



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**EFFECTO FUNCIONAL DE LAS VARIANTES R230C E I883M DEL GEN ABCA1 SOBRE LA
FORMACIÓN DE MICROPARTÍCULAS ENDOTELIALES *IN VITRO*, EN CONDICIONES BASALES
Y EN RESPUESTA A DIFERENTES ESTÍMULOS ATEROGÉNICOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ROBLES ROMERO ESMERALDA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LEONOR JACOBO ALBAVERA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, CD, MX., AGOSTO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 08 de mayo de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ROBLES ROMERO ESMERALDA** con número de cuenta **515025802**, con la tesis titulada **"EFECTO FUNCIONAL DE LAS VARIANTES R230C E I883M DEL GEN ABCA1 SOBRE LA FORMACIÓN DE MICROPARTÍCULAS ENDOTELIALES IN VITRO, EN CONDICIONES BASALES Y EN RESPUESTA A DIFERENTES ESTÍMULOS ATEROGÉNICOS"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LEONOR JACOBO ALBAVERA**:

Presidente: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
Vocal: DR. OSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ
Secretario: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE
Suplente: DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS
Suplente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 09 de mayo de 2017



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al programa de Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo y la beca otorgada (No. de beca 403046), así mismo como por el financiamiento de este proyecto (FOSISS 2015-2; No. de Proyecto 261858).

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) por permitirme la estancia y por el financiamiento de este proyecto (No. de Proyecto 169).

A la Dra. Leonor Jacobo Albavera por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por el aprendizaje, el apoyo incondicional y la confianza depositada en mí, su tutoría ha sido de enorme ayuda para mi desarrollo como estudiante y persona, muchas gracias.

A la Dra. Rebeca López Marure y a la Dra. Marcela Lizano Soberón por sus críticas constructivas y su asesoría brindada tanto en los aspectos teóricos como prácticos al formar parte de mi comité tutor.

AGRADECIMIENTOS PARTICULARES

A la Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano por darme la oportunidad de trabajar en la unidad a su cargo, por su instrucción y ayuda brindada; a la M. en C. Patricia Esther Miranda Cruz por el apoyo, la paciencia y el conocimiento compartido.

A la Dra. Ma. Teresa Villareal Molina por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme desarrollar junto con su equipo de investigación; a todos los que laboran en el laboratorio de Genómica de Enfermedades Cardiovasculares.

Al Dr. Oscar Armando Pérez por su tiempo y sus consejos que sin duda me guiaran este camino, así como por su valiosa colaboración en la realización de este proyecto, muchas gracias.

Al Dr. Felipe Massó y la Dra. Araceli Páez, quienes me iniciaron en el mundo del cultivo celular, gracias por sus consejos, ayuda, dedicación y enseñanzas, los cuales fueron clave para el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del Jurado: Dr. José Pedraza Chaverri, Dr. Oscar Armando Pérez Méndez, Dra. Rebeca López Marure, Dra. Marcela Lizano Soberón y Dr. Samuel Canizales Quintero, por su revisión y asesoría para la escritura de esta tesis.

DEDICATORIA

A mis padres, gracias por su apoyo, por estar siempre a mi lado, por los consejos, los regaños, son mi ejemplo a seguir. Todo su trabajo ahora se ve reflejado, han sabido hacer de nosotros unas personas de bien.

A mis hermanos Martha y Pedro Ángel, con quienes he compartido los grandes momentos de mi vida, ustedes son una inspiración para seguir creciendo día a día.

A Octavio, gracias por todo tu apoyo, tu cariño y por todos los momentos compartidos, eres parte clave durante esta etapa.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
ABREVIATURAS	III
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Enfermedad arterial coronaria.....	4
1.2. Aterosclerosis	4
1.3. Endotelio.....	5
1.4. Vasoregulación endotelial.....	6
1.4.1. Óxido nítrico.	6
1.4.2. Prostaciclina (PGI ₂).	7
1.4.3. Endotelina	8
1.4.4. Angiotensina II.....	8
1.5. Disfunción endotelial.....	9
1.5.1. Lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL- ox).....	9
1.5.2. Fuerzas de rozamiento.....	11
1.1.1.1 Infecciones por bacterias, virus y otros patógenos	13
1.5.3. Lipopolisacárido (LPS)	14
1.6. Micropartículas.....	14
1.6.1. Función de las MPs	18
1.6.2. Formación de MPs	19
1.7. ABCA1	21
1.7.1. Proteína.....	21
1.7.2. Gen <i>ABCA1</i>	22
1.7.3. Variante I883M.....	24
1.7.4. Variante R230C.....	24
2. HIPÓTESIS	26
3. OBJETIVO GENERAL	26
3.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
4. METODOLOGÍA	27
4.1. Reactivos.....	27
4.2. Población de estudio.....	27
4.3. Aislamiento y cultivo de células HUVEC.	28
4.4. Extracción de ADN de HUVEC.	28
4.5. Genotipificación de las variantes R230C e I883M de <i>ABCA1</i>	29
4.6. Selección y crecimiento de los cultivos de interés.....	29

4.7. Estimulación de HUVECS con LPS y LDL-ox.	30
4.8. Estandarización del aislamiento y cuantificación de micropartículas endoteliales	30
4.9. Titulación de anticuerpos	32
4.10. Aislamiento y cuantificación de micropartículas endoteliales en estado basal y con los estímulos LPS y LDL-ox.....	33
5. RESULTADOS	35
5.1. Genotipificación de la variante R230C	35
5.2. Genotipificación de la variante I883M	36
5.3. Estandarización del aislamiento y caracterización de micropartículas endoteliales.....	37
5.4. Titulación de anticuerpos	39
5.5. EMPs marcadas con CAM, CMO y CD31	43
5.6. Caracterización fenotípica de HUVEC	44
5.7. Obtención y caracterización de micropartículas endoteliales provenientes de sobrenadantes de cultivos en estado basal y después de 24 hrs de tratamiento con LPS y LDL-ox.....	46
5.8. Cálculo del número de EMPs.....	50
5.9. Comparación del número de EMPs.....	51
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	55
6.1. HUVEC como modelo de estudio.....	55
6.2. Obtención y cuantificación de MPs endoteliales en cultivo.....	56
6.3. MPs y estímulos aterogénicos	57
6.4. Variantes R230C e I883M de <i>ABCA1</i> y la producción de EMPs.	57
7. CONCLUSIONES.....	60
8. PERSPECTIVAS	60
9. LITERATURA CITADA.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Progresión de la placa aterosclerótica	5
Figura 2.- Endotelio basal vs disfunción endotelial.....	10
Figura 3.-Efecto de los diferentes patrones de flujo sobre el desarrollo de la placa aterosclerótica.....	13
Figura 4 .- Fluidos biológicos y células de origen en los que se han encontrado EVs.....	16
Figura 5.- Biogénesis y liberación de EVs.....	17
Figura 6.- Modelo topológico de la proteína ABCA1	21
Figura 7.- Modelo para la biogénesis de HDL nacientes mediada por ABCA1	23
Figura 8.- Genotipificación de la variante R230C del gen ABCA1 por PCR en tiempo real, utilizando sondas TaqMan.....	35
Figura 9.- Genotipificación de las variante I883M del gen ABCA1 por PCR en tiempo real, utilizando sondas TaqMan.....	36
Figura 10.- Algoritmo para la identificación y caracterización de micropartículas de células endoteliales.	38
Figura 11.- Histograma representativo de las medias de autofluorescencia para las diferentes concentraciones del anticuerpo CD144.....	40
Figura 12.- Estrategia de análisis para la identificación de la concentración adecuada de anticuerpo CD31 con HUVEC.....	40
Figura 13.- Histograma representativo de las medias de autofluorescencia para las diferentes concentraciones del anticuerpo CD146.....	41
Figura 14.-Histograma representativo de las medias de autofluorescencia para las diferentes concentraciones de los anticuerpos Anexina V y CD62E.	42
Figura 15.- Estrategia de análisis para la caracterización de MPs endoteliales.....	44
Figura 16.- Estrategia de análisis para la caracterización de HUVEC.	45
Figura 17.- Algoritmo para la identificación y caracterización de micropartículas en sobrenadantes de células endoteliales con genotipo R230R/I883I para las variantes R230C e I883M de ABCA1	47
Figura 18.- Algoritmo para la identificación y caracterización de micropartículas en sobrenadantes de células endoteliales con genotipo hererocigoto para la variante R230C de ABCA1	48

Figura 19.- Algoritmo para la identificación y caracterización de micropartículas en sobrenadantes de células endoteliales con genotipo heterocigoto para la variante I883M de <i>ABCA1</i>	49
Figura 20.- Gráfica de la producción total de EMPs en sobrenadantes de cultivos de HUVEC en estado basal respecto a los cultivos estimulados con LPS y LDL-ox.....	51
Figura 21.- Producción de EMPs en los cultivos de acuerdo al genotipo de la variante R230C de <i>ABCA1</i> y a los estímulos	52
Figura 22.- Producción de EMPs en los cultivos de acuerdo al genotipo de la variante I883M de <i>ABCA1</i> y a los estímulos	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.-Porcentaje de eventos positivos de EMPs a diferentes concentraciones de CMO y CAM.	37
Tabla 2.- Titulación de anticuerpo CD144	39
Tabla 3.- Titulación de anticuerpo CD31	41
Tabla 4.- Titulación de anticuerpo CD146	41
Tabla 5.- Anticuerpos anti-Anexina V y anti-CD62E.....	42
Tabla 6.- Porcentaje de eventos positivos para CMO, CAM y CD31	43
Tabla 7.- Porcentaje de eventos positivos para CMO y CAM por genotipo	46
Tabla 8.- Producción de vesículas de los cultivos seleccionados por genotipo en estado basal y después de 24hrs de tratamiento con LPS y LDL-ox.....	50

ABREVIATURAS

27-OH.- 27-hidroxicolesterol.

ABCA1.- Transportador A-1 dependiente de la unión de ATP (ATP-binding cassette transporter A-1).

AF.- Autofluorescencia.

Akt.- Proteína cinasa B.

APC.- Aloficocianina.

Apo A-I.- Apolipoproteína A-I.

ATP.- Adenosín trifosfato.

Ca²⁺.- Ion calcio.

CaM.- Calmodulina.

CAM.- Calceína AM.

CAMP.- Monofosfato de adenosina cíclico.

CEs.- Células endoteliales.

CML.- Células musculares lisas.

CMO.- Cell mask orange.

CMLVs.- Células de músculo liso vascular.

COX.- Ciclooxygenasas.

CRP.- Proteína C reactiva.

EAC.- Enfermedad arterial coronaria.

EE.- Endosoma temprano.

EMPs.- MPs endoteliales.

EVs.- Vesículas extracelulares.

FAD.- Flavín adenina dinucleótido.

FHD.- Hipoalfalipoproteinemia familiar.

FITC.- Isotiocianato de fluoresceína.

FMN.- Flavín mononucleótido.

FSC-A.- Dispersión frontal – área.

GPCR.- Receptores acoplados a proteínas G.

H₂O₂.- Peróxido de hidrógeno.

HDL.- Lipoproteínas de alta densidad.

C-HDL.- Colesterol HDL

HUVEC.- Células endoteliales de la vena umbilical humana.

ICAM-1.- Molécula de adhesión intracelular 1.

IL-6.- Interleucina-6.

IL-8.- Interleucina-8.

ILV.- Vesículas intraluminales.

Lamp1.- Proteína 1 de membrana asociada a lisosoma.

LDL.- Lipoproteínas de baja densidad.

LDL-ox.- Lipoproteínas de baja densidad oxidadas.

LNMMA.- N-mono-metil-L-arginina.

LNAME.- N-nitro-L-arginina metil éster.
LPS.- Lipopolisacárido.
LXR.- Receptor de ligando X.
MCAM.- Molécula de adhesión celular de melanoma.
MCP-1.- Proteína quimiotáctica 1 de monocitos.
MMP.- Metaloproteínasa de matriz.
MPS.- Micropartículas.
MVB.- Cuerpo multivesicular.
NADPH.- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
NF-kB.- Factor nuclear-kappa B.
NO.- Óxido nítrico.
NOS.- Enzima óxido nítrico sintasa.
 eNOS (endotelial).
 iNOS (inducible o inflamatoria).
 nNOS (neuronal).
OVM.- Vesículas de membrana externa.
PAI-1.- Inhibidor del activador de plasminógeno-1.
PB.- Azul pacífico.
PBS.- Solución salina amortiguadora de fosfatos.
PCR.- Reacción en cadena de la polimerasa.
PECAM.- Moléculas de adhesión a plaquetas y células endoteliales.
PE.- Ficoeritrina.
PDGF.- Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PGH2.- Prostaglandina H2.
PGI2.- Prostaciclina.
PS.- Fosfatidilserina.
RAS.- Sistema renina-angiotensina.
ROCK.- Cinasa Rho.
ROS.- Especies reactivas de oxígeno.
RXR.- Receptor de retinoides X.
SFB.- Suero fetal bovino.
SNPs.- Polimorfismos de un solo nucleótido.
SSC-A.- Dispersión lateral-área.
TBH.- Tetrahidrobiopterina.
TSG101.- Gen de susceptibilidad tumoral 101.
TNF- α .- Factor de necrosis tumoral alfa.
uPA.- Activador del plasminógeno tipo urocinasa.
uPAR.- Receptor del activador de plasminógeno tipo urocinasa.
VCAM-1.- Molécula de adhesión de células vasculares 1.
VEGF.- Factor de crecimiento endotelial vascular.

RESUMEN

La enfermedad arterial coronaria (EAC) es una manifestación clínica de la aterosclerosis. La aterogénesis comienza con la lesión endotelial que puede resultar de una variedad de factores. En varios estudios se ha analizado el papel de las micropartículas (MPs) circulantes en diferentes enfermedades, incluyendo la aterosclerosis y la EAC. Las MPs son vesículas fosfolípídicas esféricas de 100 a 1000 nm de diámetro, vectores potentes de información biológica, protagonistas de una red de comunicación intracelular y derivan de casi todas las células; sus niveles se encuentran incrementados en enfermedades que cursan con daño vascular. Un evento crucial implicado en la formación de las MPs es la externalización de fosfatidilserina (PS), aminofosfolípido que se encuentra preferencialmente en la cara interna de la membrana plasmática de las células. La distribución asimétrica de la PS es regulada por tres distintos tipos de enzimas; flipasas, flopasas y escramblasas. Las flopasas catalizan el transporte de la PS hacia la membrana externa de manera dependiente de adenosín trifosfato (ATP); en este grupo de enzimas están incluidos los miembros de la familia de transportadores de unión a ATP (transportadores ABC). La actividad de flopasa del transportador A-1 dependiente de la unión de ATP (ABCA1) la ha implicado en la formación de micropartículas.

En este trabajo se analizó la participación de dos variantes de *ABCA1* asociadas previamente a la EAC (R230C e I883M), en la producción de micropartículas endoteliales (EMPs) en cultivos de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) en estado basal y bajo dos distintos estímulos involucrados en la fisiopatología de la aterosclerosis. R230C es una variante exclusiva de poblaciones nativas de América y sus derivadas; relativamente frecuente en la población mexicana. Se ha asociado a niveles bajos de colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) y paradójicamente a un menor riesgo de EAC en población mestiza mexicana. La variante I883M de *ABCA1*, aun cuando se ha asociado a un mayor riesgo de EAC en diversos estudios, no se ha asociado de manera consistente a niveles de HDL.

Se genotipificaron estas dos variantes por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real en 53 cultivos de HUVEC; se seleccionaron cinco cultivos al azar de los diferentes genotipos (R230R, I883I, R230C e I883M), éstos se trataron durante 24 h con lipopolisacárido (LPS) y lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL-ox). Las EMPs obtenidas se identificaron y caracterizaron por citometría de flujo. Se evaluó la producción total de EMPs en sobrenadantes en estado basal y con respecto a los estímulos, así como la asociación de estos polimorfismos a la producción de EMPs mediante la prueba de U de Mann-

Whitney, utilizando el programa SPSS v23. La producción de EMPs fue significativamente mayor al estimular con LDL-ox comparada con la producción en estado basal ($P=0.022$) y no hubo cambios significativos con el estímulo de LPS. La variante R230C se asoció significativamente a la disminución de EMPs en estado basal ($P=0.035$) y a una disminución en la producción de EMPs al evaluar el estímulo LDL-ox ($P=0.008$). La variante I883M no se asoció significativamente a la producción de EMPs en estado basal y bajo ninguno de los estímulos.

En conclusión, la variante R230C de *ABCA1* se asoció significativamente a una disminución en la producción de EMPs, lo que sugiere que esta variante podría estar asociada a la protección de EAC al disminuir el número de MPs liberadas, las cuales se ha descrito que se encuentran incrementadas en enfermedades que cursan con daño vascular. La variante I883M no se asoció a la producción de EMPs; es necesario aumentar el tamaño de la muestra para confirmar los resultados de este trabajo.

ABSTRACT

Coronary artery disease (CAD) is a clinical manifestation of atherosclerosis. Atherogenesis begins with endothelial injury that can result from a variety of factors. Several studies have analyzed the role of circulating microparticles (MPs) in different diseases, including atherosclerosis and CAD. MPs are cell-derived vesicles that are formed from the outward blebbing of the plasma membrane. MPs are defined as 100 to 1000 nm in size, vectors of biological information, protagonists of an intracellular communication network, and derive from almost all cells. The levels of MPs are increased in vascular damage diseases. A crucial event involved in the formation of MPs is the externalization of phosphatidylserine (PS), an aminophospholipid which is found preferentially on the inside of the plasma membrane of cells. The asymmetric distribution of PS is regulated by three different types of enzymes: flippases, floppases and scramblases. The floppases catalyze the transport of PS to the outer membrane in an ATP-dependent manner; in this group of enzymes the members of the ABC carrier family (ATP-binding cassette transporter) are included. The floppase activity of ABCA1 has implicated it in the formation of microparticles.

In this work, we analyzed the participation of two genetic variants of *ABCA1*, previously associated with CAD (R230C and I883M), on the formation of endothelial microparticles *in vitro*, in response to two different stimuli involved in the pathophysiology of atherosclerosis. R230C is an exclusive variant of Native American and descent populations. This variant is relatively frequent in the Mexican population. R230C has been associated with low levels of HDL-C and, paradoxically, with a lower risk of CAD in Mexican mestizo populations. In addition, it has been shown that this variant decreases cholesterol efflux capacity of the protein by approximately 30%. I883M/*ABCA1* variant has not been consistently associated with HDL levels, however several studies has revealed an increased risk of CAD. These variants were genotyped by real-time PCR in 53 HUVEC cultures that were stimulated for 24 h with LPS and ox-LDL. The EMPs were isolated by ultracentrifugation and identified and characterized by flow cytometry. We evaluated the total production of EMPs in cells stimulated or not with LPS and ox-LDL. Association analysis of these polymorphisms with the production of EMPs was performed using Mann-Whitney U test; all statistical analyses were performed using SPSS v23. Production of EMPs was significantly higher when HUVEC were stimulated with ox-LDL compared to basal production ($P = 0.014$) and there were no significant changes with the LPS stimulus. The R230C variant was significantly associated with a decrease in the production of EMPs in the basal state ($P = 0.035$) and with a decrease in the production of EMPs when evaluating the LDL-ox stimulus ($P = 0.008$). The I883M variant was not significantly associated with the production of EMPs. In conclusion only the R230C variant was significantly associated with a decrease in the production of EMPs, suggesting that this variant could be associated with the protection of EAC by decreasing the number of MPs released, which have been described to be increased in diseases with vascular damage; it is necessary to increase the sample size to confirm the results of this study.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedad arterial coronaria

La enfermedad arterial coronaria (EAC) es el tipo de patología más común de las enfermedades cardiovasculares; es la principal causa de morbilidad y mortalidad en el mundo de acuerdo a cifras oficiales de la Organización Mundial de la Salud, la cual informa que a nivel mundial, el 30% de las muertes son consecuencia de enfermedades cardiovasculares y de continuar esta tendencia, se estima que en 2030 morirán cerca de 23.3 millones de personas a causa de estos padecimientos (OMS, 2017 (1)).

La EAC se produce cuando las arterias del corazón, conocidas como arterias coronarias, se dañan a partir de una disfunción endotelial y esto provoca la formación de placas aterogénicas que se acumulan en la pared arterial. Con el tiempo, esta acumulación de colesterol se endurece progresivamente y estrecha los vasos sanguíneos, un proceso conocido como la aterosclerosis (2). Estos eventos interrumpen el flujo de sangre rica en oxígeno al corazón, lo cual puede provocar eventos más graves como es la angina inestable de pecho, infarto de miocardio e incluso llevar a la muerte súbita.

Se ha encontrado que la gran mayoría de las enfermedades cardiovasculares son poligénicas, teniendo contribuciones tanto hereditarias como ambientales (3). Dentro de este último grupo, factores como hipertensión, dislipidemia, obesidad, tabaquismo y el consumo de alcohol predisponen a la EAC. Los grandes estudios realizados en gemelos han estimado la heredabilidad de la EAC la cual es, aproximadamente un 50% a 60% (4).

1.2. Aterosclerosis

La aterosclerosis es un fenómeno patológico focal que afecta a las grandes arterias, principalmente la aorta y las coronarias, carótidas, ilíacas y femorales (5). La enfermedad es consecuencia de la pérdida en la integridad vascular y de una disfunción endotelial. Esta última puede ser causada por efectos genéticos, bioquímicos y hemodinámicos influenciados por diferentes factores de riesgo (3).

El proceso de progresión de la placa aterosclerótica es dinámico y complicado. La aterosclerosis comienza con una hiperplasia temprana cerca de los puntos de bifurcación, generando una lesión prematura la cual se conoce como estría grasa (Figura 1a). Este proceso es considerado reversible, pero con el tiempo incrementa su acumulación lipídica y en la adolescencia ya se presentan las primeras lesiones fibrosas. Estas lesiones pueden progresar a un engrosamiento patológico de la íntima (Figura 1b)(6). Con el paso del tiempo, estas placas se agrandan y modifican, y en la mayoría de los casos todos estos procesos cursan asintomáticos; la ulceración de la placa, su rotura y trombosis son lo que precipita el evento clínico (5).

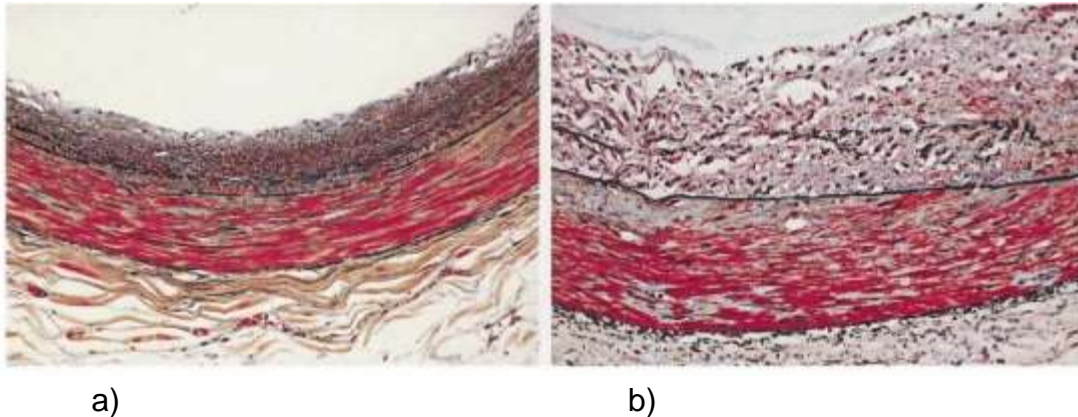


Figura 1.- Progresión de la placa aterosclerótica. a) Lesión temprana de la aterosclerosis. b) Progresión en el engrosamiento de la íntima. Imagen modificada de Virmani et al (7).

1.3. Endotelio

El endotelio es un órgano multifuncional, conformado por una capa simple de 10-50 μm de espesor, es la zona más interna de la íntima arterial que se encuentra en contacto con el torrente circulatorio, morfológicamente muestra heterogeneidad estructural; su función es compleja y requiere de su completa integridad para un correcto funcionamiento (8).

Una de las funciones más básicas del endotelio es ser una barrera semipermeable ya que regula el transporte de macromoléculas entre el lumen vascular y el músculo liso vascular. Hay diferentes mecanismos por los que las macromoléculas atraviesan la barrera endotelial; a través de las propias células endoteliales (CEs), por difusión lateral dentro de la membrana de las CEs y rodeando a la célula, a través de las uniones endoteliales célula-célula, a través de los huecos endoteliales, o mediante el transporte vesicular (9).

El endotelio también responde a estímulos humorales, estímulos del sistema nervioso y estímulos hemodinámicos; regula la función plaquetaria, la respuesta inflamatoria, así como el crecimiento de células del músculo liso vascular (CMLVs) y su migración (10).

1.4. Vasoregulación endotelial

El tono vascular depende del equilibrio entre ambos sistemas. En estado basal mantiene el equilibrio entre trombosis y fibrinólisis, y regula la actividad de las células inflamatorias en la pared del vaso, por lo que el endotelio en sí, tiene una función anti-aterogénica (11).

Normalmente, el endotelio secreta sustancias vasodilatadoras, como son óxido nítrico (NO), prostaglandinas, así como sustancias vasoconstrictoras como la endotelina y factor constrictor derivado del endotelio (12).

1.4.1. Óxido nítrico.

Es un gas simple que se libera por la conversión del aminoácido L-arginina en L-citrulina. Para la síntesis de NO, además de la L-arginina como sustrato, se requiere de la presencia de calmodulina (CaM) y de 4 cofactores: flavin mononucleótido (FMN), flavin adenina dinucleótido (FAD), tetrahidrobiopterina (TBH) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Esta reacción es catalizada por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS). Son tres las isoformas de NOS identificadas; éstas son nombradas de acuerdo a la célula de origen: eNOS (endotelial), nNOS (neuronal) y la iNOS (inducible o inflamatoria) encontrada principalmente en macrófagos. La actividad de nNOS y eNOS depende de la presencia de altos niveles de calcio (Ca^{2+}) unidos a CaM, mientras la iNOS se une a CaM con alta afinidad independientemente de la concentración de Ca^{2+} (13).

Esta enzima puede ser inhibida por derivados estructurales de arginina: la N-mono-metil-L-arginina (LNMMA), la N-nitro-L-arginina metil éster (LNAME) y otros (8, 14).

El flujo sanguíneo interviene en la producción de NO dependiente de las CEs a través de la influencia en la expresión y actividad de la eNOs. La fosforilación del aminoácido Ser1177 presente en la eNOs por la proteína cinasa B (Akt) aumenta la afinidad de la eNOS por la CaM, lo cual es crítico para la activación de la sintasa. La Akt se activa por el estrés de las fuerzas de rozamiento aumentando los niveles de Ca^{2+} intracelular, así como por la práctica de ejercicio y por algunas señales químicas, tales como estrógenos, la insulina, o peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Por el contrario, la fosforilación en Thr459 (por la proteína cinasa A o C) inactiva la eNOS (15-17).

1.4.2. Prostaciclina (PGI_2).

La PGI_2 es un eicosanoide que no se sintetiza en condiciones basales por las CEs; sin embargo, su producción es inducida por alteraciones en la función endotelial o en la hemodinámica vascular (8). Es sintetizada a partir del ácido araquidónico mediante una ruta de múltiples pasos, la cual involucra a las enzimas ciclooxigenasas (COX), produciendo prostaglandina H_2 (PGH_2); esta última es transformada a PGI_2 por una sintasa específica (13).

La PGI_2 es de naturaleza lipofílica, es fácilmente difundible en las CEs e inhibe la contracción de las CMLVs y la agregación plaquetaria al igual que el NO. A diferencia del NO, los efectos de la PGI_2 están mediados por la unión a receptores de membrana que activan la adenilato ciclasa en sus células blanco, produciendo un incremento en los niveles de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) y activando a la proteína cinasa A, quien disminuye los niveles de Ca^{2+} citosólico, provocando la apertura de los canales de potasio y causando hiperpolarización (13).

1.4.3. Endotelina

Las endotelinas son una familia de péptidos de 21 aminoácidos de los cuales hay tres familias (ET-1, ET-2, ET-3); en las células endoteliales se ha encontrado principalmente la isoforma ET-1 (8, 9, 16). Es un potente vasoconstrictor que se activa en respuesta a diferentes estímulos tales como hipoxia, angiotensina II, trombina, productos plaquetarios, citocinas proinflamatorias, norepinefrina y señales biomecánicas (8, 13).

La acción biológica de ET-1 involucra dos tipos de receptores: ET_A y ET_B, localizados en las CMLVs. Ambos subtipos pertenecen a la clase I de la familia de receptores transmembranales acoplados a proteínas G (16). El ET_A se ubica en el músculo liso y es mediador de la vasoconstricción potente y prolongada. El ET_B es vasoconstrictor si está en las CMLVs y vasodilatador si está en el endotelio (8, 9, 13).

A través del ET_A se activa la formación de inositol-trifosfato, lo que incrementa el Ca²⁺ causando la contracción. Los receptores ET_B en las CEs estimulan la producción de NO y de PGI₂, e inducen efectos vasodilatadores y antiproliferativos (9, 13).

1.4.4. Angiotensina II

El sistema renina-angiotensina (RAS) es un sistema hormonal circulatorio que regula la presión sanguínea, el flujo de la sangre, el volumen y el balance electrolítico. Con excepción de renina, todos los componentes de RAS se producen en la pared vascular. Las CEs expresan una enzima convertidora de angiotensina I, la dipeptidil carboxipeptidasa, que convierte la angiotensina I a la fisiológicamente activa angiotensina II (9). El dominio corto intracelular de esta enzima regula la vía de señalización que activa la expresión de diferentes genes en las CEs incluyendo la COX₂. La angiotensina II produce la contracción directa de las CMLVs por la unión del receptor fosfolipasa C a su ligando Ca²⁺ e indirectamente por el incremento en la liberación de norepinefrina por los nervios simpáticos; simultáneamente los receptores de la enzima convertidora de angiotensina I en las CMLVs y en CEs activan a NADPH oxidasa, lo que incrementa la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el daño provocado por estrés oxidativo (13).

1.5. Disfunción endotelial.

Diversos factores pueden modificar las funciones del endotelio y provocar lo que se conoce como disfunción endotelial. La disfunción endotelial puede definirse como un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas de origen endotelial que predispone a la inflamación, la vasoconstricción y el incremento de la permeabilidad vascular, que puede facilitar el desarrollo de aterosclerosis, agregación plaquetaria y trombosis (Figura 2) (10, 18).

Dentro de los factores que pueden llevar a la disfunción endotelial se incluyen (19) :

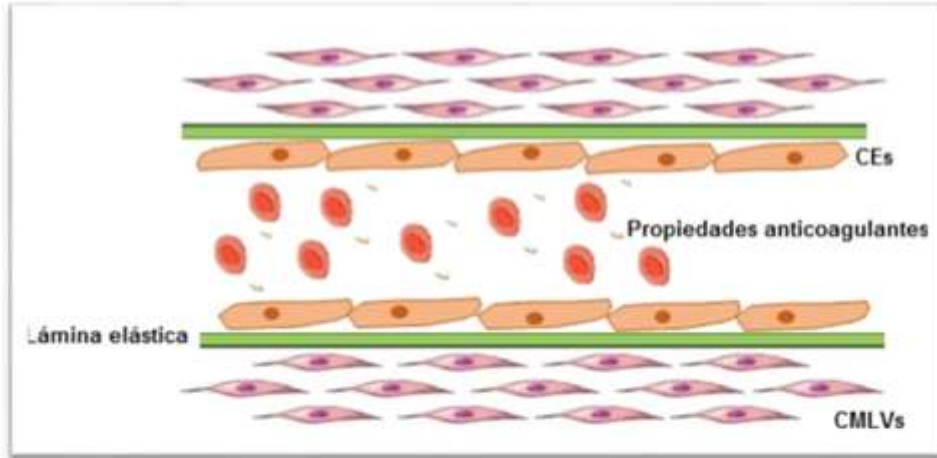
- I. Activación por citocinas.
- II. Estimulación por radicales libres o estrés oxidativo, glicación avanzada y productos generados en diabetes.
- III. Ser un fumador crónico y tener hipertensión.
- IV. Exposición crónica a hiperhomocisteinemia.
- V. Incremento en los niveles plasmáticos de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL-ox) y la acumulación de las mismas en la pared vascular.
- VI. Infecciones por bacterias, virus y otros patógenos.

1.5.1. Lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL-ox)

La acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el espacio subendotelial parece ser uno de los primeros episodios asociados al desarrollo de lesiones ateroscleróticas. El colesterol se transporta en el plasma como componente de las lipoproteínas y aproximadamente dos tercios del colesterol total son transportados por las LDL (18).

El incremento en plasma de las LDL conlleva no solo a un aumento de las partículas de colesterol-LDL dentro de la íntima en la pared vascular en donde es acumulado, sino que también alteran funciones de las CEs, CMLVs y de monocitos (9, 18) .

a)



b)

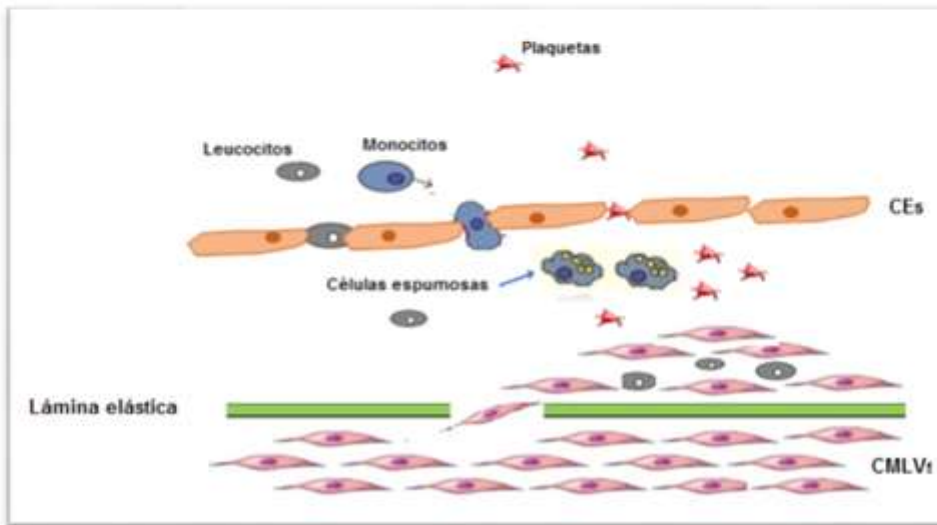


Figura 2.- Endotelio basal vs disfunción endotelial. a) El endotelio es un órgano multifuncional que en estado basal mantiene el equilibrio homeostático en el vaso sanguíneo liberando sustancias vasodilatadoras como son NO y PGI₂, así como sustancias vasoconstrictoras como la endotelina y factor constrictor derivado del endotelio, manteniendo las propiedades anticoagulantes y ateroprotectoras. b) La disfunción endotelial provoca un desequilibrio en la biodisponibilidad de estas sustancias activas que predispone a la inflamación, la vasoconstricción y el incremento de la permeabilidad vascular favoreciendo el desarrollando de la lesión aterosclerótica. En este proceso existe un aumento en la producción de moléculas de adhesión que atrae monocitos al endotelio; la producción de MCP-1 favorece la migración de estos monocitos a la íntima vascular y su acumulación como células espumosas; el aumento en la actividad de MMP (tipo 1 y 3) y factores de crecimiento favorecen la migración de las CMLVs a la íntima, agravando la lesión al aumentar la agregación plaquetaria y trombosis.

Las LDL retenidas en la pared sufren procesos de oxidación (LDL-ox) y generan productos con actividad quimiotáctica para monocitos y células musculares lisas (CML). Los monocitos atraviesan el endotelio, y se diferencian a macrófagos, captan de forma masiva LDL-ox y se transforman en células espumosas, cuya acumulación en la íntima origina la formación de la estría grasa (18).

En las CEs, las LDL-ox desencadenan la activación de rutas de señalización inflamatorias tal como CD40/CD40L, se incrementa la expresión de genes proinflamatorios y la actividad de metaloproteinasas de matriz (MMP-1 y 3) (20).

Las CEs en cultivo con concentraciones aterogénicas de LDL (>160 mg/dl) provocan cambios en el metabolismo del ácido araquidónico, alteran la producción de NO y radicales libres, incrementan la expresión de moléculas de adhesión *per se* y la inducida por citocinas, y aumentan la adhesión de monocitos (18).

Se ha demostrado que la expresión del transportador A-1 dependiente de la unión de ATP (*ABCA1*) en CEs está regulada positivamente por el colesterol-LDL y oxisteroles y negativamente por la privación de esteroles y las fuerzas de rozamiento. Las LDL-ox suprimen los niveles de proteína y ARNm de *ABCA1* en CEs de la vena umbilical humana (HUVEC) de una manera tejido-específica; las LDL-ox pueden inhibir el eflujo del colesterol libre mediado por Apo A-I. Las LDL-ox disminuyen la actividad del promotor de *ABCA1* por medio de la inhibición de la producción de ligandos endógenos del receptor de ligando X (LXR), como el 27-hidroxicolesterol (27-HO) (21).

1.5.2. Fuerzas de rozamiento

Las CEs tienen una variedad de receptores que detectan el flujo y transmiten señales mecánicas a través de vías de señalización mecanosensibles a moléculas receptoras, las cuales conducen a cambios fenotípicos y funcionales(15). Este proceso es conocido como mecanotransducción y es un proceso de conversión de fuerzas mecánicas (físicas) en mecanismos bioquímicos intracelulares (10, 15). En las CEs, las moléculas mecanosensibles incluyen proteínas de unión (VE-cadherina, ocludina), receptores tipo cinasas (Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), receptor 2 del VEGF (VEGFR2) y otros), integrinas, adhesiones focales, proteínas G, receptores acoplados a proteínas G (GPCR), transportadores de iones y glicocáliz (10, 15, 22).

Si bien ciertos tipos de fuerzas hemodinámicas son esenciales para las funciones fisiológicas de la CE en condiciones normales, otros tipos de fuerzas pueden inducir disfunción endotelial modulando de forma adversa la señalización y la expresión génica en las CEs, contribuyendo así al desarrollo de patologías vasculares (19).

La permeabilidad endotelial es principalmente influenciada por las fuerzas de rozamiento: fricción tangencial ejercida por la sangre que fluye (9, 23). Actualmente se reconoce que las lesiones ateroscleróticas se desarrollan principalmente en segmentos de vasos expuestos a un flujo lento, perturbado o flujo oscilante, mientras que el flujo laminar y las altas fuerzas de rozamiento son aparentemente ateroprotectoras (Figura 3).

La magnitud de las fuerzas de rozamiento en vasos rectos puede estimarse ya que es directamente proporcional a la viscosidad de la sangre e inversamente proporcional a la tercera potencia del radio interior del vaso. Se ha demostrado por mediciones experimentales utilizando diferentes métodos, que en seres humanos la magnitud de las fuerzas de rozamiento oscila entre 1 - 6 dinas/cm² en el sistema venoso y entre 10-70 dinas/cm² en las arterias (19, 24).

Recientemente se ha demostrado que el flujo sanguíneo perturbado y las fuerzas de rozamiento bajas inducen una activación sostenida de varios genes aterogénicos en CEs, por ejemplo, la proteína quimiotáctica 1 de monocitos (MCP-1) que induce la filtración de monocitos en la pared arterial, factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) que aumentan el recambio de las CEs y la migración de las CMLVs hacia el espacio subintimal (19).

El estímulo físico de mayor contribución para la liberación de NO es generado por la presión que ejerce el flujo sanguíneo sobre las paredes vasculares, que conduce a una vasodilatación cuya magnitud es directamente proporcional a la cantidad de NO liberado (14).

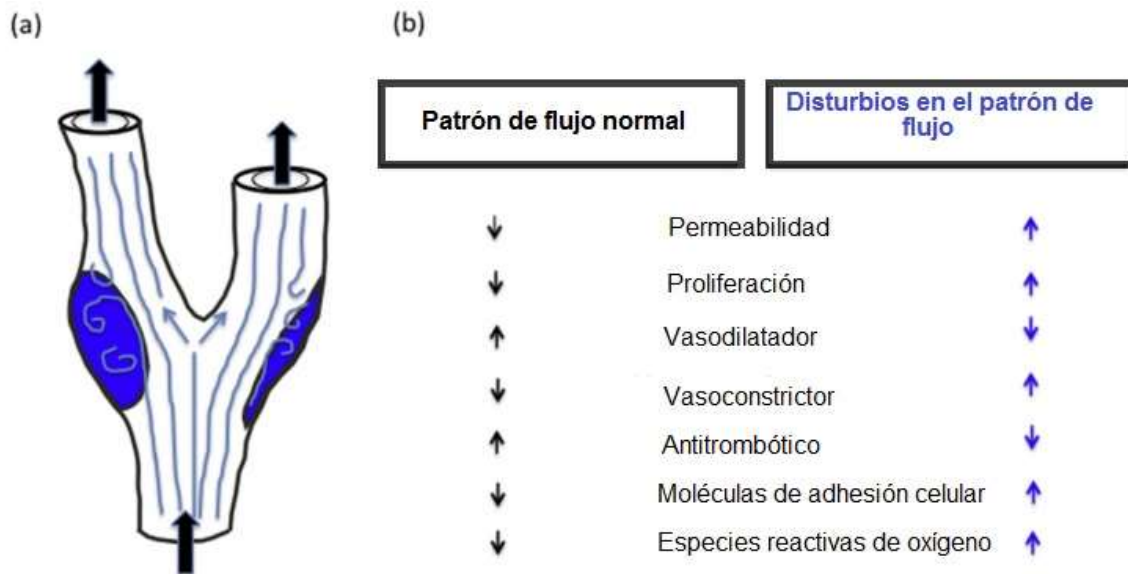


Figura 3.-Efecto de los diferentes patrones de flujo sobre el desarrollo de la placa aterosclerótica. (a) Efecto sobre el fenotipo endotelial y (b) efecto sobre la actividad. En las partes rectas del árbol arterial, el flujo sanguíneo es estable y unidireccional, y las fuerzas de rozamiento de la pared son altas. En los puntos de ramificación y curvaturas, el flujo sanguíneo es perturbado u oscilante y las fuerzas de rozamiento netas de la pared son bajas (áreas en azul en el esquema de la bifurcación arterial) (Imagen modificada de Cahill, et al. (9))

I.1.1.1 Infecciones por bacterias, virus y otros patógenos

Los estudios epidemiológicos sugieren que agentes infecciosos pueden predisponer a los pacientes a aterosclerosis y a sus eventos clínicos. Los virus, como el citomegalovirus y el herpes simple 1, bacterias como *Chlamydia* y *Helicobacter pylori*, se han asociado a EAC en humanos. Se ha demostrado que los títulos de anticuerpos de inmunoglobulina-G contra el citomegalovirus, el virus de la hepatitis A, el virus del herpes simple 1, *Chlamydia pneumoniae* y *Helicobacter pylori* son factores de riesgo independientes para la disfunción endotelial y la presencia de EAC. Por lo tanto, es probable que durante la infección con estos patógenos, se pueda producir lesión endotelial y aterosclerosis (25).

1.5.3. Lipopolisacárido (LPS)

El LPS es un componente clave de la pared de bacterias gram negativas. Está constituido por 3 estructuras elementales: un núcleo de oligosacáridos, una cadena O específica compuesta por secuencias repetitivas de polisacáridos y un componente A lipídico, que es responsable de las propiedades inflamatorias del LPS (26).

La unión de LPS a la superficie endotelial resulta en la activación endotelial a través de un complejo de receptores constituido por TLR4, CD14 y MD2, expresión de citocinas proinflamatorias y moléculas de adhesión; en algunos casos puede llevar a la apoptosis de la célula endotelial (26). El LPS hace que se genere una hiperpermeabilidad endotelial mediante la estimulación de la GTPasa pequeña, RhoA, y su efector Rho-cinasa (ROCK) (9, 27). Además, el LPS aumenta directamente la expresión de selectina-E y su contra-receptor integrina. La regulación positiva de la expresión de esta molécula de adhesión requiere de la localización en el núcleo del factor nuclear-kappa B (NF-kB) (26).

Se ha demostrado que la activación o apoptosis de CEs por ciertos agonistas *in vitro* induce la liberación de numerosas vesículas extracelulares pequeñas ($\leq 1 \mu\text{m}$), denominadas micropartículas (MPs), que pueden proporcionar información valiosa sobre la naturaleza de la lesión endotelial, apoyando el concepto de que el nivel plasmático de EMPs podría sustituir a la disfunción endotelial como marcador para el riesgo cardiovascular (11, 28).

1.6. Micropartículas

Tanto las células eucariotas como procariotas liberan vesículas extracelulares (EVs), que son partículas esféricas rodeadas por una bicapa de fosfolípidos. El diámetro de estas vesículas varía típicamente desde 30 nm a 1 μm (29).

Las EVs fueron observadas por primera vez como pequeñas partículas procoagulantes derivadas de plaquetas en plasma de pacientes sanos, reportadas originalmente en 1946 por Chargaff y West (30) y conocidas como "polvo de plaquetas" por Wolf en 1967 (31). Actualmente se estudian como vectores potentes de información biológica y son protagonistas de una red de comunicación

intracelular; se han encontrado en gran parte de los fluidos biológicos (Figura 4) bajo condiciones normales o bien en condiciones patológicas (32).

La detección y clasificación de estas vesículas extracelulares suele ser muy complicada por lo que la nomenclatura para cada una de ellas es controversial. Para definir las, los autores se basan en el origen, tamaño y tipo celular de donde son liberadas, y la mayoría de los grupos de investigación coincide en la siguiente clasificación: exosomas, micropartículas y cuerpos apoptóticos (Figura 5) (29, 32-35).

Las MPs son descritas como una población heterogénea de vesículas fosfolipídicas esféricas de 50 a 1000 nm de diámetro, que pueden liberarse por diversas células eucariotas, procariontas y organismos multicelulares en condiciones de estrés o daño celular (29, 34, 35). Se ha observado su formación en células vasculares (CEs, plaquetas, leucocitos y CMLs), eritrocitos, cardiomiocitos y podocitos (36). Las MPs son formadas por protrusiones de la membrana plasmática; contienen una amplia variedad de biomoléculas: proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (ácido ribonucleico (RNA), micro-RNA, ácido desoxirribonucleico (ADN)) derivados de su célula de origen. Las MPs pueden distinguirse de otros grupos de EVs tales como exosomas y cuerpos apoptóticos. Los exosomas son pequeñas vesículas (30-100 nm) (29, 36) que se forman a través de exocitosis constitutiva de endosomas multivesiculares, y a menudo contienen marcadores endocíticos, como HSP73, la proteína 1 de membrana asociada a lisosoma (Lamp1), gen 101 de susceptibilidad tumoral (TSG101) y la proteína de membrana CD63 (34, 36). Los cuerpos apoptóticos son vesículas mucho más grandes que los exosomas y MPs (1000-5000 nm), los cuales son liberados en el último paso del proceso de apoptosis celular (34, 36); similar a las MPs, los cuerpos apoptóticos externalizan fosfatidilserina (PS) en su membrana pero pueden ser distinguidos por su tamaño, la presencia de material nuclear y/u orgánulos celulares, además de que la membrana es altamente permeable (36).

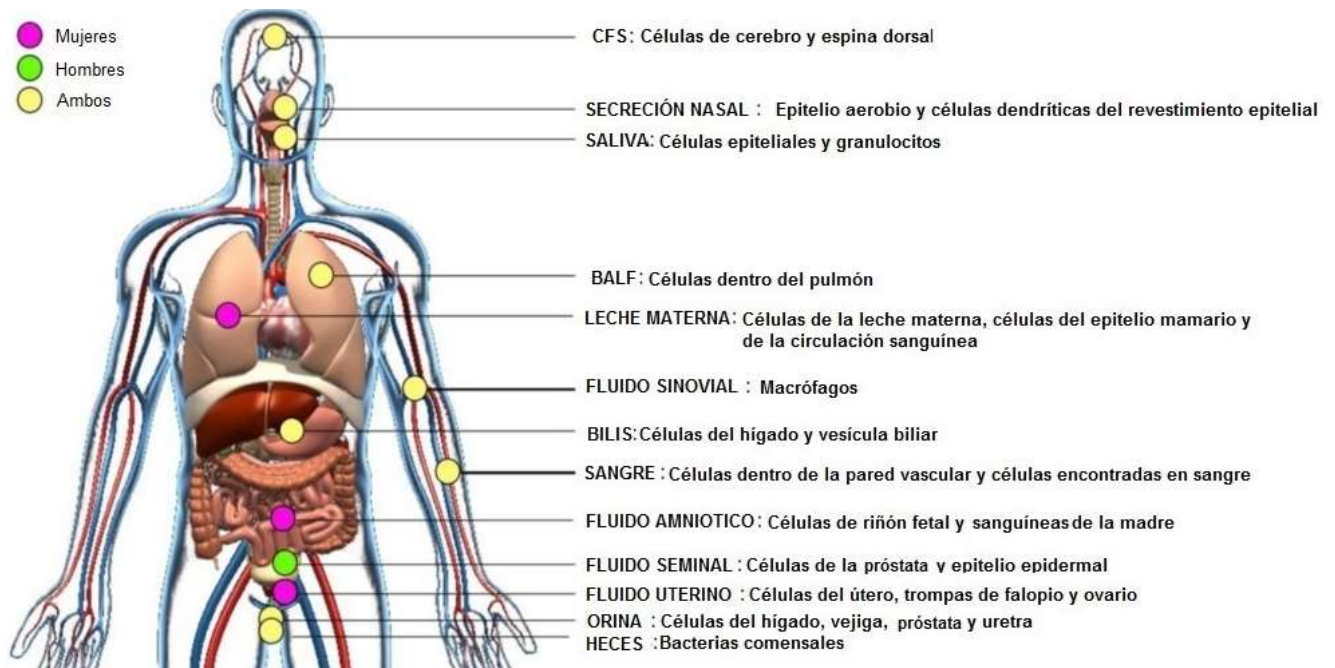


Figura 4 .- Fluidos biológicos y células de origen en los que se han encontrado EVs.
 (Imagen modificada de Yáñez-Móa et al. (32))

Entre los diversos tipos de EVs formadas, las MPs están emergiendo como índices de lesión vascular y/o como entidades circulantes biológicamente activas, se encuentran incrementadas en enfermedades que cursan con daño vascular e inflamación, incluyendo infarto agudo de miocardio, diabetes, aterotrombosis, preeclampsia, hipertensión y síndrome metabólico(11, 37-39).

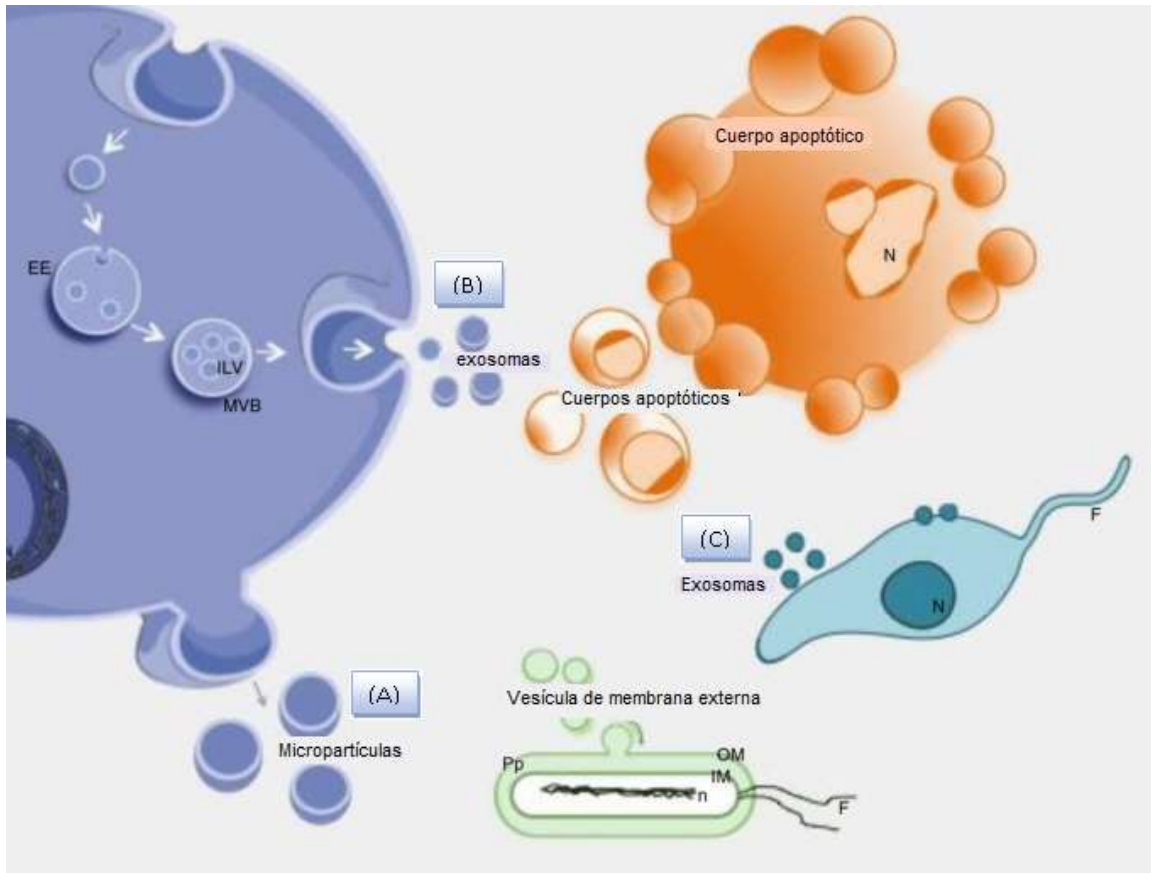


Figura 5.- Biogénesis y liberación de EVs. Las EVs pueden clasificarse ampliamente en tres clases principales: (A) MPs, que se producen por protrusión y fisión de la membrana plasmática; (B) exosomas, se forman dentro de la red endosomal y se liberan tras la fusión de cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática; y (C) los cuerpos apoptóticos, los cuales son liberados como consecuencia de la fragmentación de las células sometidas a apoptosis. Los organismos inferiores, como bacterias y parásitos, también son capaces de secretar EVs. Las vesículas de membrana externa (OVM) se forman por protrusiones hacia el exterior de la membrana externa de bacterias gram negativas. EE: endosoma temprano; MVB: cuerpo multivesicular; ILV: vesículas intraluminales; N: núcleo; OM: membrana externa; Pp: periplasma; IM: membrana interna; n: nucleoide; F: flagelo (Imagen modificada Yáñez-Mó et al. (32))

1.6.1. Función de las MPs

Como se mencionó anteriormente, se han propuesto a las MPs como biomarcadores potenciales de disfunción endotelial, coagulación, inflamación y otros procesos patológicos (36); además, existe evidencia que demuestra que las MPs tienen efectos fisiopatológicos incluyendo efectos en trombosis, señalización celular y angiogénesis (40). Las MPs pueden transferir información desde una célula efectora a varias células diana mediante contacto directo de célula a célula, a través de la secreción de mediadores y efectores solubles (37).

Las MPs se encuentran elevadas en desórdenes de hipercoagulación y esta relación es probablemente el resultado de su participación activa en el proceso de coagulación (36). La externalización de fosfolípidos aniónicos en las MPs (principalmente PS) confiere una carga negativa en la superficie de la vesícula; esta carga permite la interacción con dominios catiónicos de las proteínas de coagulación y finalmente la formación de trombina (36). Se ha demostrado que ciertas poblaciones de MPs (provenientes de células endoteliales y monocitos) contienen en su superficie factor tisular. El factor tisular es un componente crítico de las primeras etapas de coagulación, donde forma un complejo con el factor VII/VIIa, lo que conduce al inicio de la coagulación (36).

El endotelio es uno de los principales blancos de las MPs circulantes. La respuesta endotelial a las MPs puede ser aguda, resultando en la liberación de varios factores, o prolongada, lo que implica cambios en la expresión de los genes implicados en la regulación estructural y funcional de la pared vascular (37).

La estimulación de células endoteliales por MPs de plaquetas *in vitro* conlleva a la liberación de citocinas, interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) y a la consecuente expresión de moléculas de adhesión como son: molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1), molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1) y selectina-E (37). Las MPs liberadas por leucocitos polimorfonucleares promueven la liberación de IL-6 y MCP-1 en cultivo de CEs (36).

Las MPs producidas en la placa aterosclerótica contribuyen a la progresión de la lesión por estimulación en la neovascularización, ya que se ha demostrado que la superficie de las MPs liberadas en las placas ateroscleróticas, provee una superficie catalítica para la conversión de plasminógeno a plasmina por expresión de activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA) y receptor del activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPAR), lo cual desencadena la activación de metaloproteinasas que promueven la migración celular a través de la matriz

intersticial, proceso que además de participar en la angiogénesis, también es parte del remodelado tisular o el proceso de crecimiento tumoral (33, 41).

Las MPs también participan en el proceso de estrés oxidativo; se ha observado que las micropartículas endoteliales (EMPs) incrementan la producción de O_2 , H_2O_2 y de NADPH oxidasa en cultivos celulares de endotelio (33, 36, 37). Las MPs de linfocito T disminuyen la producción de NO e incrementan el estrés oxidativo en CEs; estos efectos son asociados con una disminución en la actividad de eNOS (37).

El estudio del contenido de ácidos nucleicos como RNA, microRNA e incluso ADN sugieren que las MPs también tienen un papel regulador sobre sus células diana (33). Actualmente se han encontrado diferentes miRNAs presentes en las MPs, por ejemplo el miR-126, involucrado en la reparación de las células del endotelio vascular. En condiciones fisiopatológicas como diabetes y aterosclerosis, la cantidad de miR-126 está disminuida en las MPs liberadas de células endoteliales apoptóticas, lo que reduce la capacidad del endotelio para repararse (42). El miR-122 encontrado en EMPs, puede reducir la liberación de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) provocada por la inflamación inducida a CEs *in vitro*, mediante la transferencia del miR-222 a la célula endotelial diana con la subsecuente desregulación de ICAM-1 (43). Se ha demostrado que las MPs derivadas de monocitos transfieren el miR-150 a las CEs y promueven su migración mediante la activación de la proteína c-Myb (43).

1.6.2. Formación de MPs

Se ha observado que los estímulos proinflamatorios en CEs, como TNF- α , LPS, IL-1 α y proteína C reactiva (CRP), así como trombina (factor pro-coagulante) e inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), son los que principalmente favorecen la formación de MPs (36).

Los fosfolípidos de membrana son altamente específicos en términos de composición y distribución en varias células eucariotas. En condiciones fisiológicas normales, los fosfolípidos como fosfatidilcolina y esfingomiélinina se encuentran principalmente en el exterior de la membrana plasmática, mientras que la PS, los aminofosfolípidos y la fosfatidiletanolamina son localizados en el interior de la membrana (44, 45). El remodelado de la membrana plasmática es un evento crítico durante la apoptosis y la activación celular; las enzimas que regulan estos procesos regulan también la producción de MPs (46).

Durante la apoptosis, la formación de MPs está asociada a la activación de la cinasa ROCK I y la caspasa 3, conduciendo así a la alteración de la estructura del citoesqueleto (47). Por otro lado, la formación de MPs en respuesta a un estímulo activador inicia con un incremento en la concentración de calcio intracelular mediado por un agonista, causando la activación de cinasas y calpaína e inhibiendo fosfatasa(34). La calpaína produce la rotura de los filamentos de actina en el citoesqueleto provocando la reorganización del mismo, lo que facilita la formación y liberación de MPs (44).

Un evento crucial implicado en la formación de las MPs es la externalización de PS. La distribución asimétrica de la PS es regulada por tres distintos tipos de enzimas; flipasas, flopasas y escramblasas. Una proteína que tiene función de flopasa es ATP-binding cassette transporter A-1 (ABCA1), la cual es un transportador de membrana dependiente de ATP cuya función más estudiada es promover el eflujo de colesterol hacia la apolipoproteína A-1 (Apo A-I) para formar HDLs; su actividad de flopasa la ha implicado en la formación de micropartículas (48).

Mientras que existe una gran cantidad de estudios demostrando la importancia de la variación del gen *ABCA1* en los niveles séricos de HDL, existe un solo estudio que describe el papel de estas variantes en la formación de MPs y su posible repercusión clínica en la patología de malaria (49). Los estudios *in vitro* y en modelos animales revelan que *ABCA1* también juega un papel muy importante en la formación de MPs (46, 47).

1.7. ABCA1

1.7.1. Proteína

El transportador ABCA1 pertenece a la superfamilia de proteínas integrales de membrana ABCs (familia que incluye 49 transportadores de membrana) (50). La proteína ABCA1 se clonó por primera vez en 1994 y desde entonces se ha demostrado que tiene un papel en el transporte de colesterol y fosfolípidos hacia el exterior de las células; inicialmente la proteína se denominó ABC1 pero, debido a la reclasificación de las familias ABCs (conocidas en subfamilias A-G), fue renombrada y se convirtió en miembro de la subfamilia "A" (50).

La denominación ABC (ATP Binding Cassette; por sus siglas en inglés) se debe a que poseen dos dominios de unión a ATP altamente conservados. El transportador ABCA1 es una proteína de 2261 aminoácidos que comprende dos dominios de estructura similar. Cada mitad contiene un dominio transmembranal que abarca seis hélices y un dominio de unión a nucleótidos; incluye dos motivos peptídicos conocidos como Walker A y Walker B, los cuales están presentes en muchas proteínas que utilizan ATP. El transportador ABCA1 engloba un grupo amino terminal orientado hacia el citosol y dos grandes asas extracelulares que son altamente glicosiladas y unidas por uno o más enlaces cisteína-cisteína (51, 52) (Figura 6).

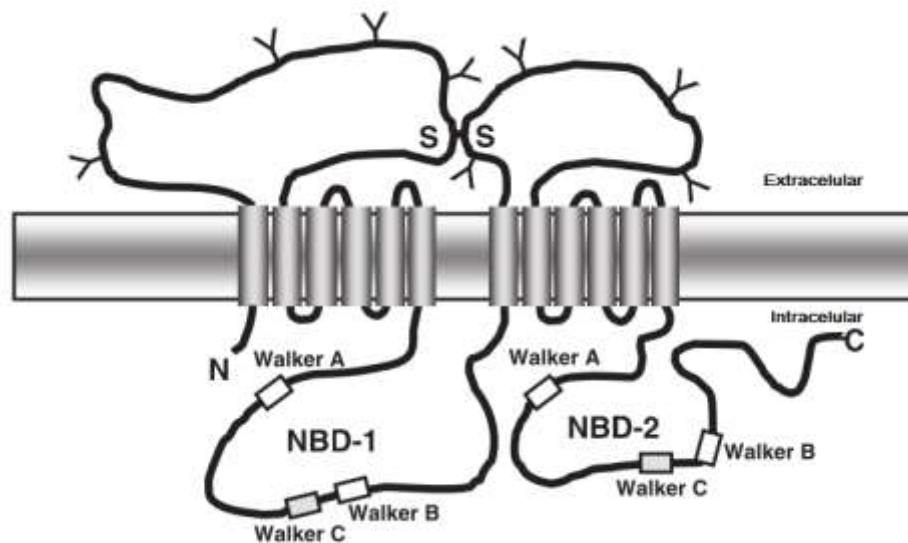


Figura 6.- Modelo topológico de la proteína ABCA1.- Este modelo se basa en estudios de los dominios de ABCA1 y su homólogo estrechamente relacionado ABCR. Y.- indican los sitios de glicosilación; S-S.- enlace disulfuro; NBD-1 y NBD-2.- Dominios de unión a

nucleótidos que contienen las secuencias altamente conservadas Walker A y Walker B (Imagen modificada de Oram et al. (51)).

El transportador ABCA1 está presente en la membrana plasmática de una amplia variedad de células, donde media el eflujo de colesterol y fosfolípidos a los aceptores extracelulares, como Apo A-I, ApoE y partículas pequeñas de HDL pobres en lípidos (Figura 7) (53). Existe evidencia de que ABCA1 también tiene efectos antiinflamatorios por señalización inducida a través de la vía JAK2/STAT3 en respuesta a la unión a Apo A-I, bloqueando de esta forma la expresión de citocinas proinflamatorias (54, 55).

Una forma en que las células monitorean el exceso de colesterol es a través de LXR, el cual tiene actividad transcripcional que depende de la formación de un heterodímero con el receptor de retinoides X (RXR). La acumulación de colesterol en las células lleva a la formación de oxisteroles, el ligando natural de LXR, quien estimula la expresión de *ABCA1* (50, 56).

1.7.2. Gen *ABCA1*

El gen *ABCA1* está situado en el cromosoma 9q31, y consta de 50 exones y 49 intrones; codifica para la proteína del mismo nombre constituida por 2,261 aminoácidos (57).

Las mutaciones en *ABCA1* se asocian con deficiencia de HDL y aterosclerosis prematura, lo que refleja un papel clave para ABCA1 en la producción de HDL en el hígado y el intestino y en la prevención de la aterosclerosis en la pared arterial (50). La pérdida de función en ambos alelos (homocigosidad o heterocigosidad compuesta) en el gen *ABCA1* causa la enfermedad de Tangier, un síndrome raro caracterizado por la deficiencia de HDL; las mutaciones heterocigóticas en *ABCA1* causan pérdida menos severa de HDL, hipoalfalipoproteinemia familiar (FHD), una forma más común de deficiencia genética de HDL (50, 58).

Se han descrito numerosos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en *ABCA1* que están asociados con cambios en los niveles de colesterol-HDL (C-HDL) (50, 59-62).

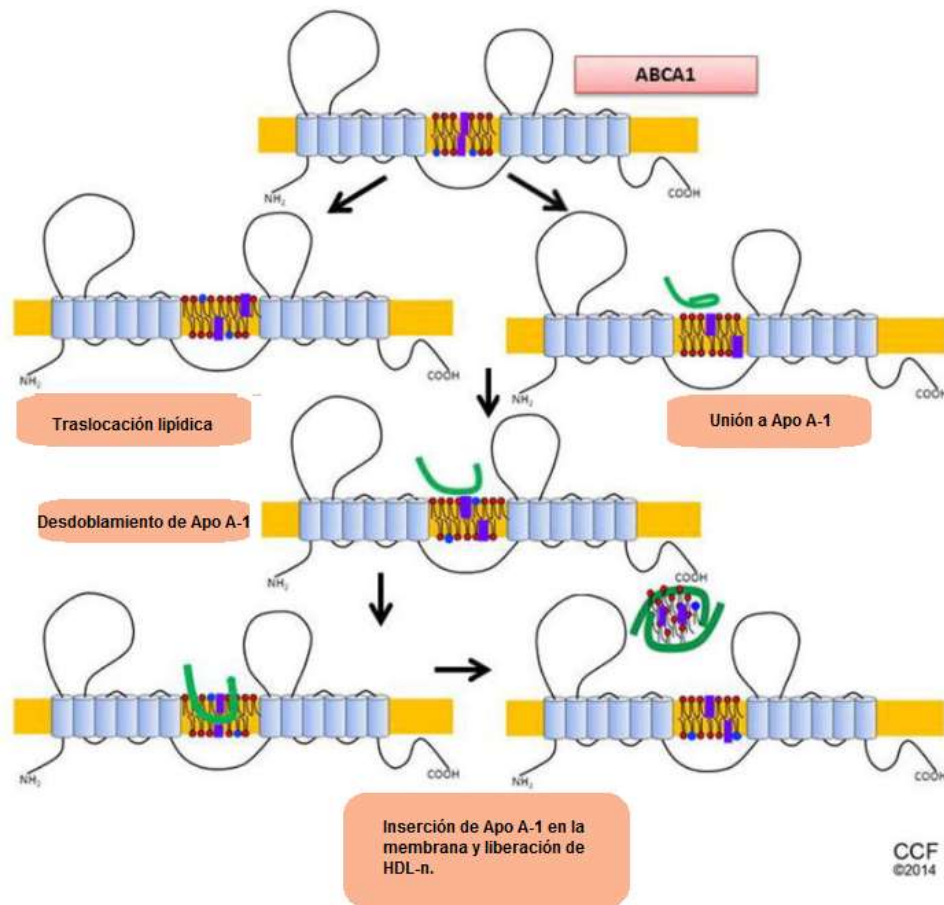


Figura 7.- Modelo para la biogénesis de HDL nacientes mediada por ABCA1. El transportador ABCA1 media dos etapas independientes: la translocación de fosfolípidos tales como PS desde la parte interna a la parte externa de la membrana plasmática y la unión celular de Apo A-I, las cuales están reguladas por hidrólisis de ATP. ABCA1 realiza el desdoblamiento parcial del N-terminal de Apo A-I. La Apo A-I desplegada es capaz de insertarse espontáneamente en la membrana plasmática y se produce la liberación de la HDL naciente de la célula. Apo A-I se muestra en verde; fosfatidilcolina en rojo; PS en azul y colesterol libre en púrpura (Imagen modificada de Wang et al. (48)).

El transportador ABCA1 participa en trastornos infecciosos y/o trombóticos que implican la formación de MPs; se demostró que las deleciones homocigóticas del gen *ABCA1* confieren resistencia completa contra la malaria cerebral en ratones, asociada a una producción alterada de MPs (63). Existe un único estudio que describe la asociación de polimorfismos del promotor de *ABCA1* (-477C/T y -320G/C), previamente asociados a niveles bajos de C-HDL (64), con el nivel

plasmático de MPs en pacientes con malaria; en este estudio se encontró una asociación entre los niveles bajos de MPs circulantes y la protección contra malaria en aquellos pacientes que portaban los polimorfismos (49).

El estudio del efecto de la variación genética en *ABCA1* sobre la producción de MPs podría ser relevante para explicar asociaciones a otros rasgos clínicos que involucran la formación de MPs. De manera muy importante, esto podría ayudar a explicar por qué son independientes el efecto de las variantes de *ABCA1* sobre los niveles séricos de C-HDL y la susceptibilidad a la EAC (65, 66).

1.7.3. Variante I883M

Es una variante puntual no sinónima, con el cambio de nucleótido A>G en el exón 18, en la posición 3044 (rs4149313, reemplazado por rs2066714). En un estudio de análisis *in silico* del polimorfismo se describió que la sustitución de una isoleucina por una metionina resulta en un fenotipo leve, así mismo se encontró que los portadores de esta variante tenían una reducción modesta pero significativa en los niveles de C-HDL y en el eflujo de colesterol (aproximadamente el 70%) (67). Esta variante es interesante, ya que el alelo menor, que codifica para metionina, es probable que sea el alelo ancestral en esta posición. Se ha demostrado experimentalmente una mayor actividad del eflujo de colesterol en presencia del alelo I883 versus M883 (68).

Se ha descrito que la variante I883M de *ABCA1* (frecuencia alélica de 22.4% en México-americanos), aun cuando se ha asociado a un mayor riesgo de EAC en diversos estudios (69), no se ha asociado de manera consistente a niveles de HDL (59, 67, 68, 70).

1.7.4. Variante R230C

Es una variante no sinónima (rs9282541), con el cambio de nucleótido C>T en la posición 1001. La variante R230C se ubica en el primer bucle extracelular, donde las mutaciones causales de enfermedad de Tangier y de FHD se agrupan. La arginina en la posición 230 se conserva entre las especies y la naturaleza de los aminoácidos involucrados es muy diferente: mientras que la arginina es básica, está cargada positivamente y es hidrofílica, la cisteína es hidrofóbica y contiene un grupo sulfhidrilo (71).

La variante R230C es exclusiva de poblaciones nativas de América y sus derivadas, es relativamente frecuente en la población mexicana (11% en población mestiza) (72), se ha asociado a varios factores de riesgo cardiovascular (hipoalfalipoproteinemia, obesidad, síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2), y disminuye la capacidad de eflujo de colesterol de la proteína en aproximadamente 30% (71-73). Sin embargo, a pesar de estar asociada a varios factores de riesgo cardiovascular, no se asoció con aterosclerosis subclínica, y paradójicamente se asoció a un menor riesgo de EAC prematura (65).

2. HIPÓTESIS

La variante genética R230C de *ABCA1* se asocia a una disminución en la producción de MPs endoteliales (EMPs), e I883M se asocia a un aumento en la producción de EMPs, tanto en condiciones basales como en respuesta a estímulos aterogénicos.

3. OBJETIVO GENERAL

Analizar el papel de las variantes R230C e I883M de *ABCA1* sobre la formación de micropartículas endoteliales *in vitro*, en condiciones basales y en respuesta a estímulos involucrados en la fisiopatología de la aterosclerosis.

3.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Genotipificar las variantes R230C e I883M de *ABCA1* en los cultivos de HUVEC.
-
- Cuantificar la producción de EMPs en HUVEC en condiciones basales y bajo diferentes estímulos: LDL-ox y LPS.
- Comparar la producción de EMPs en HUVEC de acuerdo a los genotipos de R230C e I883M de *ABCA1* en condiciones basales y en respuesta a los dos distintos estímulos.

4. METODOLOGÍA

4.1. Reactivos

- Gibco, ThermoFisher scientific, EUA.
 - Colagenasa tipo I.
 - Estreptomina (100 U/mL), penicilina (100 U/mL) y anfotericina B (10 μ g/L).
 - Glutamina.
 - Suero fetal bovino Hyclone.
- Sigma-Aldrich, EUA.
 - Factor de crecimiento endotelial.
 - Heparina.
 - Medio M199.
 - *Salmonella typhimurium*.
- Solución amortiguadora de ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinetanosulfónico 1X (HEPES).
- Solución salina amortiguadora de fosfatos 1 X (PBS).
- QIAGEN, EUA.
 - Kit de extracción de ácido desoxirribonucleico (DNA) Gentra Puregene.
- Applied Biosystems, EUA.
 - Sondas TaqMan
- Biowest, The Serum Specialist, EUA.
 - Suero fetal bovino Biowest

4.2. Población de estudio

Se tomaron las muestras de cordón umbilical de niños aparentemente sanos, nacidos en el Hospital General Tláhuac “Dra. Matilde Petra Montoya Lafragua”, cuyas madres cumplieron con los criterios de inclusión (mujeres que cursaron con un embarazo sano, sin patologías como diabetes gestacional, hipertensión, cardiopatías, enfermedades autoinmunes o tiroideas) y otorgaron el consentimiento informado por escrito, el cual fue previamente aprobado por el Comité de Ética del INMEGEN.

De acuerdo al programa QUANTO, para la variante R230C (frecuencia alélica 0.11⁵³), esperando un efecto Beta=7% y considerando un modelo dominante, se calculó que se necesitarían 93 muestras para tener un poder estadístico de 0.80. Para la variante I883M (frecuencia alélica de 0.224 en México-

americanos del Hapmap), esperando un efecto Beta=7% y bajo un modelo aditivo, se necesitarían 37 muestras para tener un poder estadístico de 0.80. Por lo tanto, inicialmente se planteó el uso de 100 cordones para hacer los ensayos de acuerdo al genotipo de las variantes R230C e I883M de *ABCA1*.

En total se recolectaron 122 cordones, de los cuales se realizó la extracción de HUVEC y su respectivo cultivo; sin embargo, únicamente 53 cultivos fueron viables y llegaron al 100% de confluencia, por lo que fue necesario ajustar el tamaño de la muestra del estudio a 53.

4.3. Aislamiento y cultivo de células HUVEC.

Los cordones se procesaron dentro de las primeras 24 horas después de su obtención. Después de canular la vena umbilical con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril y dos conectores metálicos, se lavó con solución HEPES 1X para eliminar el exceso de sangre; el endotelio vascular se sometió a disgregación enzimática agregando de 5 a 10 mL (dependiendo del tamaño del cordón) de colagenasa al 0.02%, disuelta en HEPES 1X.

Las venas umbilicales con colagenasa se incubaron por 25 min a 37°C. Al terminar esta incubación, los cordones se frotaron con un ligero masaje para despegar las células endoteliales de la lámina basal de la vena, y posteriormente se recolectaron estas células a través de una de las jeringas conectadas en los extremos en un tubo estéril con medio M199 (Sigma-Aldrich, USA) con 10% de SFB Biowest. Las células obtenidas con la digestión enzimática se centrifugaron a 900 rpm, por 6 min. El botón celular se resuspendió en medio M199 suplementado con glutamina al 1%, 0.1 mg/mL de factor de crecimiento endotelial, 0.1 mg/mL de heparina, 20% de SFB Hyclone y una dilución al 1% de una preparación comercial de estreptomycin (100 U/mL), penicilina (100 U/mL) y anfotericina B (10 µg/L).

4.4. Extracción de ADN de HUVEC.

Se extrajo el ADN de los cultivos primarios de HUVEC obtenidos mediante el kit Genra Puregene. Una vez obtenido el ADN, se procedió a almacenar de 4 a 8 viales con un millón de HUVEC de cada cultivo para la posterior estimulación y medición de la producción de MPs.

4.5. Genotipificación de las variantes R230C e I883M.

Se genotipificaron las variantes R230C (rs9282541) e I883M (rs2066714) de *ABCA1* mediante PCR en tiempo real, utilizando sondas TaqMan, un termociclador LightCycler 480 (ROCHE) y diluciones de 10 ng/μl del ADN genómico previamente extraído. Se utilizaron tres controles positivos para cada una de las variantes analizadas y tres controles negativos.

4.6. Selección y crecimiento de los cultivos de interés

Considerando que para ambas variantes (R230C e I883M) de *ABCA1* no se obtuvieron cultivos homocigotos para el alelo raro (C230C y M883M), se seleccionaron al azar 5 cultivos diferentes con genotipo homocigoto para el alelo común R230R y 6 cultivos para I883I, así como 6 cultivos heterocigotos R230C y 5 cultivos I883M, para realizar el análisis bajo un modelo dominante. Se descongelaron los cultivos elegidos (13 en total) para los genotipos R230C e I883M.

El primer paso fue iniciar los cultivos en botella de 25 cm² para así favorecer la comunicación y el crecimiento celular; los viales se descongelaron a baño maría a 37°C y el volumen del vial se pasó a un tubo de 15 ml (Corning) que contenía 9 ml de medio al 20% de SFB Biowest y por inversión se lavaron las células. A continuación se prosiguió con la centrifugación a 900 rpm durante 6 minutos; una vez obtenido el botón, las células se sembraron en medio enriquecido M199 suplementado con glutamina al 1%, 0.15 mg/mL de factor de crecimiento endotelial, 0.1 mg/mL de heparina 20% de SFB Hyclone y esta vez se adicionó al medio una solución al 1.5% de estreptomina (100 U/mL), penicilina (100 U/mL) y anfotericina B (10 μg/L). Una vez que los cultivos llegaron a confluencia, se prosiguió con la tripsinización de las células y la consiguiente separación en dos diferentes botellas de 75 cm², las cuales se utilizarían para los dos diferentes estímulos (LDL-ox y LPS).

Los cultivos permanecieron en crecimiento hasta llegar a un 90-95% de confluencia; una vez alcanzada esta etapa, nuevamente se prosiguió con la

tripsinización de los cultivos. Esta vez se separaron en seis botellas diferentes de 75 cm², de las cuales tres botellas fueron destinadas al estímulo LDL-ox y tres a LPS.

Los cultivos permanecieron en vigilancia hasta llegar a un 80% de confluencia; en ese momento se cultivaron las células con medio libre de EVs, preparado con SFB ultracentrifugado.

4.7. Estimulación de HUVECS con LPS y LDL-ox.

Se recolectaron los sobrenadantes basales de 24 h (30 ml) de los cultivos al 80% de confluencia y se conservaron a -80°C para proceder con el estímulo.

Siguiendo el protocolo descrito por Griffin, et. al. (74), a partir de plasma humano fresco se purificó la fracción de LDL por ultracentrifugación. Las LDL-ox se prepararon mediante la exposición de LDL, a CuSO₄ 5 µM por 18 horas a 37°C (75). Las HUVEC se trataron durante 24 horas con LDL-ox a una concentración de 50 µg/ml (76).

Se utilizó LPS de *Salmonella typhimurium* (LPS, 10 µg/mL) (77) y se incubaron los cultivos por 24 horas a 37°C. Finalmente se recolectó el sobrenadante de ambos estímulos.

4.8. Estandarización del aislamiento y cuantificación de micropartículas endoteliales

Se realizó el análisis por citometría de flujo a partir de 30 ml de medio metabolizado (basal de 24 h), utilizando un citómetro CytoFLEX (BECKMAN COULTER).

De acuerdo a lo descrito (29, 78, 79) se realizó una primera centrifugación al sobrenadante para eliminar partículas muy grandes como son células y detritus celulares.

1. Centrifugación a 2,000 g durante 15 minutos.
2. El sobrenadante se decantó en tubos de policarbonato (Thickwall, BECKMAN COULTER).

Un paso importante en el aislamiento de MPs es la velocidad a la que se ultracentrifugan las muestras; estudios previos han descrito como velocidad óptima de 20,000 a 22,000 g (35, 43, 80, 81)

3. Ultracentrifugación durante 1 hora a 20,000 g a 4° C.
4. El sobrenadante se descartó y el botón obtenido se resuspendió en 1 ml de buffer fosfato salino (PBS) 1X.
5. Se tomaron 500 µl para autofluorescencia (AF).

En el análisis de EVs por citometría de flujo es importante marcar las vesículas con un colorante de membrana; CellMask™ Orange (CMO) proporciona una tinción uniforme y rápida de las membranas plasmáticas. Una estrategia que surgió para el análisis de EVs por citometría de flujo es el de teñir éstas con un colorante que fluoresce únicamente cuando se activan enzimas intravesiculares; tal es el caso de Calceína AM (acetoximetil derivado de la calceína) y el éster de diacetato acetoximetil 5-carboxifluoresceína, ya que la hidrólisis de acetoximetil por esterasas activas, provoca que la fluorescencia de carboxifluoresceína y calceína sea liberada únicamente en membranas impermeables.

Se tiñó la muestra con diferentes concentraciones de calceína AM (CAM) y Cell Mask Orange (CMO) para determinar la concentración óptima de estos marcadores.

- a. 10X CAM + 1X de CMO
- b. 15X CAM + 0.5X de CMO
- c. 20X CAM+ 0.25X de CMO

*Las muestras se incubaron durante 1 hora a 37°C.

6. Se completó el volumen de todos los tubos (incluida la AF) con aproximadamente 25 ml de PBS 1X y se ultracentrifugaron nuevamente, esta vez a 100,000 g durante 1 h.
7. El sobrenadante se descartó y el botón obtenido se resuspendió en 500 µl de PBS 1X; finalmente se realizaron las lecturas en el citómetro.

En este punto se determinó que la concentración óptima de CMO era de 1X; para determinar la concentración adecuada de CAM se realizó el mismo proceso, utilizando diferentes concentraciones de CAM.

Procedimiento:

1. Centrifugación a 2,000 g durante 15 minutos.
2. El sobrenadante se decantó en tubos de policarbonato (Thickwall, BECKMAN COULTER).
3. Ultracentrifugación durante 1 hora a 20,000 g a 4° C.
4. El sobrenadante se descartó y el botón obtenido se resuspendió en 1 ml de PBS 1X.
5. Se tomaron 500 µl para AF
6. Se tiñó la muestra con las siguientes concentraciones:
 - a. 20X CAM + 1X CMO
 - b. 40X CAM + 1X CMO

*Las muestras se incubaron durante 1 hora a 37°C.

7. Se completó el volumen de los tubos con aproximadamente 25ml de PBS 1X y se ultracentrifugaron nuevamente, esta vez a 100,000 g durante 1 h.
8. El sobrenadante se descartó y el botón obtenido se resuspendió en 500µl de PBS 1X; finalmente se realizaron las lecturas en el citómetro.

En esta etapa se determinó que la concentración adecuada de CAM era de 40X quedando como concentraciones a utilizar de CAM 40X y 1X de CMO.

4.9. Titulación de anticuerpos

La titulación de anticuerpos es un procedimiento diseñado para determinar la concentración de anticuerpo apropiada para emplear en técnicas de inmunofenotipificación. Se ha descrito que la mejor concentración de anticuerpo es aquella que permite discriminar mejor entre una célula positiva y una célula negativa.

Para este proceso se eligieron los siguientes anticuerpos: CD31 (anti molécula de adhesión a plaquetas y endotelio (PECAM-1); Pacific Blue anti-human CD31, BioLegend ®), CD144 (anti-Vascular Endothelial (VE) Cadherin, APC,

Abcam®), CD146 (anti-molécula de adhesión celular de melanoma (MCAM), Abcam®, como anticuerpo primario y su anticuerpo secundario anti-ratón IgG, Abcam®, acoplado al fluoróforo Alexa 488); anti-Anexina V (acoplado al fluoróforo FITC, Abcam®) y CD62E (anti-Selectina E, acoplado al fluoróforo PE, Abcam®), ya que estos anticuerpos reconocen moléculas que se expresan en células endoteliales.

El procedimiento general fue el siguiente:

1. Tripsinizar las células, tomar una alícuota y cuantificar el número total.
2. Centrifugar a 1500 rpm durante 5 min.
3. Resuspender el botón en 500 µl de PBS 1X.
4. Preparar 4 alícuotas con aproximadamente 250,000 células en cada una.
5. Teñir cada tubo (excepto la AF) con la concentración recomendada por el fabricante, así como diluciones 1:2 y 1:5 de cada uno.
6. Incubar durante 15 min a temperatura ambiente en total oscuridad.
7. Lavar con 1 ml de PBS 1X.
8. Centrifugar a 1500 rpm durante 5 min.
9. Descartar el sobrenadante y resuspender en 300 µl de PBS 1X.
10. Leer en el citómetro.

4.10. Aislamiento y cuantificación de micropartículas endoteliales en estado basal y con los estímulos LPS y LDL-ox.

A partir de 30 ml de sobrenadante en estado basal de las células, así como del sobrenadante del estímulo LDL- ox y LPS se siguió el protocolo siguiente:

1. Centrifugar las muestras a 2,000 g durante 15 minutos.
2. Decantar el sobrenadante en tubos de policarbonato (Thickwall, BECKMAN COULTER), designando un tubo de AF para cada condición (5 ml de sobrenadante) y el otro tubo se marca con los anticuerpos (25 ml de sobrenadante).

3. Ultracentrifugar durante 1 hora a 20,000 g a 4° C.
4. Decantar el sobrenadante y el botón obtenido se resuspende en 200 µl de PBS 1X.
5. Teñir las muestra con calceína AM [40X] y Cell mask orange [1X] e incubar durante 1 hora a 37°C.
6. Completar el volumen de los tubos con aproximadamente 25 ml de PBS 1X y ultracentrifugar nuevamente, esta vez a 100,000 g durante 1 h.
7. El sobrenadante se descarta y el botón obtenido se resuspende en 200 µl de PBS 1X; finalmente se realizan las lecturas en el citómetro.

Los resultados dados por el citómetro se analizaron en el programa CytExpert. Utilizando un algoritmo de análisis de datos, se generaron gráficas de puntos conocidas como “dots plots”, en las cuales se proyectan las señales de pico y área del parámetro de tamaño (Dispersión frontal - altura (FSC-H) y dispersión frontal - área (FSC-A)) respectivamente, para seleccionar únicamente las EMPs analizadas individualmente. De acuerdo a las características de tamaño (FSC-A) y complejidad (Dispersión lateral - área (SSC-A)), se seleccionó la subpoblación conocida como “*gate*” correspondiente a EMPs por tamaño; ya identificada la región de interés, se seleccionaron las MPs fluorescentes a ficoeritrina (PE) e Isotiocianato de fluoresceína (FITC). Este algoritmo se aplicó a las tres condiciones analizadas: sobrenadante basal, con estímulo LPS y finalmente con LDL-ox.

5. RESULTADOS

5.1. Genotipificación de la variante R230C

Se determinó el genotipo del 100% de las muestras, mediante PCR en tiempo real, utilizando sondas Taqman. Se colocó un control positivo para cada homocigoto: C230C (en verde) y R230R (en azul), así como un control positivo para el heterocigoto R230C (en rojo) y tres controles negativos (en gris) (Figura 8). El análisis de discriminación alélica en 53 cultivos celulares reveló que 39 muestras fueron homocigotos para el alelo común (R230R), 14 muestras fueron heterocigotos R230C, y no se obtuvo ninguna muestra homocigota C230C, obteniendo así una frecuencia alélica del alelo raro (T; 230C) de 13.2%. La variante R230C no presentó desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg ($P=0.268$).

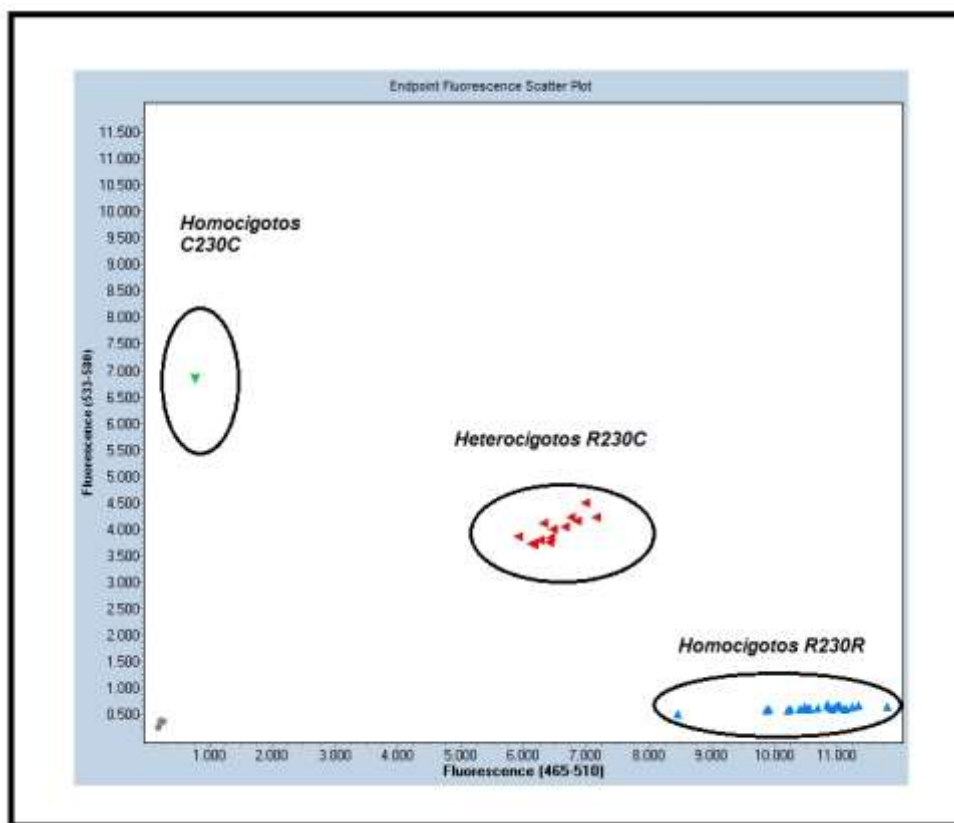


Figura 8.- Genotipificación de la variante R230C del gen ABCA1 por PCR en tiempo real, utilizando sondas TaqMan. La sonda complementaria al alelo T (230C) está marcada con el fluoróforo VIC, cuya fluorescencia se grafica en el eje de las "Y". La sonda complementaria al alelo "R" está marcada con el fluoróforo FAM, cuya fluorescencia se grafica en el eje de las "X". Cada punto representa una muestra. Los homocigotos R230R aparecen como un punto azul (fluorescencia VIC), los homocigotos C230C como un punto verde (fluorescencia FAM), y los heterocigotos R230C que emiten ambos tipos de fluorescencia aparecen como un punto rojo. Los cuadros grises representan controles negativos.

5.2. Genotipificación de la variante I883M

Para la variante I883M fue posible genotipificar el 100% de las muestras (Figura 9). El análisis de discriminación alélica en 53 cultivos celulares reveló que 31 muestras fueron homocigotos para el alelo común (I883I), 21 muestras son heterocigotos I883M y solo encontramos un homocigoto M883M, obteniendo así una frecuencia alélica del alelo raro (G; 883M) de 21.7%. La variante I883M no presentó desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg ($P= 0.227$).

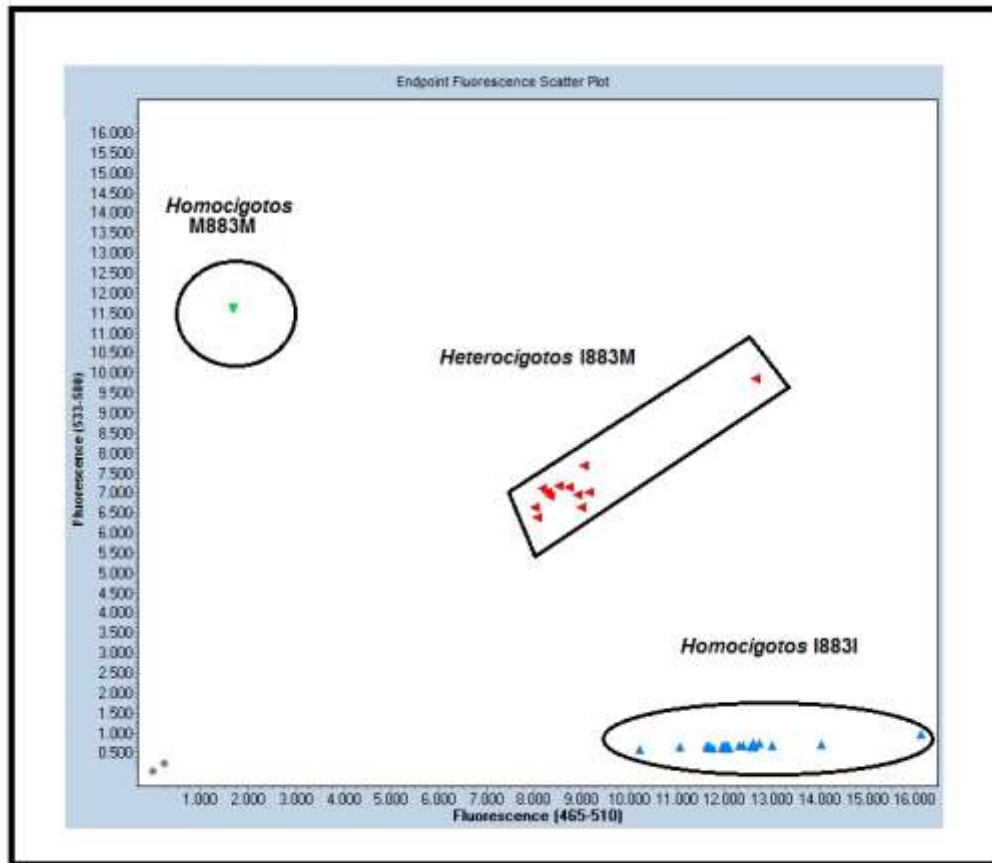


Figura 9.- Genotipificación de la variante I883M del gen *ABCA1* por PCR en tiempo real, utilizando sondas TaqMan. La sonda complementaria al alelo “M” están marcada con el fluoróforo VIC, cuya fluorescencia se grafica en el eje de las “Y”. La sonda complementaria al alelo “I” está marcada con el fluoróforo FAM, cuya fluorescencia se grafica en el eje de las “X”. Cada punto representa una muestra. Los homocigotos I883I aparecen como un punto azul (fluorescencia VIC), los homocigotos M883M como un punto verde (fluorescencia FAM), y los heterocigotos I883M que emiten ambos tipos de fluorescencia aparecen como un punto rojo. Los cuadros grises representan controles negativos.

5.3. Estandarización del aislamiento y caracterización de micropartículas endoteliales

El proceso de aislamiento de EMPs, así como de la tinción con los marcadores CMO y CAM y su respectivo análisis de datos en el citómetro de flujo con el programa CytExpert se realizó siguiendo el protocolo y algoritmo descrito en la sección de metodología.

El mejor porcentaje de eventos positivos a CMO y CAM de las EMPs fue obtenido a una concentración de 1X y 0.4 mM, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1.-Porcentaje de eventos positivos de EMPs a diferentes concentraciones de CMO y CAM.

Tinción (concentraciones)		% de eventos positivos para CMO	% de eventos positivos para CAM
CMO	CAM		
1X	0.2 mM	98.05	7.29
0.25 X	0.4 mM	97.75	87.40

Se observó un patrón bien definido correspondiente a las EMPs en los “*dot plot*” correspondientes a CAM 0.4 mM y CMO 1X (Figura 10B y 10C). Esto nos ayudó a determinar las concentraciones adecuadas de los marcadores CMO y CAM, respectivamente, y de este modo se pudo continuar con la identificación y caracterización de las EMPs en las tres diferentes condiciones: basal, estímulos LPS y LDL-ox.

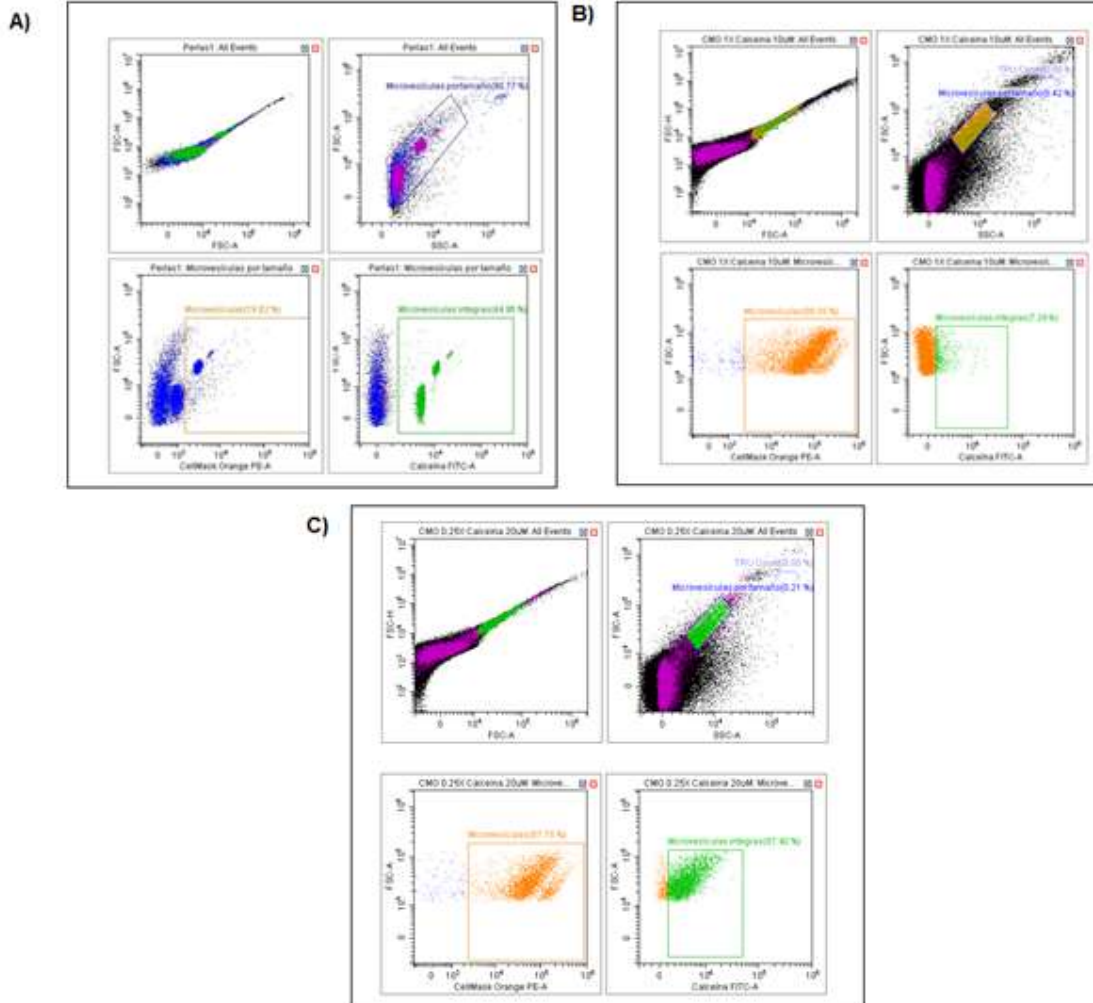


Figura 10.- Algoritmo para la identificación y caracterización de micropartículas de células endoteliales. (A) Empleando perlas de calibración Megamix, se seleccionó la región de tamaño (FSC-A) y complejidad (SSC-A) correspondiente a las perlas de 0.5 µm, 0.9 µm y 3 µm que presentan fluorescencia para FITC; esta región se denominó “Micropartículas por tamaño”. Una vez identificada la región de micropartículas, éstas fueron marcadas con CMO 1X y 0.2 mM de CAM (B) y CAM a 0.4 mM y CMO 0.25 X (C).

5.4. Titulación de anticuerpos

Al comprobar que podíamos identificar las EMPs CMO positivas y con actividad esterasa positiva (CAM +), decidimos utilizar anticuerpos que nos ayudaran a demostrar que estas MPs eran de origen endotelial.

Se titularon los anticuerpos con el procedimiento antes mencionado en la sección de metodología, en cultivos primarios de HUVEC, empleando la concentración recomendada por el fabricante, así como diluciones 1:2 y 1:5 de cada uno.

Con una concentración de 0.0625 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, la media de fluorescencia correspondiente a APC (CD144) disminuye más del 20% (Tabla 2); sin embargo, se observa una población positiva que se separa de la negativa y su posición sobre los ejes en las gráficas de dispersión permite identificar los límites de la población de manera clara (Figura 11), por lo cual dicha concentración puede ser empleada para la identificación de la población.

Tabla 2.- Titulación de anticuerpo CD144

Ac	Volumen (μl)	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Media de fluorescencia de APC
CD144	5	0.125	16675.5
	2.5	0.062	9379.9
	1	0.025	6911.1

Con respecto al anticuerpo CD31, a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, la media de fluorescencia correspondiente a APC no disminuye más del 20% respecto a la concentración de 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ recomendada (Tabla 3), por lo cual dicha concentración puede ser empleada para la identificación de la población. Se observa una población positiva que se separa de la negativa y su posición sobre los ejes en las gráficas de dispersión permite identificar los límites de la población de manera clara (Figura 12).

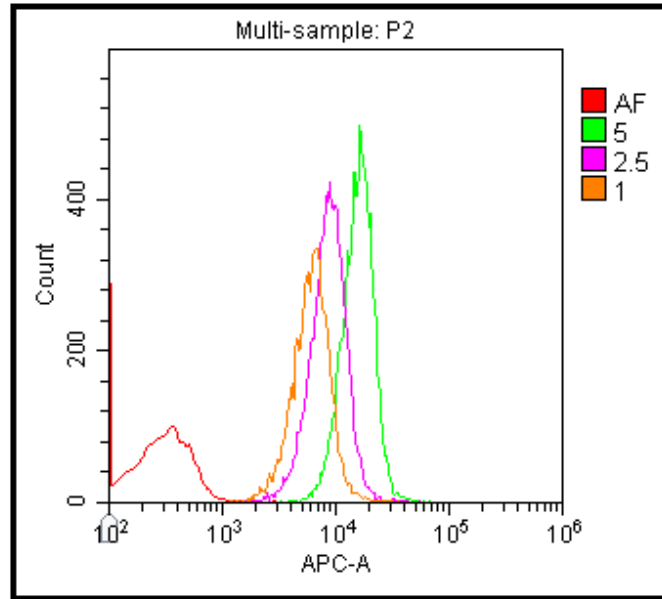
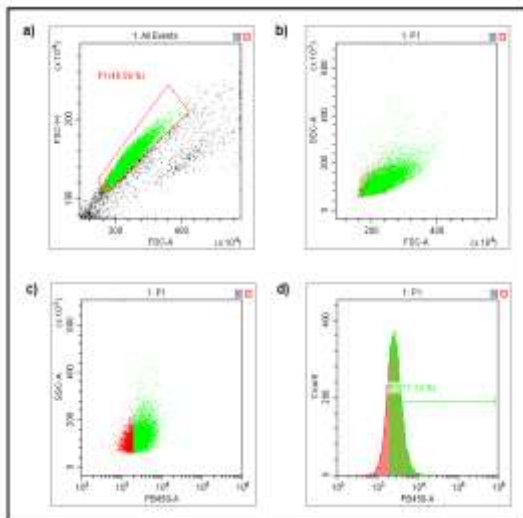


Figura 11.- Histograma representativo de las medias de autofluorescencia para las diferentes concentraciones del anticuerpo CD144.

■ AF, ■ 0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, ■ 0.062 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y ■ 0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Figura 12.- Estrategia de análisis para la identificación de la concentración adecuada de anticuerpo CD31 con HUVEC.



Se proyectan en una gráfica de puntos las señales de pico y área del parámetro de tamaño (FSC-H y FSC-A) respectivamente, para seleccionar únicamente las células analizadas individualmente (a). Se seleccionó la región de tamaño (FSC-A) y complejidad (SSC-A) correspondiente al grupo de células completas y potencialmente viables (b). Se eligieron las células positivas al fluorocromo azul pacífico (PB) (c) y finalmente se analizó la media de fluorescencia de PB (d).

Tabla 3.- Titulación de anticuerpo CD31

Ac	Volumen (µl)	Concentración (µg/µl)	Media de fluorescencia de PB
CD31	4	2.0	3819.5
	2	1.0	3671.2
	1	0.5	3427.1

El anticuerpo anti-CD146 (Anti-MCAM, Abcam®) es un anticuerpo primario, por lo que fue necesario utilizar un anticuerpo secundario anti-ratón IgG, Abcam®, acoplado al fluoróforo Alexa 488. Con una concentración de 1.0 µg/µl se obtuvo la mejor media de fluorescencia correspondiente a Alexa 488 (Tabla 4, Figura 13), por lo cual dicha concentración puede ser empleada para la identificación de la población.

Tabla 4.- Titulación de anticuerpo CD146

Ac	Volumen (µl) Primario	Concentración (µg/µl) Primario	Concentración (µg/µl) Secundario	Media de fluorescencia de Alexa 488
CD146	2	1.0	1:1000	214992.5
	1	0.5	1:1000	191723.8
	0.5	0.25	1:1000	191544.4

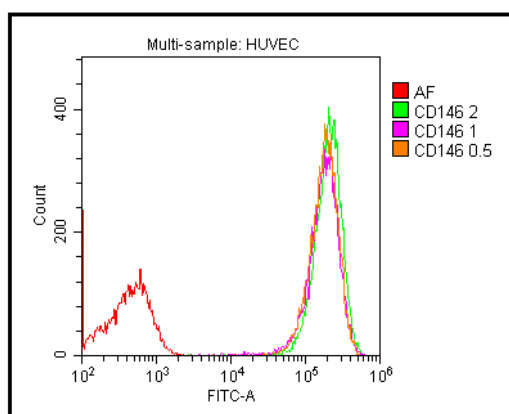


Figura 13.- Histograma representativo de las medias de autofluorescencia para las diferentes concentraciones del anticuerpo CD146.

— AF, — 1.0 µg/µl, — 0.5 µg/µl y — 0.25 µg/µl.

En los anticuerpos anti-anexina V y anti-CD62E, se utilizó el volumen recomendado por el fabricante y dos diluciones (1:2 y 1:5) (Tabla 5); debido a que las medias de fluorescencia de las diluciones se alejaban de la media recomendada para estos anticuerpos, se utilizó finalmente el volumen recomendado (Figura 14).

Tabla 5.- Anticuerpos anti-Anexina V y anti-CD62E.

Ac	Volumen (µl)	Media de fluorescencia del fluorocromo
Anexina V	2.5	785
	1	468.5
	0.5	426
CD62E	2.5	1296.9
	1	690.5
	0.5	491.4

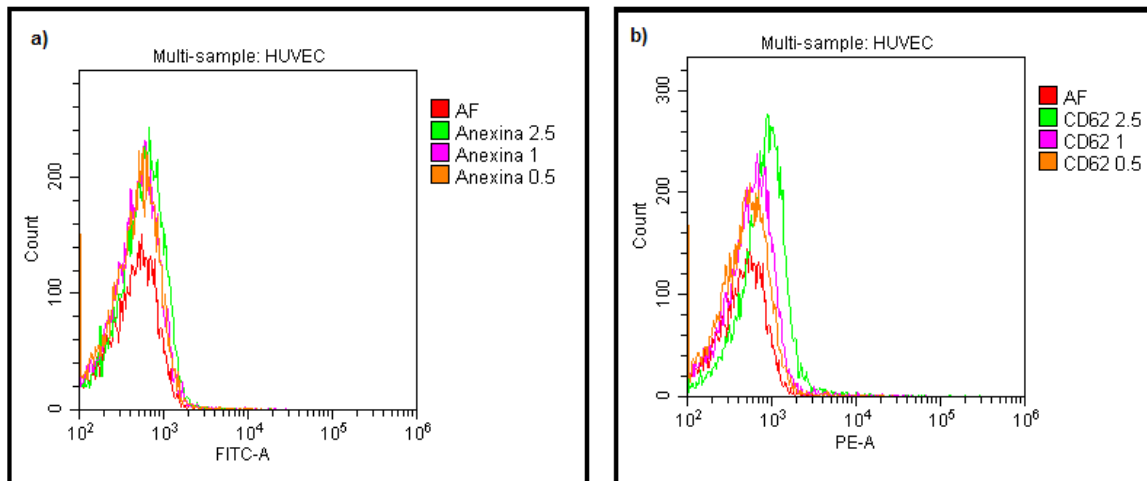


Figura 14.-Histograma representativo de las medias de autofluorescencia para las diferentes concentraciones de los anticuerpos Anexina V (a) y CD62E (b).

■ AF, ■ 2.5 µl, ■ 1.0 µl y ■ 0.5 µl.

5.5. EMPs marcadas con CAM, CMO y CD31

Se siguió el mismo protocolo descrito anteriormente para aislar las EMPs de sobrenadante basal; se marcaron las EMPs con CMO 1X, CAM 0.4 mM y CD31 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ obteniendo los porcentajes de positividad incluidos en la Tabla 6.

Tabla 6.- Porcentaje de eventos positivos para CMO, CAM y CD31

Tinción (concentraciones)			% de eventos positivos para CMO	% de eventos positivos para CAM	% de eventos positivos para CD31
CMO	CAM	CD31			
1X	0.4mM	0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	98.73	19.86	0.72

Utilizando un algoritmo de análisis de datos en gráficas “*dots plots*”, se proyectan en una gráfica de puntos las señales de pico y área del parámetro de tamaño (FSC-H y FSC-A) (Figura 15a), respectivamente. De acuerdo a las características de tamaño (FSC-A) y complejidad (SSC-A), se seleccionó la población conocida como “*gate*” correspondiente a EMPs por tamaño (Figura 15b); ya identificada la región de interés, se seleccionaron las EMPs fluorescentes a PE (Figura 15c), FITC (Figura 15d) y finalmente a PB, en la cual se puede observar una positividad baja a este fluorocromo (Figura 15e).

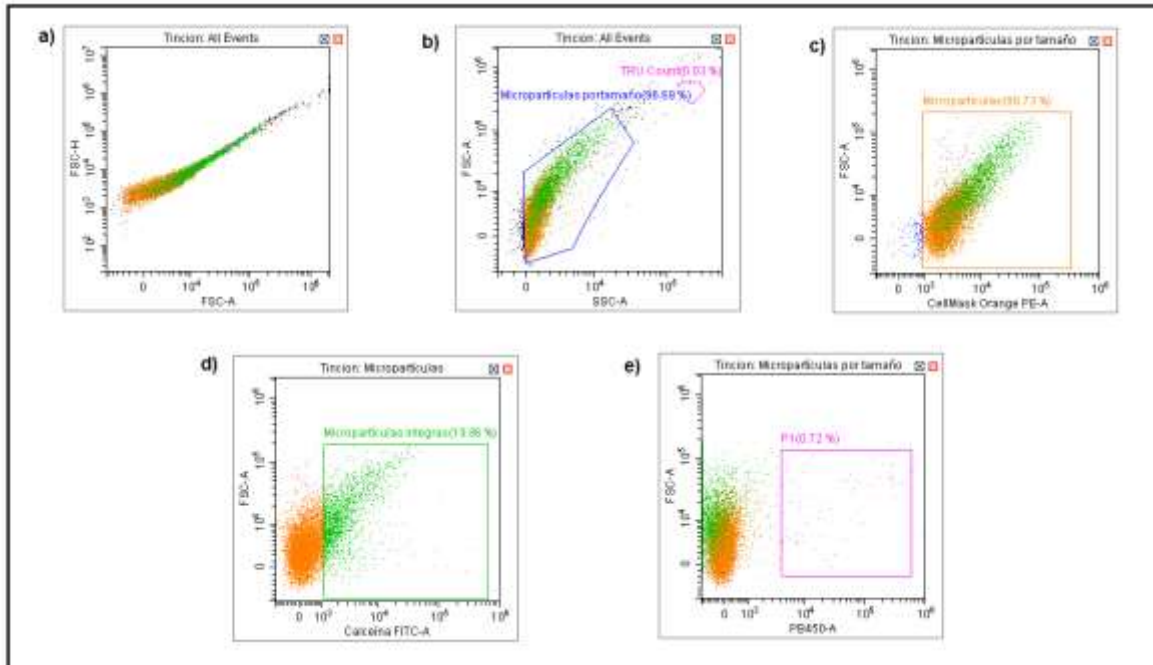


Figura 15.- Estrategia de análisis para la caracterización de MPs endoteliales. Se proyectan en una gráfica de puntos las señales de pico y área del parámetro de tamaño (FSC-H y FSC-A) respectivamente, para seleccionar únicamente las EMPs analizadas individualmente (a); se seleccionó la región de tamaño (FSC-A) y complejidad (SSC-A) correspondiente al grupo EMPs por tamaño (b); se eligieron las EMPs positivas al fluorocromo PE (c), FITC (d) y PB (e).

El mismo procedimiento se realizó con el anticuerpo anti-CD144, para el cual tampoco logramos observar positividad en las EMPs.

5.6. Caracterización fenotípica de HUVEC

Con estos resultados decidimos caracterizar de manera fenotípica las células HUVEC con las que se realizó el trabajo, utilizando los anticuerpos reportados en el apartado de metodología y así garantizar que el origen de las MPs liberadas por estos cultivos es endotelial.

Las células se marcaron con CMO 1X, con CAM 0.4 mM, con anti-CD31 acoplado al fluorocromo PB, anti-CD144 acoplado con alofococianina (APC), CD146 (anticuerpo primario y su anticuerpo secundario anti-ratón IgG, acoplado al fluoróforo Alexa 488), así como anti-Anexina V acoplado a FITC (Figura 16). Utilizando un algoritmo de análisis de datos reportado en la sección de métodos, se proyectó en una gráfica de puntos las señales de pico y área del parámetro de

tamaño (FSC-H y FSC-A) respectivamente, para seleccionar únicamente las células analizadas individualmente (Figura 16a).

De acuerdo a las características de tamaño (FSC-A) y complejidad (SSC-A) se creó el *gate* correspondiente a las células (Figura 16b); ya identificada la región de interés, se seleccionaron las células fluorescentes a FITC (Figura 16c), PE (Figura 16d), a PB (Figura 16e), y finalmente a APC (Figura 16f). Se puede observar que las HUVEC presentaron positividad a los cuatro diferentes fluorocromos, confirmandonos que nuestras células son endoteliales.

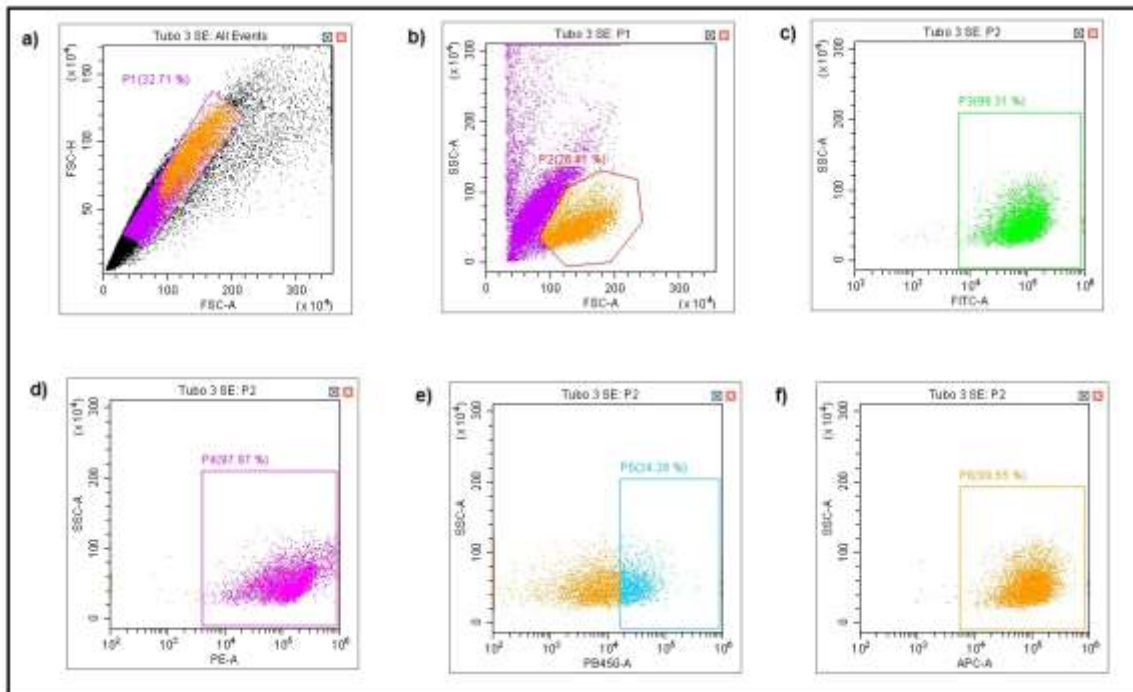


Figura 16.- Estrategia de análisis para la caracterización de HUVEC. Se proyectan en una gráfica de puntos las señales de pico y área del parámetro de tamaño (FCS-H y FCSA) respectivamente, para seleccionar únicamente las células analizadas individualmente (a); se seleccionó la región de tamaño (FSC-A) y complejidad (SSC-A) correspondiente al grupo de células vivas (b); se eligieron las EMPs positivas al fluorocromo FITC (c), PE (d), PB (e) y APC (f).

Como se mencionó en la sección de metodología, se seleccionaron al azar 5 cultivos diferentes con genotipo homocigoto para el alelo común R230R, 6 cultivos homocigotos I883I, 6 cultivos heterocigotos R230C y 5 cultivos heterocigotos I883M, para realizar el análisis bajo un modelo dominante. Se

descongelaron los cultivos elegidos (13 en total) para los genotipos R230C e I883M.

5.7. Obtención y caracterización de micropartículas endoteliales provenientes de sobrenadantes de cultivos en estado basal y después de 24 hrs de tratamiento con LPS y LDL-ox.

El proceso de aislamiento de EMPs derivadas de sobrenadantes con LPS y LDL-ox se realizó siguiendo el procedimiento reportado en la sección metodología; una vez terminado el protocolo de tinción con los marcadores CMO y CAM, se prosiguió a analizar los datos.

Los resultados dados por el citómetro se analizaron en el programa CytExpert utilizando el algoritmo de análisis de datos reportado en la sección de metodología. Los porcentajes de eventos positivos obtenidos por genotipo y su diferente condición se muestran en la Tabla 7. En las figuras 17, 18 y 19 se presentan los resultados correspondientes a cultivos con genotipos R230R/I883I y R230C de la variante R230C, e I883M heterocigoto de la variante I883M, respectivamente.

Tabla 7.- Porcentaje de eventos positivos para CMO y CAM por genotipo

Genotipo	Condición	% de eventos positivos para CMO	% de eventos positivos para CAM
R230R/I883I	BASAL	39.30	71.84
	LPS	13.57	51.08
	LDL-ox	60.48	77.71
R230C	BASAL	48.57	64.36
	LPS	13.09	53.79
	LDL-ox	55.07	62.61
I883M	BASAL	36.58	63.50
	LPS	40.04	77.17
	LDL-ox	52.10	62.40

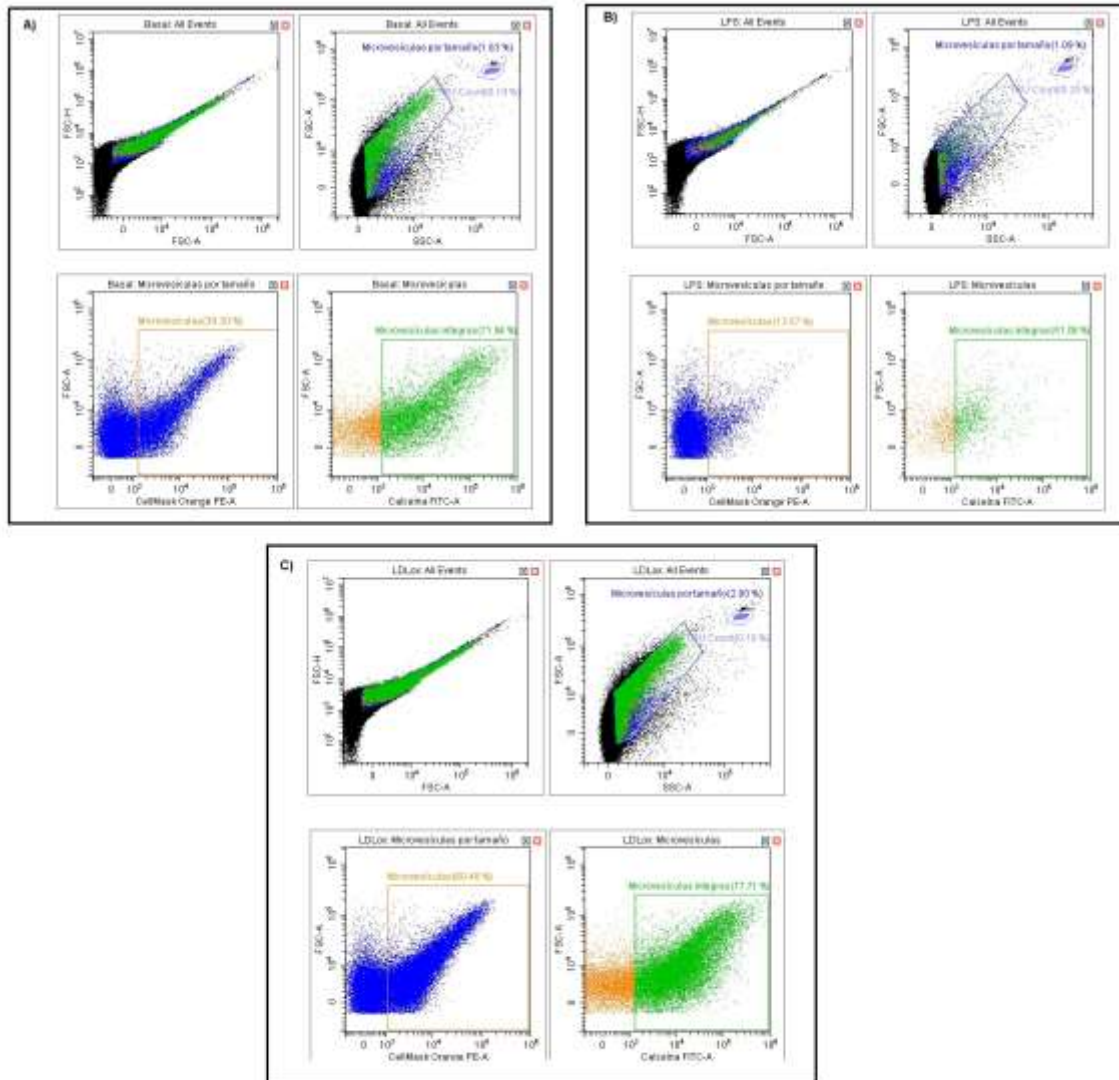


Figura 17.- Algoritmo para la identificación y caracterización de micropartículas en sobrenadantes de células endoteliales con genotipo R230R/I883I para las variantes R230C e I883M de ABCA1. Se seleccionó la región de tamaño (FSC-A) y complejidad (SSC-A) correspondiente al grupo de EMPs; dentro de esta región se escogieron las EMPs con fluorescencia positiva para PE; partiendo de este *gate* se eligieron las EMPs positivas a FITC para la condición basal (A); dicho algoritmo se aplicó a sobrenadantes con estímulo LPS (B) y a sobrenadantes con estímulo LDL-ox (C).

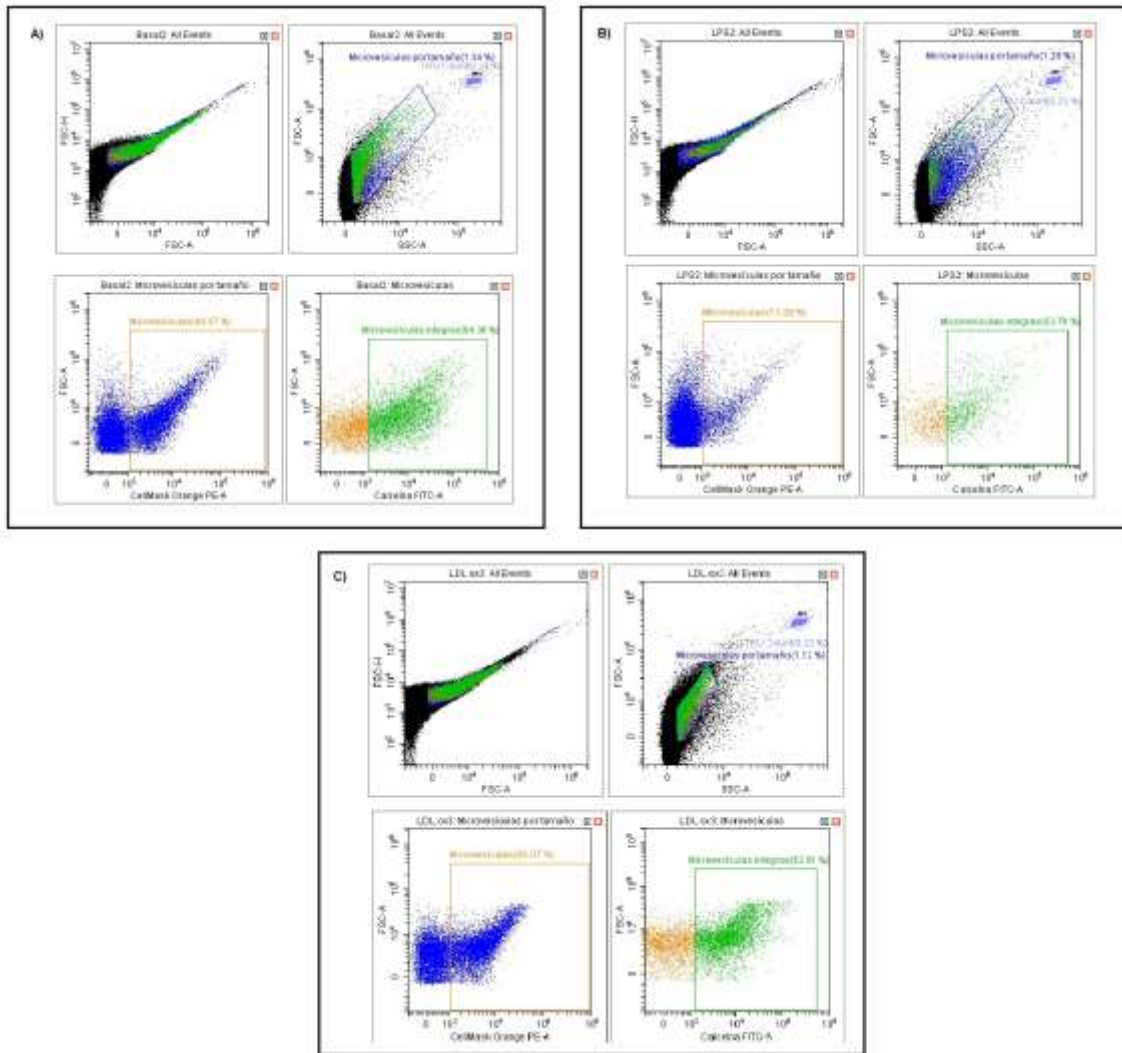


Figura 18.- Algoritmo para la identificación y caracterización de micropartículas en sobrenadantes de células endoteliales con genotipo heterocigoto para la variante R230C de ABCA1. Se seleccionó la región de tamaño (FSC-A) y complejidad (SSC-A) correspondiente al grupo de EMPs; dentro de esta región se escogieron las EMPs con fluorescencia positiva para PE; partiendo de este *gate* se eligieron las EMPs positivas a FITC para la condición basal (A); dicho algoritmo se aplicó a sobrenadantes con estímulo LPS (B) y a sobrenadantes con estímulo LDL-ox (C).

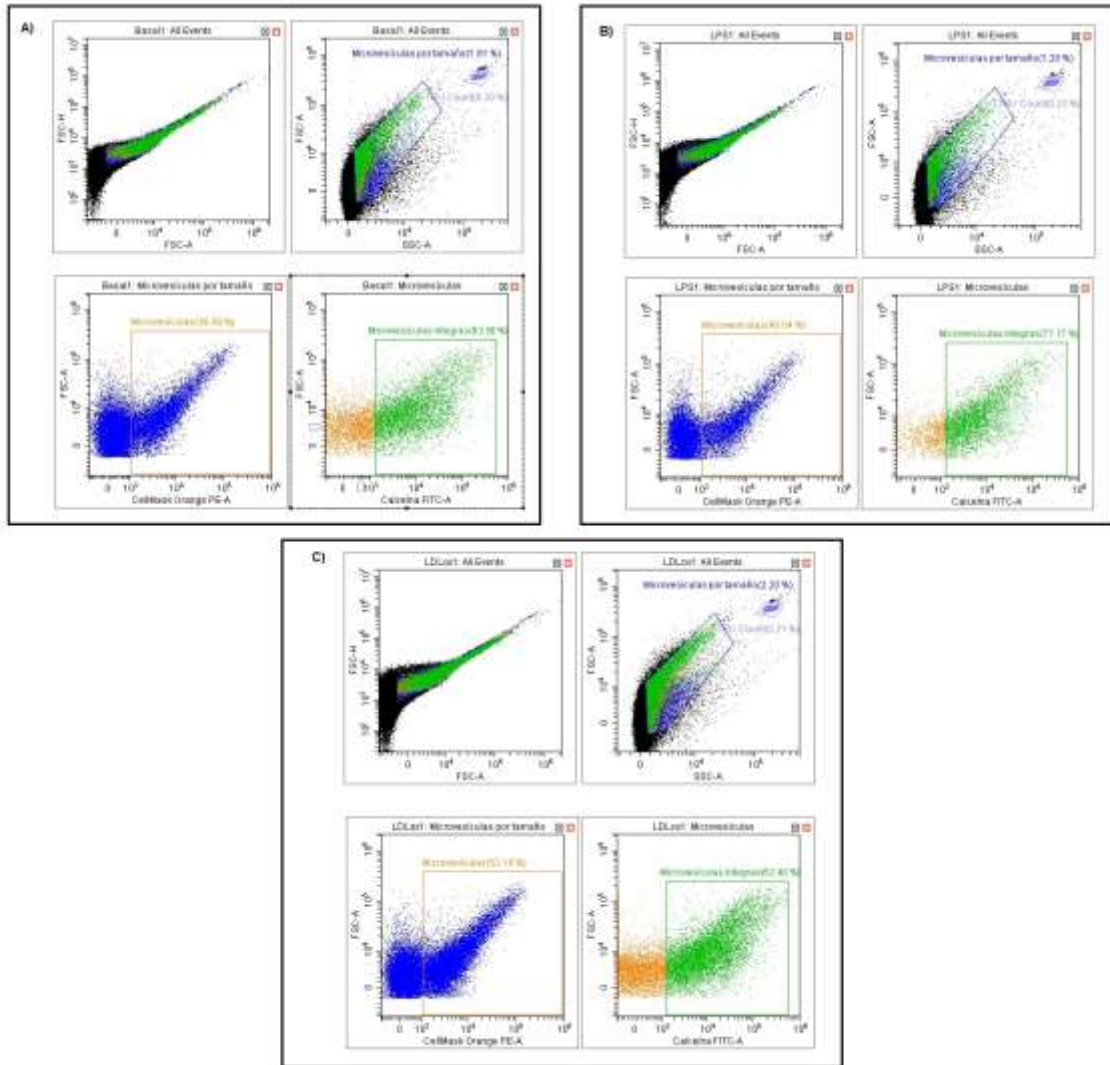


Figura 19.- Algoritmo para la identificación y caracterización de micropartículas en sobrenadantes de células endoteliales con genotipo heterocigoto para la variante I883M de ABCA1. Se seleccionó la región de tamaño (FSC-A) y complejidad (SSC-A) correspondiente al grupo de EMPs; dentro de esta región se escogieron las EMPs con fluorescencia positiva para PE; partiendo de este *gate* se eligió las EMPs positivas a FITC para la condición basal (A); dicho algoritmo se aplicó a sobrenadantes con estímulo LPS (B) y a sobrenadantes con estímulo LDL-ox (C).

5.8. Cálculo del número de EMPs

No existen protocolos de cómo realizar la cuantificación de EVs, por lo que es un reto calcular de manera exacta el número de EMPs que obtuvimos en los sobrenadantes; sin embargo, podemos apoyarnos de herramientas ya existentes. Un ejemplo de ello son los tubos Trucount™ BD; estos tubos son utilizados para determinar los conteos absolutos de leucocitos en sangre y los podemos aplicar a nuestro estudio, ya que contienen un botón (*pellet*) liofilizado, el cual se disuelve y libera un número conocido de perlas fluorescentes.

Para el análisis de EVs, modificamos la fórmula incluida en el inserto de los tubos Trucount para obtener el número absoluto de EMPs (EMPs/ml); esto se determina comparando eventos positivos a CMO de las EMPs con los eventos de las perlas contenidas en los tubos trucount. Los resultados de estos cálculos se muestran en la Tabla 8.

$$X = \left[\frac{\# \text{ de eventos positivos CMO}}{\# \text{ de eventos trucounts}} \times \left(\frac{\# \text{ microesferas}}{100\mu\text{l}} \right) \right]$$

$$\# \text{ vesículas / ml} = \frac{X (1/\mu\text{l}) \times \text{volumen resuspendio } (\mu\text{l})}{\text{volumen total (ml)}}$$

Tabla 8.- Producción de vesículas de los cultivos seleccionados por genotipo en estado basal y después de 24hrs de tratamiento con LPS y LDL-ox.

Genotipo	Número de vesículas		
	Basal	LPS	LDL-OX
R230R/I883I	12,828.65	71,595.80	87,877.11
	8,560.43	7,190.16	17,029.41
	14,459.78	2,776.52	36,214.68
	4,329.69	10,906.68	23,622.89
	50,212.71	65,963.30	119,075.46
R230C	10,854.21	13,857.11	9,355.01
	10,332.49	2,851.48	10,680.30
	3,251.94	7,344.69	5,652.26
R230C/I883M	1,521.69	1,835.02	18,590.08
	6,731.41	21,537.51	19,675.50
	7,197.66	2,664.08	19,447.62
I883M	12,506.33	7,891.79	20,739.93
	92,044.02	25,373.46	33,015.54

5.9. Comparación del número de EMPs

Se comparó el número total de EMPs liberadas por los 13 cultivos durante el estímulo con LPS y LDL-ox respecto al estado basal con la prueba U de Mann-Whitney. Interesantemente se encontró diferencia significativa entre la producción total de EMPs con el estímulo de LDL-ox con respecto al estado basal ($P=0.022$); para el caso del estímulo LPS respecto al basal, no hay cambio significativo en la producción de EMPs totales (Figura 20).

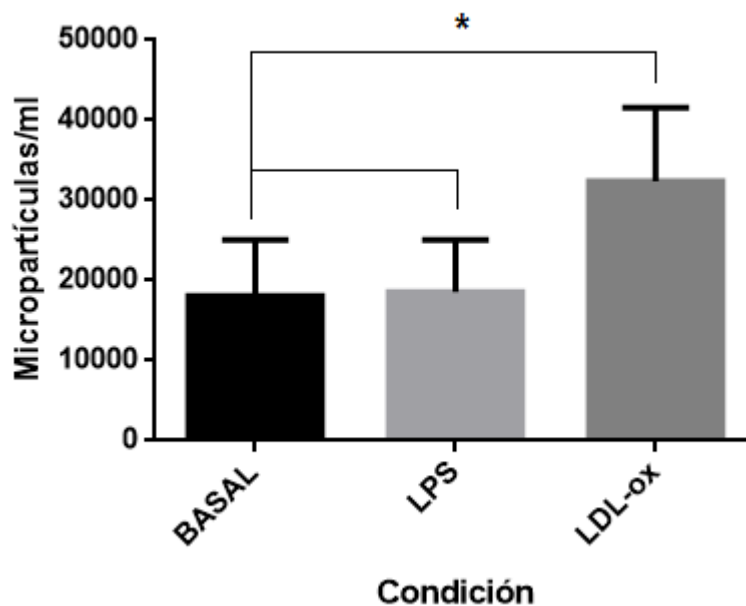


Figura 20.- Producción total de EMPs en sobrenadantes de cultivos de HUVEC en estado basal y en cultivos estimulados con LPS y LDL-ox. Las barras representan medias \pm error estándar (EE); $n=13$ para cada grupo; $*P<0.05$.

Se analizó la producción de EMPs en cultivos portadores de las variantes R230C e I883M. Utilizando la prueba U de Mann-Whitney, se compararon los sobrenadantes con genotipo R230R basales vs genotipo R230C basales, así como los sobrenadantes de genotipo R230R estimulados con LPS vs los sobrenadantes con genotipo R230C estimulados con LPS y finalmente los R230R estimulados con LDL-ox vs R230C con el mismo estímulo (Figura 21A). Encontramos que el genotipo heterocigoto R230C disminuye la producción de EMPs en los tres casos (Basal, LPS y LDL-ox); sin embargo, solo en estado basal ($P=0.035$) y al estimular las células con LDL-ox, esta disminución es significativa ($P=0.008$) (Figura 21A).

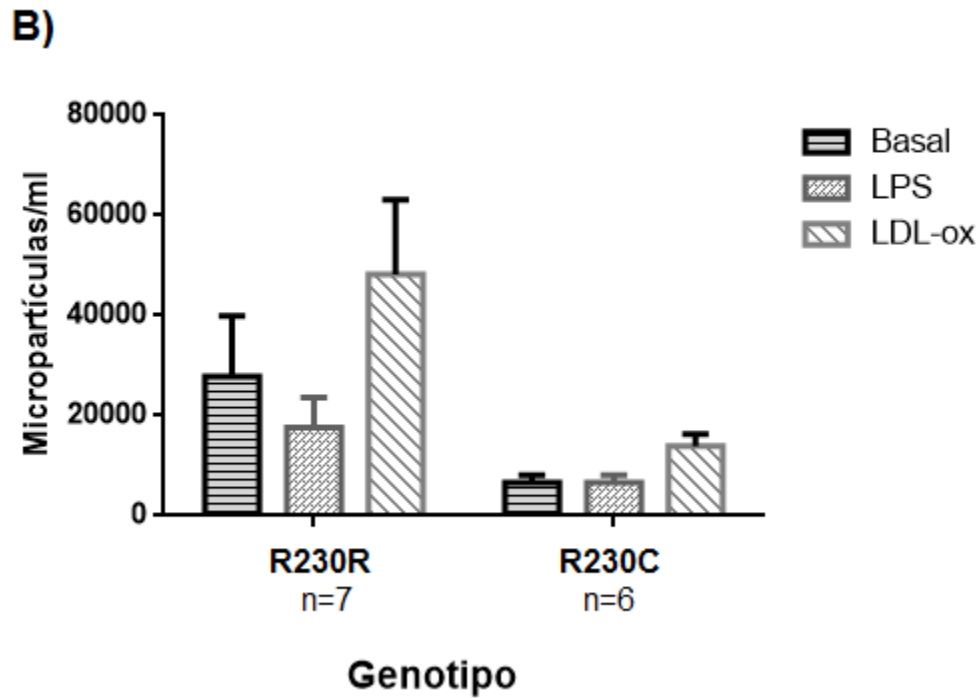
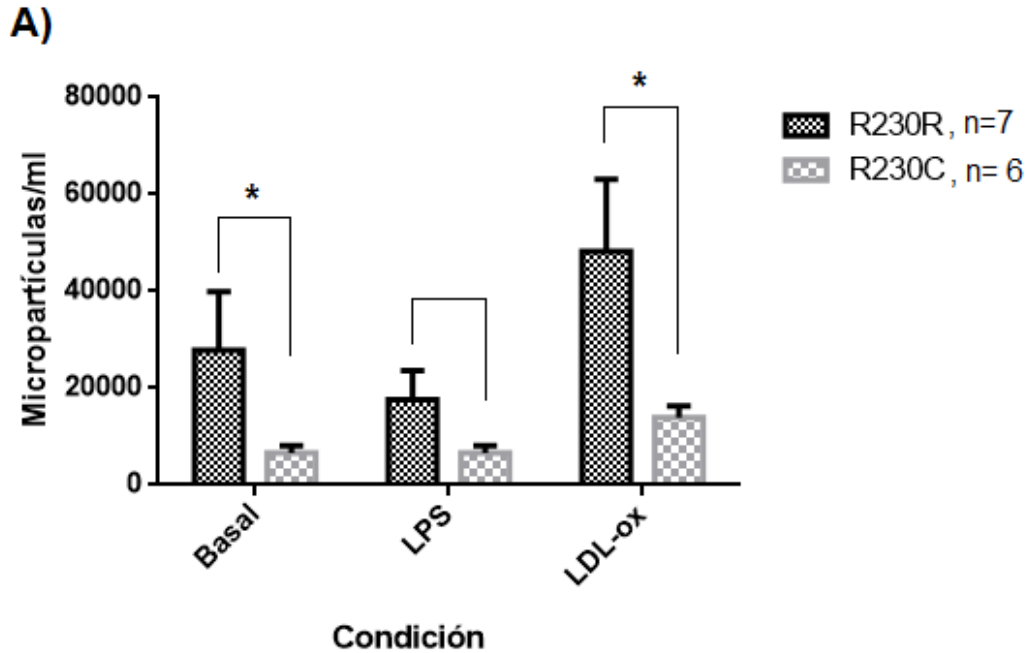
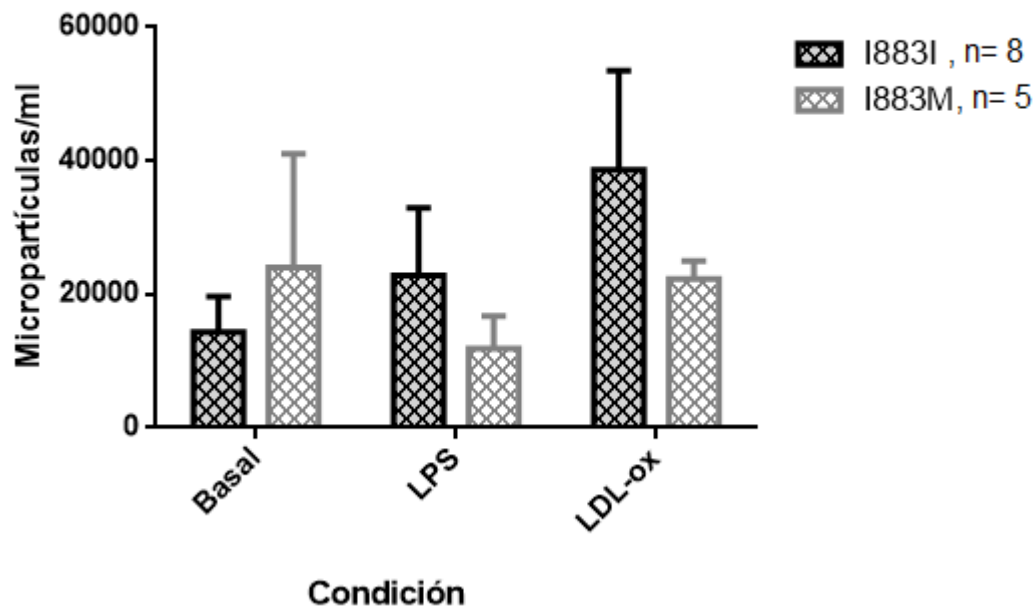


Figura 21.- Producción de EMPs en los cultivos de acuerdo al genotipo de la variante R230C de ABCA1 y a los estímulos. A) Comparación del número de EMPs liberadas por cultivos con distinto genotipo de la variante R230C de ABCA1 bajo las diferentes condiciones. B) Comparación del número de EMPs producidas por cultivos con genotipo R230R o R230C en estado basal y con los estímulos de LPS y LDL-ox. Las barras representan medias \pm EE; * $P < 0.05$.

Con el objetivo de analizar si existen diferencias en el número de EMPs producidas por cultivos con un genotipo determinado (R230R ó R230C) bajo las distintas condiciones a los que fueron sometidos, se aplicó una prueba U de Mann-Whitney. No se encontró diferencia significativa con los diferentes estímulos para los cultivos con genotipo R230R: basal vs LPS ($P = 0.710$) y basal vs LDL-ox ($P = 0.097$) o para los cultivos con genotipo R230C: basal vs LPS ($P = 0.937$) y basal vs LDL-ox ($P = 0.093$) en la liberación de EMPs (Figura 21B).

Con respecto a la variante I883M de *ABCA1*, utilizando la prueba U de Mann-Whitney, se compararon los sobrenadantes con genotipo I883I basales vs genotipo I883M basales ($P = 0.724$), así como los sobrenadantes de genotipo I883I estimulados con LPS vs los sobrenadantes con genotipo I883M estimulados con LPS ($P = 0.622$) y finalmente los sobrenadantes con genotipo I883I estimulados con LDL-ox vs I883M ($P = 0.943$) con el mismo estímulo (Figura 22A). En el caso de esta variante no se encontraron diferencias significativas en la producción de EMPs con respecto al genotipo en ninguna de las tres condiciones.

A)



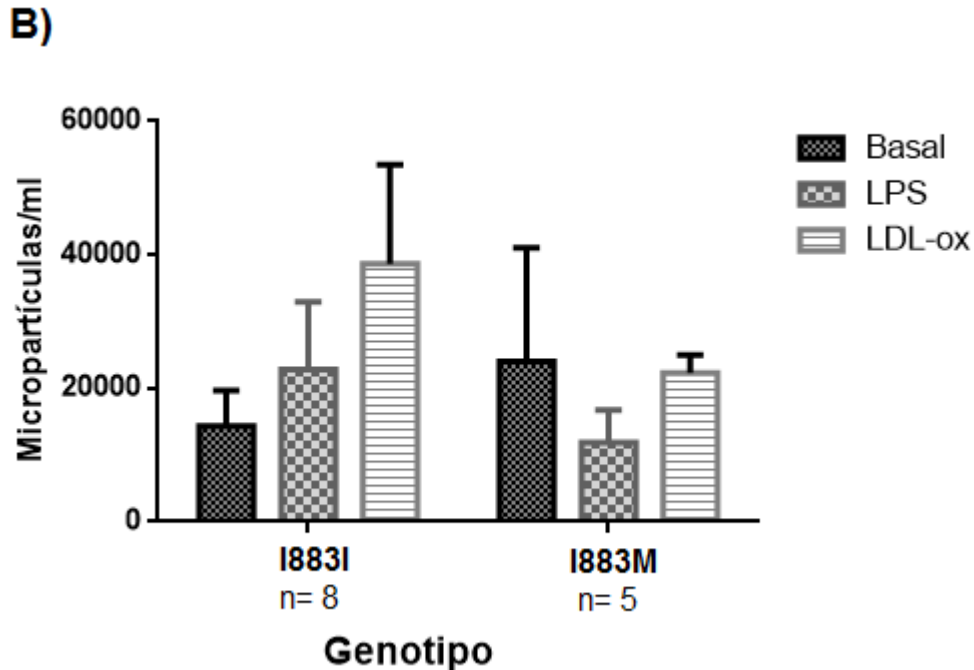


Figura 22.- Producción de EMPs en los cultivos de acuerdo al genotipo de la variante I883M de ABCA1 y a los estímulos. A) Comparación del número de EMPs liberadas por cultivos con distinto genotipo de la variante I883M de ABCA1 bajo las diferentes condiciones. B) Comparación del número de EMPs producidas por cultivos con genotipo I883I e I883M en estado basal y con los estímulos de LPS y LDL-ox. Las barras representan medias \pm EE.

Con la prueba U de Mann-Whitney, se analizó si existían diferencias en el número de EMPs producidas por cultivos con un genotipo determinado (I883I ó I883M) en estado basal y con sus respectivas condiciones (LPS y LDL-ox). Para esta variante, no se encontraron diferencias significativas en la liberación de EMPs bajo los diferentes estímulos con respecto a su basal. Para los cultivos con el genotipo I883I se obtuvo: basal vs LPS ($P = 0.959$) y basal vs LDL-ox ($P = 0.161$) y para los cultivos con el genotipo I883M: basal vs LPS ($P = 1.00$) y basal vs LDL-ox ($P = 0.151$) (Figura 22B).

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1. HUVEC como modelo de estudio

Las HUVEC son ampliamente usadas como modelo celular *in vitro* en el estudio de la fisiología y patología del endotelio (68, 82); al ser la EAC una manifestación clínica de la aterosclerosis, patología consecuente de la pérdida en la integridad vascular y de una disfunción endotelial, estas condiciones promueven a las HUVEC como un modelo ideal para el estudio *in vitro* de esta enfermedad.

Un cultivo primario como éste tiene ventajas, algunas son que se pueden controlar las condiciones físico-químicas (pH, temperatura, presión osmótica, presión parcial de O₂ y CO₂), y fisiológicas (hormonas, factores de crecimiento, densidad celular, etc.). Sin embargo, un cultivo primario requiere de muchos cuidados. El cultivo de HUVEC, por ser precisamente un cultivo primario, a diferencia de líneas celulares comerciales, está mayormente expuesto a desarrollar crecimiento de microorganismos considerado como contaminación. Estos microorganismos pueden ser de carácter bacteriano, micótico o bien viral; generalmente son acarreados de las muestras, ya que por su origen no podemos asegurar la absoluta esterilidad. Esta condición complica el crecimiento de las células; la dificultad de reconocer y eliminar estos microorganismos patológicos, provoca que la mayoría de las veces muchos de estos cultivos sean desechados (83).

Otro punto importante a tratar son las condiciones en las que se obtienen los cordones umbilicales al momento del parto; es importante instruir al médico sobre la correcta obtención del cordón ya que de esto también depende el éxito del cultivo celular. Por ende, es fundamental retirar el exceso de sangre en los cordones; esto se realiza únicamente por goteo, evitando la acción de exprimir el tejido, ya que esto podría provocar la muerte celular por estrangulamiento. Así mismo, no retirar el exceso de sangre podría llevar a la muerte celular por hipoxia, al formarse coágulos en la vena del cordón (82) .

6.2. Obtención y cuantificación de MPs endoteliales en cultivo.

Las células endoteliales vasculares liberan diferentes tipos de EVs (exosomas, MPs y cuerpos apoptóticos) en respuesta a factores de activación celular o apoptosis (84). No existe un consenso reportado para el aislamiento de estas EVs; sin embargo, la técnica de ultracentrifugación es la más utilizada. Para el caso de MPs, estudios previos reportan como velocidad óptima un rango de 20,000 a 22,000 g (35, 43, 80, 81). Existen diferentes métodos para caracterizar MPs, algunas de estas metodologías de caracterización se basan principalmente en técnicas como microscopía de fuerza atómica, microscopía electrónica, western blot, proteómica y citometría de flujo (34, 36).

La identificación de MPs de origen endotelial se realiza con el apoyo de marcadores específicos utilizados para el análisis por citometría de flujo (12, 36, 40, 43, 80, 84, 85). Al principio decidimos guiarnos por algunos de estos estudios para lograr aislar EMPs de los sobrenadantes producidas por las HUVEC; sin embargo, muchas de estas investigaciones se han realizado en plasma sanguíneo. La poca información que existe acerca de EVs en sobrenadantes de cultivo, dificultó la estandarización en nuestro procedimiento.

Se han descrito diferentes marcadores para determinar el origen endotelial de estas vesículas, algunos de éstos son CD105, CD31, CD146, CD54, CD51, CD62E, CD144 y el factor de Von Willebrand (34, 84). Basándonos en la literatura, decidimos incluir un panel con los anticuerpos CD31, CD144, CD146, CD62E, Anexina V y dos marcadores más: CellMask™ Orange, un colorante no específico de membrana que nos asegura la naturaleza de origen membranal de las MPs y calceína AM, la cual nos ayuda a distinguir las MPs íntegras con actividad intracelular esterasa positiva.

Al comienzo de la estandarización del marcaje de EMPs con los anticuerpos elegidos de endotelio, se esperaba ver fluorescencia positiva a estos marcadores y de esta forma corroborar el estirpe celular; sin embargo, no observamos la positividad a estos anticuerpos. Esto se podría deber a que nuestras EMPs al parecer no llevan consigo dichos marcadores, ya que se ha descrito que el contenido de las biomoléculas en EVs no solo es determinado por su célula de origen; el estímulo del cual son liberadas también influye mucho en el fenotipo (12, 86, 87).

Por lo anterior, decidimos inmunofenotipificar las HUVEC con las cuales trabajamos, para asegurar que eran células endoteliales y por ende corroborar que toda MP liberada en este cultivo es de origen endotelial.

No existen protocolos de cómo realizar la cuantificación de EVs; sin embargo, hay estudios en los que se describe el uso de tubos Trucount™ como herramienta útil, ya que al contener un botón (*pellet*) liofilizado que se disuelve y libera un número conocido de perlas fluorescentes, nos permite realizar el cálculo aproximado de EMPs por ml. Existen estudios en los que reportan su uso, pero únicamente para el conteo de MPs en plasma (88-91). Decidimos aplicar esta técnica a nuestro proyecto y obtuvimos resultados favorables, ya que demostramos que también es una técnica útil para el cálculo de EMPs provenientes de sobrenadantes de cultivos de HUVEC.

6.3. MPs y estímulos aterogénicos

Los resultados obtenidos en nuestro estudio mostraron que la cantidad de EMPs generadas por las HUVEC con el estímulo LPS durante 24 h, no fue estadísticamente distinta a la obtenida en el estado basal, lo cual coincide con lo ya reportado en el estudio realizado por Simak y colaboradores en 2002 (77).

A diferencia de las células estimuladas con LPS, la condición de LDL-ox aplicada durante 24 h aumentó significativamente la producción de EMPs con respecto al estado basal ($P = 0.022$); esto concuerda con lo reportado acerca de la participación de LDL-ox en el aumento de la producción de EVs en plaquetas *in vitro* (92). En otro estudio se demostró que la cantidad de MPs circulantes son significativamente elevadas en pacientes con hipercolesterolemia familiar. En dicho estudio se encontraron principalmente concentraciones altas de MPs derivadas de células endoteliales, monocitos y eritrocitos; esta alta producción de MPs endoteliales se relacionó con una probable activación y disfunción endotelial en pacientes con hipercolesterolemia (91).

6.4. Variantes R230C e I883M de ABCA1 y la producción de EMPs.

Al analizar nuestros resultados obtenidos para la genotipificación de la variante R230C de ABCA1, se encontró que de 53 cultivos celulares, 39 de éstos fueron homocigotos para el alelo común (R230R), 14 muestras fueron heterocigotos R230C, y no se obtuvo ninguna muestra homocigota C230C, obteniendo así una frecuencia alélica del alelo raro (T; 230C) de 13.2%. De acuerdo a lo informado en 1000 genomas, el alelo raro (T; 230C) tiene una

frecuencia alélica del 7% en individuos México-americanos. En este estudio obtuvimos una frecuencia alélica más alta (13.2%), lo que concuerda con lo reportado en un estudio realizado en poblaciones nativas de América por Acuña Alonzo y colaboradores en 2010, donde la frecuencia promedio fue del 12% para esta variante (73). Es importante mencionar que las muestras de cordón umbilical que nosotros estudiamos provienen principalmente de personas de bajos recursos, ya que la mayoría de las mujeres que acuden al Hospital General Tláhuac están en esta condición; un bajo nivel socioeconómico se ha asociado a un mayor componente indígena en la población mexicana (93).

En el análisis del número de EMPs producidas por las HUVEC de acuerdo al genotipo de la variante R230C de *ABCA1*, los cultivos con esta variante en forma heterocigota presentaron una disminución significativa de los niveles de EMPs con respecto a los homocigotos comunes R230R en sobrenadantes en estado basal ($P = 0.035$) y con estímulo LDL-ox ($P = 0.008$); estos resultados concuerdan con la hipótesis planteada con respecto al posible efecto de la variante R230C en la disminución de EMPs. La asociación de la variante R230C de *ABCA1* con la disminución en la producción de EMPs obtenida en este estudio podría contribuir a resolver la paradoja de que esta variante fue asociada previamente a factores de riesgo cardiovascular y a su vez, a un menor riesgo de EAC; es decir, al disminuir el número de MPs liberadas, las cuales se ha descrito que se encuentran incrementadas en enfermedades que cursan con daño vascular (9, 35-37), podría favorecerse la protección en individuos con lesión ateromatosa a desarrollar eventos más graves como infarto de miocardio. Sin embargo, el tamaño de la muestra ($n=13$) es pequeño, por lo que es necesario aumentar el número de muestras para confirmar la disminución en la producción de EMPs en cultivos con la variante R230C.

La variante I883M es interesante, ya que el alelo menor, que codifica para metionina, es probable que sea el alelo ancestral. Los resultados experimentales muestran una mayor actividad del eflujo de colesterol en presencia del alelo I883 versus M883, lo que sugiere que la mutación M883 → I883 pudo haber sido uno de los cambios adaptativos en *ABCA1* que se produjo durante la evolución de los seres humanos modernos (68). Se ha descrito que la variante I883M de *ABCA1*, aun cuando se ha asociado a un mayor riesgo de EAC en diversos estudios (69), no se ha asociado de manera consistente a niveles de HDL (59, 67, 68, 70).

El análisis de discriminación alélica en 53 cultivos celulares reveló que 31 muestras fueron homocigotos para el alelo común (I883I), 21 muestras fueron heterocigotos I883M y solo encontramos un homocigoto M883M, obteniendo así

una frecuencia alélica del alelo raro (G; 883M) de 21.7%; esto concuerda con la frecuencia alélica descrita para esta variante por 1000 genomas en individuos México-americanos (22.4%).

Al analizar la producción de EMPs con respecto a los genotipos de la variante I883M y bajo las tres diferentes condiciones, no se observaron diferencias significativas. Así mismo, al comparar los homocigotos I883I en la producción de EMPs con los diferentes estímulos respecto al basal no se observaron diferencias significativas; sin embargo, las muestras comparadas son muy pocas (n=8 para el genotipo I883I y para el genotipo I883M fue de 5), por lo que se necesita aumentar el tamaño de muestra para confirmar estos resultados.

Esta variante ha sido controversial con lo observado respecto a su función y participación en la EAC. En este estudio, debido al tamaño reducido de la muestra, no se tiene la información suficiente para confirmar o rechazar nuestra hipótesis sobre la asociación de la variante I883M con un aumento en la producción de EMPs, tanto en condiciones basales como en respuesta a factores aterogénicos; por ello, es necesario aumentar la muestra y confirmar los datos obtenidos.

Este es el primer estudio que evalúa la participación de dos variantes de *ABCA1* en la producción de EMPs *in vitro*, en estado basal y bajo dos estímulos involucrados en la fisiopatología de la aterosclerosis. Dado el papel de *ABCA1* en la formación de MPs y la relevante participación de éstas en enfermedades cardiovasculares como la EAC, los resultados de este estudio constituyen el inicio de una línea de investigación para analizar la función de este gen y otras variantes genéticas en la producción de EMPs, así como el análisis de otros estímulos aterogénicos y la caracterización de estas EMPs.

7. CONCLUSIONES

- I. La variante R230C de *ABCA1* se asoció a una disminución en la producción de EMPs en sobrenadantes de HUVEC, en condiciones basales y en respuesta al estímulo de LDL-ox.
- II. La variante I883M no se asoció significativamente a la producción de EMPs en HUVEC en estado basal y bajo ninguno de los estímulos analizados; sin embargo, es necesario aumentar el tamaño de la muestra para corroborar los datos obtenidos.
- III. La producción total de EMPs aumentó significativamente en sobrenadantes de HUVEC estimuladas con LDL-ox respecto al basal e independientemente del genotipo de las variantes de *ABCA1*.

8. PERSPECTIVAS

- I. Este es el primer trabajo que describe la asociación de una variante de *ABCA1* a la producción de EMPs en presencia de dos estímulos involucrados en la fisiopatología de la aterosclerosis. Es importante estudiar el efecto de ésta y otras variantes en el gen *ABCA1* sobre la producción de EMPs, empleando otros estímulos proaterogénicos, como las fuerzas de rozamiento y TNF- α .
- II. Debido a que no logramos detectar una señal positiva en las EMPs marcadas con anticuerpos específicos de endotelio, es necesario realizar más ensayos para estandarizar la detección de estos marcadores de origen endotelial en las EMPs.

9. LITERATURA CITADA

1. Salud OMDI. Organización Mundial de la Salud. 2017. Disponible en:<http://www.who.int/es/>. [Acceso el 06 de junio de 2017].
2. Molina E, Clarence EM, Ahmady F, Chew GS, Charchar FJ. Coronary Artery Disease: Why We should Consider the Y Chromosome. *Heart Lung Circ*. 2016;25(8):791-801.
3. Feero WG, Guttmacher AE, O 'donnell CJ, Nabel EG. Genomic Medicine Genomics of Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2011;365:2098-109.
4. Kessler T, Erdmann J, Schunkert H. Genetics of coronary artery disease and myocardial infarction - 2013. *Current Cardiology Reports*. 2013;15(6).
5. Bertomeu Ruiz A, Zambón Rados D. La placa aterogénica: fisiopatología y consecuencias clínicas. *Medicina Integral*. 2002;40(09):394-405.
6. Otsuka F, Yasuda S, Noguchi T, Ishibashi-Ueda H. Pathology of coronary atherosclerosis and thrombosis. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2016;6(4):396-408.
7. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(5):1262-75.
8. Limaye V, Vadas M. The vascular endothelium: structure and function. *Mechanisms of Vascular Disease*. 2007:1-10.
9. Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*. 2016;248:97-109.
10. Jensen HA, Mehta JL. Endothelial cell dysfunction as a novel therapeutic target in atherosclerosis. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2016;14(9):1021-33.
11. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, Pastor J, Mauro LM, Horstman LL, et al. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *American Heart Journal*. 2003;145(6):962-70.
12. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL, Ahn YS. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thrombosis Research*. 2003;109(4):175-80.
13. Mas M. A Close Look at the Endothelium: Its Role in the Regulation of Vasomotor Tone. *European Urology Supplements*. 2009;8(2):48-57.

14. De la Vega V, Rodríguez M, Quintana M. La disfunción endotelial: Una propuesta hacia el cambio. Argentina: Intermedicina [Internet]. 2007.
15. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow. *Acta Physiol (Oxf)*. 2016.
16. Moncada, S., & Higgs, E. A. (2006). In *The vascular endothelium I* . Springer Berlin Heidelberg. Pharmacology E. Volume 176/l.
17. Ruiz MM. Participación de la vía de señalización fosfatidilinositol 3 quinasa / Akt / sintasa endotelial del óxido nítrico en procesos de angiogénesis y remodelado vascular. 2002;XXII:19-22.
18. Martínez-gonzález J, Llorente-cortés V, Badimon L. Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas. *Revista española de cardiología*. 2001;54(li):218-31.
19. Chiu JJ, Chien S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev*. 2011;91(1):327-87.
20. Li D, Mehta JL. Oxidized LDL, a critical factor in atherogenesis. *Cardiovasc Res*. 2005;68(3):353-4.
21. Zhu Y, Liao H, Xie X, Yuan Y, Lee TS, Wang N, et al. Oxidized LDL downregulates ATP-binding cassette transporter-1 in human vascular endothelial cells via inhibiting liver X receptor (LXR). *Cardiovasc Res*. 2005;68(3):425-32.
22. Zhou J, Li YS, Chien S. Shear stress-initiated signaling and its regulation of endothelial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(10):2191-8.
23. Soulis JV, Fytanidis DK, Papaioannou VC, Giannoglou GD. Wall shear stress on LDL accumulation in human RCAs. *Med Eng Phys*. 2010;32(8):867-77.
24. Malek AM, Alper SL. and Its Role in Atherosclerosis. 2010;282(21):2035-42.
25. Park KH, Park WJ. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. *J Korean Med Sci*. 2015;30(9):1213-25.
26. Dauphinee SM, Karsan A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest*. 2006;86(1):9-22.
27. Joshi AD, Dimitropoulou C, Thangjam G, Snead C, Feldman S, Barabutis N, et al. Heat shock protein 90 inhibitors prevent LPS-induced endothelial barrier dysfunction by disrupting RhoA signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;50(1):170-9.

28. Amabile N, Guérin AP, Tedgui A, Boulanger CM, London GM. Predictive value of circulating endothelial microparticles for cardiovascular mortality in end-stage renal failure: a pilot study. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2012;27(5):1873-80.

29. van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological reviews*. 2012;64(3):676-705.

30. Randolph WE, Service M. THE SIGNIFICANCE OF THE PROTEIN OF BLOOD * The activators of blood clotting present ' in mammalian tissue , i . e . the agents responsible for the conversion of prothrombin to thrombin , have been shown to be lipoproteins of a very high particle weight (I. 1946(7).

31. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *British journal of haematology*. 1967;13(3):269-88.

32. Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:27066.

33. Leroyer AS, Anfosso F, Lacroix R, Sabatier F, Simoncini S, Njock SM, et al. Endothelial-derived microparticles: Biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis. *Thrombosis and Haemostasis*. 2010;104(3):456-63.

34. Barteneva NS, Fasler-Kan E, Bernimoulin M, Stern JN, Ponomarev ED, Duckett L, et al. Circulating microparticles: square the circle. *BMC cell biology*. 2013;14:23.

35. Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res*. 2010;107(9):1047-57.

36. Burger D, Schock S, Thompson CS, Montezano AC, Hakim AM, Touyz RM. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin Sci (Lond)*. 2013;124(7):423-41.

37. Lovren F, Verma S. Evolving role of microparticles in the pathophysiology of endothelial dysfunction. *Clinical Chemistry*. 2013;59(8):1166-74.

38. Wang JM, Su C, Wang Y, Huang YJ, Yang Z, Chen L, et al. Elevated circulating endothelial microparticles and brachial-ankle pulse wave velocity in well-controlled hypertensive patients. *J Hum Hypertens*. 2009;23(5):307-15.

39. Vion AC, Ramkhalawon B, Loyer X, Chironi G, Devue C, Loirand G, et al. Shear stress regulates endothelial microparticle release. *Circ Res*. 2013;112(10):1323-33.

40. Mahajan K. Clinical & Experimental Cardiology Microparticles in Atherosclerosis : Biomarkers of Disease. 2015;6(1).
41. Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, Basire A, Pannell R, Borghi H, et al. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: A mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*. 2007;110(7):2432-9.
42. Alexandru N, Badila E, Weiss E, Cochior D, Stepien E, Georgescu A. Vascular complications in diabetes: Microparticles and microparticle associated microRNAs as active players. *Biochemical and biophysical research communications*. 2016;472(1):1-10.
43. Jansen F, Yang X, Baumann K, Przybilla D, Schmitz T, Flender A, et al. Endothelial microparticles reduce ICAM-1 expression in a microRNA-222-dependent mechanism. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2015;19(9):2202-14.
44. Martinez MC, Andriantsitohaina R. Microparticles in angiogenesis: therapeutic potential. *Circ Res*. 2011;109(1):110-9.
45. Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, Zwaal RF. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1439(3):317-30.
46. Duong PT, Collins HL, Nickel M, Lund-Katz S, Rothblat GH, Phillips MC. Characterization of nascent HDL particles and microparticles formed by ABCA1-mediated efflux of cellular lipids to apoA-I. *J Lipid Res*. 2006;47(4):832-43.
47. Nandi S, Ma L, Denis M, Karwatsky J, Li Z, Jiang XC, et al. ABCA1-mediated cholesterol efflux generates microparticles in addition to HDL through processes governed by membrane rigidity. *J Lipid Res*. 2009;50(3):456-66.
48. Wang S, Smith JD. ABCA1 and nascent HDL biogenesis. *BioFactors* (Oxford, England). 2014;40(6):547-54.
49. Sahu U, Mohapatra BN, Kar SK, Ranjit M. Promoter polymorphisms in the ATP binding cassette transporter gene influence production of cell-derived microparticles and are highly associated with susceptibility to severe malaria in humans. *Infect Immun*. 2013;81(4):1287-94.
50. Attie AD. ABCA1: at the nexus of cholesterol, HDL and atherosclerosis. *Trends Biochem Sci*. 2007;32(4):172-9.
51. Oram JF, Heinecke JW. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol Rev*. 2005;85(4):1343-72.

52. Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res.* 2001;42(7):1007-17.
53. Bielicki JK. ABCA1 agonist peptides for the treatment of disease. *Curr Opin Lipidol.* 2016;27(1):40-6.
54. Fitzgerald ML, Mujawar Z, Tamehiro N. ABC transporters, atherosclerosis and inflammation. *Atherosclerosis.* 2010;211(2):361-70.
55. Liu Y, Tang C. Regulation of ABCA1 functions by signaling pathways. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1821(3):522-9.
56. Hussein MA, Shrestha E, Ouimet M, Barrett TJ, Leone S, Moore KJ, et al. LXR-Mediated ABCA1 Expression and Function Are Modulated by High Glucose and PRMT2. *PLoS One.* 2015;10(8):e0135218.
57. Yao MH, He J, Ma RL, Ding YS, Guo H, Yan YZ, et al. Association between Polymorphisms and Haplotype in the ABCA1 Gene and Overweight/Obesity Patients in the Uyghur Population of China. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(2):220.
58. Alrasadi K, Ruel IL, Marcil M, Genest J. Functional mutations of the ABCA1 gene in subjects of French-Canadian descent with HDL deficiency. *Atherosclerosis.* 2006;188(2):281-91.
59. Brousseau ME, Bodzioch M, Schaefer EJ, Goldkamp AL, Kielar D, Probst M, et al. Common variants in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 in men with low HDL cholesterol levels and coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 2001;154(3):607-11.
60. Clee SM, Zwinderman AH, Engert JC, Zwartz KY, Molhuizen HOF, Roomp K, et al. Common Genetic Variation in ABCA1 Is Associated With Altered Lipoprotein Levels and a Modified Risk for Coronary Artery Disease. *Circulation.* 2001;103(9):1198-205.
61. Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Jensen GB, Steffensen R, Tybjaerg-Hansen A. Genetic variation in ABCA1 predicts ischemic heart disease in the general population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(1):180-6.
62. Kitjaroenthom A, Hananantachai H, Tungtrongchitr A, Pooudong S, Tungtrongchitr R. R219K polymorphism of ATP binding cassette transporter A1 related with low HDL in overweight/obese Thai males. *Arch Med Res.* 2007;38.
63. Combes V, Coltel N, Alibert M, van Eck M, Raymond C, Juhan-Vague I, et al. ABCA1 gene deletion protects against cerebral malaria: potential pathogenic role of microparticles in neuropathology. *The American journal of pathology.* 2005;166(1):295-302.

64. Lutucuta S, Ballantyne CM, Elghannam H, Gotto AM, Marian AJ. Novel Polymorphisms in Promoter Region of ATP Binding Cassette Transporter Gene and Plasma Lipids, Severity, Progression, and Regression of Coronary Atherosclerosis and Response to Therapy. *Circulation Research*. 2001;88(9):969-73.
65. Villarreal-Molina T, Posadas-Romero C, Romero-Hidalgo S, Antúnez-Argüelles E, Bautista-Grande A, Vargas-Alarcón G, et al. The ABCA1 Gene R230C Variant Is Associated with Decreased Risk of Premature Coronary Artery Disease: The Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) Study. *PLoS ONE*. 2012;7(11):1-9.
66. Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, Frikke-Schmidt R, Barbalic M, Jensen MK, et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: A mendelian randomisation study. *The Lancet*. 2012;380(9841):572-80.
67. Fawzy MS, Alhadramy O, Hussein MH, Ismail HM, Ismail NM, Biomy NM, et al. Functional and Structural Impact of ATP-Binding Cassette Transporter A1 R219K and I883M Gene Polymorphisms in Obese Children and Adolescents. *Molecular diagnosis & therapy*. 2015;19(4):221-34.
68. Brunham LR, Singaraja RR, Pape TD, Kejariwal A, Thomas PD, Hayden MR. Accurate prediction of the functional significance of single nucleotide polymorphisms and mutations in the ABCA1 gene. *PLoS genetics*. 2005;1(6):e83.
69. Tan JH, Low PS, Tan YS, Tong MC, Saha N, Yang H, et al. ABCA1 gene polymorphisms and their associations with coronary artery disease and plasma lipids in males from three ethnic populations in Singapore. *Hum Genet*. 2003;113(2):106-17.
70. Nebel A, Croucher PJ, El Mokhtari NE, Flachsbart F, Schreiber S. Common coding polymorphisms in the ABCA1 gene and risk of early-onset coronary heart disease in northern Germany. *Atherosclerosis*. 2007;193(2):458-60.
71. Villarreal-Molina MT, Aguilar-Salinas CA, Rodriguez-Cruz M, Riano D, Villalobos-Comparan M, Coral-Vazquez R, et al. The ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant affects HDL cholesterol levels and BMI in the Mexican population: association with obesity and obesity-related comorbidities. *Diabetes*. 2007;56(7):1881-7.
72. Villarreal-Molina MT, Flores-Dorantes MT, Arellano-Campos O, Villalobos-Comparan M, Rodriguez-Cruz M, Miliar-Garcia A, et al. Association of the ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant with early-onset type 2 diabetes in a Mexican population. *Diabetes*. 2008;57(2):509-13.
73. Acuña-Alonzo V, Flores-Dorantes T, Kruit JK, Villarreal-Molina T, Arellano-Campos O, Hünemeier T, et al. A functional ABCA1 gene variant is associated with low HDL-cholesterol levels and shows evidence of positive selection in Native Americans. *Human Molecular Genetics*. 2010;19(14):2877-85.

74. Griffin BA, Caslake MJ, Yip B, Tait GW, Packard CJ, Shepherd J. Rapid isolation of low density lipoprotein (LDL) subfractions from plasma by density gradient ultracentrifugation. *Atherosclerosis*. 1990;83(1):59-67.

75. Cominacini L, Pasini AF, Garbin U, Davoli A, Tosetti ML, Campagnola M, et al. Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 2000;275(17):12633-8.

76. Garbin U, Fratta Pasini A, Stranieri C, Manfro S, Mozzini C, Boccioletti V, et al. Effects of nebivolol on endothelial gene expression during oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. *Mediators of inflammation*. 2008;2008:367590.

77. Simak J, Holada K, Vostal JG. Release of annexin V-binding membrane microparticles from cultured human umbilical vein endothelial cells after treatment with camptothecin. *BMC cell biology*. 2002;3:11.

78. Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:255-89.

79. Rousseau M, Belleannee C, Duchez AC, Cloutier N, Levesque T, Jacques F, et al. Detection and quantification of microparticles from different cellular lineages using flow cytometry. Evaluation of the impact of secreted phospholipase A2 on microparticle assessment. *PLoS One*. 2015;10(1):e0116812.

80. Jansen F, Yang X, Hoelscher M, Cattelan A, Schmitz T, Proebsting S, et al. Endothelial microparticle-mediated transfer of MicroRNA-126 promotes vascular endothelial cell repair via SPRED1 and is abrogated in glucose-damaged endothelial microparticles. *Circulation*. 2013;128(18):2026-38.

81. Larson MC, Woodliff JE, Hillery CA, Kearl TJ, Zhao M. Phosphatidylethanolamine is externalized at the surface of microparticles. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2012;1821(12):1501-7.

82. Marin V, Kaplanski G, Gres S, Farnarier C, Bongrand P. Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. *Journal of immunological methods*. 2001;254(1-2):183-90.

83. Lincoln CK, Gabridge MG. Chapter 4 Cell Culture Contamination: Sources, Consequences, Prevention, and Elimination. *Methods in Cell Biology*. 1998;57:49-65.

84. Dignat-George F, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(1):27-33.

85. Sinning JM, Losch J, Walenta K, Bohm M, Nickenig G, Werner N. Circulating CD31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes. *Eur Heart J*. 2011;32(16):2034-41.

86. Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda, Md)*. 2005;20:22-7.

87. Inal JM, Ansa-Addo EA, Stratton D, Kholia S, Antwi-Baffour SS, Jorfi S, et al. Microvesicles in health and disease. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2012;60(2):107-21.

88. Grant R, Ansa-Addo E, Stratton D, Antwi-Baffour S, Jorfi S, Kholia S, et al. A filtration-based protocol to isolate human plasma membrane-derived vesicles and exosomes from blood plasma. *Journal of immunological methods*. 2011;371(1-2):143-51.

89. Sahu U, Sahoo PK, Kar SK, Mohapatra BN, Ranjit M. Association of TNF level with production of circulating cellular microparticles during clinical manifestation of human cerebral malaria. *Human immunology*. 2013;74(6):713-21.

90. Nielsen MH, Beck-Nielsen H, Andersen MN, Handberg A. A flow cytometric method for characterization of circulating cell-derived microparticles in plasma. *J Extracell Vesicles*. 2014;3.

91. Nielsen MH, Irvine H, Vedel S, Raungaard B, Beck-Nielsen H, Handberg A. The Impact of Lipoprotein-Associated Oxidative Stress on Cell-Specific Microvesicle Release in Patients with Familial Hypercholesterolemia. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016;2016:2492858.

92. Wang H, Wang Z-H, Kong J, Yang M-Y, Jiang G-H, Wang X-P, et al. Oxidized Low-Density Lipoprotein-Dependent Platelet-Derived Microvesicles Trigger Procoagulant Effects and Amplify Oxidative Stress. *Molecular Medicine*. 2012;18(1):159-66.

93. Bello M, Rangel M. Etnicidad," raza" y equidad en América Latina y el Caribe. 2000.