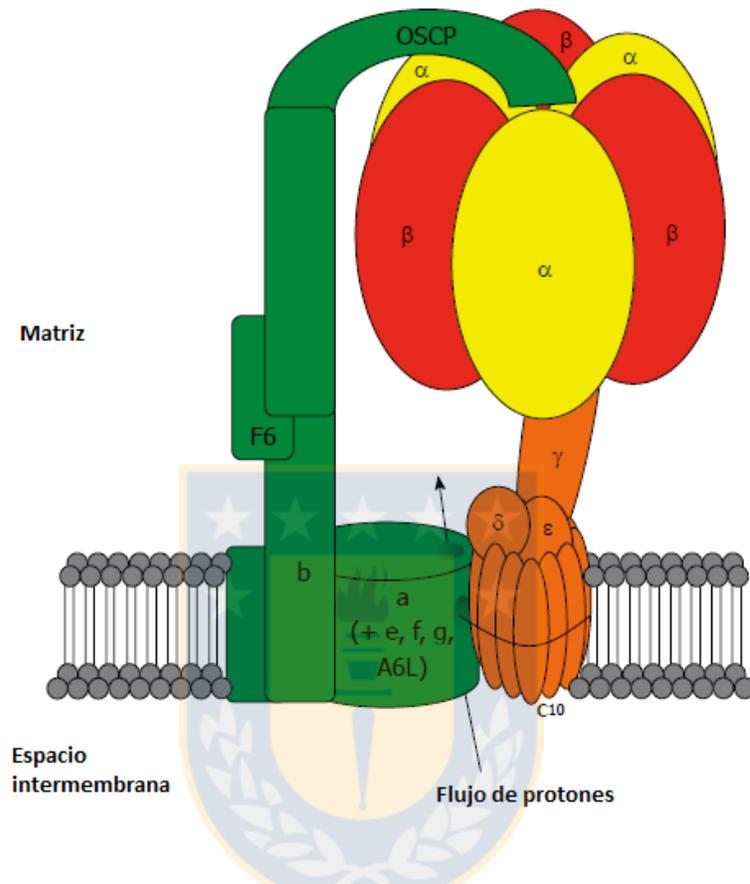


Figura 5. Estructura de la ATP sintasa. En las células eucariotas, F₁F₀ ATP sintasa es un complejo proteico compuesto por 16 sub-unidades, formando dos dominios. F₁ es el dominio catalítico y está conformado por las subunidades α y β (rojo y amarillo), y las subunidades γ, δ y ε (anaranjado). Fo está constituido por las sub-unidades a, e, f, g, A6L, b, F6, d y OSCP (verde) y corresponde a un canal de protones que ancla al dominio F₁ a la membrana. Modificado de [145]

En 1999, Moser *y col* describieron un sitio de unión de la angioestatina, en la superficie de células endoteliales HUVEC, que correspondió a la subunidad $\alpha\beta$ de la ATP sintasa [149]. Posteriormente, en la superficie de células HUVEC y en hepatocitos humanos inmortalizados, se ha descrito el dominio F_1 de la ATP sintasa, la cual genera ADP extracelular a partir de la hidrólisis de ATP, motivo por el cual este complejo se denominó [150, 151]. La actividad hidrolasa descrita se ve aumentada frente al ligando de ecto- F_1 -ATPasa, apoA-I, e inhibida por IF1 [150, 151]. La expresión ectópica de este receptor ha sido establecida en varios tipos celulares, como por ejemplo en queratinocitos [152], y en adipocitos [153], en ambos casos describiéndose una actividad ATP sintasa. En líneas celulares de cáncer, ecto- F_1 -ATPasa ha ido relacionada con la citotoxicidad mediada por linfocitos [154], y en hepatocitos, donde juega un rol central en la endocitosis de HDL. A este respecto, se describe que apoA-I interacciona con ecto- F_1 -ATPasa presente en la superficie de hepatocitos, estimulando la producción extracelular de ADP, el cual interacciona específicamente con el receptor purinérgico $P2Y_{13}$. Esta interacción genera la activación de la GTPasa RhoA y ROCK1, llevando a una reorganización del citoesqueleto y a la endocitosis de las HDL a través de un receptor de baja afinidad aún no identificado [103, 150]. Esto constituye uno de los últimos pasos del transporte reverso de colesterol, lo que nos indica que este receptor participa en el eflujo de colesterol para su excreción.

En el endotelio, ecto- F_1 -ATPasa cumple funciones centrales, ya que se ha descrito que media la transcitosis de HDL y apoA-I a través del endotelio [131] y, en respuesta a su ligando apoA-I, disminuye la apoptosis y promueve la proliferación celular [151]. Además, estudios realizados en nuestro laboratorio, han mostrado que el tratamiento de células HUVEC con apoA-I aumenta la actividad de la eNOS, efecto

que es revertido por inhibidores de ecto-F₁-ATPasa, como son IF₁ y oligomicina, pero no por el bloqueo de SR-BI ni ABCA1 [155]. Estudios posteriores demostraron que en el aumento de la actividad de la eNOS, generado por apoA-I vía ecto-F₁-ATPasa, estaría involucrada la vía de señalización PI3K / Akt y MAPK (ERK1/2) [110]. Estos resultados se correlacionan con hallazgos *ex vivo* donde se describe, en ensayos de miografía, que la vasodilatación dependiente de endotelio (vía NO) es a través de ecto-F₁-ATPasa [156].

En hEPC tempranas, la única evidencia de ecto-F₁-ATPasa fue generada por nuestro grupo de investigación, demostrando su expresión en la superficie celular, a los 3 días de cultivo. En estos ensayos, la incubación con apoA-I (50 µg/mL) genera un aumento de alrededor del 30% en la formación de estructuras tipo capilares y de 14% en la proliferación [116]. La angiogénesis *in vitro* disminuye significativamente en células tratadas con IF₁, con oligomicina y con un inhibidor de SR-BI (BLT-1), mientras la proliferación de hEPC sólo es revertida por inhibidores de ecto-F₁-ATPasa [116]. Estos resultados demuestran que ecto-F₁-ATPasa juega un rol central en los efectos protectores producidos por apoA-I en hEPC tempranas, y sugiere la lipidación parcial de apoA-I en estos ensayos, lo que explicaría la participación parcial de SR-BI. Sin embargo, no se conocen los mecanismos por los cuales ecto-F₁-ATPasa promueve los efectos biológicos descritos.

Por los resultados expuestos, es posible postular que ecto-F₁-ATPasa constituiría un nuevo regulador de la función de hEPC tempranas. Además, según los antecedentes obtenidos en células endoteliales HUVEC, los efectos observados en hEPC tempranas podrían depender de la síntesis de NO. La identificación de la vía

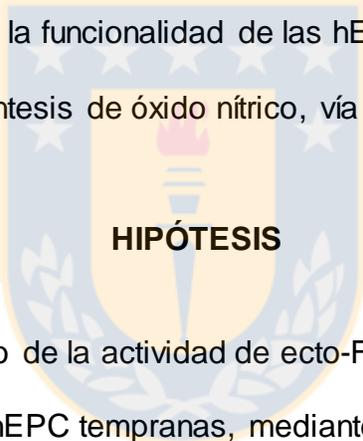
ecto-F₁-ATPasa / NO como un modulador positivo de la población de hEPC tempranas, podría traer beneficios a diferentes niveles: por un lado potenciar la funcionalidad de las mismas hEPC, a través del aumento de secreción de citoquinas angiogénicas y su diferenciación a progenitores tardíos capaces de incluirse en nichos de neovascularización o de re-endotelización y por otro lado, favorecer la función endotelial mediante la liberación de citoquinas y NO. Estos resultados contribuirían al conocimiento para proponer nuevos blancos terapéuticos que permitan desarrollar terapias alternativas al tratamiento de enfermedades de alta prevalencia en nuestra población, como es la ECV y en particular la terapia post-IAM.



PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Se ha documentado que apoA-I promueve la proliferación y formación de estructuras tipo capilares en hEPC tempranas, a través de la actividad de ecto-F₁-ATPasa. Este receptor ha sido relacionado a un aumento de la síntesis de NO en modelos de células endoteliales humanas maduras. Por otro lado, se ha reportado que el tratamiento de EPC con miméticos de apoA-I aumenta la funcionalidad de estas células vía síntesis de NO. Por lo anterior, surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Dependerá el aumento de la funcionalidad de las hEPC tempranas, generada por apoA-I, de la síntesis de óxido nítrico, vía ecto-F₁-ATPasa?



HIPÓTESIS

ApoA-I produce un aumento de la actividad de ecto-F₁-ATPasa, lo que genera una mayor funcionalidad de las hEPC tempranas, mediante un aumento de la síntesis de óxido nítrico.

OBJETIVO GENERAL

Establecer si el receptor ecto-F₁-ATPasa, en respuesta a apoA-I, promueve parámetros de funcionalidad en hEPC tempranas, a través de la síntesis de óxido nítrico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Determinar el efecto de apoA-I en la proliferación y angiogénesis mediada por hEPC tempranas.

En este objetivo se determinará el efecto de concentraciones fisiológicas apoA-I sobre la proliferación (cuantificada por el reactivo Metil-Tiazol-Tetrazol, MTT) y la angiogénesis *in vitro* (determinada en ensayos de Matrigel), utilizando distintos tiempos de incubación. Estos experimentos permitirán establecer las condiciones bajo las cuales apoA-I genera mayor efecto en estos parámetros, las que serán utilizadas en los ensayos con inhibidores del siguiente objetivo.

2.- Determinar si el efecto de apoA-I observado en la proliferación y la angiogénesis mediada por hEPC tempranas, depende de la síntesis de óxido nítrico y del receptor ecto-F₁-ATPasa.

Para esto se utilizarán inhibidores de la eNOS y de ecto-F₁-ATPasa, con el fin de evaluar si éstos disminuyen el efecto producido por apoA-I en la proliferación y la angiogénesis. Además, se evaluará la participación de otros receptores de apoA-I, como son SR-BI y ABCA1, mediante el uso de un inhibidor específico y un anticuerpo neutralizante, respectivamente.

3.- Establecer el efecto de apoA-I sobre la síntesis de óxido nítrico en hEPC temprana.

Se determinará el efecto de concentraciones fisiológicas de apoA-I en la actividad de la eNOS, a través de la conversión de L-[³H]-citrulina a partir de L-[³H]-arginina, y la biodisponibilidad de NO, utilizando la sonda 4-Amino-5-Metilamino-2',7'-

Difluorofluoreceína Diacetate, DAF-FM-DA. La condición que genere mayor efecto en la síntesis de NO será utilizada en los ensayos con inhibidores del siguiente objetivo.

4.- Establecer si el efecto de apoA-I sobre la síntesis de óxido nítrico depende del receptor ecto-F₁-ATPasa en hEPC tempranas.

Se utilizarán inhibidores de ecto-F₁-ATPasa para evaluar si éstos disminuyen el efecto de apoA-I en la actividad de la eNOS y la biodisponibilidad de NO. Asimismo se evaluará la participación de SR-BI y ABCA1 como se señaló en el objetivo específico 2.



MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de HDL

Las HDL fueron aisladas desde plasma humano, mediante el método de ultracentrifugación con ajuste de densidad [157]. Para ello se obtuvieron muestras de sangre venosa de voluntarios sanos, normolipémicos y normoglicémicos en ayuno, entre 20 y 28 años de edad, previa firma de consentimiento informado (anexo1). Estos procedimientos fueron realizados en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, y contaron con la aprobación del Comité de Ética de esta casa de estudios. Las muestras fueron recolectadas utilizando EDTA 1 mg/mL como anticoagulante, y se centrifugaron a 1.000 x g por 20 minutos para obtener un *pool* de plasmas. Éste fue centrifugado a 145.000 x g por 20 horas para la obtención de las VLDL. La densidad del infranadante fue ajustada a 1,063 g/mL con bromuro de potasio (KBr), para ser centrifugado bajo las mismas condiciones y obtener las LDL. Posteriormente, la densidad del infranadante fue ajustada a 1,210 g/mL con KBr y se centrifugó a 185.000 x g por 48 horas para aislar las HDL. Esta fracción fue retirada y dializada frente a tampón fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4. Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Lowry modificado (Pierce BCA Thermo Scientific), la pureza de las HDL fue verificada mediante electroforesis en gel denaturante (SDS-PAGE) al 12%. Las muestras de HDL fueron almacenadas bajo atmósfera de N₂ en oscuridad a 4°C.

Obtención de apoA-I

Las HDL fueron delipidadas según ha sido descrito [158]. Para ello, 1 mL de HDL fue tratado con una mezcla fría de 30 mL de metanol/cloroformo en una proporción de 1:1, agitadas por 30 minutos a 4°C y centrifugada a 3.300 x g por 20 minutos a 4°C. El precipitado obtenido fue lavado en una mezcla fresca de metanol/cloroformo, seguido de una centrifugación, aumentando la proporción de metanol, para precipitar las proteínas. Se repitió el proceso una vez más y el precipitado fue secado con corriente de N₂ a temperatura ambiente. Las proteínas fueron resuspendidas en el volumen mínimo de tampón bicarbonato 10 mM pH 8,0, para su posterior cuantificación por el método de Lowry modificado (Pierce BCA Thermo Scientific).

ApoA-I fue aislada mediante elución desde gel de acrilamida, utilizando la metodología descrita por Brace y col [159], con algunas modificaciones. Brevemente, el *pool* de proteínas obtenidas desde las HDL se sometió a una electroforesis en gel SDS-PAGE 12%. Uno de los carriles fue cortado y teñido con azul de Coomassie, para la visualización de apoA-I, y se utilizó como patrón de migración para cortar los demás carriles del gel. La fracción obtenida fue eluida toda la noche en 10 mL de agua destilada, dializada frente a PBS 10 mM pH 7,4 y finalmente contra tampón bicarbonato 10 mM, pH 8,0. La solución de apoA-I fue concentrada con polietilenglicol de peso molecular mayor a 20.000 g/mol (Merck), para su posterior cuantificación por el método BCA. La verificación de la obtención de apoA-I se realizó a través de gel SDS-PAGE 12%.

Obtención y cultivo hEPC

Las hEPC fueron aisladas desde sangre venosa de voluntarios sanos (20-28 años), normolipémicos y normoglicémicos, según el protocolo de Asahara y col [47], previa encuesta de salud y firma de consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Concepción (anexo 1). Desde cada donante se obtuvieron 50 mL de sangre que fueron diluidos en relación 1:1 en tampón PBS 10 mM, pH 7,4 suplementado con EDTA 5 mM. 25 mL de esta mezcla fueron distribuidos en tubos cónicos que contenían 10 mL de medio separador de linfocitos (Corning). Éstos fueron centrifugados por 45 minutos a 400 x g a 4°C, para separar las fases mediante gradiente de densidad, lo que permitió obtener las PBMC con las que se formó un *pool* por cada donante. Éste fue lavado 2 veces con PBS 10 mM pH 7,4 y luego con medio para EPC (medio M-199 suplementado con 30% suero fetal bovino, SFB). El *pellet* celular fue resuspendido en medio para EPC suplementado con VEGF 20 ng/mL y fue distribuido en placas de 100 mm recubiertas con fibronectina. El medio de cultivo fue reemplazado cada 3 días por medio fresco.

Ensayos de proliferación

Las hEPC de 5 días de cultivo fueron recuperadas con tripsina / EDTA. El recuento celular fue realizado mediante observación al microscopio óptico, utilizando Azul de Tripán. Las células fueron distribuidas en placas de 96 pocillos recubiertos con fibronectina (50.000 células por pocillo), en medio EPC con VEGF. Transcurridas 48 horas, el medio fue reemplazado por medio EPC 10% SFB sin VEGF e incubado por 24 horas en condiciones estándar. Las células fueron tratadas con apoA-I (10-100

$\mu\text{g/mL}$) por 24, 48 y 72 horas, luego se agregó 10 μL de bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (MTT, Thermofisher) en concentración 12 mM, siendo incubadas por 4 horas más.

La cantidad de células metabólicamente activas es proporcional al número de cristales de formazán formados y éstos, al ser disueltos con DMSO, colorean el medio permitiendo su cuantificación por absorbancia a 540 nm [160], lo cual fue realizado en un fotómetro Synergy 2, Biotek.

Ensayos de angiogénesis *in vitro*

La angiogénesis fue evaluada *in vitro*, utilizando el método de Matrigel (Corning), según lo descrito previamente [116]. El Matrigel fue distribuido en placas de 96 pocillos (25 μL por pocillo) e incubado a 37°C por 30 minutos. Luego, se agregó hEPC de 7 días (10.000) y células ECV-304 (20.000) en cada pocillo, en medio EPC 10% SFB. Inmediatamente, se adicionó apoA-I (50-200 $\mu\text{g/mL}$) y se incubó por 4, 6 y 8 horas, obteniéndose fotografías digitales de la formación de estructura tipo capilares. Los análisis fueron realizados con el *software ImageJ*, cuantificando los parámetros de: área, longitud y número de ramificaciones de las estructuras formadas. Cuando fue necesario, los inhibidores: L-NAME (100 μM), oligomicina (125 nM) y BLT-1 (10 μM), utilizados para bloquear eNOS, ecto-F₁-ATPasa y SR-BI, respectivamente, fueron agregados a los cultivos de hEPC 4 horas antes de la recuperación de las células y su distribución en las placas con Matrigel, sin volver a añadirlos en el co-cultivo con las ECV-304. El inhibidor IF1 (3,6 μM) fue agregado junto con apoA-I y se

mantuvo en cultivo hasta el final de los ensayos. Para evaluar la participación de ABCA1, se utilizó un anticuerpo neutralizante (# NB400-105, Novus Biologicals, dilución 1:1000) y un control de isotipo (# NB810-56910, Novus Biologicals, dilución 1:1000), los cuales fueron incubados por 30 minutos con las hEPC, previo al co-cultivo con las ECV-304.

Actividad de la eNOS

Se utilizó el método de la formación de L-[³H]-citrulina a partir de L-[³H]-arginina, según lo descrito previamente [161]. Las hEPC de 5 días fueron distribuidas en placas de 24 pocillos, a una densidad de 130.000 células por pocillo, e incubadas por 48 horas con medio EPC con VEGF. Luego, las células fueron incubadas por 4 horas en medio EPC 10% SFB, y posteriormente se agregó una mezcla de L-[³H]-arginina (4 μ Ci/mL, 5 μ M) y L-arginina no marcada (100 μ M) junto con apoA-I (50-200 μ g/mL) o PBS (control), según correspondiera, todo lo cual se incubó por 30 minutos. En el caso de los inhibidores L-NAME (100 μ M), oligomicina (125 nM) y BLT1 (10 μ M), éstos fueron agregados junto con el medio EPC 10% SFB el tiempo de incubación de 4 horas previo al estímulo de apoA-I; con respecto a IF1 (3,6 μ M), este inhibidor fue agregado junto con apoA-I. Para el caso del anticuerpo anti-ABCA1 y el control de isotipo, éstos fueron adicionados al cultivo una hora antes de agregar apoA-I. En todos los casos, los inhibidores y los anticuerpos fueron mantenidos en cultivo hasta el final de los ensayos. Una vez finalizado el periodo de incubación con apoA-I sola y con los inhibidores, el medio de cultivo fue eliminado y las células fueron lavadas con PBS 10 mM pH 7,4 frío y lisadas con 200 μ L por pocillo de KOH 0,5 N (incubación de 30

minutos a 4°C en agitación). Desde cada lisado se extrajeron 25 µL para cuantificar proteínas totales por el método Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). El lisado restante fue tratado con 100 µL por pocillo de ácido fórmico 95% v/v (60 minutos a 4°C), tras lo cual se sometió a una cromatografía de intercambio catiónico Dowex 50W (Sigma-Aldrich 50X8-200), utilizando agua como fase móvil. La radiactividad de la fracción no retenida (correspondiente a L-[³H]-citrulina) se determinó en una mezcla de 90 µL de eluato con 2,7 mL de líquido de centelleo (Ecoscint – National Diagnostics) en contador de centelleo (Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción). La radiactividad fue normalizada por la cantidad de proteína por pocillo.

Biodisponibilidad de NO

Para la medición de la biodisponibilidad de NO se utilizó la sonda 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoreceína diacetato (DAF-FM-DA, Termofisher). La sonda DAF-FM-DA difunde pasivamente a través de la membrana celular y dentro de la célula, por la acción de esterasas, es convertida en DAF-FM en condición basal que emite fluorescencia despreciable. Luego de reaccionar con NO, la fluorescencia del DAF-FM aumenta hasta 160 veces, pudiendo ser detectada y medida en fluorímetro.

Las hEPC de 5 días fueron distribuidas en placas de 96 pocillos, a una densidad de 75.000 células por pocillo, e incubadas en medio EPC con VEGF por 48 horas en condiciones estándar. Pasado este tiempo, las células fueron incubadas en medio EPC 10% SFB por 4 horas, para luego ser tratadas por 45 minutos con una mezcla de DAF-FM-DA (7,5 µM) y L-arginina (100 µM). Luego se agregó apoA-I (50-200

$\mu\text{g/mL}$) e inmediatamente se midió la fluorescencia (λ de excitación/emisión = 485/540 nm) por 30 minutos, en un lector de placa Synergy 2, Biotek. Los inhibidores L-NAME (100 μM), oligomicina (125 nM) y BLT1 (10 μM) fueron agregados junto con el medio EPC 10% SFB; el inhibidor IF1 (3,6 μM) fue adicionado al cultivo junto con apoA-I; el anticuerpo anti-ABCA1 y el control de isotipo (1:1000 cada uno), fueron agregados una hora antes de incubar con la sonda. Todos los inhibidores y anticuerpos, fueron mantenidos en cultivo hasta el final del experimento.

Western blots

Para determinar la expresión de la eNOS y del transportador ABCA1, se realizaron ensayos de Western blot. Las hEPC de 3, 7 y 9 días fueron recuperadas con tampón RIPA (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0,1%, desoxicolato de sodio 0,5 %, Triton X-100 1%), suplementado con un *cocktail* de inhibidores de proteasas (Thermo Scientific). Las muestras fueron tratadas por 10 minutos a 4°C en baño sonicador y luego centrifugadas a 14.000 x g por 10 minutos a 4°C, recuperando el sobrenadante. Las proteínas totales fueron cuantificadas por el método Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific). Alrededor de 50 μg de proteínas totales de cada muestra fueron separadas por electroforesis en un gel denaturante SDS-PAGE 8% a 100 V por 100 minutos. La transferencia a membrana de poliviniliden-difluoruro (PVDF) fue realizada a corriente constante de 250 mA por 2 horas. Finalizada la transferencia, se confirmó la presencia de las bandas mediante tinción con Rojo Ponceau (1% Ponceau S, 5% ácido acético glacial). Para el *blotting* la membrana fue bloqueada por 1 hora con leche 5% en PBS 10 mM pH 7,4. El anticuerpo anti-eNOS

(# 610296, BD Biosciences), anti-ABCA1 (# NB400-105, Novus biologicals) y el anticuerpo anti- β -actina (# sc-69879, Santa Cruz) fueron diluidos 1:1000, 1:400 y 1:1000, respectivamente, en albúmina de suero bovino (BSA) 1% en PBS 10 mM - Tween 0,05%, y se incubaron con la membrana por separado toda la noche a 4°C en agitación constante. Posteriormente, las membranas fueron expuestas a un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (# A0168, Sigma-Aldrich, 1:1000) para el caso de la eNOS y β -actina, y a un anti-IgG de conejo-HRP (# A6154, Sigma-Aldrich, 1:1000) para ABCA1 a temperatura ambiente por 2 horas. El revelado se realizó mediante quimioluminiscencia con el kit Western Lightning Plus ECL (PerkinElmer, USA), en el equipo LI-COR (Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción). Las bandas proteicas fueron cuantificadas por densitometría, utilizando el *software* ImageJ.

Análisis estadísticos

Cada ensayo fue realizado, como mínimo, en triplicado, considerando al menos 3 experimentos independientes con células obtenidas desde distintos donantes. Cada condición fue expresada como porcentajes de cambio con respecto a la condición basal, los resultados son presentados como los promedios \pm error estándar. Los datos fueron procesados con el *software* GraphPad Prism 6 (San Diego CA, USA) utilizando comparaciones múltiples mediante el test ANOVA de dos colas y el post-test Bonferroni. Se consideró un valor de $p < 0,05$ para identificar diferencias estadísticamente significativas.

Eliminación de residuos biológicos y radioactivos

Todas las muestras y tejidos biológicos, los materiales contaminados con sangre o plasma y aquéllos que estuvieron en contacto con reactivos radioactivos (L-arginina y L-citrulina tritiadas) fueron eliminados según las normas de Bioseguridad y Manejo de Residuos Biológicos estipulados por la Universidad de Concepción (MATPEL) [162].



RESULTADOS

1. Obtención de apoA-I humana

1.1 Obtención HDL desde plasma humano

Las HDL fueron obtenidas mediante el método de ultracentrifugación con ajuste de densidad [85]. La confirmación de la pureza de las HDL fue realizada mediante electroforesis en gel SDS-PAGE 12% en condiciones denaturantes (figura 6). Se utilizaron como controles albúmina humana (67 kDa), que corresponde al principal contaminante de esta técnica de aislamiento de HDL, y patrones de apoA-I (28 kDa) y apolipoproteína A-II (17 kDa), las dos proteínas mayoritarias de las HDL. Se observa en los carriles de HDL una gran banda entre los 25 y 30 kDa correspondiente a apoA-I, y la presencia minoritaria de apoA-II. Además, se visualizan otras bandas débiles, entre ellas la albúmina humana y otras que representan apoproteínas menos presentes en las HDL, como apoE, apoC-I, apoC-II, apoC-III, entre otras. Como se puede observar en el gel, la pureza de la HDL es alta, dada la baja presencia de albúmina.

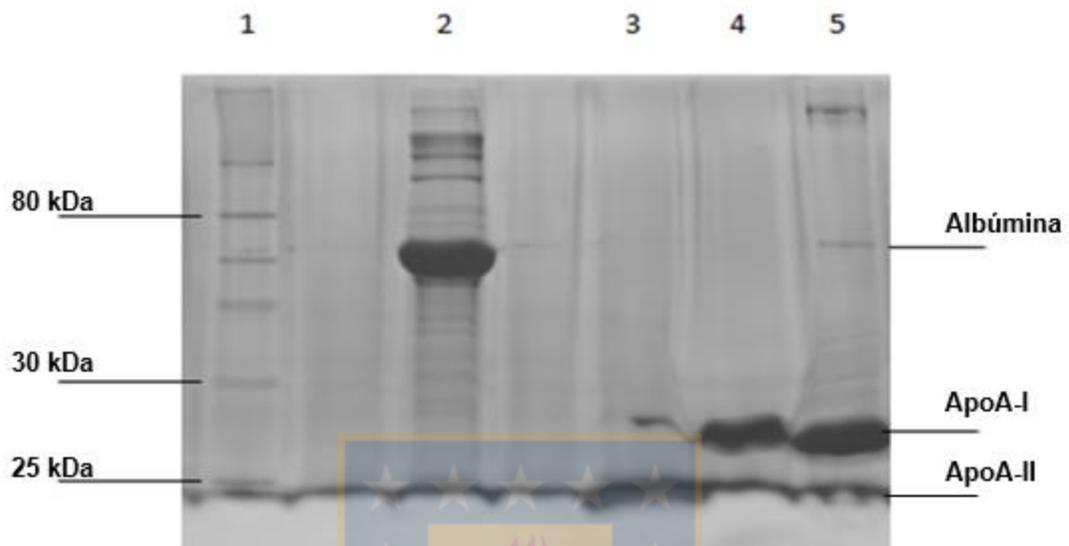


Figura 6. Verificación de la pureza de HDL. Las HDL obtenidas desde plasma mediante ultracentrifugación con ajuste de densidad fueron analizadas en un gel SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: patrón de albúmina humana, carril 3: patrón de apoA-II humana, carril 4: patrón de apoA-I humana, carril 5: muestra de HDL

1.2 Obtención de apoA-I

Las HDL humanas fueron delipidadas según protocolo descrito en bibliografía, mediante una mezcla fría de metanol-cloroformo [158]. El *pool* de proteínas de las HDL fue resuelto en un gel SDS-PAGE 12%, desde el cual se eluyó la apoA-I, como se describió previamente [159]. Como se observa en la figura 7, hubo una completa extracción de apoA-I desde el gel, evitándose el corte de otras apolipoproteínas presentes en las HDL, como apoA-II. La cuantificación del *pool* de apoA-I obtenida por este método arrojó una concentración promedio de 2 mg/mL de proteína por extracción, correspondiente aproximadamente al 62,5% de proteínas totales de las HDL que fueron cargadas en el gel, lo que coincide con lo descrito en la literatura donde se señala que apoA-I corresponde alrededor del 70% del contenido proteico promedio de las HDL [84]. Este porcentaje de extracción corresponde aprox. a un 90% de rendimiento para esta metodología, considerando el *stock* de HDL sembrado.

La apoA-I obtenida fue analizada nuevamente en gel SDS-PAGE 12%, en el cual se comparó su movilidad electroforética con la correspondiente a albúmina y otras proteínas de HDL (figura 8). Se observa en el carril de apoA-I sólo una banda, cercana a los 30 kDa que representa a esta apoproteína.

Por lo tanto, con esta metodología, fue posible obtener apoA-I humana desde HDL plasmática. Además, corresponde a una metodología relativamente sencilla, rápida y con la cual se obtienen altos porcentajes de extracción.

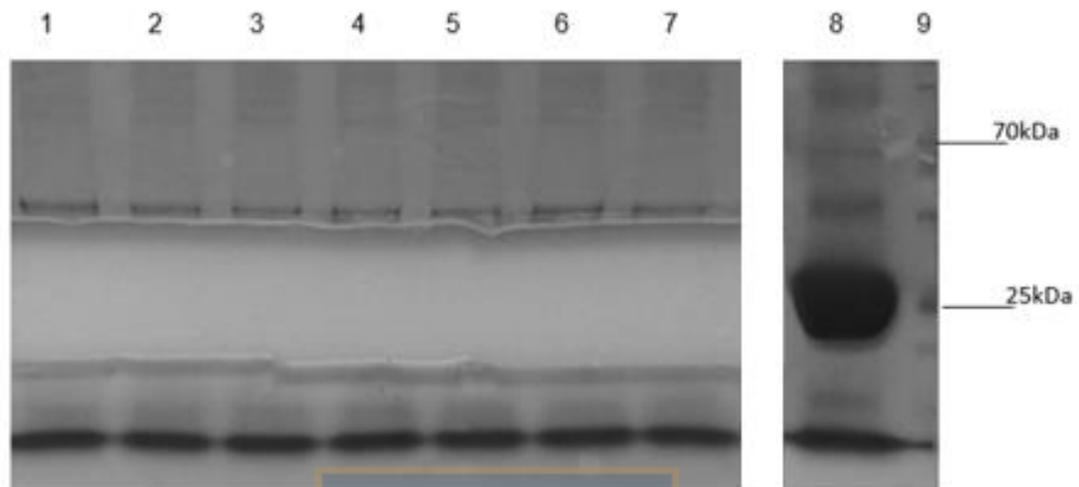


Figura 7. Gel representativo de la obtención de apoA-I desde HDL. Las proteínas de las HDL fueron resueltas en un gel SDS-PAGE 12%. Se observa en los carriles 1-7: muestras de HDL delipidada. Desde ellos se recuperó apoA-I, mediante corte del gel, seguido de la elución de la proteína. En el carril 8 se muestra un patrón de apoA-I, carril 9: marcador de peso molecular. La imagen fue reconstruida desde carriles obtenidos del mismo gel resuelto a las mismas condiciones.

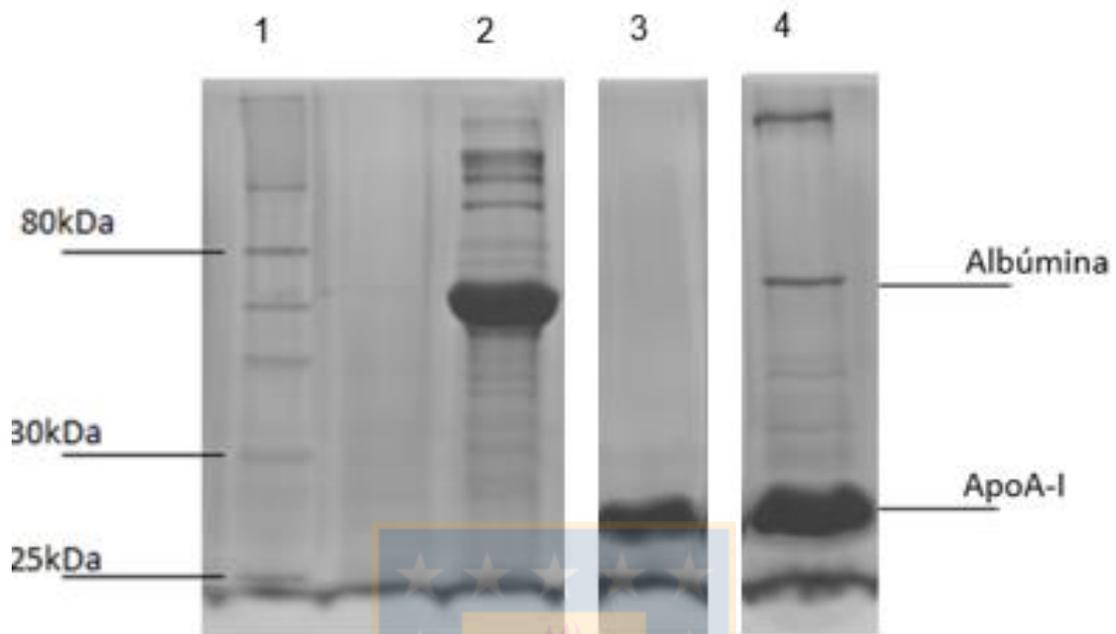


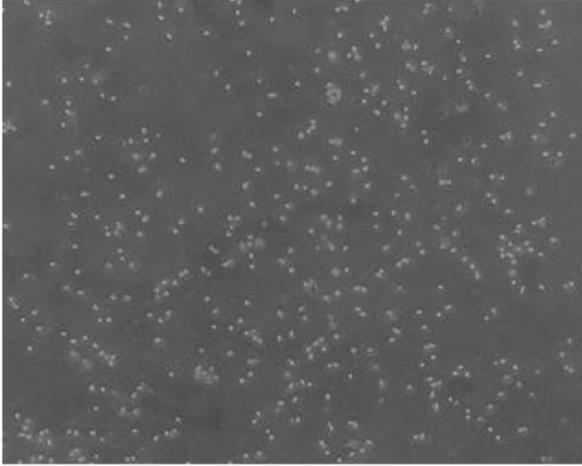
Figura 8. Confirmación de la obtención de apoA-I. La apoA-I fue resuelta en un segundo gel SDS-PAGE 12%. Se observa en el carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: patrón de albúmina humana, carril 3: apoA-I obtenida desde gel, carril 4: *pool* de proteínas HDL. La imagen fue reconstruida desde carriles obtenidos del mismo gel resuelto a las mismas condiciones.

1 Obtención y cultivo de hEPC

Las hEPC fueron obtenidas desde sangre venosa de voluntarios sanos, a partir del *pool* de células mononucleares presentes en sangre periférica, cultivado en medio suplementado con VEGF. A los 3 días, se cambió el medio de cultivo para eliminar las células en suspensión, y las hEPC tempranas, correspondientes a las células adheridas a la placa, presentaron morfología pequeña y redondeada, acorde a lo descrito en bibliografía [53] (figura 9A). Al séptimo día de cultivo, se observa una población de células mucho más alargada que a los 3 días, similar a una célula endotelial madura, pero más pequeña (figura 9B). Las hEPC en este estadio de diferenciación fueron utilizadas como modelo de estudio para los ensayos funcionales descritos a continuación.



A.



B.

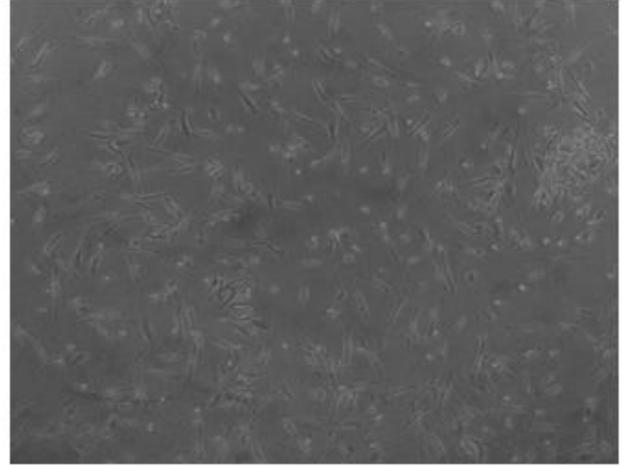


Figura 9. Obtención y cultivo de hEPC tempranas. Imágenes representativas de cultivos de hEPC, obtenidas mediante observación al microscopio óptico con aumento 200x. **A.** hEPC de 3 días. **B.** hEPC de 7 días. Imágenes presentadas corresponden al mismo donante.



2 Determinación del efecto de apoA-I sobre hEPC tempranas

2.2 Proliferación de hEPC tempranas

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que hEPC tempranas de 3 días aumentan su proliferación luego de 48 horas de incubación con apoA-I 50 µg/mL, efecto comparable al de HDL [116], un conocido estímulo proliferativo para este tipo celular [113]. En este trabajo, se utilizaron hEPC de 7 días, con el objetivo de validar los antecedentes de nuestro laboratorio en progenitores más comprometidos con el linaje endotelial, que además son el estadio de diferenciación más utilizados en literatura, particularmente en aplicaciones terapéuticas. Si bien las hEPC de 7 días aún son consideradas dentro de la categoría de tempranas, se observa un fenotipo diferente al de las células de 3 días (figura 9), acorde a lo descrito previamente en nuestro laboratorio [163]. En la práctica, este hecho se vio reflejado en que las condiciones estandarizadas anteriormente en nuestro laboratorio para evaluar la proliferación de hEPC de 3 días, no fueron aplicables a las hEPC de 7 días. Por lo tanto se debió comenzar por la estandarización del método de MTT para hEPC de 7 días.

Primeramente se determinó la densidad celular a utilizar en los ensayos de proliferación, la que varió entre 50.000 y 100.000 células por pocillo considerando una condición basal (medio EPC 10% SFB) y un control positivo (medio EPC 30% SBF con VEGF). Como se observa a las 24 horas (figura 10A), existe una tendencia al aumento del control positivo con respecto al basal para todas las condiciones evaluadas (42, 44 y 25% de aumento para 50.000, 75.000 y 100.000 células por pocillo respectivamente), siendo sólo estadísticamente significativa para la densidad celular

intermedia ($p < 0,05$). A las 48 horas (figura 10B) se observa la misma tendencia al aumento, pero esta vez alcanzaron significancia estadística las condiciones de 50.000 y 75.000 células por pocillo (63% y 60%, $p < 0,01$ y $p < 0,05$ respectivamente) observándose con 100.000 células por pocillo una tendencia menos notoria (+34%). Considerando resultados anteriores y los presentados en esta tesis, además de la observación del comportamiento de las células por microscopía óptica en la condición basal y control positivo a través de los días, se decidió utilizar 50.000 células por pocillo y 48 horas de incubación para los ensayos posteriores.

A continuación, se evaluó el efecto de apoA-I en la proliferación de hEPC de 7 días. Como se observa en la figura 11, no existieron diferencias significativas entre ninguna concentración de apoA-I y la condición basal, luego de 48 y 72 horas de incubación, sin embargo, el control positivo sí generó un aumento estadísticamente significativo (32% y 25% respectivamente, $p < 0,01$). Como no se observó efecto de apoA-I, para la proliferación de hEPC de 7 días cuantificada por el método MTT, este parámetro no fue evaluado en los siguientes objetivos específicos de estas tesis.

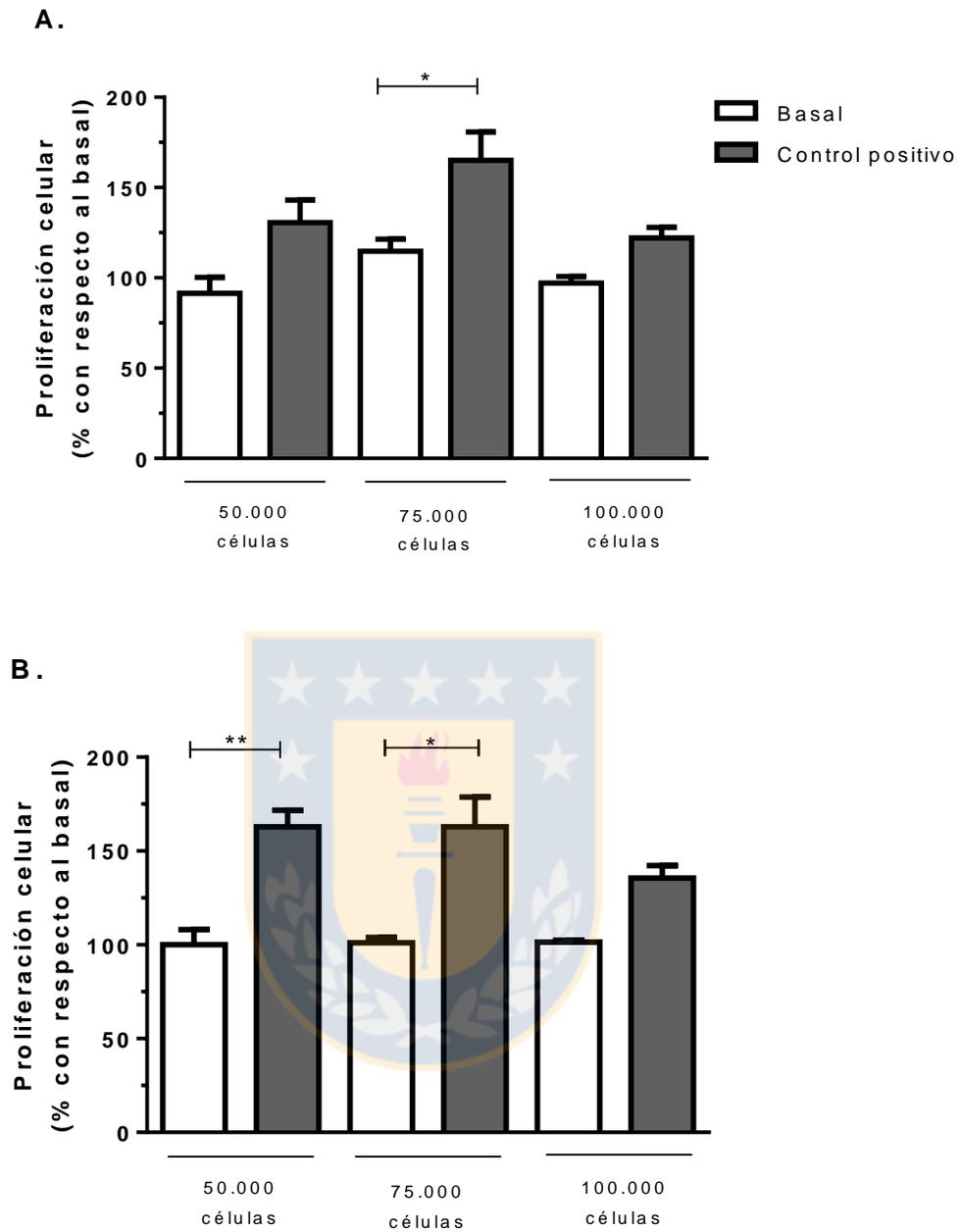


Figura 10. Estandarización de las condiciones para evaluar proliferación de hEPC tempranas.

Las células fueron tratadas con medio basal (medio EPC 10% SFB) y con un control positivo (medio EPC 30% SBF con VEGF) por 24 horas (A) y 48 horas (B) La cantidad de células metabólicamente activas fue cuantificada con el método de MTT.* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

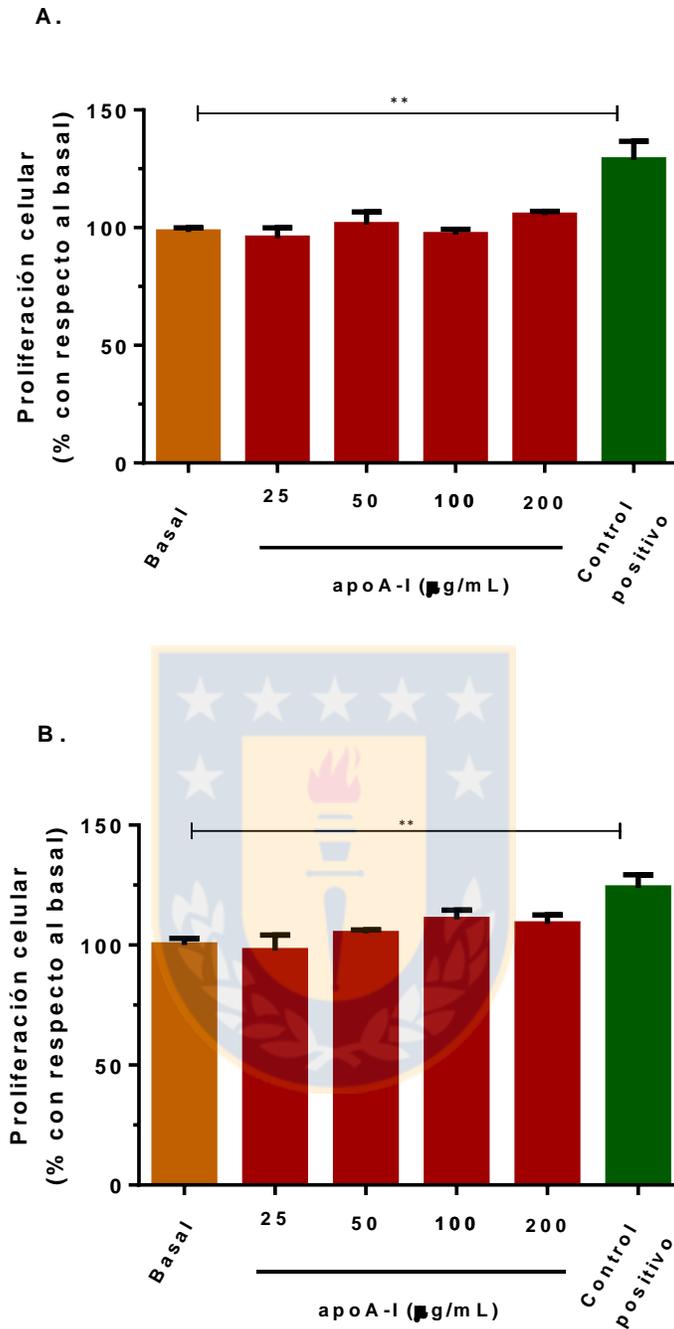


Figura 11. Efecto de apoA-I sobre la proliferación de hEPC tempranas. hEPC de 7 días fueron incubadas con diferentes concentraciones fisiológicas de apoA-I durante 48 horas (**A**) y 72 horas (**B**). La cantidad de células metabólicamente activas fue cuantificada con el método de MTT. Control basal: Medio EPC 10% SFB; control positivo: medio EPC 30% SBF con VEGF. ** $p < 0,01$. $n = 4$ experimentos independientes.

2.3 Angiogénesis mediada por hEPC tempranas

Para los ensayos de angiogénesis mediada por hEPC se utilizaron 10.000 ECV-304 y 20.000 hEPC, de 7 días, acorde a lo descrito en bibliografía [116]. Cabe señalar que se realizaron ensayos preliminares con células HUVEC con la finalidad de utilizarlas en lugar de las ECV-304, sin embargo, estos ensayos presentaron gran dispersión de resultados y poca reproducibilidad, debido, probablemente, al uso de dos cultivos primarios (HUVEC y hEPC) y la variabilidad biológica inherente a cada uno (datos no mostrados). Como con esta metodología no se logró llegar a resultados concluyentes, los ensayos fueron realizados con células ECV-304, como previamente se describió en nuestro laboratorio [116].

Para evaluar el efecto de apoA-I, ésta se incubó tanto con las ECV-304 como en el co-cultivo de ECV-304 con hEPC de 7 días, obteniéndose fotografías luego de 4, 6 y 8 horas para su posterior análisis con el *software* ImageJ. La razón por la que se trabajó en un modelo de co-cultivo, es debido a que en el estadio de diferenciación de hEPC tempranas, estas células son incapaces de formar estructuras tipo capilares por sí solas [56].

En las ECV-304 se observa una tendencia al aumento del área de las estructuras tipo capilares a concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de apoA-I, a las 4 y 6 horas, pero este efecto no es estadísticamente significativo. A las 8 horas se observa un leve aumento con apoA-I 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ que tampoco alcanza significancia estadística (figura 12A). En relación al largo de las estructuras, se observa la misma tendencia al aumento a las 4 horas con apoA-I 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y luego de 6 horas alcanza a ser significativo (16% de aumento, $p < 0,05$), desapareciendo a las 8 horas (figura 12B). Con respecto al número de ramificaciones, sólo a las 8 horas se observa un efecto

estadísticamente significativo de +60% ($p < 0,001$) con apoA-I 50 μ g/mL, mientras que a las 4 y 6 horas se observa la misma tendencia no significativa descrita en el área y largo, con apoA-I 200 μ g/mL (figura 12C).



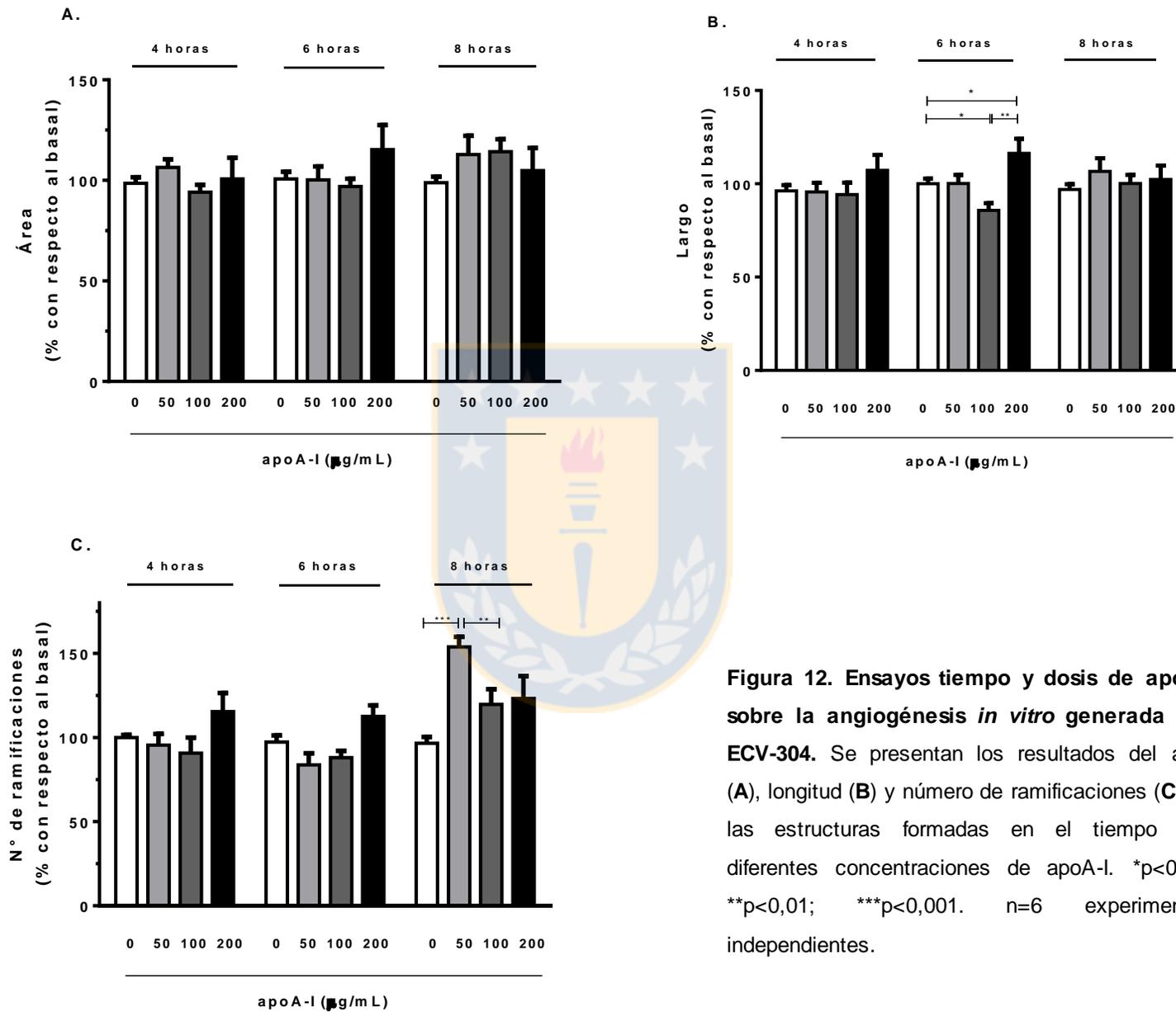


Figura 12. Ensayos tiempo y dosis de apoA-I sobre la angiogénesis *in vitro* generada por ECV-304. Se presentan los resultados del área (A), longitud (B) y número de ramificaciones (C) de las estructuras formadas en el tiempo con diferentes concentraciones de apoA-I. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. $n = 6$ experimentos independientes.

Con respecto al co-cultivo de ECV y hEPC, en la figura 13 se muestra el resultado del área de las estructuras formadas a las 4, 6 y 8 horas con apoA-I (50-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), el cual es representativo de los otros dos parámetros (largo y número de ramificaciones). Como se observa, apoA-I produce un aumento en la angiogénesis a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 4 y 6 horas de tratamiento, efecto que sólo logra significancia estadística al menor tiempo de incubación y, por este motivo fue utilizado para los ensayos posteriores. En la figura 14 se presentan los gráficos de los 3 parámetros utilizados para evaluar la angiogénesis a las 4 horas de incubación. Como ha sido descrito previamente, la presencia de hEPC tempranas aumenta significativamente el área, largo y número de ramificaciones observadas con ECV-304 [116]. Nuestros resultados apoyan estos antecedentes, ya que se observa que las hEPC generan un aumento del 73%, 69% y 63% en el área, largo y número de ramificaciones, respectivamente, de las estructuras formadas por las ECV-304 ($p < 0,001$). Se destaca además, que apoA-I no tiene efecto significativo a ninguna concentración sobre las ECV-304, concordante con lo mostrado previamente (figura 12).

Con respecto a apoA-I en el co-cultivo, la concentración 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aumenta el área, largo y número de ramificaciones (54%, 38% y 48% respectivamente, $p < 0,001$) de las estructuras tipo capilares, en comparación con la condición sin apoA-I. Esto coincide con antecedentes previos obtenidos de nuestro laboratorio [116], y por ende fue la concentración elegida de apoA-I para realizar los ensayos posteriores con los inhibidores.

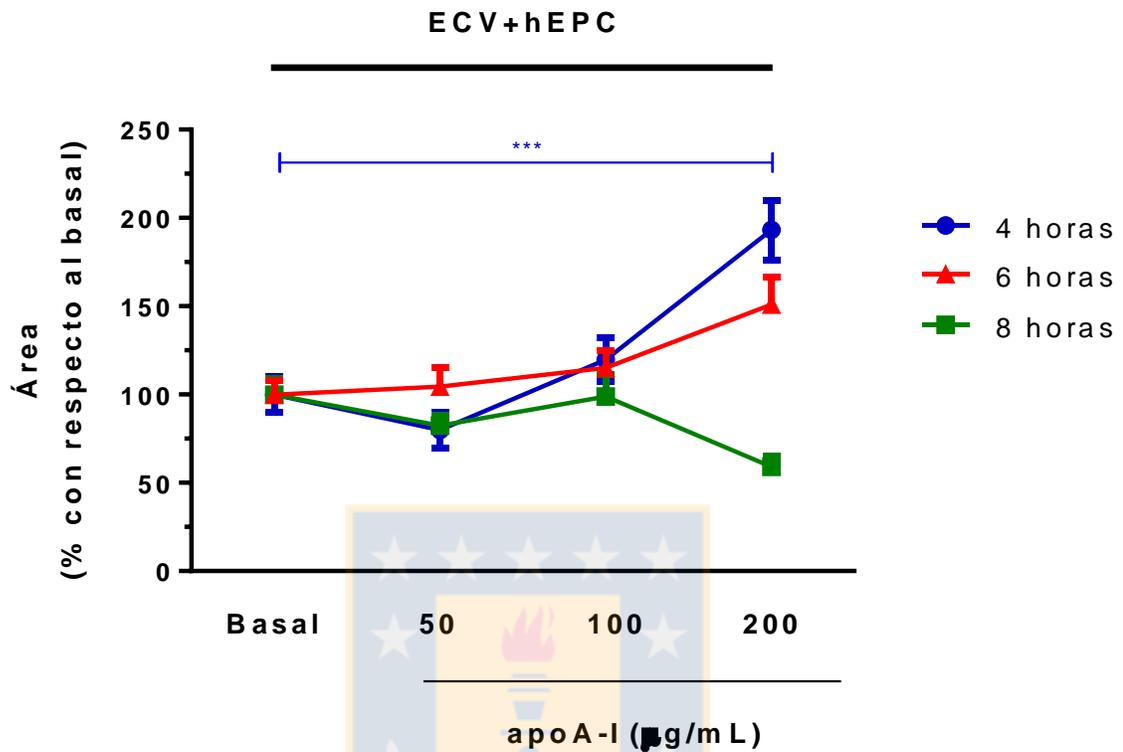


Figura 13. Ensayos tiempo y dosis de apoA-I en la angiogénesis *in vitro* en el co-cultivo de ECV-304 y hEPC. Se presentan los resultados del área de las estructuras tipo capilares, efecto representativo de los parámetros de largo y número de ramificaciones. *** $p < 0,001$. $n=6$ experimentos independientes.

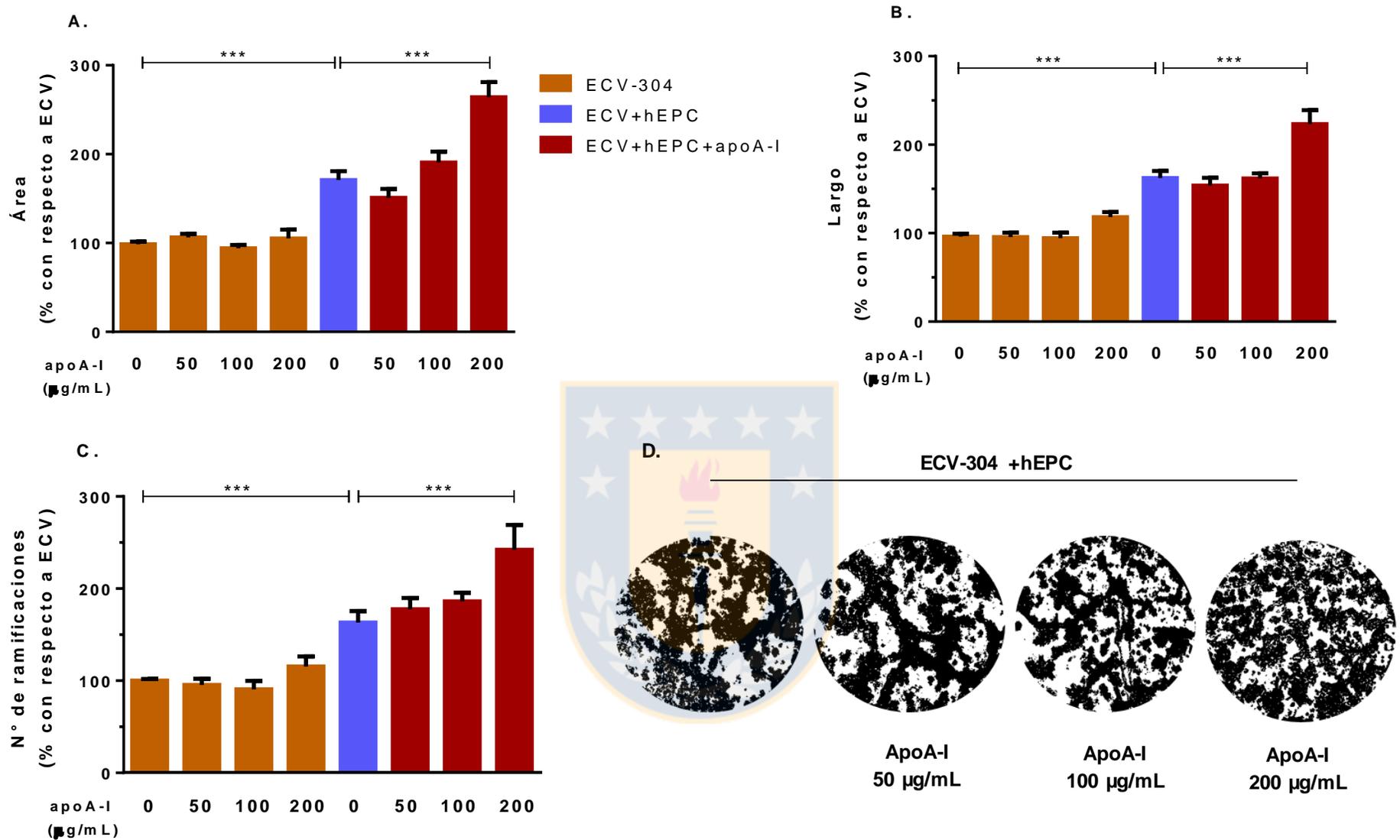


Figura 14. Efecto de apoA-I en la angiogénesis *in vitro*. Células ECV-304 fueron co-cultivadas con hEPC de 7 días, en presencia de apoA-I por. 4 horas. Se presentan los resultados de **A.** Área **B.** Largo **C.** Número de ramificaciones de las estructuras tipo capilares. **D.** Imágenes representativas de las estructuras tipo capilares formadas. *** $p < 0,001$. $n = 6$ experimentos independientes

Estos resultados de angiogénesis *in vitro*, permiten postular que apoA-I aumentaría la formación de estructuras tipo capilares por acción sobre las hEPC. Sin embargo, nuestro modelo no nos permite discernir si el efecto que ejerce apoA-I es debido a un aumento de la inclusión de las hEPC a la red pre-formada por las ECV-304 o por un aumento de los factores angiogénicos que secretan estas células y que podrían actuar de forma autocrina y paracrina.

3 Contribución de la eNOS en el efecto de apoA-I sobre la angiogénesis mediada por hEPC tempranas

Previo a la evaluación de la participación de la eNOS en la angiogénesis generada por apoA-I, se determinó la expresión relativa de esta enzima en hEPC tempranas. Para ello, se realizó un *western blot* con lisados totales de hEPC de 3, 7 y 9 días de cultivo y se comparó con el modelo de célula endotelial maduro HUVEC que expresa esta enzima [74]. Como se observa, las hEPC tempranas expresan la eNOS y esta expresión aumenta acorde al tiempo en cultivo. Se observa que la eNOS aumenta al doble su expresión entre el día tercero al séptimo de cultivo y el triple entre el séptimo y el noveno, siendo este último comparable a la expresión en HUVEC (figura 15).

Para determinar la participación de la eNOS en la angiogénesis producida por apoA-I, se utilizó un inhibidor de esta enzima, L-nitroarginina metil éster (L-NAME), que fue incubado con las hEPC previo al co-cultivo con las ECV-304 y apoA-I. El área, largo y número de ramificaciones formadas aumentan un 116 %, 50% y 75% respectivamente, al agregar apoA-I 200 µg/mL. Estos efectos se revierten

completamente en la condición con L-NAME, observándose que este inhibidor no tiene efecto sobre el co-cultivo sin apoA-I (figura 16). Por lo tanto, según estos resultados, el aumento en la angiogénesis producida por apoA-I, sería dependiente de la síntesis de NO por las hEPC.



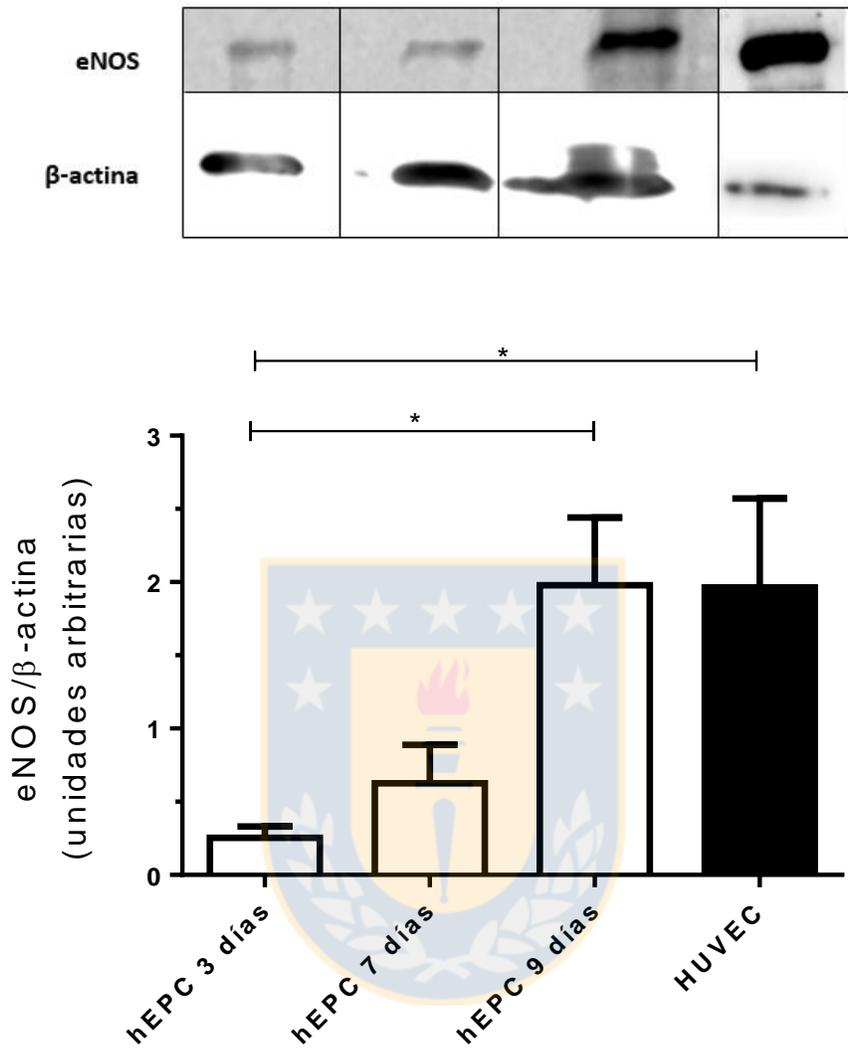
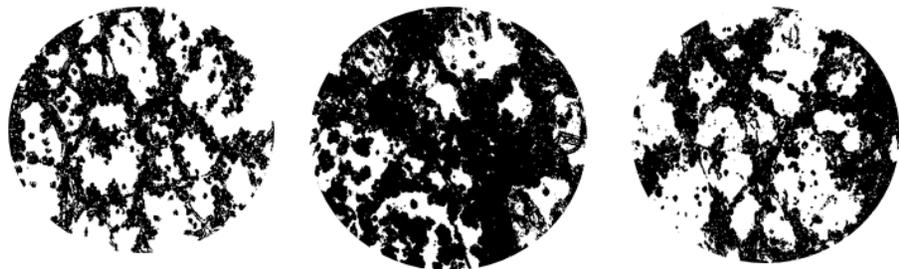


Figura 15. Expresión relativa de eNOS en hEPC tempranas. Las hEPC de 3, 7 y 9 días de cultivo, y las HUVEC, fueron recuperadas con tampón RIPA. 50 μ g de proteína total por condición fueron resueltos en gel SDS-PAGE 12%. * $p < 0,05$. $n = 3$ experimentos independientes

A.

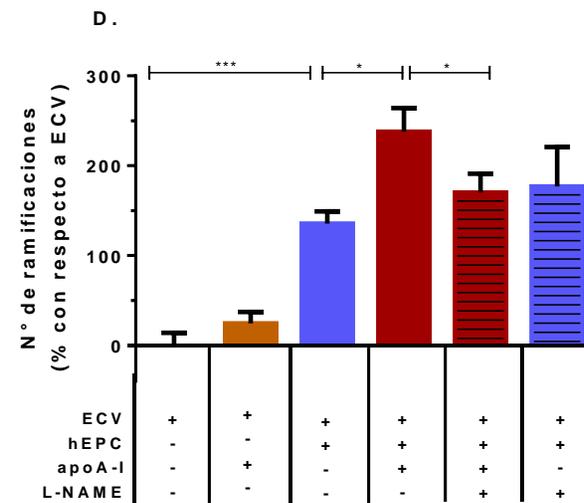
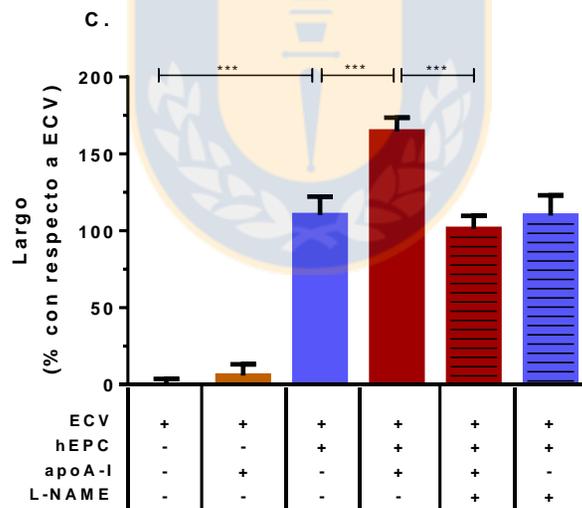
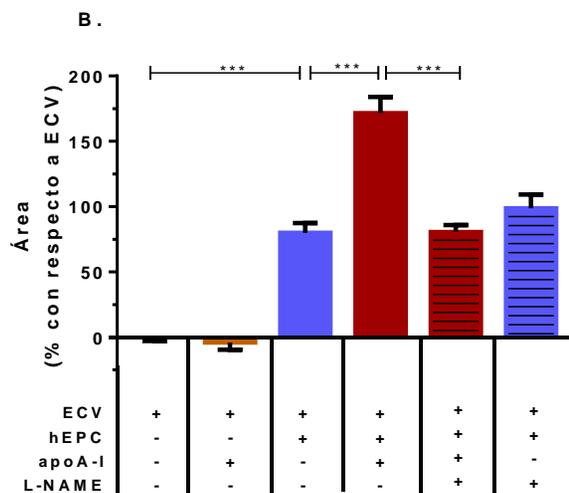
ECV-304 +hEPC



ApoA-I

ApoA-I + L-NAME

Figura 16. Contribución de la eNOS en la angiogénesis *in vitro* producida por apoA-I. hEPC fueron incubadas con L-NAME (100 μ M) previo al co-cultivo con ECV-304 y apoA-I (200 μ g/mL). Los análisis se realizaron con el *software* ImageJ. **A.** Imágenes representativas de la angiogénesis *in vitro*. **B.** Área. **C.** Largo. **D.** Número de ramificaciones de las estructuras tipo capilares. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. n=6 experimentos independientes.



4 Rol del receptor ecto-F₁-ATPasa en el efecto de apoA-I sobre la angiogénesis mediada por hEPC tempranas

En el endotelio, ecto-F₁-ATPasa, se describe como un receptor de apoA-I y de HDL cuya modulación genera una serie de efectos benéficos [151]. La primera evidencia de la presencia de este receptor en hEPC fue proporcionada por nuestro grupo de investigación en hEPC tempranas de 3 días, donde media el efecto en la proliferación y la angiogénesis *in vitro* de estas células, en respuesta a apoA-I [116]. Ensayos preliminares de inmunocitoquímica nos han permitido inferir sobre su presencia en las hEPC de 7 días (datos no mostrados), sin embargo, estos datos deben ser confirmados.

Para establecer la participación de este receptor en la angiogénesis producida por apoA-I se utilizaron dos inhibidores: IF1 y oligomicina. El primero es el inhibidor fisiológico de la ATP-sintasa mitocondrial y de ecto-F₁-ATPasa, el cual se une al heterodímero $\alpha\beta$ del dominio F₁, impidiendo el cambio conformacional requerido para la actividad hidrolasa [148]. Oligomicina es un antibiótico que se une al dominio F_o e inhibe el paso de protones por este canal [164].

Como se observa (figura 17), tanto IF1 como oligomicina revierten por completo el efecto angiogénico de apoA-I, observado en el área, largo y número de ramificaciones de las estructuras tipo capilares formadas. Se observa además que en cada uno de los parámetros analizados, IF1 por sí solo tiene un efecto inhibitorio sobre las ECV-304, alcanzado significancia estadística para el largo y número de ramificaciones (35% de disminución en ambos casos, $p < 0,001$). Este efecto podría explicar la tendencia a la disminución que se observa en los controles de IF1 en los co-cultivos, en comparación con la condición del co-cultivo basal de ECV-304 con

hEPC, sugiriendo que IF1 ejercería un efecto anti-angiogénico tanto en las ECV-304 como en las hEPC. Con respecto al control de oligomicina, también se observa una disminución de la formación de estructuras tipo capilares con respecto al co-cultivo sin estímulo, pero en este caso dicho efecto se ejercería exclusivamente sobre las hEPC, puesto que este inhibidor no fue incluido en los co-cultivos de ECV-304 con hEPC.



A.

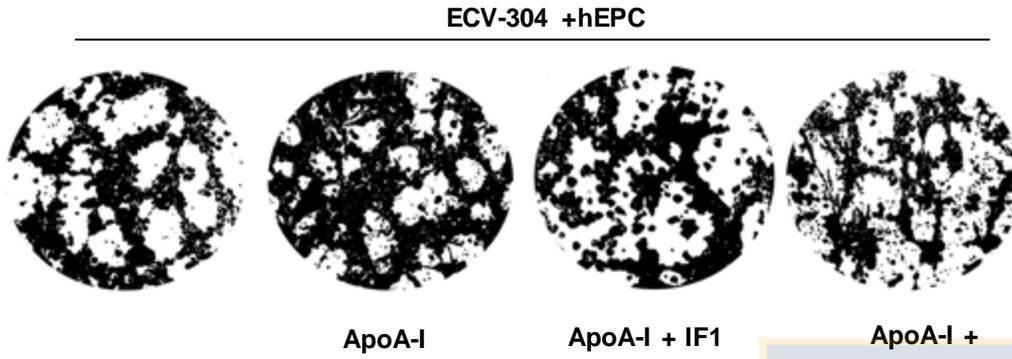
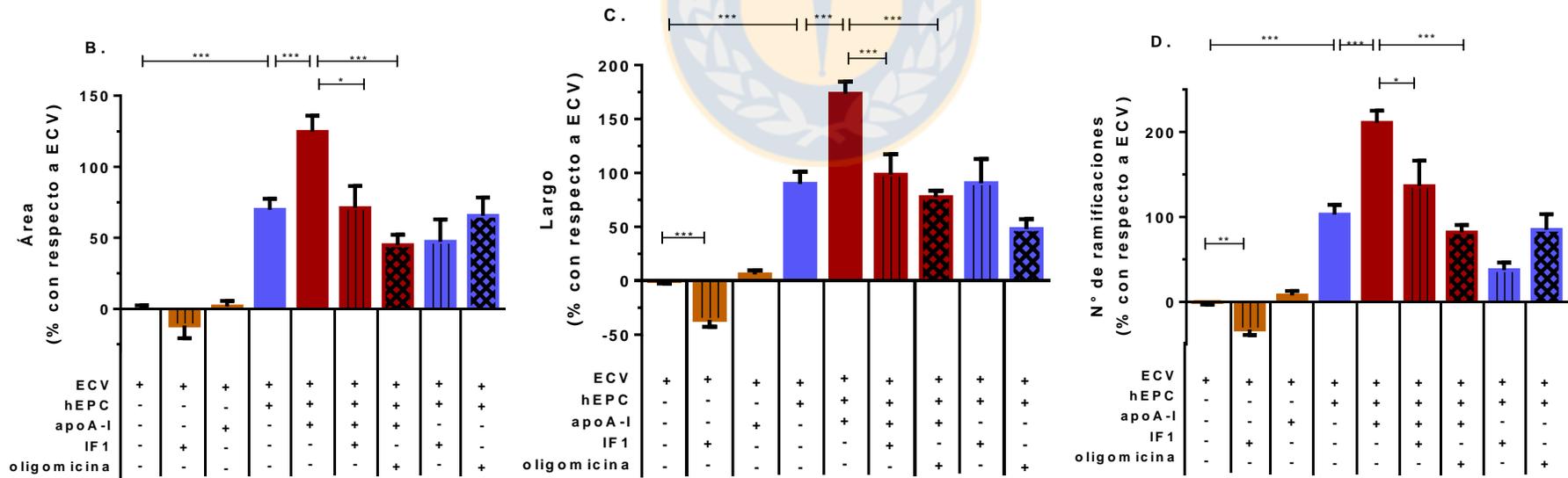


Figura 17. Rol del receptor ecto-F₁-ATPasa en el efecto de apoA-I sobre la angiogenesis *in vitro*. Células ECV-304 fueron co-cultivadas con hEPC de 7 días en presencia de apoA-I (200 µg/mL). IF1 (3,6 µM) fue agregado junto con apoA-I al co-cultivo, mientras que oligomycin (125 nM) fue pre-incubado sólo con las hEPC durante 4 horas. Los análisis se realizaron con el *software* ImageJ. **A.** Imágenes representativas de la angiogenesis *in vitro*. **B.** Área. **C.** Largo. **D.** Número de ramificaciones de las estructuras tipo capilares. *p<0,05;***p<0,001 n=5 experimentos independientes para cada inhibidor.



Como se mencionó anteriormente, ABCA1 es un transportador de membrana con alta afinidad por apoA-I libre [100] y representa el 30% de unión de esta apolipoproteína en la superficie celular de células endoteliales maduras [151]. Hasta ahora, no se ha reportado de la presencia de ABCA1 en ningún estadio de maduración de las EPC. Para evaluar la presencia de este transportador en hEPC tempranas, se realizó un *western blot* con células luego de 3, 7 y 9 días de cultivo, utilizando células HUVEC como control positivo. Se observa en la figura 18, la presencia de una banda proteica en todas las muestras de hEPC, cuya migración electroforética coincide con la observada en el lisado de HUVEC y con el tamaño de ABCA1 (230 kDa). Este resultado, preliminar, sugiere la expresión de ABCA1 en hEPC tempranas, que aumenta acorde avanzan los días en cultivo, siendo la expresión desde los 7 días comparable con la expresión en HUVEC.

Para determinar la contribución de ABCA1 en el efecto de apoA-I observado en la angiogénesis *in vitro*, se incubaron las hEPC de 7 días con un anticuerpo neutralizante dirigido contra este transportador, previo al co-cultivo con ECV-304. Como se observa, este tratamiento no modificó el efecto de apoA-I en el área, largo y número de ramificaciones de las estructuras tipo capilares formadas (figura 19). Curiosamente, las células expuestas sólo al anticuerpo anti-ABCA1 y al control de isotipo reducen la magnitud de la angiogénesis a niveles similares a la condición con ECV-304 sin hEPC, lo que nos indicaría un efecto ejercido por los anticuerpos, posiblemente debido a un impedimento estérico, que interferiría en la interacción entre ECV-304 y hEPC, que apoA-I es capaz de revertir.

Por otro lado, SR-BI corresponde a un receptor de HDL que ha sido descrito en hEPC, donde participa en la migración y angiogénesis *in vitro* de estas células [116,

120]. Para evaluar la contribución de SR-BI en el efecto angiogénico de apoA-I en hEPC se utilizó un inhibidor específico, denominado *block lipid transport-1* o BLT-1. Como se observa, BLT-1 produce una disminución parcial (-20%) del efecto angiogénico de apoA-I, el cual no alcanza a ser estadísticamente significativo (figura 20).

En conclusión, estos resultados nos permiten postular que ecto-F₁-ATPasa juega un rol central en el efecto angiogénico producido por apoA-I en las hEPC, ya sea favoreciendo la inclusión de estas células en la red pre-formada o a través de la secreción de citoquinas angiogénicas de acción autocrina y paracrina.



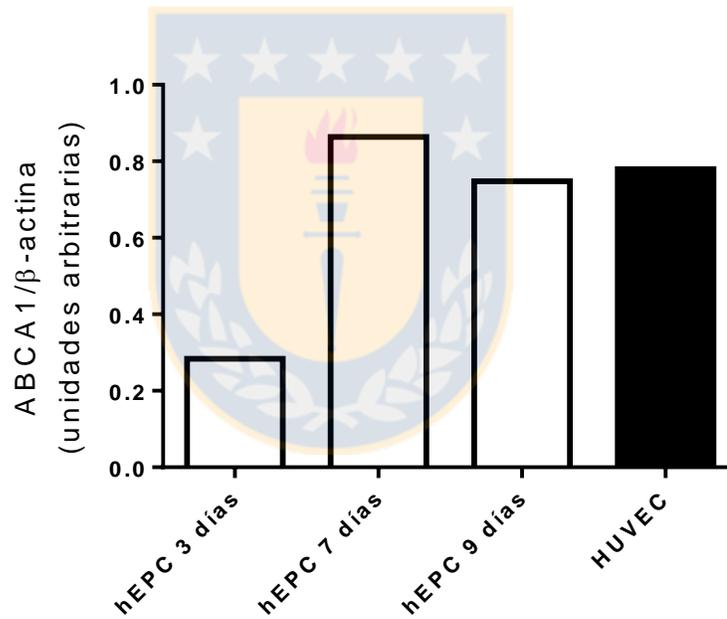
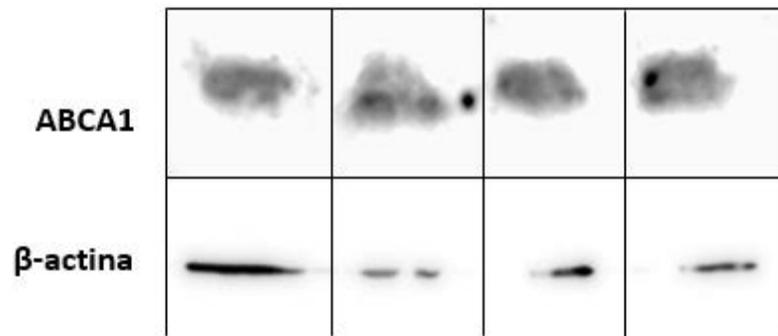
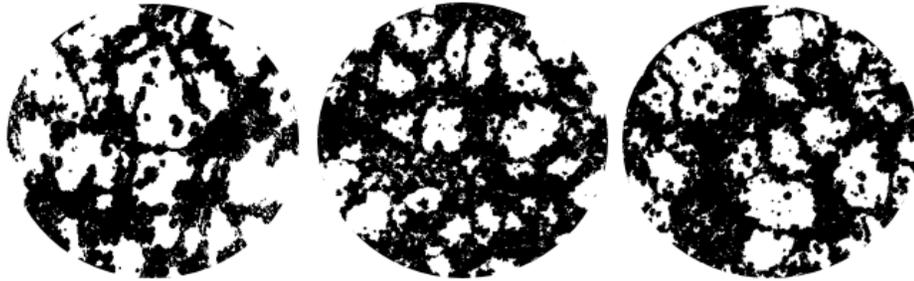


Figura 18. Detección de ABCA1 en hEPC tempranas. hEPC de 3, 7 y 9 días de cultivo, y las células HUVEC como control, fueron recuperadas con tampón RIPA. 40 μ g de proteína total por condición fueron separados en gel SDS-PAGE 8%. n=1.

A.

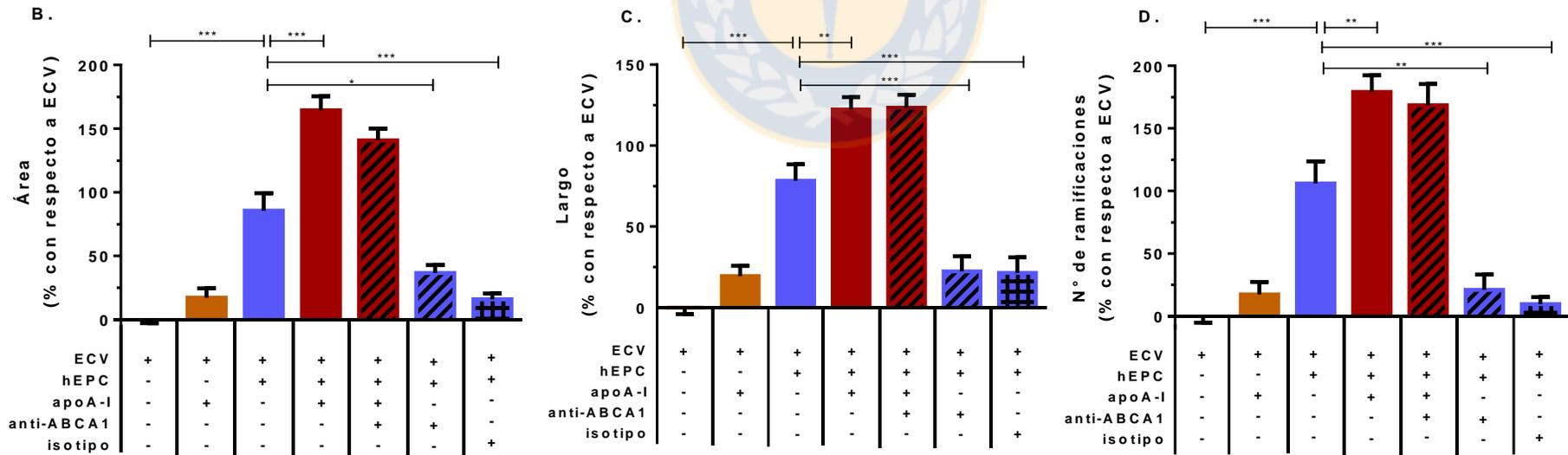
ECV-304 +hEPC



ApoA-I

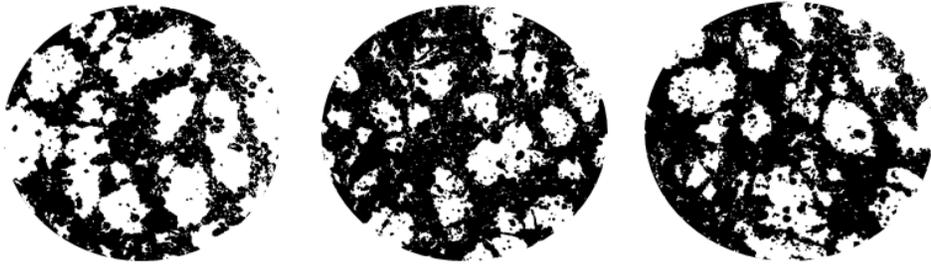
ApoA-I+
anticuerpo anti-ABCA1

Figura 19. Participación del transportador ABCA1 en el efecto de apoA-I sobre la angiogénesis *in vitro*. hEPC de 7 días fueron pre-tratadas con un anticuerpo neutralizante dirigido contra ABCA1 o control de isotipo y luego fueron co-incubadas con ECV-304, en presencia de apoA-I (200 µg/mL). Los análisis se realizaron con el *software* ImageJ. **A.** Imágenes representativas de la angiogénesis *in vitro* **B.** Área. **C.** Largo. **D.** Número de ramificaciones de las estructuras tipo capilares. *p<0,01; ***p<0,001 n=4 experimentos independientes.



A.

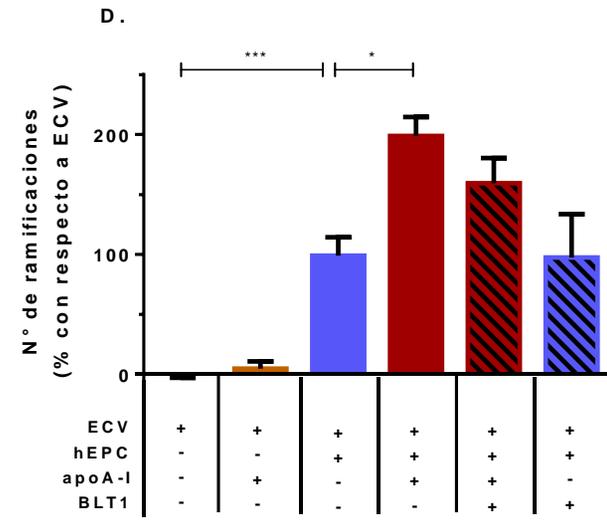
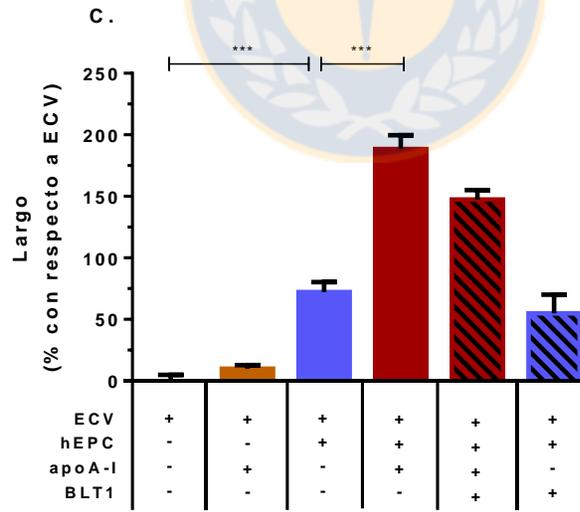
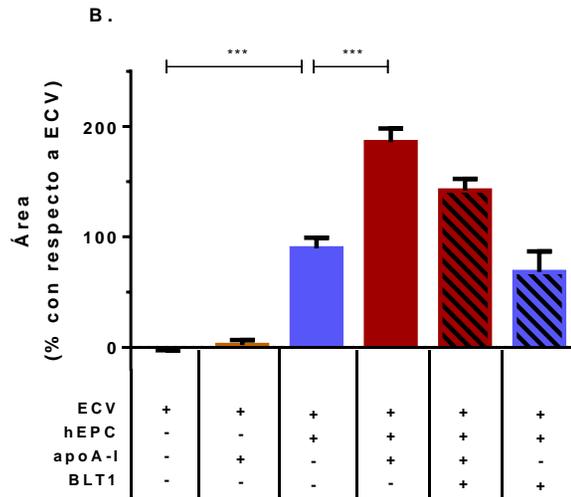
ECV-304 +hEPC



ApoA-I

ApoA-I+
BLT-1

Figura 20. Contribución del receptor SR-BI en el efecto de apoA-I sobre la angiogénesis *in vitro*. hEPC de 7 días fueron pre-tratadas con el inhibidor BLT-1 (10 μ M) y luego co-incubadas con ECV-304 en presencia de apoA-I (200 μ g/mL). Los análisis se realizaron con el software ImageJ. **A.** Imágenes representativas de la angiogénesis *in vitro*. **B.** Área. **C.** Largo. **D.** Número de ramificaciones de las estructuras tipo capilares. * $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ n=5 experimentos independientes.



5 Efecto de apoA-I sobre la síntesis de óxido nítrico en hEPC tempranas

Para determinar si apoA-I produce cambios en la síntesis de NO en las células hEPC, se utilizaron dos aproximaciones experimentales: la evaluación de la actividad de la eNOS y la biodisponibilidad de NO. La primera se cuantificó de forma indirecta a través de la formación de L-[³H]-citrulina a partir de L-[³H]-arginina, y la biodisponibilidad de NO fue determinada utilizando una sonda que reacciona con esta molécula (DAF-FM-DA) lo que genera un producto fluorescente.

Mediante los ensayos de L-[³H]-citrulina se observa que apoA-I 100 y 200 µg/mL producen un aumento significativo de la actividad de la eNOS (36% y 42% respectivamente, $p < 0,05$) (figura 21) y comparable al observado con el control positivo (histamina 10 mM). Cabe destacar que a concentraciones menores, 25 y 50 µg/mL, también se observa una mayor actividad de la eNOS (alrededor de un 30% para ambas concentraciones), pero éstos no logran significancia estadística. Por lo anterior, se utilizó la concentración de 200 µg/mL de apoA-I para los ensayos posteriores de la actividad de la eNOS.

Con respecto a la biodisponibilidad de NO (figura 21) se observa un aumento significativo luego de la incubación con apoA-I 50, 100 y 200 µg/mL (13%, 28% y 16% respectivamente, $p < 0,001$) y comparable al control positivo. Además existe una diferencia significativa entre la concentración de 100 y 200 µg/mL de apoA-I, siendo la primera la que genera la mayor magnitud de aumento en la biodisponibilidad de NO, y, por lo tanto, la concentración elegida para los ensayos posteriores.

Para confirmar que los resultados obtenidos con apoA-I dependen de la síntesis de NO, las hEPC de 7 días fueron incubadas con L-NAME (inhibidor de la eNOS) previo a la adición de la L-[³H]-arginina o la sonda DAF-FM-DA. Se observa que L-

NAME (figura 21) revierte completamente el efecto de apoA-I sobre ambos parámetros, obteniéndose un efecto comparable a la condición basal (sin estímulo).

Estos resultados demuestran que en hEPC de 7 días, apoA-I libre aumenta la actividad de la eNOS que conlleva una mayor biodisponibilidad de NO, es decir, promueve una mayor síntesis de NO. Este efecto se observa a concentraciones fisiológicas de apoA-I.



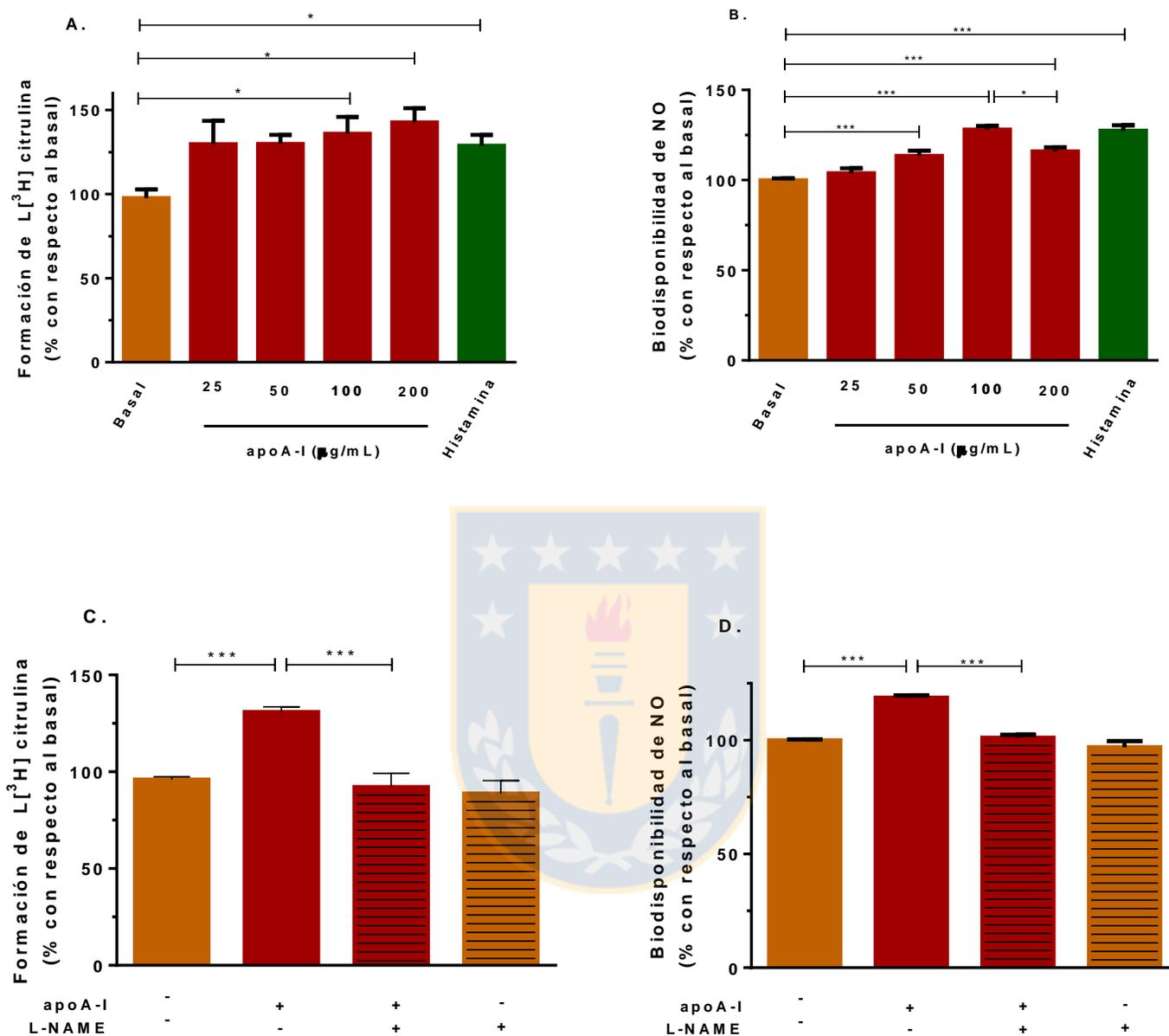


Figura 21. Efecto de apoA-I sobre la síntesis de NO. **A. y C.** Actividad de eNOS determinada por la conversión de L-[³H]-arginina a L-[³H]-citrulina. **B. y D.** La biodisponibilidad de NO fue cuantificada por fluorescencia con la sonda DAF-FM-DA. Ambos efectos se midieron a 30 minutos de incubación. **A y B.** curvas de concentración de apoA-I; **C y D.** Efecto de la inhibición de la eNOS. En **C** apoA-I = 200 µg/mL; en **D**, apoA-I = 100 µg/mL. El inhibidor L-NAME (100 µM) fue agregado a las hEPC 4 horas antes del tratamiento con L-[³H]-arginina o la sonda. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. n=6 experimentos independientes.

6 Rol del receptor ecto-F₁-ATPasa en la síntesis de NO en hEPC tempranas

Para este objetivo, se utilizaron los inhibidores IF1 y oligomicina. El primero de ellos fue adicionado a los cultivos junto con apoA-I y el segundo, previo a agregar la sonda o tratarlas con L-[³H]-arginina. En los ensayos de actividad se observa que IF1 revierte completamente el efecto de apoA-I, llevándolo al valor de la condición basal (figura 22A). Este efecto no se observa con oligomicina, el cual no modifica el resultado obtenido con apoA-I. Por otro lado, se observa que tanto IF1 como oligomicina revierten completamente la mayor biodisponibilidad de NO obtenida luego del tratamiento con apoA-I. Estos resultados demuestran que el receptor ecto-F₁-ATPasa media el aumento en la síntesis de NO, generada por apoA-I.

Para determinar la participación de otros receptores de apoA-I que pudieran estar implicados en la mayor síntesis de NO observada en células tratadas con apoA-I, se evaluó ABCA1 y SR-BI. Con respecto al primero, se utilizó un anticuerpo neutralizante dirigido con este transportador, cuya pre-incubación con las hEPC no generó cambios en la actividad de eNOS ni en la biodisponibilidad de NO, en comparación con apoA-I. El control de isotipo y el anticuerpo anti-ABCA1 no produjeron efecto alguno sobre estos parámetros (figura 23). Con respecto a SR-BI, el inhibidor BLT-1 tampoco modificó el efecto de apoA-I, en la actividad de la eNOS ni en la biodisponibilidad de NO (figura 24).

En conjunto de estos resultados demuestran que, en nuestras condiciones, apoA-I aumenta la síntesis de NO en hEPC de 7 días, efecto que depende únicamente del receptor ecto-F₁-ATPasa, lo que concuerda con resultados anteriores realizados por nuestro grupo de investigación en células endoteliales HUVEC.

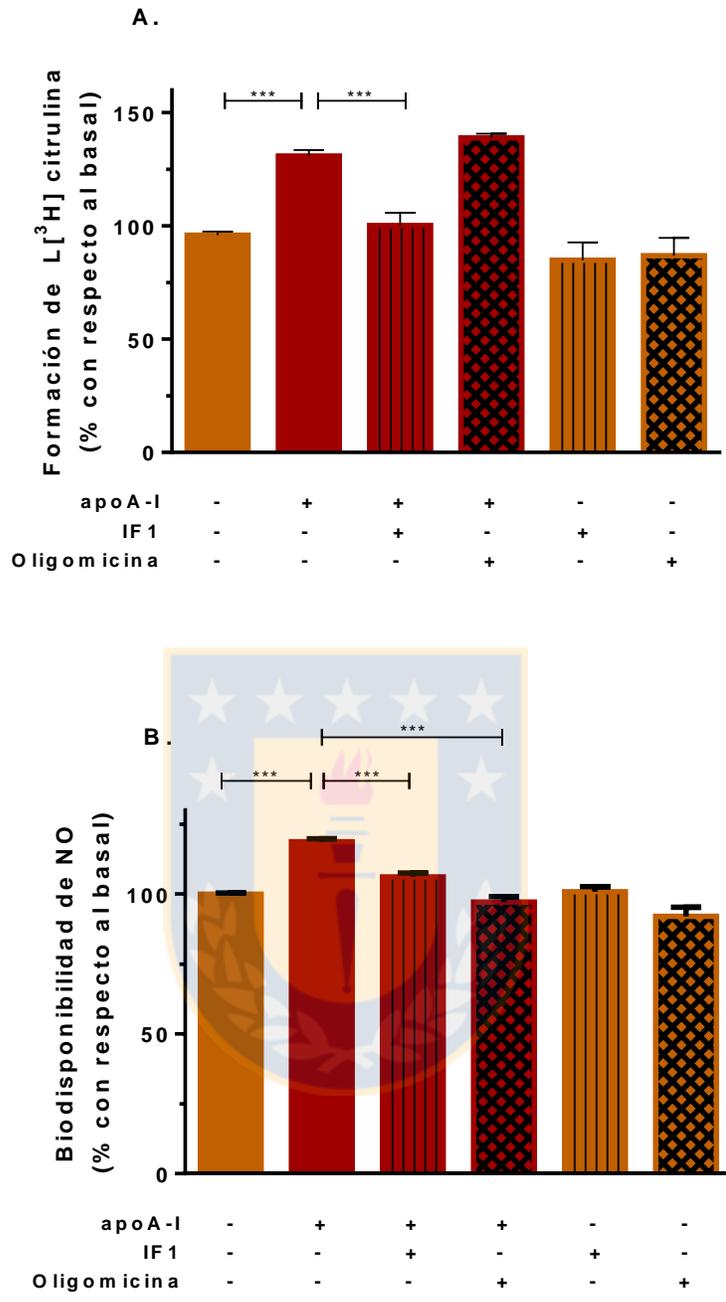


Figura 22. Rol de ecto-F₁-ATPasa en la síntesis de NO. **A.** La actividad de la eNOS fue determinada por la formación de L-[³H]-citrulina a partir de L-[³H]-arginina. **B.** La biodisponibilidad de NO fue cuantificada por fluorescencia con la sonda DAF-FM-DA. Ambos efectos se midieron a 30 minutos de incubación con apoA-I (200 µg/mL para actividad de eNOS y 100 µg/mL para biodisponibilidad de NO). El inhibidor IF1 (3,6 µg/mL) fue agregado junto con apoA-I y oligomicina (125 nM) fue incubada con las hEPC 4 horas previo a los tratamientos con L-[³H]-arginina o la sonda. ***p<0,001. n=4 experimentos independientes.

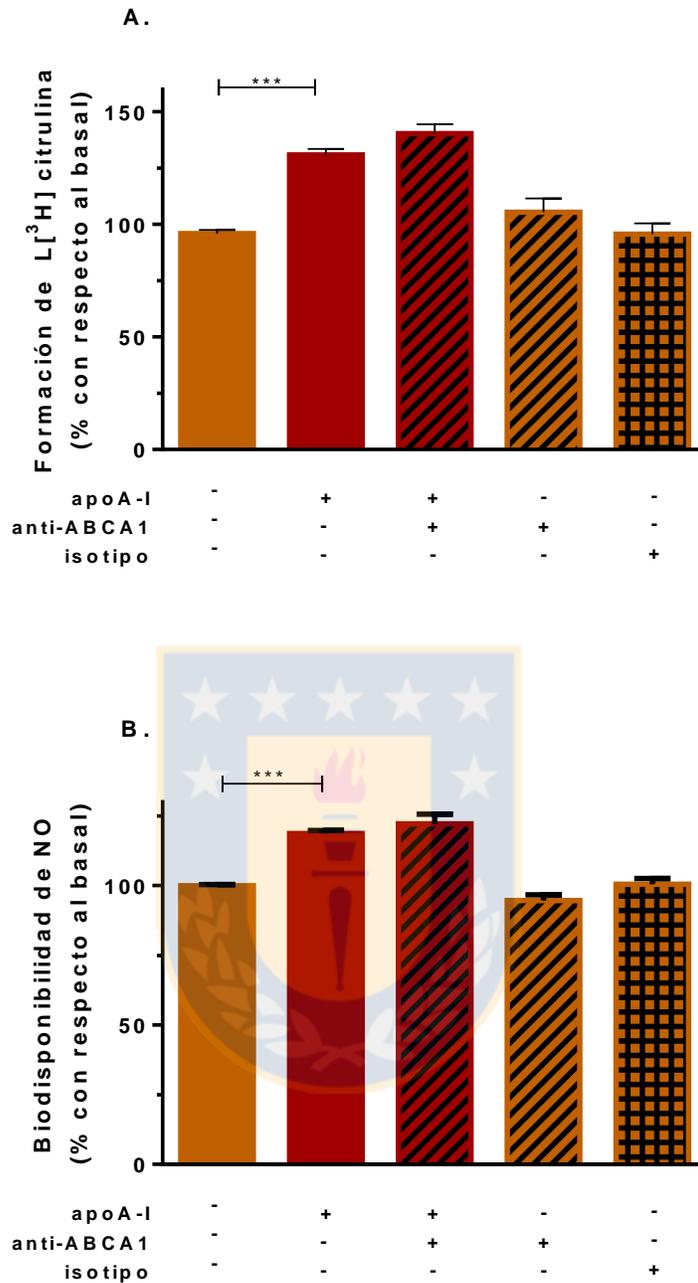
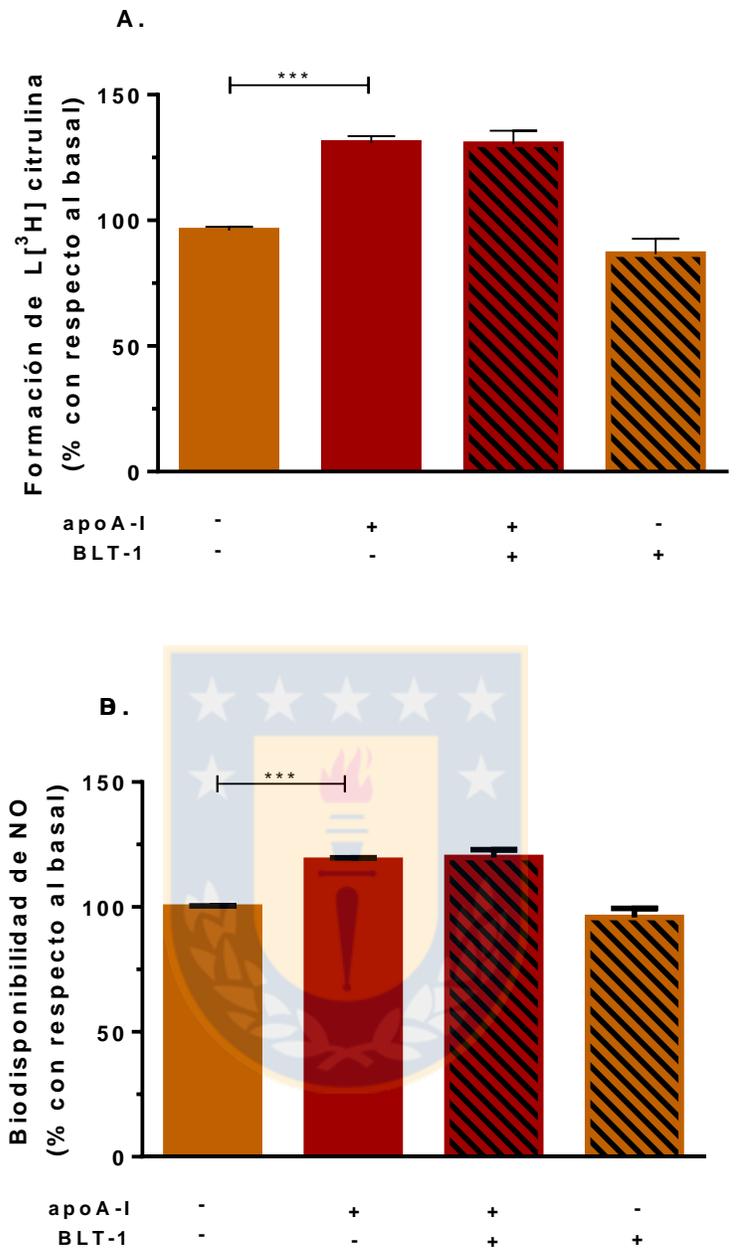


Figura 23. Contribución del transportador ABCA1 en la síntesis de NO **A.** La actividad de la eNOS fue determinada por la formación de L-[³H]-citrulina a partir de L-[³H]-arginina. **B.** La biodisponibilidad de NO fue cuantificada por fluorescencia con la sonda DAF-FM-DA. Ambos efectos se midieron a 30 minutos de incubación con apoA-I (200 µg/mL para actividad de eNOS y 100 µg/mL para biodisponibilidad de NO) El anticuerpo anti-ABCA1 y control de isotipo (1/1000) fueron pre-incubados con las hEPC 1 hora previo a los tratamientos con L-[³H]-arginina o la sonda. ***p<0,05. n=3 experimentos independientes.



00

Figura 24. Participación del receptor SR-BI en la síntesis de NO. **A.** La actividad de la eNOS fue determinada por la formación de L-[³H]-citrulina a partir de L-[³H]-arginina. **B.** La biodisponibilidad de NO fue cuantificada por fluorescencia con la sonda DAF-FM-DA. Ambos efectos se midieron a 30 minutos de incubación con apoA-I (200 µg/mL para la actividad de eNOS y 100 µg/mL para la biodisponibilidad de NO). El inhibidor BLT-1 (10 µM) fue pre-incubado con las hEPC durante 4 horas previo a los tratamientos con L-[³H]-arginina o la sonda. ***p<0,001. n=3 experimentos independientes.

DISCUSIÓN

Las ECV son la principal causa de muerte en Chile y el mundo. En el año 2015, un 31% de las defunciones mundiales se debieron a estas patologías y en Chile correspondió al 28% en el año 2014 [2, 3]. A pesar de la implementación de programas de prevención, la Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que para el año 2030 habrá un alza de 6 millones fallecimientos por esta causa [1]. Además, las ECV son la tercera causa de Años de Vida Perdidos por Discapacidad y Muerte Prematura en Chile en el rango etario de los 20 a los 74 años [4]. Por lo tanto, es importante prevenir la aparición de la enfermedad y mejorar la sobrevida y calidad de vida de los pacientes que ya sufrieron un evento agudo isquémico.

Los factores de riesgo de las ECV son similares a los que predisponen al desarrollo de aterosclerosis, proceso de engrosamiento de arterias mayores cuyas complicaciones llevan a oclusiones totales o parciales del flujo sanguíneo o embolia en arterias periféricas [22, 32]. El inicio de la aterosclerosis se relaciona con una condición que afecta al endotelio vascular, denominada disfunción endotelial, cuyo principal signo y causa es una menor síntesis y/o biodisponibilidad de NO. En este estado el endotelio presenta un fenotipo pro-inflamatorio, coagulante, oxidante y proliferativo, favoreciendo la pérdida de la integridad endotelial, causado por los factores de riesgo que favorecen el inicio y desarrollo de la aterosclerosis [22]. El conocimiento de los mecanismos involucrados en el inicio de la disfunción endotelial y progresión de la aterosclerosis constituyen la base para el desarrollo de futuros tratamientos contra las ECV.

Entre los mecanismos endógenos de mantención de la integridad y función endotelial destacan HDL y su proteína mayoritaria, apoA-I, además de una población celular circulante inmadura capaz de diferenciarse a célula endotelial, denominadas EPC [36]. Como se ha descrito, tanto la funcionalidad como el número de estas células constituyen factores importantes tanto para la mantención de la función fisiológica del endotelio como para el éxito de los tratamientos existentes contra el desarrollo de ECV [42]. La apoA-I y las HDL modulan la funcionalidad y el número de estas células en circulación, por lo tanto constituyen un eje importante para la mantención de la integridad endotelial.

Por lo anterior, la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos que permitan modular la funcionalidad de las hEPC para mejorar o complementar los tratamientos de ECV son de gran utilidad, tanto para prevenir futuros eventos cardiovasculares, como para mejorar el resultado de intervenciones en pacientes post-infarto agudo de miocardio.

En esta tesis se trabajó con hEPC tempranas y apoA-I con la finalidad de dilucidar un nuevo eje de modulación de la funcionalidad de estas células. Para ello se utilizaron hEPC de 7 días de cultivo, ya que corresponden a una población celular con beneficios terapéuticos reportados, y por otro lado se trabajó con apoA-I extraída desde HDL humanas.

Obtención de apoA-I humana

ApoA-I es una reconocida apoproteína anti-aterogénica, importante para la biosíntesis de las HDL y el transporte reverso del colesterol. Además, apoA-I se ha descrito en efectos protectores en el endotelio, tanto en su forma lipídada como libre de lípidos [131, 151].

El principal foco de esta investigación se centró en el estudio de ecto-F₁-ATPasa, un receptor de apoA-I y HDL, expresado en la superficie de hEPC. Para ello, se utilizó apoA-I libre de lípidos, con el objetivo de activar selectivamente dicho receptor y ABCA1, excluyendo el aporte de ABCG1 y SR-BI y otros receptores de HDL expresados en células endoteliales [100, 151]. Puesto que entre los receptores de apoA-I más expresados en la superficie endotelial es ecto-F₁-ATPasa, esta metodología activa principalmente este receptor, siendo minoritaria la contribución de ABCA1 [151]

La apoA-I libre utilizada en esta tesis fue obtenida desde plasma humano, específicamente desde la fracción de HDL, mediante delipidación de estas lipoproteínas y posterior elución desde gel. Esta técnica es ampliamente aplicada a variadas proteínas y para distintos fines, como la obtención de antígenos para la producción de anticuerpos, determinación de secuencia aminoacídica, utilización en espectrómetro de masas, determinación de actividad enzimática, entre otros. Brace y col [159] fueron los primeros en aplicar esta metodología para aislar apoA-I humana funcional desde pequeños volúmenes de plasma (en comparación con la cromatografía de exclusión por tamaño [165]). Con este protocolo, se obtuvo apoA-I libre de albúmina, que corresponde al principal contaminante del método utilizado para

aislar las HDL, y apoA-II, que es la segunda apoproteína más abundante de las HDL. Si bien el gel para la verificación de la pureza de apoA-I fue realizado a la misma concentración que el de extracción (por lo tanto, no hay mayor resolución), la finalidad de éste fue descartar la presencia de albúmina y apoA-II, ya que se trata de un aislamiento desde HDL, condición bajo la cual apoA-I es la única proteína que migra cerca de los 28 kDa [97]. Con esta metodología fue posible recuperar, en promedio, alrededor del 90% de la apoA-I contenida en el *pool* de HDL sembrado en los geles, por lo tanto se considera una metodología apropiada para recuperar apoA-I con gran pureza y rendimiento desde HDL plasmática.

Validaciones anteriores realizadas en nuestro laboratorio compararon la funcionalidad del preparado de apoA-I eluido desde gel con los obtenidos mediante cromatografía exclusión, en ensayos de actividad de la eNOS, biodisponibilidad de NO y reactividad de vasos sanguíneos (miografías). En estos experimentos, apoA-I generó idénticos efectos, independiente del método de aislamiento, lo que demuestra que la apoA-I obtenida desde gel mantiene sus características funcionales [156]. Cabe destacar que al obtener menores cantidades de apoA-I por la metodología de aislamiento desde gel (por utilizar pequeños volúmenes de HDL delipidada), en esta tesis se realizaron varias purificaciones de apoA-I a partir de un mismo *stock* de HDL y desde diferentes *pools* de HDL. Éstas HDL fueron obtenidas desde diferentes donantes sanos, no fumadores, que realizaban deporte normalmente y en los cuales se mantenía una proporción 1:1 de hombres y mujeres. La magnitud de los efectos producidos por estas diferentes preparaciones podría diferir en los ensayos funcionales, lo que es intrínseco a la variabilidad biológica, tanto de las muestras de apoA-I como de las hEPC. Para evitar sesgos y grandes desviaciones estándar en los

resultados, todos los preparados de apoA-I fueron utilizados para la determinación de los distintos parámetros funcionales de esta tesis, variando además los donantes desde los cuales se aislaron las hEPC. Con ello, se evitó la utilización de un mismo preparado de apoA-I para el desarrollo de un único objetivo o metodología, buscando obtener resultados más representativos.

En conclusión, la metodología de obtención de apoA-I mediante aislamiento desde HDL por elución desde gel, nos permitió aislar esta proteína de manera rápida (en comparación con el método de extracción convencional [165]) y utilizando menores volúmenes de HDL, obteniendo una apoproteína pura y funcional.

Obtención de hEPC tempranas

La hEPC fueron aisladas desde sangre periférica de voluntarios sanos, según lo descrito en literatura [47, 116]. Para la diferenciación de los progenitores hacia el linaje endotelial, las PBMC fueron cultivadas en placas recubiertas con fibronectina, utilizando medio suplementado con factores de crecimiento endotelial durante 7 días. Según esta metodología de cultivo, las EPC se seleccionan por la adherencia a la fibronectina [47]. Durante el tiempo de cultivo, se pudo observar el cambio en la morfología desde células pequeñas y redondas a los 3 días, hasta células más alargadas, grandes y distribuidas de manera más homogénea a los 7 días, como se describe en literatura a las hEPC más comprometidas con el linaje endotelial [53]. Esta metodología asegura el aislamiento de progenitores tempranos derivados de médula ósea, lo que se confirma por la expresión de marcadores (CD34, CD31, Flk-1 y E-selectina entre otros [47]), por ensayos de funcionalidad [53] y por los cambios

morfológicos observados microscópicamente [47, 53]. Si bien en esta tesis no hubo evaluación de marcadores de diferenciación en la población celular con la que se trabajó, ensayos previos de nuestro laboratorio confirman la obtención de hEPC con las características fenotípicas y funcionales, mediante metodología aquí utilizada [116, 163].

Considerando que las hEPC constituyen una pequeña población de células en circulación sanguínea (entre 0,0001-0,01% de las PBMC [49]), muy susceptibles al efecto de factores endógenos y exógenos [42], se establecieron criterios de inclusión y exclusión para la selección de los donantes, como se señaló en los materiales y métodos. Cabe señalar además que los donantes realizaban actividad física regular (70% de los donantes) y se incluyó aproximadamente mitad hombres (10) y mitad mujeres (12), los que fueron distribuidos aleatoriamente para la determinación de cada parámetro en estudio, manteniendo la relación 1:1 señalada en cada técnica utilizada.

La importancia de utilizar hEPC de 7 días radica en el interés de modular su funcionalidad para su futuro uso en terapia celular. En primer lugar, antecedentes previos obtenidos en nuestro laboratorio, demuestran que a los 7 días es posible modificar genéticamente la expresión de proteínas en hEPC, mediante infección con adenovirus, lo cual no ocurre a los 3 días de diferenciación [163]. Por otro lado, se ha reportado en literatura el uso de hEPC aisladas desde pacientes infartados transcurridos 7 días desde el evento cardiovascular, las que demuestran mejoras significativas en la zona isquémica y en el tejido cardíaco post-infarto [166]. Por lo tanto, considerando que nuestra línea de investigación apunta a la implementación de una futura terapia celular post-infarto, el tiempo de 7 días es idóneo tanto en el aspecto

metodológico como en el terapéutico. Si bien las hEPC de 3 y 7 días de cultivo corresponden a la población de EPC tempranas, este tiempo es suficiente para evidenciar cambios fenotípicos y funcionales, según lo descrito en esta tesis, los cuales pueden repercutir en el diseño y aplicación de la terapia celular.

Proliferación de hEPC

El número de hEPC tempranas es un factor importante para la función de estas células y su posterior diferenciación a fenotipos tardíos [167]. Estudios demuestran que mientras mayor es la población de hEPC tempranas luego de un IAM, mejor es el pronóstico de los pacientes, lo que muestra la importancia de la magnitud del *pool* de esta población [166]. Considerando que la proliferación de EPC en los estadios tempranos es menor que en los tardíos [53, 167], la posibilidad de modular esta población para aumentar tempranamente su cantidad permitiría contar con un mayor *pool* que pudiera promover su propia funcionalidad, y la de hEPC tardías y células endoteliales, a través de la liberación de citoquinas angiogénicas, además de otorgar una mayor población celular con potencial diferenciación a hEPC tardías.

Con respecto a las hEPC tempranas de 3 días, ha sido descrito que apoA-I aumenta la proliferación celular de forma dosis dependiente, luego de 48 horas de estímulo [116], siendo éste el único antecedente que involucra apoA-I extraída desde plasma humano con la funcionalidad de este tipo celular. Se ha reportado que VEGF [168] y HDL [113] también aumentan la proliferación de EPC tempranas, pero la magnitud del efecto de HDL es menor si se compara con el de apoA-I libre [116]. Con respecto a EPC de 7 días, estudios desarrollados en rEPC con HDL, describen un

aumento en la proliferación a concentración de 37,5 µg/mL a las 8 horas de estímulo [113]. Por otro lado en hEPC, un mimético de apoA-I (D-4F) promueve la proliferación a concentraciones menores a las utilizadas en esta tesis (5-25 µg/mL) y a tiempos más cortos (24 horas) [120]. La estructura de este mimético corresponde a una porción de apoA-I, la que ha sido caracterizada como la secuencia más ávida de lípidos dentro de la proteína nativa [118]. Existe evidencia que D-4F aumenta los parámetros funcionales de hEPC de 7 días por una posible lipidación parcial en el medio de cultivo, lo que permite su interacción con el receptor de HDL, SR-BI [120]. En células endoteliales maduras se ha descrito que los efectos producidos por este mimético estarían mediados por la interacción con ABCA1 [143]. Por lo tanto, según estos antecedentes, D-4F interacciona con al menos dos receptores, lo que podría explicar el aumento significativo en los parámetros funcionales, a menor tiempo y concentración que apoA-I nativa. Sin embargo, no existen estudios de hEPC de 7 días que involucren apoA-I libre extraída desde plasma humano, como en este trabajo, por lo tanto, si bien los antecedentes de D-4F son importantes de mencionar, no son ensayos comparables, ni en dosis ni en tiempo de respuesta. En nuestros ensayos apoA-I libre puede ser lipidadada en el curso de los experimentos, sin embargo nuestros resultados muestran que si este fenómeno ocurrió, fue en un porcentaje despreciable. Por una parte se tomó la precaución experimental de trabajar con un medio bajo en suero en todos los ensayos y al evaluar la participación del receptor SR-BI, se determinó que éste no mediaba de manera significativa ninguno de los efectos que apoA-I producía sobre las hEPC. Por lo tanto, efectivamente la fracción de apoA-I lipidadada puede ser considerada como despreciable bajo nuestras condiciones experimentales, lo que concuerda con antecedentes bibliográficos que describen que

a los 30 minutos de experimentación, sólo un 20% de la apoA-I adicionada al cultivo se encuentra lipidada, porcentaje que se mantiene hasta los 120 minutos [169].

Como se mencionó, ensayos realizados por nuestro laboratorio en hEPC de 3 días muestran un aumento significativo en la proliferación con apoA-I [116], sin embargo en este trabajo no se observó este efecto con células de 7 días de cultivo. Esto se puede deber a que fenotípicamente y a nivel de expresión de diferentes enzimas, transportadores, receptores, etc., las hEPC de 3 y 7 días son dos poblaciones con diferencias considerables. Se ha descrito un aumento de la población doble positivo CD34⁺ / KDR⁺ desde un 29,6% a los 3 días de cultivo a un 83,6% a los 7 días lo que se correlaciona con diferencias funcionales, como la posibilidad de infectarlas con adenovirus, lo que no ocurre a los 3 días, debido a una expresión diferencial de proteínas de membrana como el receptor coxsackie-adenovirus y las integrinas $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$ [163]. En esta tesis se demostró que la expresión de la eNOS aumenta significativamente entre los 3 y los 9 días de cultivo, este último tiempo coincide con la determinación de los ensayos de proliferación. La diferencia en la expresión de la eNOS había sido descrita previamente entre células de 3 y 14 días [74] sin embargo, en esta tesis demostramos que en los tiempos intermedios a los ya descritos, hay una expresión basal de la eNOS que se modifica significativamente (figura 15). Por otra parte nuestros ensayos preliminares sugieren que la expresión de ABCA1 también muestra una diferencia de expresión considerable entre 3,7 y 9 días de cultivo (figura 18). Por lo tanto, la población celular utilizada, a pesar de cumplir con los criterios de hEPC tempranas, presenta diferencias considerables que determinan que no respondan necesariamente de igual manera frente a un mismo estímulo. Para complementar nuestros resultados, se sugiere realizar ensayos con otros estímulos,

como por ejemplo con HDL, para verificar si los cambios observados en la respuesta de hEPC tempranas de 3 y 7 días con apoA-I son particulares a esta proteína o corresponden a los cambios asociados al estado de diferenciación celular.

El método utilizado para determinar la proliferación fue el reactivo metil-tiazol-tetrazol (MTT), el cual evidencia la cantidad de células metabólicamente activas, capaces de formar cristales de formazán que, luego de la lisis celular, colorean el medio [160]. Para interpretar los resultados obtenidos por esta metodología se deben tomar ciertas precauciones. En primer lugar, se consideró igual número de células por pocillo (al momento de sembrar), lo que fue corroborado microscópicamente cada día hasta el final de los ensayos. Además, previo al tratamiento con MTT las células fueron incubadas en medio con bajo suero para disminuir el metabolismo basal. Por último, luego del tratamiento con MTT y previo al lisado celular, se observaron todos los pocillos al microscopio óptico para confirmar que efectivamente los resultados obtenidos por absorciometría se correlacionaban con la mayor cantidad de células por pocillo. En todas las observaciones microscópicas se confirmó que aquellos pocillos tratados con apoA-I no mostraban diferencias visibles con respecto al basal, a diferencia del control positivo donde sí se evidenció un aumento en la densidad celular, que se correlacionó con la absorbancia obtenida. A pesar de lo anterior, para corroborar estos resultados, se podrían utilizar otras metodologías que directamente determinen la proliferación celular, como es la incorporación de bromodesoxiuridina o a través de citometría de flujo.

Por lo tanto en nuestros resultados y con la metodología utilizada, apoA-I no aumenta la proliferación de hEPC de 7 días a ninguna concentración ensayada, luego

de 48 ni 72 horas de tratamiento. Sin embargo, que no se evidencie proliferación no significa que apoA-I no genere algún efecto en la sobrevivencia celular. Antecedentes en hEPC tardías, muestran que las HDL a concentraciones de 400 y 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ previene la disminución en la viabilidad celular producida por LDLox [170], antecedentes que son complementados con estudios realizados en hEPC de 7 días, tratadas por 24 horas con HDL (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), en los cuales se observa una disminución en la actividad de caspasa-3, frente a homocisteína como estímulo apoptótico [112]. Un efecto parecido se observa en hEPC tempranas tratadas durante 7 días con rHDL (1 mg/mL), donde se describe la disminución de la apoptosis, en comparación con las células no tratadas [171]. Por lo tanto, si bien no detectamos un aumento en la proliferación utilizando apoA-I libre, pudiera existir un efecto protector de esta apoproteína sobre una población de hEPC expuesta a un agente apoptótico. Si consideramos además que los efectos descritos para HDL en hEPC tempranas son menores en magnitud a los producidos por apoA-I libre [116], cabe la probabilidad que esta apoproteína ejerza mayor protección contra la apoptosis que HDL. Así, se sugiere complementar los resultados obtenidos con ensayos de viabilidad celular frente a estímulos citotóxicos.

Capacidad angiogénica de hEPC

Para la evaluación de la angiogénesis mediada por hEPC, se utilizaron células ECV-304, una línea celular epitelio-endotelial [172], que proporciona un modelo de angiogénesis *in vitro* robusto y altamente reproducible [173]. Estas células fueron co-cultivadas con hEPC de 7 días, debido a que las hEPC tempranas son incapaces de formar estructuras tipo capilares por sí solas, y por lo tanto se hace necesario proveer

una red capilar en la cual hEPC se incluyan o ejerzan acción mediante la liberación de citoquinas [56].

En términos generales, apoA-I no produce efecto significativo en la angiogénesis generada por ECV-304, a excepción de concentraciones particulares en tiempos determinados (Figura 12). Sin embargo, éstos no coincidieron con las condiciones bajo las cuales se realizaron los ensayos de angiogénesis con apoA-I (apoA-I 200 µg/mL y 4 horas de incubación). Con respecto al co-cultivo de ECV-304 y hEPC, se observó que estas últimas aumentan significativamente el área, largo y número de ramificaciones de las estructuras formadas por las células endoteliales (figura 14), lo que se condice con antecedentes previos [116]. Sobre este efecto se observó que sólo apoA-I 200 µg/mL produjo un aumento estadísticamente significativo en la angiogénesis (figura 14). Si bien la concentración de apoA-I utilizada es mayor a la descrita en otros estudios [116], corresponde al límite superior del rango fisiológico de apoA-I libre en el humano, por lo mismo no se utilizaron concentraciones mayores [97]. El aumento observado en los parámetros de angiogénesis en el co-cultivo incubado con apoA-I corresponderían a un efecto de esta proteína sobre las hEPC, puesto que a pesar de observarse una tendencia al aumento sobre las ECV-304, tratadas con apoA-I 200 µg/mL, éste no es estadísticamente significativo ni representa una magnitud comparable a lo observado en el co-cultivo con apoA-I.

La angiogénesis corresponde por definición al proceso de formación de vasos sanguíneos desde otros pre-existentes [44, 46], por lo que estrictamente hablando, con la metodología utilizada, se podría haber evaluado tanto angiogénesis como vasculogénesis (formación de vasos sanguíneos desde células indiferenciadas). Sin

embargo, como ya se describió, la población de hEPC tempranas no es capaz de generar estructuras tipo capilares por sí solas [56], y por lo tanto, los resultados observados corresponderían al efecto de las hEPC en la angiogénesis, ya sea por la inclusión de estas células en las estructuras generadas por las ECV-304 como por la síntesis de moléculas angiogénicas de acción autocrina y paracrina. Para corroborar estos resultados se podría modificar la metodología y marcar las hEPC previo al cocultivo, para determinar cuál es el porcentaje que se incluye en la red formada por las ECV-304. Por otro lado, se podría tratar las ECV-304 sólo con los medios condicionados de las hEPC, no con las células. Así sería posible determinar la contribución de cada factor al aumento de la angiogénesis.

Es ampliamente aceptado el rol del NO en la angiogénesis, donde su principal contribución es su participación como molécula efectora de diferentes estímulos como VEGF, angiopoyetina-1, FGF e IL-8, entre otros [174]. Se ha demostrado *in vivo* que la angiogénesis mediada por VEGF [175] y la neovascularización generada por VEGF y por angiopoyetina-1 [176], se ven disminuidas significativamente al utilizar ratones eNOS^{-/-}. Con respecto a la vía de señalización, se ha descrito que VEGF y SDF-1, entre otros, actúan en la médula ósea, aumentando la actividad y expresión de la MMP-9 vía NO [177], que cliva a Kit-ligando (generando sKitL) lo que lleva a proliferación y movilización de los progenitores endoteliales a circulación [72]. Por otra parte, el NO aumenta la síntesis de citoquinas angiogénicas por distintos tipos celulares, como VEGF y eritropoyetina [83, 178, 179], por lo que estos antecedentes nos sugerirían que además de los efectos en la proliferación y migración de las células endoteliales, NO podría estar aumentando la expresión de citoquinas angiogénicas importantes.

Para evaluar la participación de la eNOS en la angiogénesis observada en el co-cultivo de ECV-304 con hEPC, se determinó de manera semi-cuantitativa la expresión de la eNOS en diferentes días de cultivo de hEPC tempranas (figura 15). Se observa para las hEPC una expresión diferencial de eNOS conforme aumentan los días de cultivo, lo que concuerda con lo descrito en bibliografía [53, 74]. Con respecto a la evaluación de la actividad enzimática, se ha demostrado que ésta aumenta en hEPC de 14 días, comparado con 3 días de cultivo, lo que se relaciona con un incremento de la expresión de la eNOS y la funcionalidad de estas células [74]. En esta tesis se realizó una evaluación preliminar de la biodisponibilidad de NO a los 7 días en comparación 9 sin encontrar diferencias significativas (datos no mostrados). Estos antecedentes deben ser corroborados con ensayos de actividad de la eNOS, puesto que existen diferencias significativas en la expresión de esta enzima en estos días de cultivo (figura 15).

La participación de la eNOS en la angiogénesis mediada por hEPC de 7 días, fue determinada por la incubación de las hEPC con L-NAME (100 μ M) previo al co-cultivo con ECV-304 (figura 16). Con esta estrategia, que busca inhibir sólo la eNOS presente en las hEPC, se abolió la angiogénesis generada por apoA-I en los co-cultivos, alcanzando los niveles de la condición basal (ECV-304 + hEPC). Estos resultados demuestran que la síntesis de NO en las hEPC tempranas promueve efectos autocrinos o paracrinos que favorecen la angiogénesis. Si bien el rol del NO en la angiogénesis mediada por EPC ya ha sido descrito [78, 180], así como el efecto de apoA-I libre en la angiogénesis de hEPC de 3 días [116], nuestros resultados constituyen la primera evidencia del nexo entre la angiogénesis generada por apoA-I

nativa humana, a través de efectos sobre los progenitores endoteliales, con la síntesis de NO en estas células.

Ecto-F₁-ATPasa corresponde a la ATP sintasa mitocondrial descrita en la superficie de células endoteliales maduras [149]. En HUVEC se ha demostrado que este receptor une apoA-I libre de lípidos, representando cerca del 70% de la unión de esta apoproteína [151]. La primera evidencia de la presencia de este receptor en hEPC fue dada por nuestro grupo de investigación en células de 3 días de cultivo [116], en las cuales media los efectos de proliferativos y angiogénicos de apoA-I. Para evaluar la participación de este receptor en la angiogénesis mediada por hEPC de 7 días, se utilizó dos inhibidores: IF1 y oligomicina. Con ellos se observa una reversión total del efecto de apoA-I sobre los 3 parámetros de angiogénesis evaluados (largo, área y número de ramificaciones, figura 17). Curiosamente, IF1 genera una inhibición significativa de las estructuras formadas sólo por las ECV-304. El efecto de IF1 en la proliferación se había descrito anteriormente en HUVEC, mediante la interacción con ecto-F₁-ATPasa [151, 181], sin embargo no se había detectado el efecto inhibitorio sobre la angiogénesis basal. Como se observa en el co-cultivo con IF1, existe una disminución de la angiogénesis con respecto al co-cultivo sin estímulo, que correspondería al efecto del inhibidor tanto en las hEPC como ECV-304, ya que IF1 fue agregado al co-cultivo junto con apoA-I y mantenido hasta cuando se sacaron las fotos (4 horas). Con respecto a la oligomicina, este inhibidor disminuye la angiogénesis basal del co-cultivo, lo que se debe a un efecto exclusivo sobre las hEPC, debido que este inhibidor no estuvo en contacto con las ECV-304. Estos resultados muestran que la inhibición de la funcionalidad de las hEPC disminuye la formación basal de las estructuras tipo capilar por parte de las ECV-304, presuntamente por la inhibición de

la síntesis de citoquinas por las hEPC, puesto que el número de hEPC que se utilizó en el co-cultivo sin estímulo es el mismo al utilizado con las células tratadas con oligomicina. Esto no excluye que disminuya además la inclusión de las hEPC en las redes formadas por las ECV-304, pero se necesita modificar la metodología utilizada para poder determinarlo, como se describió anteriormente.

Si bien ecto-F1-ATPasa es el receptor mayoritario de apoA-I en células endoteliales, ABCA1 también puede mediar efectos dependientes de esta apoproteína. Por lo anterior, es necesaria la evaluación de la participación de ABCA1 en el efecto angiogénico producido por apoA-I. En EPC no existe antecedente de la expresión de ABCA1, pero nuestros ensayos preliminares por *western blot* sugieren su presencia y aumento en los días de cultivo. Este resultado corresponde a la primera evidencia de la presencia de este transportador en hEPC, por lo cual es necesario confirmarlo y complementarlo con otras metodologías, como inmunocitoquímica. Con respecto a las posibles repercusiones funcionales, se ha descrito en células endoteliales que ABCA1 media efectos anti-inflamatorios en respuesta a miméticos de apoA-I, como la inhibición de la expresión de moléculas de adhesión [142]; además, contribuye al aumento de funcionalidad (proliferación y migración) en células HUVEC [143]. Sin embargo, estudios de nuestro laboratorio en células HUVEC han demostrado que ABCA1 no participa en la síntesis de NO ni en la vasodilatación mediada por endotelio en respuesta a apoA-I humana [110, 156]. De igual modo, se demostró en esta tesis que el efecto de apoA-I sobre la angiogénesis dependiente de hEPC de 7 días no es modificado significativamente por la presencia de un anticuerpo neutralizante dirigido contra ABCA1. De manera interesante, se observa que los anticuerpos anti-ABCA1 y el control de isotipo inhiben la interacción entre ECV-304 y

hEPC, lo que se podría atribuir a un impedimento estérico debido a la unión de éstos a las hEPC, efecto que se revierte al utilizar apoA-I. Para complementar estos resultados se podría realizar un silenciamiento de ABCA1 en hEPC mediante el uso de siRNA.

En relación a SR-BI, se ha descrito su participación en la migración de células endoteliales maduras [90] y de EPC [77], además de un rol importante *in vivo* en modelos de re-endotelización [90]. Para evaluar su participación en el efecto angiogénico producido por apoA-I, se utilizó BLT-1, el bloqueador más potente del transporte de lípidos a través de SR-BI [182]. Con esta estrategia, se observa una reversión parcial, no estadísticamente significativa, del efecto de apoA-I en la angiogénesis *in vitro*. La tendencia a la disminución observada con BLT-1 se puede atribuir a una posible lipidación sufrida por apoA-I en el medio donde se llevó a cabo los experimentos o por las células presentes en el co-cultivo, antecedentes que ya se habían presentado en hEPC de 3 días tratadas con apoA-I [116] y en células de 7 días, utilizando el mimético D-4F [120]. Estos resultados avalan lo descrito anteriormente, con respecto al bajo porcentaje de lipidación de apoA-I, que correspondería a menos del 20% de la proteína adicionada al cultivo.

Con los antecedentes mostrados, es posible establecer que ecto-F₁-ATPasa promueve la capacidad angiogénica de hEPC de 7 días, siendo el único receptor implicado en este efecto en respuesta a apoA-I libre.

Síntesis de NO en hEPC

Está ampliamente documentado que la eNOS es esencial para la movilización de EPC desde médula ósea a circulación [72] y para su funcionalidad [80, 120]. En términos generales, la actividad de esta enzima es proporcional a su expresión, evidenciándose mayor síntesis de NO a mayor expresión proteica [74]. En hEPC de 7 días, se confirmó la expresión de la eNOS y se observó que a concentraciones fisiológicas de apoA-I aumentan de manera significativa la actividad de esta enzima y la biodisponibilidad de NO. Estos resultados corresponden a la primera evidencia del nexo entre apoA-I humana y la síntesis de NO en hEPC de 7 días, correlacionándose con lo que se ha descrito en células endoteliales [110].

En nuestro laboratorio hemos demostrado que en células endoteliales maduras, ecto-F₁-ATPasa es el principal receptor implicado en la síntesis de NO, tanto *in vitro* [155] como *ex vivo* [156], en respuesta a su ligando apoA-I. Ecto-F₁-ATPasa se expresa en hEPC tempranas [116] y nuestros resultados confirman que la síntesis de NO generada en hEPC de 7 días por apoA-I es mediada exclusivamente por este receptor. Tanto IF1 como oligomicina, inhibidores de ecto-F₁-ATPasa, revierten la mayor biodisponibilidad de NO producida por apoA-I, lo que concuerda con lo reportado anteriormente en células endoteliales HUVEC [110, 155]. Con respecto a la actividad de la eNOS, se observa el mismo efecto descrito con IF1, pero no para oligomicina. Este último no inhibe el efecto producido por apoA-I, pero tampoco ejerce acción por sí sólo en células no expuestas a apoA-I. Si bien IF1 y oligomicina se describen como inhibidores de la ecto-F₁-ATPasa, lo hacen por mecanismos diferentes y uniéndose a distintos dominios de la enzima: IF1 presenta un sitio de unión en el dominio F₁, mientras que oligomicina bloquea el dominio F_o [164]. Estos mecanismos

de inhibición podrían explicar las diferencias observadas en la actividad de la eNOS. Si bien oligomicina disminuyó la biodisponibilidad de NO, las metodologías de evaluación de estos dos parámetros son completamente diferentes, por lo tanto, ambas metodologías son complementarias, no necesariamente comparables y pueden ser afectadas por distintos mecanismos y factores.

En células endoteliales maduras se ha descrito que SR-BI modula la expresión de la eNOS frente a *shear stress* [132], mientras que antecedentes otorgados por nuestro laboratorio describen que no existe participación de este receptor en la síntesis de NO, en respuesta a apoA-I en células endoteliales HUVEC [110]. En hEPC, se observa que con BLT-1 no existe inhibición del efecto de apoA-I en la síntesis de NO, lo que concuerda con lo descrito en células endoteliales maduras [110]. Si bien en la angiogénesis *in vitro* se observa un efecto inhibitorio parcial y no significativo de BLT-1, éste no se detecta en la síntesis de NO. Esta diferencia se podría deber a que la síntesis de NO se mide a tiempos más cortos (30 minutos), donde menor cantidad de apoA-I puede ser lipídada [169], comparados con la angiogénesis que contempla 4 horas de incubación.

Con respecto al aporte de ABCA1 en la síntesis de NO producida por apoA-I, el bloqueo de este transportador con un anticuerpo que inhibe la unión de apoA-I no afecta ni la actividad de la eNOS ni la biodisponibilidad de NO, lo que se condice con los resultados obtenidos en la angiogénesis y antecedentes obtenidos en células endoteliales maduras [110, 155]

Por lo tanto, los resultados descritos en esta tesis avalan nuestra hipótesis de trabajo, en la cual se postula que el receptor ecto-F₁-ATPasa es el principal receptor de apoA-I que participa en el aumento de la funcionalidad de las hEPC tempranas, lo

cual se logra a través de una mayor síntesis de NO. El modelo propuesto para el actuar de apoA-I se describe en la figura 25. ApoA-I interacciona con el receptor ecto-F₁-ATPasa, lo que aumenta la síntesis de NO. Éste, por vías de señalización aún no descritas aumenta la capacidad angiogénica de EPC, ya sea por aumento en la secreción de citoquinas o de inclusión de las EPC en vasos sanguíneos. En base a lo descrito en células endoteliales maduras, es posible proponer que ecto-F₁-ATPasa podría promover la síntesis de NO a través de su actividad hidrolasa (ATP→ADP+Pi), la cual aumenta con apoA-I [131, 151]. El ADP activaría receptores purinérgicos P2Y, los cuales, a través de proteína G activaría las vía PI3K / Akt y MAPK (ERK1/2) que llevarían a la síntesis de NO y el aumento en la angiogénesis. Resta evaluar si el aumento de NO por la vía apoA-I / ecto-F₁-ATPasa regula otros parámetros de funcionalidad de EPC, como la migración, secreción de moléculas de adhesión, entre otras.

Cabe recalcar que ésta es la primera evidencia del rol que cumple apoA-I libre extraída desde plasma humano, y su receptor ecto-F₁-ATPasa, en la síntesis de NO y la repercusión funcional para hEPC de 7 días. Si bien aún falta confirmar los mecanismos propuestos para estos efectos, esta nueva vía de regulación proporciona conocimiento de importancia para identificar blancos terapéuticos que permitan optimizar el uso de esta población celular en el tratamiento de enfermedades cardiacas isquémicas. A pesar de no haber obtenido una mayor proliferación de hEPC al tratar estas células con apoA-I, nuestros resultados respaldan una mayor capacidad angiogénica dependiente de las hEPC, la que es un factor determinante para terapias post-IAM, que requieren una rápida y eficiente reperusión en la zona isquémica.

Es necesario recalcar que hace falta complementar los resultados obtenidos en esta tesis con enfoque en:

1) Determinar la presencia del receptor ecto-F₁-ATPasa en la superficie de las hEPC de 7 días, ya que hasta el momento sólo tenemos resultados certeros a los 3 días de diferenciación y algunos ensayos preliminares para los 7 días de cultivo.

2) Evaluar el posible efecto protector de apoA-I frente a estímulos citotóxicos que generen apoptosis.

3) Complementar la caracterización del efecto angiogénico de las hEPC, utilizando los medios condicionados de estas células en ensayos de Matrigel con células ECV-304 y marcando las hEPC previo al co-cultivo para observar su inclusión en las estructuras formadas.

4) Determinar si las vías de señalización corriente abajo del eje apoA-I / ecto-F₁-ATPasa en células endoteliales maduras aplican para hEPC.

El conjunto de estas investigaciones permitirá proponer una nueva alternativa para terapia celular en patologías isquémicas, como infarto agudo del miocardio, potenciando las capacidades de las hEPC del propio paciente en pos de la reparación de la zona infartada.

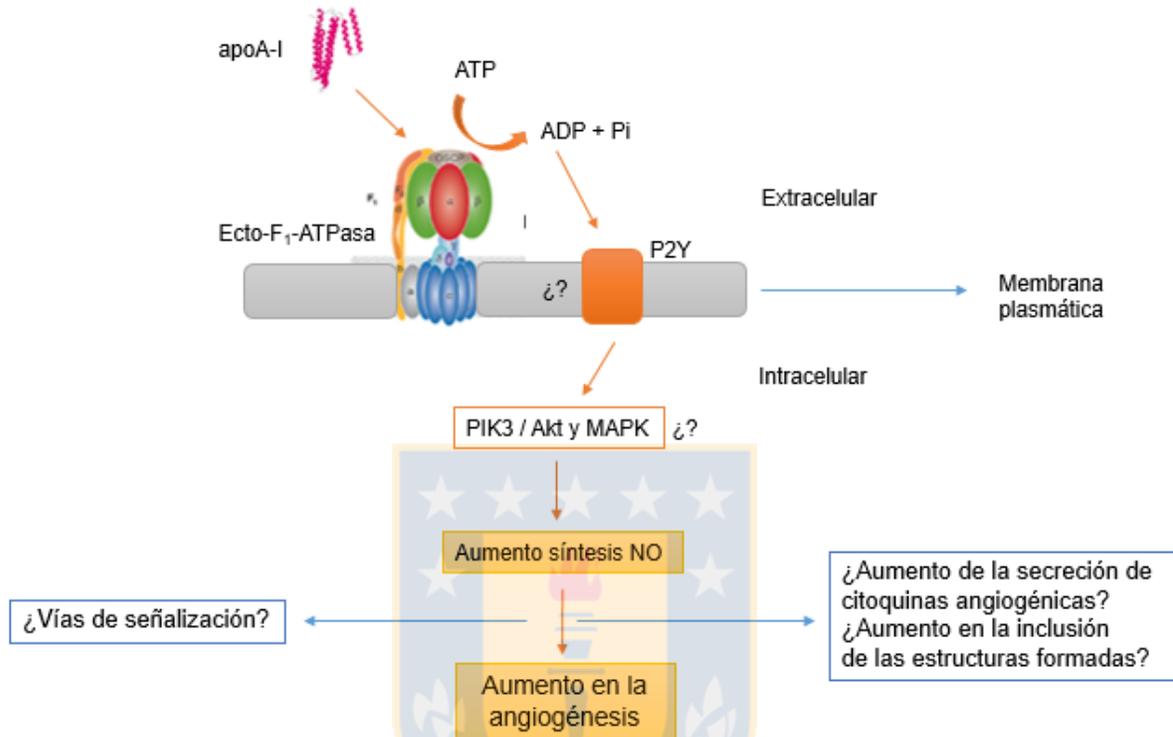


Figura 25. Modelo propuesto para la angiogénesis mediada por hEPC tempranas en respuesta a apoA-I. Sobre la base de los resultados obtenidos en esta tesis y los antecedentes disponibles en células endoteliales maduras (HUVEC), se propone que apoA-I aumenta la actividad hidrolasa de ecto-F₁-ATPasa generando un aumento en las concentraciones extracelulares de ADP. El ADP podría activar receptores P2Y, los que aumentarían la síntesis de NO, a través de la vía PIK3 / Akt y MAPK. El aumento del NO promovería la angiogénesis de las hEPC, por medio de vías de señalización y mecanismos aún no identificados.

AGRADECIMIENTOS

En este largo camino que concluye hoy, quisiera agradecer con todo mi corazón a todos los que estuvieron presentes. Gracias por el apoyo, la comprensión, el soporte que significaron y la paciencia que me tuvieron.

Primero a mis padres y hermano. Sin ustedes, no hubiera sido capaz. Gracias por fomentarme soñar en grande y contenerme para alcanzar esos sueños. Gracias por todos sus sacrificios y paciencia.

A Fabián por ser un compañero incondicional, por amarme pacientemente e incentivarme a ser mejor.

A mis amigos Diego, Ariel, Pamela, Consuelo, Lucía, Pablo y Paula. Gracias por ser parte activa de mi vida y permitirme ser parte de la suya. Gracias por los abrazos, las onces y las palabras de aliento. Son lo máximo.

A mi tutora Dra. Claudia Radojkovic por la paciencia, la oportunidad de crecer y la voluntad de compartir conocimiento. Gracias.

Y como la ciencia se realiza en comunidad, gracias al Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología por el apoyo constante. A los profesores, los paradoscentes y todos y todas las que forman parte de la gran familia que este departamento significa. Gracias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Organization, W.H., *Global status report on noncommunicable diseases*. 2010.
2. Organization, W.H., *Global Health Estimates 2015 Summary Tables*. 2015.
3. DEIS, *Indicadores básicos de salud, Chile 2014*. 2014.
4. MINSAL, *Informe final estudio de carga de enfermedad y carga atribuible* 2007.
5. MINSAL, *Estrategia nacional de salud, 2011-2020*.
6. Triggle, C.R., et al., *The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways*. *Can J Physiol Pharmacol*, 2012. **90**(6): p. 713-38.
7. Cahill, P.A. and E.M. Redmond, *Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health*. *Atherosclerosis*, 2016. **248**: p. 97-109.
8. Vanhoutte, P.M., et al., *Thirty Years of Saying NO: Sources, Fate, Actions, and Misfortunes of the Endothelium-Derived Vasodilator Mediator*. *Circ Res*, 2016. **119**(2): p. 375-96.
9. Lacza, Z.S., J.A; Zhang, J; Horvath, E.M, Figueroa, J.P, and C.a.B.D.W. Szabo, *Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS*. *Free Radical Biology & Medicine*, 2003. **35**: p. 1217-1228.
10. Knowle, R.G.a.M., S, *Nitric oxide synthases in mammals*. *Biochem. J*, 1994. **298**: p. 249-258.
11. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. *Biochem J*, 2001. **357**(Pt 3): p. 593-615.
12. Andrew, P.J. and B. Mayer, *Enzymatic function of nitric oxide synthases*. *Cardiovasc Res*, 1999. **43**(3): p. 521-31.
13. Govers, R. and T.J. Rabelink, *Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001. **280**(2): p. F193-206.
14. Forstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function*. *Eur Heart J*, 2012. **33**(7): p. 829-37, 837a-837d.
15. Zhao, Y., P.M. Vanhoutte, and S.W. Leung, *Vascular nitric oxide: Beyond eNOS*. *J Pharmacol Sci*, 2015. **129**(2): p. 83-94.
16. Sessa, W.C., *eNOS at a glance*. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 12): p. 2427-9.
17. Fleming, I., *Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS*. *Pflugers Arch*, 2010. **459**(6): p. 793-806.
18. Friebe, A. and D. Koesling, *Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase*. *Circ Res*, 2003. **93**(2): p. 96-105.
19. Kawasaki, K., et al., *Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(16): p. 5726-37.
20. Vanhoutte, P.M., et al., *Endothelial dysfunction and vascular disease*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2009. **196**(2): p. 193-222.
21. Bonetti, P.O., L.O. Lerman, and A. Lerman, *Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(2): p. 168-75.
22. Mudau, M., et al., *Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis*. *Cardiovasc J Afr*, 2012. **23**(4): p. 222-31.
23. Ludmer, P.L., et al., *Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries*. *N Engl J Med*, 1986. **315**(17): p. 1046-51.
24. Vita, J.A., et al., *Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease*. *Circulation*, 1990. **81**(2): p. 491-7.
25. Mitra, S., T. Goyal, and J.L. Mehta, *Oxidized LDL, LOX-1 and atherosclerosis*. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2011. **25**(5): p. 419-29.

26. Ellulu, M.S., et al., *Atherosclerotic cardiovascular disease: a review of initiators and protective factors*. *Inflammopharmacology*, 2016. **24**(1): p. 1-10.
27. Siegel-Axel, D., et al., *Platelet lipoprotein interplay: trigger of foam cell formation and driver of atherosclerosis*. *Cardiovasc Res*, 2008. **78**(1): p. 8-17.
28. Libby, P., P.M. Ridker, and G.K. Hansson, *Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis*. *Nature*, 2011. **473**(7347): p. 317-25.
29. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. *N Engl J Med*, 1999. **340**(2): p. 115-26.
30. Kolodgie, F.D., et al., *The thin-cap fibroatheroma: a type of vulnerable plaque: the major precursor lesion to acute coronary syndromes*. *Curr Opin Cardiol*, 2001. **16**(5): p. 285-92.
31. Sanz, J. and Z.A. Fayad, *Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease*. *Nature*, 2008. **451**(7181): p. 953-7.
32. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. *Nature*, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
33. Gordon, T., et al., *High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study*. *Am J Med*, 1977. **62**(5): p. 707-14.
34. Sharrett, A.R., et al., *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*, 2001. **104**(10): p. 1108-13.
35. Barter, P., et al., *HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(13): p. 1301-10.
36. Urbich, C. and S. Dimmeler, *Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology*. *Circ Res*, 2004. **95**(4): p. 343-53.
37. Capobianco, S., et al., *Endothelial progenitor cells as factors in neovascularization and endothelial repair*. *World J Cardiol*, 2010. **2**(12): p. 411-20.
38. Hill, J.M., et al., *Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(7): p. 593-600.
39. Jialal, I., et al., *Decreased number and impaired functionality of endothelial progenitor cells in subjects with metabolic syndrome: implications for increased cardiovascular risk*. *Atherosclerosis*, 2010. **211**(1): p. 297-302.
40. Werner, N., et al., *Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(10): p. 999-1007.
41. Schmidt-Lucke, C., et al., *Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair*. *Circulation*, 2005. **111**(22): p. 2981-7.
42. Vasa, M., et al., *Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease*. *Circ Res*, 2001. **89**(1): p. E1-7.
43. Risau, W. and I. Flamme, *Vasculogenesis*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995. **11**: p. 73-91.
44. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. *Nature*, 1997. **386**(6626): p. 671-4.
45. Aicher, A., A.M. Zeiher, and S. Dimmeler, *Mobilizing endothelial progenitor cells*. *Hypertension*, 2005. **45**(3): p. 321-5.
46. Folkman, J. and Y. Shing, *Angiogenesis*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(16): p. 10931-4.
47. Asahara, T., *Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis*. *Science*, 1997. **275**(5302): p. 964-966.
48. Asahara, T., et al., *Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization*. *Circ Res*, 1999. **85**(3): p. 221-8.
49. Sen, S., et al., *Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease*. *Clin Sci (Lond)*, 2011. **120**(7): p. 263-83.
50. Mayr, M., D. Niederseer, and J. Niebauer, *From bench to bedside: what physicians need to know about endothelial progenitor cells*. *Am J Med*, 2011. **124**(6): p. 489-97.

51. Urbich, C.a.D., S., *Endothelial Progenitor Cells Functional Characterization*. Trends Cardiovasc Med, 2004. **14**: p. 318–322.
52. Kirton, J.P. and Q. Xu, *Endothelial precursors in vascular repair*. Microvasc Res, 2010. **79**(3): p. 193-9.
53. Hur, J., et al., *Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(2): p. 288-93.
54. Fadini, G.P., D. Losordo, and S. Dimmeler, *Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use*. Circ Res, 2012. **110**(4): p. 624-37.
55. Miller-Kasprzak, E. and P.P. Jagodzinski, *Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2007. **55**(4): p. 247-59.
56. Mukai, N., et al., *A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells*. Exp Cell Res, 2008. **314**(3): p. 430-40.
57. Heissig, B., et al., *Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand*. Cell, 2002. **109**(5): p. 625-37.
58. Rehman, J., *Peripheral Blood "Endothelial Progenitor Cells" Are Derived From Monocyte/Macrophages and Secrete Angiogenic Growth Factors*. Circulation, 2003. **107**(8): p. 1164-1169.
59. Cheng, C.-C.C., S-J; Chueh, Y-N; Huang, T-S; Huang, P-H; Cheng, S-M; Tsai, T-N; Chen, J-W and Wang, H-W, *Distinct angiogenesis roles and surface markers of early and late endothelial progenitor cells revealed by functional group analyses*. BMC Genomics, 2013. **14**.
60. He, T.P., T.E and Katusic, Z.S, *Paracrine mitogenic effect of human endothelial progenitor cells: role of interleukin-8*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **298**.
61. Li, A., et al., *IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 3369-76.
62. George, J., et al., *Transfer of endothelial progenitor and bone marrow cells influences atherosclerotic plaque size and composition in apolipoprotein E knockout mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(12): p. 2636-41.
63. Moulton, K.S., et al., *Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(8): p. 4736-41.
64. Zoll, J., et al., *Role of human smooth muscle cell progenitors in atherosclerotic plaque development and composition*. Cardiovasc Res, 2008. **77**(3): p. 471-80.
65. Kocher, A.A., et al., *Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function*. Nat Med, 2001. **7**(4): p. 430-6.
66. Kawamoto, A., et al., *Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia*. Circulation, 2001. **103**(5): p. 634-7.
67. Kawamoto, A., et al., *Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia*. Circulation, 2003. **107**(3): p. 461-8.
68. Assmus, B., et al., *Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI)*. Circulation, 2002. **106**(24): p. 3009-17.
69. Britten, M.B., et al., *Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging*. Circulation, 2003. **108**(18): p. 2212-8.
70. Schachinger, V., et al., *Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial*. J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(8): p. 1690-9.

71. Leistner, D.M., et al., *Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy*. Clin Res Cardiol, 2011. **100**(10): p. 925-34.
72. Aicher, A., et al., *Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells*. Nat Med, 2003. **9**(11): p. 1370-6.
73. Qiao, W., et al., *Endothelial Nitric Oxide Synthase as A Marker for Human Endothelial Progenitor Cells*. The Tohoku Journal of Experimental Medicine, 2010. **221**(1): p. 19-27.
74. Díaz-Pérez, F.R., C; Aguilera, V ; Veas, C; and M.L. González, L; Escudero, C; Aguayo, C, *L-Arginine Transport and Nitric Oxide Synthesis in Human Endothelial Progenitor Cells*. J Cardiovasc Pharmacol, 2012.
75. Tao, J., et al., *Effects of fluid shear stress on eNOS mRNA expression and NO production in human endothelial progenitor cells*. Cardiology, 2006. **106**(2): p. 82-8.
76. Landmesser, U., et al., *Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase*. Circulation, 2004. **110**(14): p. 1933-9.
77. Feng, Y., et al., *Critical role of scavenger receptor-BI-expressing bone marrow-derived endothelial progenitor cells in the attenuation of allograft vasculopathy after human apo A-I transfer*. Blood, 2009. **113**(3): p. 755-64.
78. Lu, A.W., L; Qian, L, *The Role of eNOS in the Migration and Proliferation of Bone-Marrow Derived Endothelial Progenitor Cells and In Vitro Angiogenesis*. Cell Biol Int., 2015. **39**: p. 484-490.
79. Thum, T., et al., *Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(9): p. 1693-701.
80. Cui, B.H., L; Fang, Y ; Guo, R ; Yin, Y ; Zhao, X, *Transplantation of endothelial progenitor cells overexpressing endothelial nitric oxide synthase enhances inhibition of neointimal hyperplasia and restores endothelium-dependent vasodilatation*. Microvascular Research, 2011. **81**: p. 143-150.
81. Kong, D., et al., *Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cells*. Circulation, 2004. **109**(14): p. 1769-75.
82. Chin, K., et al., *Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells*. Oncogene, 1997. **15**(4): p. 437-42.
83. Dulak, J., et al., *Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(3): p. 659-66.
84. Camont, L., M.J. Chapman, and A. Kontush, *Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease*. Trends Mol Med, 2011. **17**(10): p. 594-603.
85. Perez-Mendez, O., et al., *HDL-cholesterol in coronary artery disease risk: function or structure?* Clin Chim Acta, 2014. **429**: p. 111-22.
86. Tsompanidi, E.M., et al., *HDL biogenesis and functions: role of HDL quality and quantity in atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2010. **208**(1): p. 3-9.
87. Rosenson, R.S., et al., *Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport*. Circulation, 2012. **125**(15): p. 1905-19.
88. Rye, K.A. and P.J. Barter, *Cardioprotective functions of HDLs*. J Lipid Res, 2014. **55**(2): p. 168-79.
89. Rothblat, G.H. and M.C. Phillips, *High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport*. Curr Opin Lipidol, 2010. **21**(3): p. 229-38.
90. Seetharam, D., et al., *High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I*. Circ Res, 2006. **98**(1): p. 63-72.

91. Li, W.H., et al., *The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution*. J Lipid Res, 1988. **29**(3): p. 245-71.
92. Sviridov, D., *Maturation of apolipoprotein A-I: unrecognized health benefit or a forgotten rudiment?* J Lipid Res, 2009. **50**(7): p. 1257-8.
93. Saito, H., S. Lund-Katz, and M.C. Phillips, *Contributions of domain structure and lipid interaction to the functionality of exchangeable human apolipoproteins*. Prog Lipid Res, 2004. **43**(4): p.350-80.
94. Frank, P.G.B., J; Emmanuel, F; Lavigne, J-P; Sparks, D.L; Deneffe, P; Rassart, E and Marcel, YL, *Deletion of Central R-Helices in Human Apolipoprotein A-I: Effect on Phospholipid Association*. Biochemistry, 1997. **36**.
95. Phillips, M.C., *New insights into the determination of HDL structure by apolipoproteins: Thematic review series: high density lipoprotein structure, function, and metabolism*. J Lipid Res, 2013. **54**(8): p. 2034-48.
96. Stoffel, W., *Synthesis, transport, and processing of apolipoproteins of high density lipoproteins*. Journal of Lipid Research, 1984. **25**.
97. Jayaraman, S.C., Gand Gursky, O, *Folded Functional Lipid-Poor Apolipoprotein A-I Obtained by Heating of High-Density Lipoproteins: Relevance to HDL Biogenesis*. Biochem J., 2012. **442**.
98. Rye K-A and Barter, P., *Formation and Metabolism of Prebeta-Migrating, Lipid-Poor Apolipoprotein A-I*. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2004. **24**: p. 421-428.
99. Rubin, E.M.K., RM; Spangler, EA; Verstuyft, JG and Clift, SM, *Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI*. Nature, 1991. **353**: p. 265-267.
100. Zannis, V.I., A. Chroni, and M. Krieger, *Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL*. J Mol Med (Berl), 2006. **84**(4): p. 276-94.
101. Fisher, E.A., et al., *High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(12): p. 2813-20.
102. Kingwell, B.A., et al., *HDL-targeted therapies: progress, failures and future*. Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(6): p. 445-64.
103. Martinez, L.O., et al., *Ecto-F1-ATPase/P2Y pathways in metabolic and vascular functions of high density lipoproteins*. Atherosclerosis, 2015. **238**(1): p. 89-100.
104. Barter, P.J., et al., *Antiinflammatory properties of HDL*. Circ Res, 2004. **95**(8): p. 764-72.
105. Tabet, F. and K.A. Rye, *High-density lipoproteins, inflammation and oxidative stress*. Clin Sci (Lond), 2009. **116**(2): p. 87-98.
106. Yuhanna, I.S., et al., *High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase*. Nat Med, 2001. **7**(7): p. 853-7.
107. Ramet, M.E., et al., *High-density lipoprotein increases the abundance of eNOS protein in human vascular endothelial cells by increasing its half-life*. J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(12): p. 2288-97.
108. Zhang, Q.H., et al., *An involvement of SR-B1 mediated PI3K-Akt-eNOS signaling in HDL-induced cyclooxygenase 2 expression and prostacyclin production in endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **420**(1): p. 17-23.
109. Flynn, R., et al., *Expression of apolipoprotein A-I in rabbit carotid endothelium protects against atherosclerosis*. Mol Ther, 2011. **19**(10): p. 1833-41.
110. Briceño, L., *Tesis magister Bioquímica Clínica e Inmunología. Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción*. . 2015.
111. Petoumenos, V., G. Nickenig, and N. Werner, *High-density lipoprotein exerts vasculoprotection via endothelial progenitor cells*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(11-12): p. 4623-35.
112. Noor, R., et al., *High-density lipoprotein cholesterol regulates endothelial progenitor cells by increasing eNOS and preventing apoptosis*. Atherosclerosis, 2007. **192**(1): p. 92-9.
113. Zhang, Q., et al., *Essential role of HDL on endothelial progenitor cell proliferation with PI3K/Akt/cyclin D1 as the signal pathway*. Exp Biol Med (Maywood), 2010. **235**(9): p. 1082-92.

114. Tso, C., et al., *High-density lipoproteins enhance progenitor-mediated endothelium repair in mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(5): p. 1144-9.
115. Van Oostrom, O., et al., *Reconstituted HDL increases circulating endothelial progenitor cells in patients with type 2 diabetes*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(8): p. 1864-5.
116. González-Pecchi, V.V., S; Pons, V; Honorato, P; Martinez, L; Lamperti, L; Aguayo, C; Radojkovic, C., *Apolipoprotein A-I enhances proliferation of human endothelial progenitor cells and promotes angiogenesis through the cell surface ATP synthase*. *Microvascular Research*, 2015. **98**: p. 9-15.
117. Anantharamaiah, G.M., et al., *Structural requirements for antioxidative and anti-inflammatory properties of apolipoprotein A-I mimetic peptides*. *J Lipid Res*, 2007. **48**(9): p. 1915-23.
118. Navab, M., et al., *Apolipoprotein A-I mimetic peptides and their role in atherosclerosis prevention*. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2006. **3**(10): p. 540-7.
119. Navab, M., et al., *Oral administration of an Apo A-I mimetic Peptide synthesized from D-amino acids dramatically reduces atherosclerosis in mice independent of plasma cholesterol*. *Circulation*, 2002. **105**(3): p. 290-2.
120. Zhang, Z., et al., *Apolipoprotein A-I mimetic peptide D-4F promotes human endothelial progenitor cell proliferation, migration, adhesion through eNOS/NO pathway*. *Mol Biol Rep*, 2012. **39**(4): p. 4445-54.
121. Yang, N., et al., *Apolipoprotein A-I mimetic peptide reverse D-4F improves the biological functions of mouse bone marrow-derived late EPCs via PI3K/AKT/eNOS pathway*. *Mol Cell Biochem*, 2013. **377**(1-2): p. 229-36.
122. Cao, G., et al., *Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(52): p. 33068-76.
123. Shen, W.J., et al., *Scavenger receptor class B type I (SR-BI): a versatile receptor with multiple functions and actions*. *Metabolism*, 2014. **63**(7): p. 875-86.
124. Hoekstra, M., *SR-BI as target in atherosclerosis and cardiovascular disease - A comprehensive appraisal of the cellular functions of SR-BI in physiology and disease*. *Atherosclerosis*, 2017. **258**: p. 153-161.
125. Trigatti, B.L., M. Krieger, and A. Rigotti, *Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(10): p. 1732-8.
126. Liu, T., et al., *The effects of mutations in helices 4 and 6 of ApoA-I on scavenger receptor class B type I (SR-BI)-mediated cholesterol efflux suggest that formation of a productive complex between reconstituted high density lipoprotein and SR-BI is required for efficient lipid transport*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(24): p. 21576-84.
127. Neculai, D., et al., *Structure of LIMP-2 provides functional insights with implications for SR-BI and CD36*. *Nature*, 2013. **504**(7478): p. 172-6.
128. Rodriguez, W.V., et al., *Mechanism of scavenger receptor class B type I-mediated selective uptake of cholesteryl esters from high density lipoprotein to adrenal cells*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(29): p. 20344-50.
129. Babbitt, J., et al., *Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(20): p. 13242-9.
130. Rohrer, L., et al., *High-density lipoprotein transport through aortic endothelial cells involves scavenger receptor BI and ATP-binding cassette transporter G1*. *Circ Res*, 2009. **104**(10): p. 1142-50.
131. Cavellier, C., et al., *The beta-chain of cell surface F(0)F(1) ATPase modulates apoA-I and HDL transcytosis through aortic endothelial cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(1): p. 131-9.

132. Zhang, Y., et al., *Shear stress regulates endothelial cell function through SRB1-eNOS signaling pathway*. Cardiovasc Ther, 2016. **34**(5): p. 308-13.
133. Mineo, C. and P.W. Shaul, *HDL stimulation of endothelial nitric oxide synthase: a novel mechanism of HDL action*. Trends Cardiovasc Med, 2003. **13**(6): p. 226-31.
134. Santamarina-Fojo, S., et al., *Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter*. Proc Natl Acad Sci US A, 2000. **97**(14): p. 7987-92.
135. Oram, J.F. and J.W. Heinecke, *ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease*. Physiol Rev, 2005. **85**(4): p. 1343-72.
136. Wang, N. and A.R. Tall, *Regulation and mechanisms of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular cholesterol efflux*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(7): p. 1178-84.
137. Oram, J.F. and A.M. Vaughan, *ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease*. Circ Res, 2006. **99**(10): p. 1031-43.
138. Tall, A.R., et al., *HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis*. Cell Metab, 2008. **7**(5): p. 365-75.
139. Remaley, A.T., et al., *Apolipoprotein specificity for lipid efflux by the human ABCA1 transporter*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **280**(3): p. 818-23.
140. Chen, P.Y., et al., *Endothelial-to-mesenchymal transition drives atherosclerosis progression*. J Clin Invest, 2015. **125**(12): p. 4514-28.
141. Feng, J., et al., *Apolipoprotein A1 Inhibits the TGF-beta1-Induced Endothelial-to-Mesenchymal Transition of Human Coronary Artery Endothelial Cells*. Cardiology, 2017. **137**(3): p. 179-187.
142. Tabet, F., et al., *The 5A apolipoprotein A-I mimetic peptide displays antiinflammatory and antioxidant properties in vivo and in vitro*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(2): p. 246-52.
143. Liu, D., et al., *The apolipoprotein A-I mimetic peptide, D-4F, alleviates ox-LDL-induced oxidative stress and promotes endothelial repair through the eNOS/HO-1 pathway*. J Mol Cell Cardiol, 2017. **105**: p. 77-88.
144. Leslie, A.G.W.a.W., J. E., *Structural model of F1-ATPase and the implications for rotary catalysis*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 2000. **355**: p. 465-472.
145. Vantourout, P., et al., *Ecto-F(1)-ATPase: a moonlighting protein complex and an unexpected apoA-I receptor*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(47): p. 5925-35.
146. Campanella, M.C., E; Chong, S; Farah, Z; Wieckowski, M.R; Abramov, A.Y; Tinker, A and Duchon, M.R, *Regulation of Mitochondrial Structure and Function by the F1Fo-ATPase Inhibitor Protein, IF1*. Cell Metabolism 2008. **8**: p. 13-25.
147. Green, D.W.a.G., G.J, *The IF1 inhibitor protein of the mitochondrial F1FO-ATPase*. Biochimica et Biophysica Acta 2000. **1458**(343-355).
148. Cabezon, E., et al., *The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1*. Nat Struct Biol, 2003. **10**(9): p. 744-50.
149. Moser T.M; Stack, M.S.A., I; Enghild, J.J; Hojrup, P; Everitt, L; Hubchak, S, H.WILLIAM Schanper, H.W and Pizzo, S.V, *Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999. **96**: p. 2811-2816.
150. Martinez, L.O., et al., *Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis*. Nature, 2003. **421**(6918): p. 75-9.
151. Radojkovic, C., et al., *Stimulation of cell surface F1-ATPase activity by apolipoprotein A-I inhibits endothelial cell apoptosis and promotes proliferation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(7): p. 1125-30.
152. Burrell, H.E., et al., *Human keratinocytes release ATP and utilize three mechanisms for nucleotide interconversion at the cell surface*. J Biol Chem, 2005. **280**(33): p. 29667-76.

153. Kim, B.-W.C., H-J; Lee, J-W; Kim, J-H and Ko, Y-G, *Extracellular ATP is generated by ATP synthase complex in adipocyte lipid rafts* Experimental & Molecular Medicine, 2004. **36**: p. 476-485.
154. Das, B., et al., *A novel ligand in lymphocyte-mediated cytotoxicity: expression of the beta subunit of H⁺ transporting ATP synthase on the surface of tumor cell lines.* J Exp Med, 1994. **180**(1): p. 273-81.
155. León, M., *Tesis magister Bioquímica Clínica e Inmunología. Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción.* 2013.
156. Honorato, P., *Tesis magister Bioquímica Clínica e Inmunología. Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción.* . 2015.
157. Havel, R.J., Eder, H. A., and Bragdon, J. H., *The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum,*. The Journal of clinical investigation 1955. **34**: p. 1345-1353.
158. McConathy, W.J., and Alaupovic, P., *Isolation and characterization of other apolipoproteins.* Methods in enzymology 1986. **128**(297-230).
159. Brace, R.S., B; Sviridov, D and McCormick, S.P.A, *A gel-based method for purification of apolipoprotein A-I from small volumes of plasma.* Journal of Lipid Research, 2010. **51**.
160. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.* J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
161. Moncada, S. and A. Higgs, *The L-arginine-nitric oxide pathway.* N Engl J Med, 1993. **329**(27): p. 2002-12.
162. MATPEL, *Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos* Universidad de Concepción
163. Valdés, S., *Tesis magister Bioquímica Clínica e Inmunología. Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción.* . 2015.
164. Bertina, R.M., J.A. Steenstra, and E.C. Slater, *The mechanism of inhibition by oligomycin of oxidative phosphorylation in mitochondria.* Biochim Biophys Acta, 1974. **368**(3): p. 279-97.
165. Scanu, A., et al., *Fractionation of human serum high density lipoprotein in urea solutions. Evidence for polypeptide heterogeneity.* Biochemistry, 1969. **8**(8): p. 3309-16.
166. Sobrino, T., et al., *The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome.* Stroke, 2007. **38**(10): p. 2759-64.
167. Yoon, C.H., et al., *Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases.* Circulation, 2005. **112**(11): p. 1618-27.
168. Asahara, T., et al., *VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells.* EMBO J, 1999. **18**(14): p. 3964-72.
169. Chisholm, J.W., et al., *ApoA-I secretion from HepG2 cells: evidence for the secretion of both lipid-poor apoA-I and intracellularly assembled nascent HDL.* J Lipid Res, 2002. **43**(1): p. 36-44.
170. Huang, C.Y., et al., *Moderate to high concentrations of high-density lipoprotein from healthy subjects paradoxically impair human endothelial progenitor cells and related angiogenesis by activating Rho-associated kinase pathways.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(10): p. 2405-17.
171. Gebhard, C., et al., *Beneficial Effects of Reconstituted High-Density Lipoprotein (rHDL) on Circulating CD34+ Cells in Patients after an Acute Coronary Syndrome.* PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0168448.
172. Suda, K., et al., *Phenotypic characterization of human umbilical vein endothelial (ECV304) and urinary carcinoma (T24) cells: endothelial versus epithelial features.* In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2001. **37**(8): p. 505-14.
173. Hughes, S.E., *Functional characterization of the spontaneously transformed human umbilical vein endothelial cell line ECV304: use in an in vitro model of angiogenesis.* Exp Cell Res, 1996. **225**(1): p. 171-85.

174. Duda, D.G., D. Fukumura, and R.K. Jain, *Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells*. Trends Mol Med, 2004. **10**(4): p. 143-5.
175. Murohara, T., et al., *Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia*. J Clin Invest, 1998. **101**(11): p. 2567-78.
176. Babaei, S., et al., *Angiogenic actions of angiotensin-1 require endothelium-derived nitric oxide*. Am J Pathol, 2003. **162**(6): p. 1927-36.
177. Gu, Z., et al., *S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death*. Science, 2002. **297**(5584): p. 1186-90.
178. Ziche, M., et al., *Nitric oxide promotes proliferation and plasminogen activator production by coronary venular endothelium through endogenous bFGF*. Circ Res, 1997. **80**(6): p. 845-52.
179. Kimura, H., et al., *Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide*. Blood, 2000. **95**(1): p. 189-97.
180. Ma, F.X., et al., *Oxidized low density lipoprotein impairs endothelial progenitor cells by regulation of endothelial nitric oxide synthase*. J Lipid Res, 2006. **47**(6): p. 1227-37.
181. Burwick, N.R., et al., *An Inhibitor of the F1 subunit of ATP synthase (IF1) modulates the activity of angiotensin on the endothelial cell surface*. J Biol Chem, 2005. **280**(3): p. 1740-5.
182. Nieland, T.J., et al., *Identification of the molecular target of small molecule inhibitors of HDL receptor SR-BI activity*. Biochemistry, 2008. **47**(1): p. 460-72.



ANEXO 1



Consentimiento informado

HOJA DE INFORMACION PARA PARTICIPANTES

Título de la investigación: *Regulación de la funcionalidad de células progenitoras endoteliales humanas tempranas por el receptor ecto-F₁-ATPasa, vía síntesis de óxido nítrico.*

Investigador responsable: Nicol Parada Cortés

Profesor guía: Dra. Claudia Radojkovic Navarro

Mediante el presente documento, lo/la invito a participar de una investigación realizada en la Universidad de Concepción que busca estudiar células presentes en la sangre, capaces de evitar el desarrollo de enfermedades del sistema circulatorio, con el objetivo de generar conocimiento que pudiese ser utilizado como futura terapia en el tratamiento de estas patologías. Esta investigación se encuentra enmarcada en un proyecto de tesis de magister para optar al grado de Magister en Bioquímica Clínica e Inmunología.

En qué consiste

Si Usted está de acuerdo en participar, se le tomará una muestra de sangre (50 mL, equivalentes a 5 cucharadas soperas) desde una vena superficial del antebrazo.

Su participación es libre y voluntaria.

En este estudio:

- La muestra de sangre será obtenida por profesionales capacitados, en un espacio adaptado para ello, dentro de la Facultad de Farmacia. La muestra será usada exclusivamente para los fines establecidos en esta investigación, **sin relacionarlos a su persona**, manteniendo en privado su identidad y sus antecedentes personales.
- Los riesgos inmediatos son los asociados a una toma de muestra sanguínea de rutina, y podrían incluir mareos o pequeño ardor al momento de la punción. Los participantes que indiquen desmayos anteriores durante una toma de muestra, serán tratados con mayor cuidado por personal de asistencia. Luego de la extracción podría presentarse un pequeño sangramiento en el lugar de la

punción, que cesará a los pocos minutos. Eventualmente se puede producir un moretón en la zona de punción, el cual desaparecerá a los pocos días.

- En aquellos casos en que se presenten problemas durante la toma de muestra, se tomará un volumen menor de sangre. Si la punción es dificultosa en el brazo, se le consultará si accede a tomar la muestra con mariposa en las venas de la mano; **si no accede, no se tomará la muestra.**
- Una vez utilizada la sangre, los restos y los desechos biológicos no serán por ningún motivo almacenados, congelados o utilizados para otro fin, siendo eliminados según protocolos establecidos por el Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos (MATPEL) de la Universidad de Concepción.
- Su participación no tendrá ningún beneficio personal ni económico alguno al momento de la toma de muestra, ni posteriormente. La colaboración en esta investigación contribuirá a generar nuevo conocimiento y con ello, posibles tratamientos para las enfermedades cardiovasculares.
- En caso de retracto, para la toma de muestra o el uso de su sangre, puede hacerlo sin ningún problema y no traerá ninguna consecuencia para usted.
- Los datos obtenidos de este estudio, incluidos aquellos derivados de su muestra de sangre, serán publicados en revistas y conferencias científicas, manteniendo en absoluta confidencialidad la identidad de los participantes.
- 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 y a sus derechos como participante podrá hacerla a:
 - Dra. Claudia Radojkovic, Investigadora responsable, Dpto. de Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, teléfonos 041-2204439 / 041-2203451.
 - Dr. José Becerra, presidente del Comité de Ética de la Universidad de Concepción, Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, teléfono 041-2204114

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

ACLARE SUS DUDAS CON LOS PROFESIONALES ENCARGADOS DE LA TOMA DE MUESTRA Y/O EL INVESTIGADOR RESPONSABLE DEL PROYECTO

Regulación de la funcionalidad de células progenitoras endoteliales humanas tempranas por el receptor ecto-F₁-ATPasa, vía síntesis de óxido nítrico.

Declaro que he sido informado/a acerca de este estudio.

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

Declaro que procedí en completo acuerdo con los principios éticos descritos en las directrices de GCP (Buenas Prácticas Clínicas) y otras leyes nacionales e internacionales vigentes.

En consecuencia, doy mi consentimiento para toma de muestra de sangre.

HOJA DE FIRMAS

Nombre y firma del participante

Nombre y firma del investigador responsable

Concepción,.....de.....de.....

ACTA DE RECHAZO

Con fecha _____ he decidido libre y voluntariamente no participar o abandonar la investigación, haciendo uso de mi derecho a retirarme en el momento que lo estime conveniente, sin que ello pueda ocasionarme ningún perjuicio.

HOJA DE FIRMAS

Nombre y firma del participante

