



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

*« ESTUDIO DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD COMO
VECTORES LÍPIDICOS PARA EL MANTENIMIENTO DE LA FUNCIÓN
ENDOTELIAL »*

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. MÓNICA MUÑOZ VEGA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. OSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ

FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR:

DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. JAIME MAS OLIVA

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

CUIDAD DE MÉXICO MAYO DE 2018



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.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Metabolismo de Lípidos que pertenece al Departamento de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Oscar Pérez Méndez por dejarme forma parte de su grupo de trabajo pese a la situación adversa, por su tutoría y la confianza depositada en mí y en mi trabajo.

Al Dr. Felipe Massó Rojas y la Dra. Araceli Páez Arenas por su paciencia, apoyo y ayuda en cada una de las técnicas implementada para obtener los resultados aquí plasmados.

A la Dra. Elizabeth Carreón Torres y a todos las personas que han formado parte del Laboratorio de Metabolismo de Lípidos en los últimos tres años, por su compañerismo y apoyo técnico.

A los doctores Jaime Mas Oliva y Ramón Coral Vázquez por contribuir a través de la revisión y la crítica constructiva durante el desarrollo de mis estudios de doctorado.

A los doctores Laurent Martinez y Souad Najib por su hospitalidad y por su colaboración a la parte técnica.

DEDICATORIAS

A mis padres, Ángeles y Esteban, por su apoyo incondicional, por rodearme siempre de libros, música y amor. Por enseñarme el camino de la honestidad y tener pasión por lo que hago.

A Juan Esteban, por su apoyo, su honestidad y por ser un ejemplo como hermano mayor.

A mis abuelos, María Luisa y Juan Manuel, por las pláticas, la comida y las sobremesas interminables.

A los amigos de toda la vida, que han estado hasta en los momentos más difíciles. Gracias.

A los maestros que me inspiraron durante todos estos años con su ejemplo o con sus palabras, estoy segura que no soy la única.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ABREVIATURAS	9
RESUMEN	11
ABSTRACT.....	13
INTRODUCCIÓN.....	15
<i>Lipoproteínas de alta densidad (HDL) y protección contra el riesgo cardiovascular.....</i>	15
<i>El transporte reverso del colesterol (TRC) y los efectos ateroprotectores de las HDL</i>	16
<i>Evidencia contradictoria sobre el TRC: terapias farmacológicas y mutaciones en genes involucrados.</i>	17
Niacina.....	17
Inhibidores de CETP	18
Tiromiméticos.....	20
Agonistas de PPAR-α.....	20
Apo AI Milano y Apo AI París	22
Enfermedad de Tánger.....	23
Fish Eye Disease (FED).....	23
<i>Disfunción endotelial e inflamación: papel de la óxido nítrico endotelial (eNOS).</i>	24
HDL y función endotelial	26
HDL e inhibición de moléculas de adhesión.....	28
HDL y la modulación del contenido lipídico membranal	31
JUSTIFICACIÓN.....	33
HIPÓTESIS.....	33
OBJETIVO GENERAL	34
OBJETIVOS PARTICULARES.....	34
METODOLOGÍA.....	35
<i>Donadores voluntarios de plasma para obtención de HDL</i>	35
Etapa 1.....	35
Etapa 2.....	35
Muestras	35
Aislamiento de HDL	36
Marcaje de HDL con Alexa Fluor 488	36
Preparación de HDL reconstituídas con 25-NBD-colesterol y NBD-esfingomielina	36
Cultivo de células endoteliales.....	37

Curva dosis-respuesta de TNF-alfa	37
Cuantificación de moléculas de adhesión	37
Ensayo de internalización	38
Fosforilación de eNOS en la S1177	39
Citometría de flujo	39
Sistema de órgano aislado	40
Análisis estadístico	41
RESULTADOS	42
Caracterización de células HMEC-1	42
Expresión de SR-BI en células HMEC-1	43
Curva concentración-respuesta de TNF-alfa	45
Efecto de las HDL sobre las células HMEC-1.	47
Ensayo de internalización de HDL en células HepG2.	51
Ensayos de internalización del HDL en células endoteliales	52
Participación de SR-BI en la internalización de componentes de HDL	54
Cinética de internalización de componentes de HDL	59
Competencia C-HDL vs C-LDL	62
Composición de HDL y expresión de moléculas de adhesión	63
Composición de HDL y activación de la eNOS	65
PROYECTOS EN PARALELO	67
HDL aisladas de sujetos sanos y su efecto sobre el endotelio vascular.	67
Otros efectos de BLT-1	71
DISCUSIÓN	74
CONCLUSIONES	83
REFERENCIAS	84
ARTÍCULO PUBLICADO	100

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. <i>Receptores con los que interactúan las HDL y la inducción de señales intracelulares en el endotelio</i>	28
Figura 2 <i>Las HDL inhiben la expresión de moléculas de adhesión</i>	30
Figura 3 <i>Caracterización de línea celular HMEC-1</i>	42
Figura 4 <i>Las células HMEC-1 expresan SR-BI.</i>	44
Figura 5 <i>La expresión de SR-BI no se modifica por los estímulos utilizados</i>	45
Figura 6 <i>Diagramas de puntos de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en HMEC-1</i>	47
Figura 7 <i>HDL inhiben la expresión de ICAM-1</i>	48
Figura 8 <i>HDL inhiben la expresión de VCAM-1</i>	49
Figura 9 <i>Expresión de ICAM-1 en células lavadas y con medio + HDL</i>	50
Figura 10 <i>Expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en células incubadas con albúmina sérica humana VS control sin estímulo</i>	51
Figura 11 <i>Internalización de HDL en células HepG2</i>	52
Figura 12 <i>Internalización de los componentes de HDL en HMEC-1.</i>	53
Figura 13 <i>Internalización de los componentes de HDL en HUVEC</i>	54
Figura 14 <i>Internalización de HDL marcadas con Alexa 488 en células endoteliales</i>	55
Figura 15 <i>Contribución de SR-BI a la internalización los componentes de HDL en células HMEC-1</i>	57
Figura 16 <i>Contribución de SR-BI en la internalización los componentes de HDL en células HUVEC</i>	58
Figura 17 <i>Internalización de colesterol y proteína de HDL.</i>	60
Figura 18 <i>Internalización de colesterol y proteína de HDL</i>	61
Figura 19 <i>Ensayo de competencia C-HDL vs C-LDL</i>	63
Figura 20 <i>Inhibición de la expresión de moléculas de adhesión al estimular con rHDL preparadas con diferentes contenidos de lípidos y TNF-alfa</i>	64

Figura 21	<i>Efecto de la composición de lípidos de HDL en la fosforilación de eNOS</i>	66
Figura 22	<i>Curvas dosis respuesta HDL tipo 1.</i>	67
Figura 23	<i>Expresión de ICAM-1 y VCAM-1 de los diferentes tratamientos en células HMEC-1.</i>	68
Figura 24	<i>Curvas dosis respuesta HDL tipo 2</i>	68
Figura 25	<i>Morfología células HMEC-1 para los diferentes estímulos</i>	69
Figura 26	<i>Expresión de ICAM-1 y VCAM-1 de los diferentes tratamientos en células HMEC-1.</i>	70
Figura 27	<i>Curvas dosis respuesta HDL tipo 3. Las aortas de rata fueron estimuladas con acetilcolina y fenilefrina tras ser incubadas con las diferentes condiciones.</i>	70
Figura 28	<i>Expresión de ICAM-1 y VCAM-1 de los diferentes tratamientos en células HMEC-1</i>	71
Figura 29	<i>Expresión de ICAM-1 en HMEC-1 tratadas con BLT-1</i>	72
Figura 30	<i>Expresión de VCAM-1 en HMEC-1 tratadas con BLT-1</i>	72
Figura 31	<i>Efecto de la inhibición de SR-BI en la estructura del citoesqueleto de vimentina en HMEC-1.</i>	73

ABREVIATURAS

ABCA1	Transportador Dependiente de ATP subfamilia A miembro 1
ABCG1	Transportador Dependiente de ATP subfamilia G miembro 1
ApoA1	Apolipoproteína A1
ApoAIV	Apolipoproteína AIV
ApoB	Apolipoproteína B
ApoE	Apolipoproteína E
CH	Colesterol
CETP	Proteína de Transferencia de Ésteres de Colesterol
C-HDL	Colesterol HDL
C-LDL	Colesterol LDL
eNOS	Sintasa de Óxido Nítrico Endotelial
ICAM-1	Molécula de Adhesión Intercelular 1
IMC	Índice de Masa Corporal
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidad
HDL 2	Lipoproteínas de Alta Densidad Subclase 2
HDL 3	Lipoproteínas de Alta Densidad Subclase 3
HMEC-1	Células Endoteliales de Microvasculatura Humana
HUVEC	Células Endoteliales de Vena Umbilical Humana
LCAT	Lecitin Colesterol Acil Transferasa
LDLR	Receptor de Lipoproteínas de Baja Densidad
LH	Lipasa Hepática
mmHg	Milímetros de mercurio
MCP-1	Proteína Quimioatrayente de Monocitos 1
NF-κB	Factor Nuclear kappa B
NO	Óxido Nítrico
P2Y	Receptor Purinérgico Acoplado a Proteína G Familia P2Y
PC	Fosfatidilcolina
PLTP	Proteína de Transferencia de Fosfolípidos
PPAR	Receptor Proliferador Activado por Peroxisomas

S1P	Esfingosina-1- Fosfato
SM	Esfingomielina
SR-BI	Receptor Scavenger Clase B Tipo 1
rHDL	HDL reconstituídas
TNF-alfa	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
TRC	Transporte Reverso de Colesterol
VCAM-1	Molécula de Adhesión Vascular Celular 1
VLDL	Lipoproteínas de Muy Baja Densidad

RESUMEN

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) han sido asociadas positivamente con la protección del riesgo cardiovascular. Durante décadas, el Transporte Reverso del Colesterol (TRC), un mecanismo por el cual las HDL recuperan el colesterol excedente de las células periféricas para su excreción por vía biliar, se postuló como su principal actividad biológica y fue relacionado directamente con su actividad antiaterosclerosa, principalmente en el endotelio.

Sin embargo, numerosa evidencia tanto farmacológica como de estudios genéticos apunta a que el papel protector de las HDL no puede ser totalmente explicado por el TRC lo que sugiere mecanismos adicionales.

En la década de 1970, se demostró que las HDL pueden ser internalizadas por el endotelio aórtico pero los mecanismos asociados a este fenómeno no se estudiaron hasta muy recientemente. Adicionalmente, se sabe que la mayor parte del colesterol es sintetizado en el hígado, al igual que las HDL y que el único receptor caracterizado para este tipo de partículas, el Receptor Scavenger clase B, tipo 1 (SR-BI) es expresado en la mayor parte de los tejidos. Todo lo anterior sugiere que las HDL podrían tener un papel como vectores.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la relevancia del influjo de colesterol y el efecto que tienen los componentes lipídicos (colesterol y esfingomielina) sobre la función endotelial y su participación en la regulación de la actividad enzimática de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) mediante ensayos en cultivos de células endoteliales.

Para ello, se validó a las Células Endoteliales de Microvasulatura Humana (HMEC-1) como modelo de endotelio utilizando a las Células Endoteliales de Vena Umbilical Humana (HUVEC) como modelo de referencia. Se determinó que las HMEC-1 expresan a SR-BI así como otros marcadores típicos de endotelio como VCAM-1 y endogлина de manera semejante a las HUVEC. Se demostró que ambos modelos de endotelio tienen morfologías, tamaño y granularidad similares, por lo que se determinó que HMEC-1 es un modelo útil para el estudio de las interacciones entre las HDL y el endotelio.

Se realizaron ensayos de internalización con HDL aisladas de plasma de donadores sanos y marcadas con Alexa Fluor 488 en su porción proteica así como con HDL reconstituídas (rHDL) preparadas con 25-NBD-colesterol o NBD- esfingomielina para determinar localización subcelular y cinética de cada componente de las HDL. Además se incubaron las células con el Bloqueador de Transporte de Lípidos 1 (BLT-1), un inhibidor no reversible de SR-BI para determinar la participación de este receptor en la internalización de cada componente de las HDL. La determinación de fluorescencia se realizó utilizando citometría de flujo o microscopía confocal.

El colesterol y la proteína de HDL siguen cinéticas y localizaciones subcelulares distintas. En el caso de la esfingomielina esta sigue un comportamiento similar a la proteína.

SR-BI participa sólo parcialmente en la internalización de la proteína de HDL, pero no se observó efecto sobre la entrada de colesterol o esfingomielina al utilizar diferentes concentraciones de BLT-1.

Para determinar la relevancia fisiológica de la internalización de colesterol HDL (C-HDL) se realizó un ensayo de competencia con colesterol LDL (C-LDL) y se determinó que incluso al utilizar una concentración de este último 20 veces mayor que la fisiológica, el C-HDL continúa ingresando a las células endoteliales.

Con la finalidad de conocer el papel de la composición lipídica de las HDL sobre la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 así como la fosforilación de eNOS en la S1177, se utilizaron rHDL con la Apolipoproteína AI (ApoAI) y fosfatidil colina y concentraciones variables de esfingomielina (5, 11 y 16 %) o bien 5% de colesterol.

Se observó que las rHDL preparadas con esfingomielina inhiben significativamente mejor la expresión de ICAM-1 que las partículas que no contienen este lípido. De manera interesante este efecto no se observa sobre la expresión de VCAM-1.

Las rHDL con 5% de esfingomielina fueron las que activaron significativamente más la fosforilación de eNOS en la S1177, lo que significa una mayor activación de la enzima. Sin embargo, las rHDL con mayores concentraciones de esfingomielina no lograron incrementar la fosforilación de eNOS.

Algunos datos preliminares revelan que las HDL provenientes de sujetos sanos presentan diferencias en la capacidad de inhibir la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, lo cual podría estar asociado a la composición de las partículas.

En conclusión, el presente estudio valida el uso de la línea celular HMEC-1 como modelo de endotelio, confirma la relevancia fisiológica de la internalización de HDL en las células endoteliales así como la importancia de la composición de lípidos de estas partículas sobre la expresión de ICAM-1 y la activación de eNOS. Además, proporciona evidencia sobre las diferencias en cuanto a localización y comportamiento cinético de los componentes de las HDL en las células endoteliales y sugiere la existencia de mecanismos adicionales a SR-BI para modular la entrada de proteína, colesterol y esfingomielina provenientes de las partículas HDL hacia el endotelio.

ABSTRACT

High density lipoproteins (HDL) have been positively associated with protection of cardiovascular risk. For decades, Reverse Cholesterol Transport (RCT), a mechanism by which exceeding cholesterol from peripheral cell is captured in HDL structure and then secreted by biliary pathway, has been proposed as its main biological activity and directly related with anti-atherogenic activity of HDL, particularly in vascular endothelium.

However, a numerous pharmacologic and genetic evidence is supporting that cardioprotective role of HDL cannot be totally explained by RCT suggesting additional mechanisms.

In the 1970 decade, one study showed that HDL can be internalized by aortic endothelium but the associated mechanisms to this phenomenon have only recently been studied. In addition, we know that most of the cholesterol is synthesized by the liver as HDL and the only characterized HDL receptor, named Scavenger Receptor Class B, type I (SR-BI), is expressed in most of the tissues. All of these evidence combined suggest that HDL could be lipid vectors and that role contributes to atheroprotective activity.

The aim of this work is to demonstrate the participation of HDL as lipid vectors, the subcellular location of the main components of this kind of particles, their kinetic behavior, as well as the effect of lipid delivery in endothelial function like the expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) and Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) and phosphorylation of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) S1177.

We validated Human Microvascular Endothelial Cells (HMEC-1) as endothelium model using Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) as reference model. We determined that HMEC-1 can express SR-BI and other typical endothelial markers as VCAM-1 and endoglin resembling to HUVEC. We demonstrated that both endothelial models have similar morphologies, size and granularity and HMEC-1 is a useful model to study HDL-endothelium interactions.

We performed internalizations assay using HDL isolated from plasma of healthy donors and fluorescently labeled with Alexa Fluor 488 in their protein portion as well as reconstituted HDL (rHDL) synthesized with 25-NBD-cholesterol or NBD-sphingomyelin to determine subcellular location and kinetic of each HDL component. In addition, we incubated cells with Blocking Lipid Transport 1 (BLT-1), an irreversible inhibitor of SR-BI to measure the participation of this receptor in the internalization of HDL components. Fluorescence determinations were performed using flow cytometry and confocal microscopy.

Cholesterol and protein from HDL had different kinetics and subcellular locations. Sphingomyelin behaved similarly to protein.

SR-BI partially participated in HDL protein internalization but we did not observed any effect over cholesterol of sphingomyelin uptake when incubated with different concentrations of BLT-1.

To determine physiological relevance of HDL cholesterol (C-HDL) uptake we designed a competition assay with LDL cholesterol (C-LDL) and we demonstrated that even when we used C-LDL 20 times more concentrated than physiologic level, C-HDL is still internalized by endothelial cells.

To assess the role of lipid composition of HDL over VCAM-1 and ICAM-1 and phosphorylation in S1177 of eNOS, we synthesized rHDL with Apolipoprotein AI (ApoAI) and phosphatidylcholine and variable concentrations of sphingomyelin (5, 11 and 16 %) or alternatively, 5% of cholesterol.

We demonstrated that rHDL prepared with sphingomyelin can inhibit more efficiently the expression of ICAM-1 than the particles that did not contained that lipid. Interestingly, we did not observed such effect in VCAM-1 expression.

rHDL with 5% of sphingomyelin enhance significantly the phosphorylation of S1177 position in eNOS, which means more activation of the enzyme. In contrast, rHDL with higher concentrations of sphingomyelin did not enhance the activation of eNOS.

Some preliminary data showed that HDL from healthy donors have differences the ability of inhibition of the ICAM-1 and VCAM-1 inhibition, this effect maybe is associated to lipid composition of HDL particles.

In summary, this study validates the use of HMEC-1 cell line as endothelial model, confirms the physiological relevance of HDL internalization in endothelial cells and the importance of lipid composition of the particles in ICAM-1 expression and eNOS activation. Also provides evidence about location differences and kinetic behavior of HDL components in endothelial cells and suggest the existence of additional mechanisms to SR-BI for the regulation of protein, sphingomyelin and cholesterol uptake from HDL to endothelium.

INTRODUCCIÓN

Lipoproteínas de alta densidad (HDL) y protección contra el riesgo cardiovascular

Las lipoproteínas de alta densidad o HDL son complejos macromoleculares pseudomicelares formados por lípidos y proteínas que conforman la porción lipoproteica más densa del plasma [1]. Su composición es muy heterogénea y algunos estudios calculan que una partícula de HDL normalmente contiene de 2 a 5 moléculas de apolipoproteína AI (Apo AI) la cual constituye hasta un 70 % del contenido proteico total, por lo que es considerada su principal componente [2]. Sin embargo, estudios proteómicos proponen que las HDL son capaces de asociar a más de 80 proteínas distintas [3, 4] .

Además, se calcula que cada partícula de HDL contiene alrededor de 100 moléculas de fosfatidilcolina, la cual es responsable de mantener una superficie antipática y donde pueden ser embebidas las moléculas de colesterol no esterificado, todo ello rodeando un núcleo de lípidos insolubles al agua, principalmente ésteres de colesterol [2, 5]. Los estudios más recientes revelan que las HDL también pueden fungir como vehículos de microRNAs [6]. Todo lo anterior sugiere que las HDL juegan un importante papel como vectores en el plasma de una gran diversidad de moléculas.

Se ha propuesto que todos los componentes mencionados no son únicamente transportados de manera pasiva por las HDL sino que son responsables de las múltiples actividades biológicas que han sido descritas, es por ello que su papel como vectores adquiere gran relevancia [7]. Las variaciones en concentraciones y proporción en dichos componentes son las responsables de la gran heterogeneidad estructural de estas lipoproteínas, y sugiere fuertemente que también son responsables de la variabilidad en las funciones de las HDL ya que ninguno de ellos se distribuye de manera homogénea en la población total de partículas [8].

Las enfermedades cardíacas y en particular las de origen isquémico son la principal causa de muerte en México y el mundo [9, 10] . En diversos estudios epidemiológicos se ha demostrado una asociación negativa entre la concentración del colesterol asociado a las HDL (C-HDL) y el riesgo cardiovascular [11]. En este contexto, algunos

estudios postulan que un incremento de 1 mg/dL en la concentración de C-HDL disminuye en un 3% el riesgo cardiovascular [12].

Sin embargo, propuestas recientes ponen en duda que el contenido de C-HDL refleje el número de partículas o su saturación con lípidos [13]. Sin embargo, hasta el momento la determinación del C-HDL sigue siendo la única manera aceptada, aunque indirecta, de expresar la concentración de partículas HDL en el plasma.

El transporte reverso del colesterol (TRC) y los efectos ateroprotectores de las HDL

Con base en los resultados de los estudios epidemiológicos, se han intentado describir experimentalmente los mecanismos por los cuales las HDL tienen actividad ateroprotectora. El Transporte Reverso del Colesterol (TRC), la función más ampliamente aceptada y documentada de las HDL, parecía responder la mayoría de las preguntas respecto a sus funciones antiaterosclerosas [14].

El TRC comienza con la secreción hepática de Apo AI pobre en lípidos, la cual forma partículas HDL discoidales que migran en la fracción pre-beta del plasma. Las partículas pre-beta son muy afines al colesterol libre excedente de las células, el cual se asocia a ellas a través del eflujo de colesterol mediado por el transportador de membrana ABCA1, dando lugar a las partículas denominadas HDL3 [15].

El colesterol contenido en las HDL3 es sustrato de la Lecitin Colesterol Acil Transferasa (LCAT), enzima plasmática que esterifica el colesterol libre ubicado en la superficie de la lipoproteína. Los ésteres de colesterol producidos migran hacia el interior de la partícula formando el núcleo hidrofóbico de la partícula denominada HDL2 [16]. Las partículas HDL2 pueden seguir al menos dos rutas metabólicas alternativas. La primera de ellas es que sus ésteres de colesterol sean reconocidos por el receptor hepático SR-BI, uno de los pocos receptores identificados para las HDL. Se ha propuesto que la pérdida de ésteres de colesterol debida a la interacción con el SR-BI, regenera la partícula HDL3 inicial que ingresa nuevamente al ciclo de captación de colesterol [15, 17]. La otra alternativa es que la partícula HDL2 sea sustrato de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) cuya actividad consiste en el intercambio de estas moléculas presentes en las HDL2 por triglicéridos

provenientes de las lipoproteínas que contienen apolipoproteína B (Apo B) [16]. El intercambio de lípidos genera partículas HDL2 enriquecidas con triglicéridos las cuales pueden ser modificadas por la lipasa hepática (LH) y lipasa endotelial. De manera sinérgica a la acción de las lipasas, los fosfolípidos de la lipoproteína remanente se redistribuyen por acción de la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP), dando lugar a una partícula pre-beta y una partícula HDL3 que se reincorporan nuevamente al ciclo de captación de colesterol [18]. Por medio de esta ruta metabólica intravascular, las HDL recuperarían el colesterol excedente del ateroma evitando o retardando su desarrollo.

Debido a que las HDL se encuentran en constante remodelación y a que existe gran heterogeneidad en su estructura, se han propuesto diferentes subclasificaciones de estas lipoproteínas. Por ejemplo, las HDL se han agrupado de manera arbitraria en cinco subclases de acuerdo con su tamaño. En orden decreciente podemos enlistarlas como sigue: HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL3b y HDL3c [19]. Sin embargo, los estudios funcionales realizados con las subclases no han mostrado resultados concluyentes sobre si existe diferencia en la actividad biológica de alguna de ellas [20].

Evidencia contradictoria sobre el TRC: terapias farmacológicas y mutaciones en genes involucrados.

Con base en la hipótesis del TRC como principal actividad antiaterosclerosa de las HDL, era plausible proponer que aumentar las concentraciones plasmáticas de C-HDL resultaría en un incremento de la protección cardiovascular. Esta fue la justificación para desarrollar fármacos cuyo objetivo terapéutico primario era aumentar las HDL, así como buscar una nueva prescripción para el uso de fármacos como la niacina y los agonistas de PPARalfa y gama. Usando esta premisa probaron distintos grupos de moléculas los cuales se describen brevemente a continuación.

Niacina

La niacina es un nutriente esencial para el humano que incrementa las concentraciones de HDL cuando se consume a dosis altas. Se han propuesto varios mecanismos sobre su actividad farmacológica los cuales involucran las funciones de

Apo AI, CETP y ABCA1. Este último es mencionado con mayor interés debido a que la niacina incrementa el eflujo de colesterol incrementando la transcripción de ABCA1 [21].

Su administración incrementa el C-HDL hasta en un 25%. Sin embargo, también disminuye las concentraciones del C-LDL y de triglicéridos, por lo que fue propuesta como un fármaco que podría prevenir eventos cardiovasculares. A este respecto, un seguimiento de pacientes a los cuales se les administró niacina durante cuatro años, reveló que no existe una disminución significativa de eventos cardiovasculares mayores. [22]

Llama la atención, además de su falta de eficacia, la gran cantidad de efectos adversos relacionados con la administración del fármaco que comprenden desde efectos cutáneos, gastrointestinales, musculo esqueléticos, infecciosos así como sangrados y complicaciones en el control de glucemia en los individuos diabéticos [23, 24].

Algunos autores recientemente declararon que el perfil de toxicidad de la niacina es inaceptable para la mayoría de los pacientes y no debería ser usada de manera rutinaria a menos que cumplan con tres requisitos: que presenten riesgo alto de presentar eventos cardiovasculares, en los casos en los que las estatinas estén contraindicadas y que además presenten niveles altos de C-LDL [25].

Inhibidores de CETP

La inhibición de CETP como blanco farmacológico fue propuesta después de la publicación de un estudio en el que individuos portadores de mutaciones para pérdida de función en CETP presentaban un incremento notable de los niveles de C-HDL [26]. Un estudio posterior reveló que esto se debía a un incremento en el eflujo de colesterol en un mecanismo mediado por Apo E y ABCA1 [27-29]. Además, existen estudios genéticos que demostraron una disminución en el riesgo de eventos coronarios asociada a varios polimorfismos de pérdida de función del gen CETP [30, 31]. Por otra parte, los roedores como la rata y el ratón, carecen de actividad CETP y son malos modelos de aterosclerosis [32]. A partir de entonces se sintetizaron varios compuestos con actividad inhibitoria de esta proteína. Sin embargo, ninguno de ellos

ha probado su eficacia como protector ante eventos cardiovasculares pese a la modificación de los perfiles de lípidos de los pacientes estudiados [33]. Por esta razón, se ha cuestionado el mecanismo farmacológico como medida eficaz para la protección ante el riesgo cardiovascular. A continuación se mencionan las características principales de los inhibidores de CETP que se han probado incluso en fase III hasta el momento [34].

Torcetrapib

Es un inhibidor competitivo de CETP que incrementa los niveles de C-HDL. Su uso no se asoció a modificaciones en los niveles de triglicéridos o C-LDL [35, 36]. A pesar de que el torcetrapib incrementaba la concentración plasmática de C-HDL, incluso al doble de la concentración inicial, estudios realizados en pacientes demostraron un incremento en el riesgo coronario asociado a su administración y un incremento discreto, pero significativo, de la presión arterial por estimulación de la sintasa de aldosterona [33, 37-39]. Debido a estos efectos adversos, los ensayos fase III fueron suspendidos [40].

Dalcetrapib

Se trata de un fármaco denominado modulador de la actividad CETP; incrementa la eliminación de ácidos biliares por vía fecal y los niveles de C-HDL hasta en un 23%, y no afecta la producción de aldosterona [36, 41, 42]. Sin embargo, el uso de dalcetrapib fue fútil debido a que no presentó una disminución significativa en la incidencia, riesgo o desenlace de infartos, isquemia, paro cardíaco o angina inestable por lo que el uso comercial del fármaco se descartó definitivamente [43]. Cabe destacar que se observó un pequeño incremento en la presión sistólica (alrededor de 0.6 mmHg) en los pacientes a los que se les administró dalcetrapib así como de la proteína C reactiva [44, 45].

Anacetrapib

Esta molécula posee mayor capacidad de inhibición de la CETP que el torcetrapib. Los sujetos que recibieron este fármaco tuvieron incremento en los niveles de C-HDL

mayores al 100% y disminución de C-LDL hasta en un 40% [46, 47]. El efecto en la modulación de los lípidos sanguíneos se propone que es causado por el incremento en el eflujo de colesterol. Adicionalmente, se encontró una disminución en la señal proinflamatoria inducida por TNF- α , es decir, disminución en la expresión de VCAM-1, ICAM-1, MCP-1 y E-selectina [48-50]. Sin embargo, no se demostró una diferencia significativa en la incidencia de eventos cardiovasculares hasta el momento [51]. El ensayo clínico REVEAL (Evaluación Aleatorizada de los Efectos del Anacetrapib a través de la Modificación de los Lípidos) brindará mayor información acerca de la eficacia del fármaco.

Evacetrapib

Muy recientemente un ensayo fase III fue suspendido debido a la falta de eficacia de este fármaco entre los individuos con alto riesgo cardiovascular [52]. En estudios anteriores se encontró un incremento en los niveles de C-HDL y la disminución del C-LDL y que además no presentaba respuesta hipertensiva [53].

Tiromiméticos

Los tiromiméticos son fármacos que simulan la actividad de la hormona T₃ o triyodotironina. Su administración provoca un incremento en la expresión del receptor de LDL (LDLR) y de Apo A1 lo cual provoca una disminución del C-LDL e incremento C-HDL debido al aumento del catabolismo de las lipoproteínas. Sin embargo, las dosis a las cuales se observan estos efectos tienen efectos cardiovasculares adversos por lo que su uso ha sido cuestionado y discontinuado [54].

Agonistas de PPAR- α

Este grupo de fármacos actúan sobre el receptor proliferador activado por peroxisomas alfa (PPAR- α). Comúnmente se les denomina fibratos y son una clase de ácidos carboxílicos anfipáticos que fueron inicialmente sintetizados como derivados del ácido oxisobutírico en la década de los 1950's [55].

En numerosos estudios se ha demostrado la eficacia de la monoterapia con fibratos en la disminución de los triglicéridos y es considerado su efecto principal [56-59]. Algunos meta análisis han reportado que la terapia con fibratos reduce los niveles de

triglicéridos hasta un 36% y que incrementa los niveles de C-HDL hasta en un 10%. Sin embargo, éste último no se considera como uno de los efectos principales de los fibratos [60]. Adicionalmente, se han observado disminuciones de alrededor del 8% en el C-LDL pero este efecto depende del nivel de hipertrigliceridemia del paciente [61, 62].

Los fibratos disminuyen la secreción de VLDL ricas en triglicéridos e incrementan el catabolismo de lipoproteínas con alto contenido de los mismos. Esto tiene como consecuencia un incremento en el tamaño de las LDL y HDL con la disminución en la densidad de partícula [63-65]. Sin embargo, es controversial si la modificación en las subclases de LDL podría ser un factor para predecir el riesgo cardiovascular [66].

Los resultados sobre prevención de eventos cardiovasculares en general han sido inconsistentes. El gemfibrozil posee un efecto significativo en la prevención de eventos coronarios [57, 59]. En contraste, en el Estudio de Prevención de Infarto con Bezafibrato (BIP) y el Estudio de Intervención y Disminución de Eventos en Diabetes con Fenofibrato (FIELD), no mostraron un beneficio significativo en los efectos primarios de infarto al miocardio y muerte súbita o eventos coronarios, respectivamente [56, 58].

La prescripción de los fibratos para incrementar farmacológicamente los niveles de colesterol-HDL surgió del hecho que el gen de la Apo AI tiene un elemento de respuesta para PPAR- α en su promotor [67]. De esta manera, era válido postular que al elevar la cantidad de Apo AI disminuyera el riesgo cardiovascular. No obstante, la evidencia sobre el beneficio clínico del uso de fibratos se reduce a pacientes con triglicéridos elevados que además poseen características del síndrome metabólico, y no se asocia con las elevaciones de C-HDL [68]. Es por esta razón que en las guías terapéuticas actuales, se recomienda el uso de fenofibrato combinado con estatinas aunque este tratamiento tampoco ha arrojado resultados concluyentes sobre su efectividad ante la prevención de eventos cardiovasculares [69-71].

A pesar de la evidencia que demuestra que el incremento en los niveles de C-HDL no se traduce en una disminución en el riesgo cardiovascular, se suman los niveles de HDL drásticamente disminuidos observados en sujetos que presentan mutaciones en genes involucrados en el metabolismo o estructura de las HDL, sin que esto suponga

necesariamente un aumento en el riesgo cardiovascular de los individuos portadores. A continuación se describen algunos de estos casos.

Apo AI Milano y Apo AI París

La primera mutación reportada en el gen Apo AI fue la mutación no sinónima de arginina por cisteína en la posición 173, llamada Apo AI Milano. Posteriormente se reportó una nueva sustitución de arginina por cisteína pero en la posición 151, denominada Apo AI París. Ambas son mutaciones que ocurren naturalmente en los humanos y se han reportado muy pocos casos en el mundo, todos ellos heterocigotos [72, 73].

Los portadores de estas mutaciones presentan niveles extremadamente bajos de HDL-C, un incremento en la tasa de catabolismo de la Apo AI, e hipertrigliceridemia moderada, lo cual, como ya se mencionó anteriormente, podría estar considerado asociado a un alto riesgo cardiovascular [57, 74]. Además, ambas proteínas mutadas tienen una marcada tendencia a formar homodímeros y heterodímeros con Apo AII y apo AIV [75-77]. Sin embargo, los individuos portadores no presentan ninguna diferencia en el grosor de la íntima-media de la carótida cuando son comparados con individuos sanos que viven bajo las mismas condiciones ambientales y tampoco han presentado enfermedad cardiovascular prematura [78].

Lo anterior sugiere cierto grado de protección cardiovascular en los portadores y se ha llegado a proponer que la Apo AI Milano es una mutación con ganancia de función [79, 80]. Numerosos estudios funcionales se han llevado a cabo para comprender los mecanismos por los que esto ocurre; la primera propuesta es que la generación de partículas inusualmente pequeñas, las cuales son el signo característico para ambas mutaciones, son aceptores potentes del colesterol celular y esto contribuiría a su actividad ateroprotectora [81, 82]. También se sugiere que estas partículas pequeñas sufren mayor degradación proteolítica y presentan una deficiencia para asociarse a LCAT, lo que resulta en una baja relación entre los ésteres de colesterol y los triglicéridos presentes en su núcleo [83-86].

El uso de los proteoliposomas basados en Apo AI Milano recombinante como medida terapéutica para reducir las lesiones aterosclerosas se ha probado en algunos estudios con humanos [87-89]. A pesar de que los primeros resultados demostraron

en un número reducido de pacientes no sólo un arresto en el crecimiento de la placa aterosclerosa, sino una disminución en el volumen de la misma, estas observaciones no se pudieron comprobar en estudios posteriores que utilizaron una muestra poblacional de mayor tamaño [90]. Así, el uso de Apo AI Milano como tratamiento de la aterosclerosis sigue bajo debate debido a resultados contradictorios tanto en estudios en humanos como en modelos animales.

Enfermedad de Tánger

Mutaciones en el gen que codifica para el transportador ABCA1 se han reportado como causales de la enfermedad de Tánger, una enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por niveles bajos de C-HDL, o incluso indetectables en los individuos homocigotos, deposición de ésteres de colesterol en el sistema retículo endotelial y tráfico celular aberrante [91-93]. Lo anterior tiene como resultado un incremento del tamaño de las amígdalas, esplenomegalia y en algunos casos neuropatía periférica [11, 94].

Debido a su perfil lipídico modificado, se ha puesto especial atención en la posible implicación del gen ABCA1 y la progresión de la aterosclerosis, más que en cualquier otra característica clínica de la enfermedad [95]. Se han llevado a cabo diversos estudios para determinar si los individuos portadores de las mutaciones presentan un mayor riesgo cardiovascular, comparados con individuos controles con niveles de C-HDL normales a altos. Los resultados hasta el momento no son concluyentes, ya que sólo algunos pacientes con enfermedad de Tánger presentan una progresión rápida de la placa aterosclerosa mientras que otros no lo hacen [96-98]. Recientemente se ha propuesto que ABCA1 podría tener otras funciones en el tráfico vesicular de las células además de su papel en el eflujo de colesterol, lo cual explicaría en parte esta diversidad de resultados [99]. Independientemente del verdadero papel del ABCA1, la inconsistencia de eventos cardiovasculares en los pacientes con enfermedad de Tánger no es congruente con el TRC.

Fish Eye Disease (FED)

Esta enfermedad se caracteriza por niveles de C-HDL muy bajos, además de la presencia de depósitos de colesterol en sitios específicos como: riñón, eritrocitos,

médula ósea y córnea, por lo que ésta última se torna opaca [100]. Consiste en una mutación en el gen en que codifica para la enzima LCAT, la cual habitualmente es parcial ya que sólo se pierde la actividad de alfa-LCAT pero se conserva la de beta-LCAT. Es decir, no se esterifican los ésteres de colesterol de las HDL, pero sí de VLDL y LDL [101, 102]. Los pacientes con FED son hipoalfalipoproteinémicos, con niveles de colesterol-HDL alrededor de 5 mg/dL, hecho que debería manifestarse por un desarrollo acelerado de aterosclerosis a luz del TRC [57]. Sin embargo, no ha sido descrito ningún caso con enfermedad arterial coronaria prematura en pacientes con FED [103].

Debido a lo anterior, no se ha establecido una relación directa entre la deficiencia de LCAT y la aterosclerosis. En otros estudios han informado que no existe relación entre la aterosclerosis y mutaciones en el gen *LCAT*, y hasta el momento, los estudios animales no han sido concluyentes al respecto [104].

Toda esta evidencia remarca el hecho de que la hipótesis del TRC no explica la función ateroprotectora de las HDL. El TRC no hace predicciones correctas, sugiriendo que el paradigma de que las HDL protegen contra la aterosclerosis porque eliminan el colesterol excedente de las células periféricas es incorrecto o incompleto. Otro dato que debe considerarse es que una gran parte del colesterol es sintetizado en el hígado y es precisamente este órgano el sitio donde las HDL son sintetizadas [105]. El mecanismo de secreción de partículas HDL expuesto con anterioridad podría ser afín a la idea de que estas partículas son las principales acarreadoras del colesterol hepático en el plasma, sin que hasta el momento se conozcan las implicaciones de ello sobre los tejidos periféricos. Por lo tanto, se han comenzado a explorar otros posibles mecanismos, principalmente el papel del endotelio vascular, como el sitio donde se establece la lesión aterosclerosa, así como las interacciones de éste con las lipoproteínas.

Disfunción endotelial e inflamación: papel de la óxido nítrico endotelial (eNOS).

El endotelio es una monocapa celular que recubre a los vasos sanguíneos y linfáticos. Más allá de su función como barrera mecánica en el tejido vascular, se ha demostrado

que el endotelio regula procesos diversos; modula el proceso de trombogénesis, controla la tonicidad vascular y la capacidad de proliferación tanto propia como del músculo liso de los vasos y es fundamental durante los procesos de migración y diapédesis de neutrófilos y monocitos [106-109].

La perturbación de las funciones del endotelio se denomina disfunción endotelial. Si bien algunos autores la interpretan como la activación de endotelio, es considerado al evento temprano y central en la aparición de la aterosclerosis [110-112].

La disfunción endotelial se caracteriza por la disminución en la disponibilidad de óxido nítrico (NO). Este fenómeno es el resultado del aumento de la degradación o bien la disminución en la actividad de la eNOS [109, 113].

La eNOS es una enzima que cataliza la producción de NO, a partir de la L-arginina. Casi todas las funciones endoteliales antes mencionadas dependen en alguna medida de la integridad del sistema L-arginina-eNOS-NO. Además, la actividad de la eNOS es el punto donde convergen numerosas vías de señalización; su alteración provoca modificaciones en casi todos los aspectos de la función endotelial [114, 115]. La eNOS está localizada en el aparato de Golgi y las vesículas citoplasmáticas dentro de las células endoteliales y tiene una expresión constitutiva [116]. Es en ese organelo donde la enzima sufre modificación postraduccional a través de la adición de grupos palmitoilo de manera reversible y demás se miristoila de manera irreversible [117]. Ambas modificaciones se realizan de manera simétrica en las dos subunidades que conforman a la eNOS y son las responsables de su estabilización en la membrana plasmática [118]. Ya en la membrana, se ubica en caveolas, que son microdominios membranales caracterizados por su alto contenido de colesterol [119]. Además de su característica composición lipídica, la caveolina 1 es el componente proteico principal de las caveolas y forma estructuras oligoméricas de alto peso molecular [120]. Las células endoteliales también regulan a eNOS a través de modificaciones postraduccionales, destacando las fosforilaciones en los residuos de treonina 495 y los de serina 114, 615, 633 y 1177. Esta última se considera un sitio importante de activación de la enzima a través de diversas cinasas como Akt, AMPk, CAMK-2, PKA y PKG lo que ha sido asociado a una gran cantidad de efectos terapéuticos en el tejido vascular [121]. La eNOS interactúa directamente con la caveolina una vez ubicada en las caveolas y esta interacción se encuentra regulada mediante la fosforilación de los

sitios antes mencionados. Esta interacción inhibe la actividad de la eNOS, pero puede ser revertida rápidamente mediante el aumento en la concentración del complejo Ca^{2+} /calmodulina [122].

HDL y función endotelial

Actualmente hay un interés creciente para entender los efectos de las HDL en el tejido vascular, lo cuales se ha propuesto sean potencialmente antiaterogénicos y que podrían ser independientes al TRC. A este respecto, en algunos estudios se han demostrado que las HDL inhiben la oxidación de las LDL, la migración de las células de músculo liso, la agregación plaquetaria y disminuyen los efectos asociados a la disfunción endotelial. Esto último se atribuye a que las HDL estimulan la proliferación y supervivencia celular, la síntesis de NO y a que inhiben la expresión de moléculas de adhesión como la Molécula de Adhesión Intercelular 1 (ICAM-1) y la Molécula de Adhesión Vascular Celular 1 (VCAM-1) [123-125]. Es necesario mencionar que los efectos antes mencionados son muy variables en individuos con enfermedad coronaria, lo cual podría deberse a cambios en la estructura, en la función de las HDL o ambas [126-128].

La mayor parte de los estudios actuales sobre la función de las HDL se han centrado en el papel de las proteínas que las conforman. Sin embargo, el papel de los lípidos permanece elusivo. En el presente trabajo está enfocado al papel de éstos últimos y su impacto en la funcionalidad de las partículas HDL.

La esfingomielina es el segundo fosfolípido más abundante en la estructura de las HDL; ha sido poco estudiado a pesar de su abundancia y un pequeño número de trabajos sugieren un papel anti-inflamatorio e incluso que podría revertir el tamaño de la lesiones aterosclerosas en ratones deficientes de Apo E [129]. Los mecanismos moleculares para explicar estos efectos no se han descrito completamente pero existe numerosa evidencia sobre un metabolito de esfingomielina, la esfingosina-1-fosfato (S1P) que podría proporcionar pistas a este respecto. Algunas de las funciones mejor estudiadas de la S1P sobre las HDL son descritas a continuación.

Recientemente se demostró que un componente común de las HDL, S1P, que se acumula principalmente en las fracciones HDL₃, participa en la relajación inducida por

las HDL a través de la activación de la eNOS en un modelo de arteria de ratón a través de sus receptores membranales S1P₁, S1P₃ [130, 131]. Esta evidencia sugiere que la S1P podría jugar un papel importante dentro de los mecanismos antiaterogénicos de las HDL.

Otro receptor clave en la función de las HDL es SR-BI, una proteína transmembranal que también se ubica en las caveolas y que se propone como uno de los receptores de HDL; se ha propuesto que este receptor de membrana internaliza ésteres de colesterol provenientes de las HDL [17]. Además, estudios previos han demostrado que las HDL modulan la actividad de la eNOS a través de la señalización inducida por SR-BI [132, 133]. Es decir, la señalización inducida por SR-BI y S1P a través de sus receptores S1P₁ y S1P₃, convergen en la activación de la eNOS como se esquematiza en la figura 1.

Si bien se han realizado numerosos estudios acerca de las posibles funciones del receptor SR-BI, sigue siendo una molécula de la cual no se conocen datos como su estructura cristalográfica o los posibles mecanismos moleculares mediante los cuales capta ésteres de colesterol o partículas de HDL. Por lo tanto, es necesario el estudio de las características bioquímicas y celulares del SR-BI, para comprender mejor la actividad de las HDL.

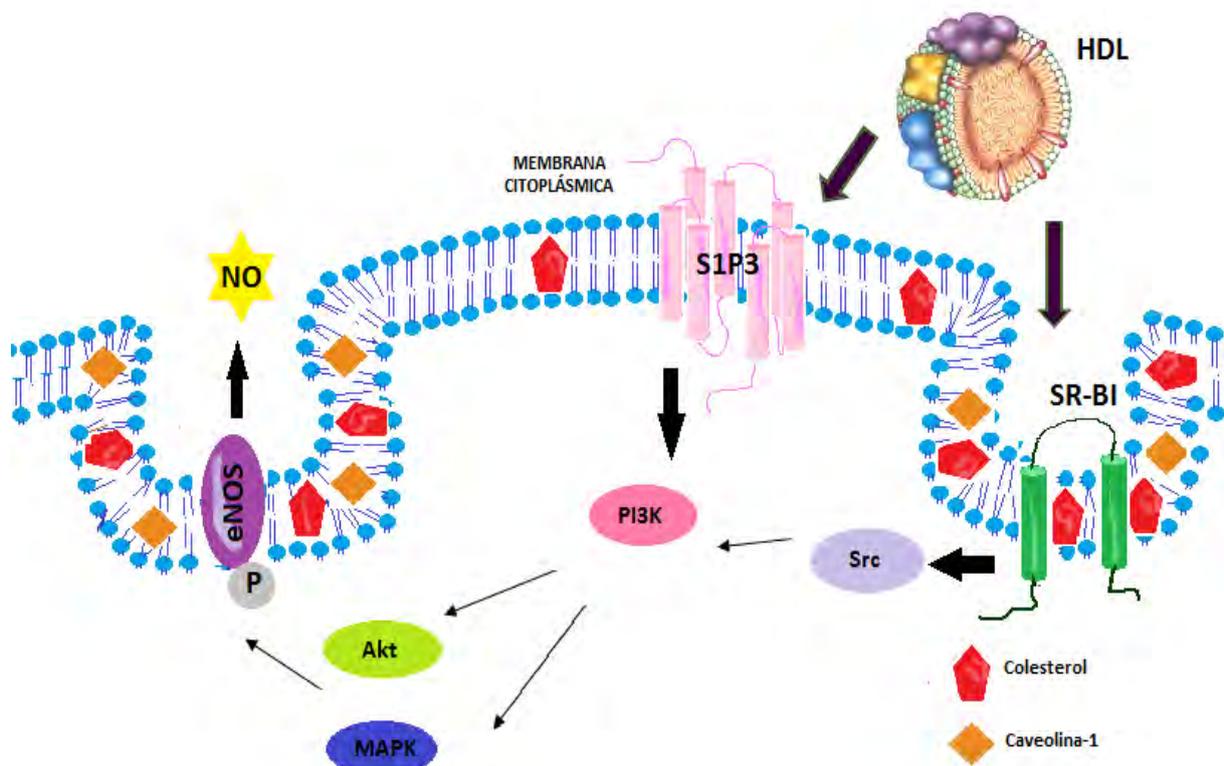


Figura 1. Receptores con los que interactúan las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y la inducción de señales intracelulares en el endotelio. La esfingosina-1-fosfato (S1P) interactúa con el receptor para esfingosina-1-fosfato tipo 3 (SIP₃) activando a la cinasa de fosfatidil inositol (PI3K) que a su vez activa a la vía de proteína cinasa b (Akt) y las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK). Ambas vías convergen en la fosforilación de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS). Además, las HDL pueden interactuar con el receptor scavenger clase B, tipo I (SR-BI), lo que fosforila a la cinasa de tirosina del tipo Src y nuevamente a PI3K y las vías antes mencionadas, es decir, la eNOS es una molécula clave en la señalización inducida por las HDL y éstas tienen varios mecanismos que redundan en su activación y por consecuencia en la producción de óxido nítrico (NO).

HDL e inhibición de moléculas de adhesión.

La expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales se considera el primer paso para la migración de los monocitos hacia el espacio subendotelial o la íntima de las paredes en las etapas tempranas del establecimiento de la lesión aterosclerosa [134, 135]. Numerosos estudios indican que las HDL provenientes de

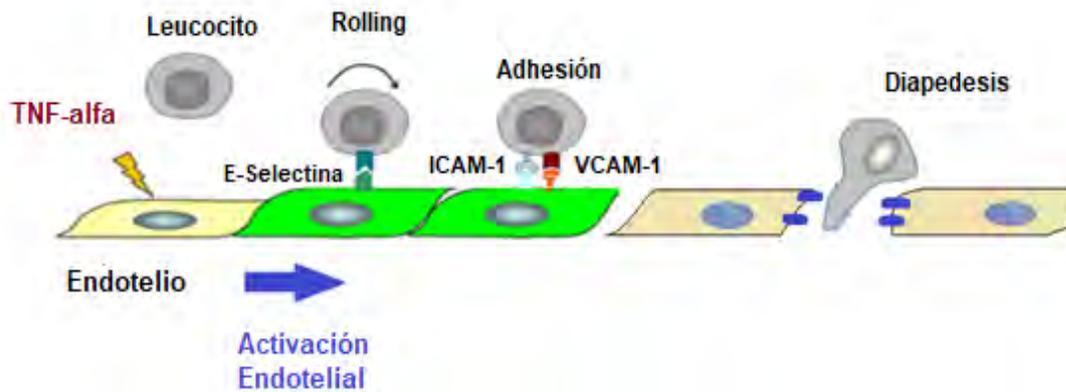
sujetos sanos inhiben la expresión de moléculas de adhesión en cultivos de células endoteliales [136].

Por otra parte, una vez más se ha observado que S1P es el mediador de las respuestas de sobrevivencia celular y de migración inducidas por las HDL sobre las células endoteliales mediante la inhibición de las moléculas de adhesión. Se ha propuesto que sus receptores S1P₁ y S1P₃, son claves en este proceso [137-139].

Sin embargo, los efectos de la S1P sobre el endotelio no son fáciles de explicar, ya que cuando la S1P es agregada al medio de cultivo, induce la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 a través de la activación del Factor Nuclear κ B (NF- κ B) [140]. Lo anterior podría sugerir que se requiere que la S1P se encuentre asociada a las HDL para que se observe su efecto inhibidor de las moléculas de adhesión [140].

Adicionalmente, la activación de la eNOS es un potencial mecanismo adicional en la inhibición de la expresión de moléculas de adhesión (figura 2), sugiriendo que varios procesos inducidos por las HDL convergen en un mismo efecto [139, 141]. Recientemente se reportó que el uso de un ARN pequeño de interferencia específico para el gen que codifica a SR-BI revierte el efecto inhibidor de las HDL sobre la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 [140]. Nuevamente, la señalización inducida por SR-BI y S1P convergen en las funciones antiinflamatorias de las HDL, sugiriendo que todas ellas son moléculas clave para comprender la actividad de estas lipoproteínas sobre el endotelio y los eventos tempranos de la aterosclerosis.

A



B

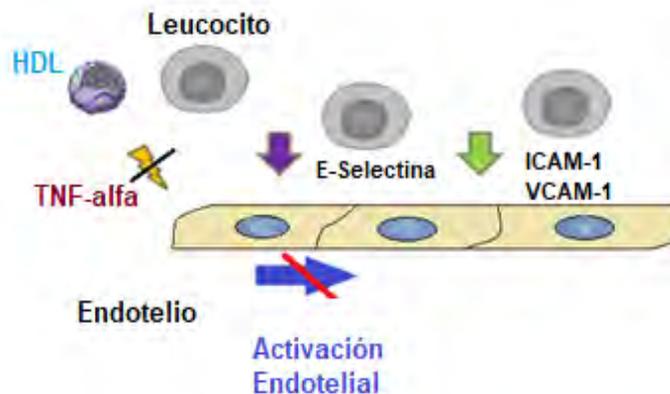


Figura 2. Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) inhiben la expresión de moléculas de adhesión. Panel A: cuando un estímulo proinflamatorio como el factor de necrosis tumoral (TNF-alfa) es recibido por las células endoteliales, éstas incrementan la expresión de moléculas de adhesión como E-selectina y la moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), además de inducir la expresión de moléculas propias de la activación endotelial como la moléculas de adhesión vascular celular (VCAM-1). Todas ellas promueven los fenómenos de rodamiento de los leucocitos circulantes que implica una adhesión débil. Más tarde se provoca adhesión sostenida lo cual culminará con la diapédesis de estas células hacia el espacio subendotelial. Panel B: en presencia del mismo estímulo proinflamatorio más HDL, se ha demostrado que estas inhiben la expresión del RNA mensajero (mRNA) de las moléculas de adhesión antes mencionadas. Se propone que lo anterior ocurre a través de un mecanismo que involucra la inactivación de la esfingosina cinasa, la disminución en la producción de esfingosina-1-fosfato y la regulación a la baja del factor de transcripción factor nuclear κB (NF- κB), responsable de modular la expresión de moléculas de adhesión y citocinas proinflamatorias.

HDL y la modulación del contenido lipídico membranar

Además de las funciones mencionadas anteriormente, se ha propuesto que las HDL también modulan el contenido lipídico de la membrana celular, principalmente de colesterol, lo que remodelaría microdominios como las caveolas, indispensables para la estabilización de proteínas membranales clave como eNOS y SR-BI [142].

Debido a que SR-BI fue el único receptor conocido para HDL, desde hace tiempo existe un interés sobre describir nuevos receptores de estas lipoproteínas. Algunos estudios en ratones deficientes del receptor SR-BI y los transportadores ABCA1 y ABCG1 se observó que la captación de colesterol por parte de las HDL no se eliminaba por completo [143, 144].

Se ha propuesto que la ecto-F1-ATPasa como un receptor para Apo AI [145]. El complejo enzimático de la ecto-F1-ATPasa está ubicado habitualmente dentro de la mitocondria como parte de la cadena respiratoria. Sin embargo, se demostró que también puede ser expresada de manera ectópica en la membrana plasmática de las células endoteliales, donde funciona en sentido contrario al descrito cuando se localiza en la mitocondria [145, 146]. Se propone que la unión de Apo AI a la ecto-F1-ATPase estimula la hidrólisis de ATP extra celular en ADP y fosfato. El ADP producido induce la activación de los receptores purinérgicos P2Y y de esta manera se induce la señalización intracelular que induce transcitosis de HDL y Apo AI pobre en lípidos [146]. De manera interesante, las células endoteliales expresan varios tipos de receptores P2Y-ADP, lo cual sugiere que podrían llevar a cabo el mecanismo antes descrito [147].

También se ha descrito que las HDL pueden ser internalizadas para luego realizar transcitosis en el endotelio y que son liberadas en la íntima arterial [148, 149]. El fenómeno de transcitosis o transporte transendotelial se ha propuesto también como alternativa a la internalización de partículas. Algunos autores proponen que podría ser un mecanismo para evitar la formación de depósitos de colesterol en el espacio subendotelial; sin embargo esta hipótesis no ha sido comprobada hasta el momento [150].

Como se ha mencionado, existen evidencias que no apoyan al TRC como el mecanismo que explique las propiedades antiaterosclerosas de las HDL. Es por ello que la internalización de las partículas de HDL, un fenómeno descubierto desde la

década del 1970, y sus posibles implicaciones en la homeostasis celular sean una opción para explicar dicha evidencia contradictoria [151]. Para tal efecto, es necesario plantear que las HDL son vectores que podrían regular el equilibrio lipídico de las membranas celulares; a continuación se mencionan las evidencias que soportan esta hipótesis.

La mayor parte de colesterol que estructura las células del organismo es sintetizado en el hígado. En vista de que este colesterol hepático debe ser transportado a las células periféricas a través del plasma en el cual es insoluble, se requiere de una lipoproteína que sirva como vector. Dado además que las HDL también son sintetizadas en el hígado, es probable que las HDL participen como acarreadoras o vectores del colesterol hepático para llevarlo a los tejidos periféricos [105].

Por otra parte, el receptor SR-BI es uno de los pocos receptores conocidos para las HDL y actualmente se sabe que es expresado no sólo por los tejidos esteroideogénicos, sino en general por todos los tejidos [152]. La expresión tan ubicua del SR-BI sugiere que la movilización de colesterol desde o hacia todos los tejidos es indispensable. En el mismo contexto, cuando se incuban HDL con células CHO de ovario de hámster, la interacción de las HDL con el SR-BI de la membrana celular da lugar a una reducción del tamaño de las partículas después del tiempo de incubación [153]. Esto sugiere que las HDL podrían depositar parte de sus lípidos en el interior de la célula, lo cual podría tener efectos que aún no se han estudiado.

Tomando todo lo anterior como antecedente, el presente trabajo aborda el fenómeno de la internalización de los diferentes componentes de las HDL, su localización intracelular y comportamiento cinético, con énfasis en los componentes lipídicos como el colesterol y la esfingomielina así como la participación del receptor SR-BI en este proceso. En vista de que una posible entrega de lípidos a la célula por parte de la HDL podría repercutir en las funciones de esta última, exploraremos el papel de la composición de lípidos de las HDL sobre la modulación de la expresión de moléculas de adhesión y la activación de la eNOS de células endoteliales en cultivo.

JUSTIFICACIÓN

Desde el descubrimiento del receptor de LDL (receptor Apo B/E), los paradigmas que se han generado a través de la investigación en el metabolismo de lipoproteínas han coincidido en que la actividad antiaterosclerosa de las HDL se debe al TRC. Sin embargo, el colesterol es sintetizado casi exclusivamente por el hígado y debe ser transportado en el plasma hacia las células periféricas, por lo que es necesario un mecanismo de transporte en el plasma. Es probable que dicho transporte plasmático del colesterol sea llevado a cabo por las HDL.

A este respecto, se ha demostrado que las HDL son internalizadas por las células endoteliales, sin que hasta el momento se conozca la relevancia biológica de este proceso. Debido a que muchas de las células periféricas tienen receptores para HDL como el SR-BI, surge la posibilidad de que estas lipoproteínas sean un muy buen candidato para entregar los lípidos hepáticos a las células.

Lo anterior plantea una idea opuesta al paradigma actual; las HDL realizarían la función de transporte de colesterol del hígado hacia las células periféricas. Esta propuesta podría explicar por qué los resultados de estudios de intervención dirigidos hacia las HDL no han arrojado respuestas concluyentes sobre el papel de estas lipoproteínas en la prevención del riesgo cardiovascular.

HIPÓTESIS

La internalización de colesterol y esfingomielina de las HDL es un proceso fisiológicamente relevante que puede modular el contenido de lípidos de la célula endotelial y así generar cambios en la activación de la eNOS y la expresión de las moléculas de adhesión.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la relevancia del influjo de colesterol y el efecto que tienen los componentes lipídicos (esfingolípidos y colesterol) sobre la función endotelial y su participación en la regulación de la actividad enzimática de eNOS mediante ensayos en cultivos de células endoteliales.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Generar y caracterizar cultivo de células endoteliales humanas de la línea HMEC-1.
- Analizar la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1, y VCAM, inducida por TNF α en células HMEC-1 en cultivo en presencia de HDL empleando un ensayo de citofluorometría.
- Estandarizar el método para determinar el influjo de lípidos de las HDL hacia las células endoteliales utilizando marcadores fluorescentes.
- Determinar el influjo de colesterol promovido por las HDL aisladas de sujetos control y HDL reconstituídas (rHDL) en células HMEC-1 así como el papel de SR-BI en este proceso.
- Determinar cómo la composición lipídica de las rHDL modulan la expresión de moléculas de adhesión y la fosforilación de la eNOS en la S1177.

METODOLOGÍA

Donadores voluntarios de plasma para obtención de HDL

Etapa 1

Sujetos clínicamente sanos (n=3), con índice de masa corporal (IMC) no mayor a 24.9 kg/m², sin antecedentes de enfermedad coronaria, con perfil de lípidos normal (colesterol total <200 mg/dL, triglicéridos <150 mg/dL), sin hábito de tabaquismo activo, que no estén bajo tratamiento farmacológico de ningún tipo, que no hayan sido expuestos a cirugía en las últimas 6 semanas, sin antecedentes familiares de diabetes mellitus, o enfermedades cardiovasculares y que laboran en el departamento de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INC).

Criterios de exclusión: Anomalías en el perfil bioquímico que sugieran enfermedad hepática, renal o tiroidea, desconocida por el donador.

Etapa 2

Sujetos sanos (n=81 divididos en 4 lotes), con índice de masa corporal (IMC) no mayor a 29.9 kg/m², sin antecedentes de enfermedad coronaria, con perfil de lípidos normal (colesterol total <200 mg/dL, triglicéridos <150 mg/dL), sin hábito de tabaquismo activo, que no estén bajo tratamiento farmacológico de ningún tipo, que no hayan sido expuestos a cirugía en las últimas seis semanas, sin antecedentes familiares de diabetes mellitus o enfermedades cardiovasculares, reclutados del servicio de consulta externa del INC y los controles del banco de sangre del mismo Instituto.

Criterios de exclusión: Anomalías en el perfil bioquímico que sugieran enfermedad hepática, renal o tiroidea, desconocida por el donador.

Muestras

Se obtuvieron muestras de sangre venosa (6 mL) de los voluntarios sanos en ayuno en tubos con EDTA como anticoagulante. Se separó el suero o plasma del paquete globular y fue procesado de inmediato para el análisis de lípidos, y aislamiento de HDL.

Aislamiento de HDL

Las HDL se separaron por ultracentrifugación secuencial (Beckman Optima TLX) a partir de plasma, de acuerdo al siguiente esquema: A) Ajuste de densidad del plasma a 1.063 g/mL con KBr sólido y ultracentrifugación durante 2:30 h a 100000 rpm. B) Ajuste de densidad a 1.21 g/mL con KBr sólido. Ultracentrifugación por 3 h a 100000 rpm C) Ajuste del sobrenadante con solución de KBr a densidad 1.25 g/mL. En este paso se disminuyó la cantidad de albúmina residual que está presente con las HDL. Posterior al aislamiento, las HDL se dializaron en solución PBS pH=7.5. Se cuantificó colesterol, fosfolípidos y proteína para realizar el ajuste de concentración a los experimentos posteriores.

Marcaje de HDL con Alexa Fluor 488

Se preparó una solución de HDL dializadas en PBS a una concentración final de 2 mg/mL. Esta tinción se realiza sobre las proteínas de las partículas de HDL aisladas de plasma o rHDL. Se utilizó el kit MOLECULAR PROBES Alexa 488 (Life Technologies, Waltham, MA USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las HDL marcadas se concentraron en una unidad de filtración para centrífuga (con un tamaño de poro de 30 kD) agregando 1 mL de PBS y centrifugando a 3000 g a 4° C. Se repitió el lavado tres veces.

Preparación de HDL reconstituídas con 25-NBD-colesterol y NBD-esfingomielina

Se agregó a un tubo de vidrio el equivalente a 1 mg/mL de colesterol en hexano; se añadieron 10 mg/mL de fosfatidil colina más el lípido marcado en diferentes proporciones de masa total de lípidos.

Se evaporaron los solventes con N₂ mientras se agitaba en un vórtex a velocidad media. Posteriormente se agregaron 500 mg de Apo AI humana y se adicionó gota a gota solución de colato de sodio mientras se continuaba con la agitación y se obtenía una solución transparente. Se dializó con PBS-SSI cambiando constantemente la solución para eliminar las sales.

En el caso de requerir marcaje doble, las rHDL y dializadas se sometieron a marcaje con Alexa Fluor 568, como se indicó en el apartado anterior.

Cultivo de células endoteliales

Se cultivaron células endoteliales de microvasculatura de la línea HMEC-1 con medio MCDB-131 suplementado con 10 mM de glutamina, 1 µg/mL de hidrocortisona, 20 µg/mL de factor de crecimiento endotelial y 15% de suero fetal bovino según las recomendaciones de la ATCC. Se cultivaron en frascos de 74 cm² a 37°C y 7% de pCO₂ hasta obtener confluencia de 70-80%.

Como modelo control se utilizaron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) las cuales fueron aisladas de donadores sin antecedentes heredofamiliares de enfermedades metabólicas o cardiovasculares. El aislamiento se realizó usando colagenasa tipo II al 0.2 % y cultivadas con medio de cultivo M-199 suplementado con 20% de suero fetal bovino. Durante los experimentos se utilizó un pool de células provenientes de 3 cordones umbilicales diferentes con la finalidad de que nuestros resultados fueran más representativos de la población control.

Curva dosis-respuesta de TNF-alfa

Una vez cultivadas bajo las condiciones antes mencionadas, las células se recuperaron utilizando tripsina-EDTA y se colocaron 150 000 células por pozo en una placa de 24 pozos. Se incubaron durante toda la noche. Al día siguiente se incubó con medio MCDB-131 suplementado con 7% suero pobre en lípidos y se agregó TNF-alfa en los pozos en un rango de concentraciones de 15 ng/mL a 37.5 ng/mL.

Las células se incubaron durante cinco horas bajo las mismas condiciones temperatura y pCO₂ después de lo cual se recuperaron las células de cada pozo de la placa mediante tratamiento con colagenasa. A continuación se fijaron con FIX & PERM Cell fixation and permeabilization kit (INVITROGEN, Thermo Fisher Scientific laboratories, Austria) y se resuspendieron en solución PBS-BSA-azida de sodio para proceder a su tinción con anticuerpos y posterior análisis por citimetría de flujo.

Cuantificación de moléculas de adhesión

Las células HMEC-1 se recuperaron mediante tratamiento con tripsina-EDTA y se colocaron 100000 células por pozo en placas de 24. Una vez en los pozos las células se incubaron durante 4h con 7% suero fetal bovino pobre en lípidos y/o HDL 50 mg/dL o rHDL equivalentes a 100 µg/ mL de proteína Algunos experimentos se realizaron en

presencia de HDL agregando TNF-alfa 10 ng/mL directamente al pozo. En otros casos, se realizó un lavado con medio de cultivo antes de agregar el TNF-alfa. En ambos casos se incubó durante 5 h con el estímulo.

Posteriormente, se recuperaron las células de cada pozo mediante tratamiento con colagenasa. A continuación se fijaron con FIX & PERM Cell fixation and permeabilization kit (INVITROGEN, Thermo Fisher Scientific Laboratories, Austria) y se resuspendieron en solución PBS-BSA-azida de sodio para proceder a su tinción con anticuerpos.

Se realizó una variante de este ensayo utilizando BLT-1, el inhibidor específico e irreversible para SR-BI. El inhibidor se incubó durante 1h y se colocó a concentraciones finales de 100, 150 y 300 μ M para luego continuar con el tratamiento con HDL y TNF-alfa como fue mencionado con anterioridad.

Ensayo de internalización

Se preparó una placa de 24 pozos colocando en el fondo de cada uno, un cubreobjetos redondo de 12 mm de diámetro recubierto de poli-L-lisina. Posteriormente las células HMEC-1 o HepG2 se resuspendieron mediante un tratamiento con tripsina EDTA y se colocaron 100 000 células por pozo. Se incubaron toda la noche con medio MCDB-131 suplementado después de lo cual se reemplazó por medio con 7% de suero fetal bovino deslipidado.

Las células se incubaron en estas condiciones durante 1 h a 37°C después de lo cual se agregó BLT-1 en DMSO a una concentración de 100 μ M en los pozos correspondientes. Una vez transcurrida esta incubación, se agregaron HDL o rHDL según el caso usando una concentración final de 100 μ g/mL. Los pozos que fueron utilizados como control se estilaron además con HDL sin marca a una concentración 25 veces mayor, cuidando que cada condición tuviese un duplicado para realizar todos los controles necesarios. Se incubaron las células a 37°C durante 20 minutos, posteriormente se realizó un lavado con medio de cultivo sin suplementar y se incubaron durante 1 h a 4°C. Se realizaron tres lavados con PBS y se agregó a cada pozo paraformaldeído al 4% para fijar las células. Una vez fijadas se recuperaron los cubreobjetos colocados en el fondo de cada pozo y se agregaron 70 μ L DAPI a una

concentración de 5 µg/mL. Se incubaron durante cinco minutos y se lavaron tres veces con PBS. Finalmente se montaron los cubreobjetos en un portaobjetos utilizando resina y se realizó su lectura en un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 700.

El análisis de los datos fue realizado mediante el cálculo de la fluorescencia total corregida (CFCF) = Densidad integrada – (Área de la célula seleccionada x fluorescencia media del fondo). El cálculo se realizó de manera manual célula por célula hasta contabilizar el total de las imágenes obtenidas utilizando el programa ImageJ y definiendo una medición del fondo adyacente a cada célula contabilizada.

Adicionalmente, la técnica se adaptó para su lectura mediante citometría de flujo. En este caso no se utilizaron cubreobjetos redondos en el fondo del pozo y al finalizar la incubación las células se trataron con colagenasa y se resuspendieron en PBS para su lectura.

Fosforilación de eNOS en la S1177

Posterior al ensayo de internalización como el descrito anteriormente, se agregaron anticuerpos anti-eNOS humana hecho en ratón y anti-peNOS S1177 humana hecho en conejo (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Se incubaron durante 1 h y se agregaron los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo asociado a FITC y anti-IgG de ratón marcado con Alexa 405. Las imágenes fueron se obtuvieron a través de microscopía confocal y el análisis de las mismas se realizó de la manera descrita.

Citometría de flujo

Las células fijadas se distribuyeron de manera homogénea en tres series de tubos para citometría para cada ensayo. A la primera serie no se le agregó marca, y los cinco tubos se utilizaron como control del experimento.

A la serie número dos se agregaron anticuerpos anti-ICAM-1 conjugado con FITC y anti-VCAM-1 conjugado con ficoeritrina (PE), ambos con e IgGk de ratón, reactividad anti-humano (Biolegend, San Diego, EUA) a una concentración 1:500.

A la serie número 3 se agregó anticuerpo anti-SR-BI sin conjugar, con reactividad anti humano hecho en conejo (Novus, CO, EUA) a una dilución 1:200 y anticuerpo secundario anti-IgG de conejo hecho en ratón marcado con PE (Biolegend, San Diego, EUA) diluido 1:200.

Adicionalmente, en un experimento independiente se usó anticuerpo anti-CD105 acoplado a alofococianina (APC) usando el volumen sugerido por el fabricante (Biolegend, San Diego EUA).

Todos los anticuerpos se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Posteriormente se lavaron con solución PBS-BSA-azida de sodio y se resuspendieron para su análisis por citofluorometría en un equipo FACSCalibur (Beckton Dickinson, San Jose, EUA). Se utilizó el software CellQuest Pro (BD Biosciences, San Jose, EUA) para la obtención de los datos crudos de cada experimento.

Sistema de órgano aislado

Se sacrificaron ratas Wistar macho (n=7) mediante administración intraperitoneal de pentobarbital. Se realizó la disección de la arteria aorta torácica, se lavó con solución de Krebs y se limpió cuidadosamente del tejido conectivo remanente. A continuación se cortaron cuatro anillos de aproximadamente 5 mm de grosor.

Dos de ellos se colocaron en tubos, uno correspondiente al control con solución de Krebs y otro correspondiente a HDL a una concentración de 50 mg/dL en solución Krebs ambos en un volumen final de 300 μ L. Se incubaron a Baño María con una temperatura constante de 37°C y oxigenación regular durante 4h . Los dos anillos de aorta restantes se utilizaron como control del ensayo y se montaron en dos cámaras para órgano aislado con 10 mL de solución de Krebs a 37°C.

Se ajustó la tensión gancho-transductor de manera que su tensión basal fuera de 1 g (40 mm del papel milimétrico utilizado para realizar el registro); la tensión se mantuvo constante durante todo el experimento. Se realizaron lavados con solución de Krebs a cada una de las cámaras a intervalos de 15 minutos durante 1h y finalmente se dejó estabilizar el tejido durante 15 minutos. Se agregaron 15 μ L de fenilefrina (Phe) 1 mM

para inducir una precontracción en el tejido y así poder evaluar la relajación inducida por la acetilcolina.

Cuando el registro alcanzó la meseta, se agregó acetilcolina (ACh) en dosis crecientes, de 50 μ M hasta 100 mM.

Se obtuvo el registro correspondiente y se lavó el tejido tres veces seguidas para eliminar el fármaco después de lo cual se dejó estabilizar el tejido durante 15 minutos.

Una vez transcurrido el tiempo se procedió a realizar una curva de Phe, agregando las soluciones de fármaco en dosis crecientes, 50 μ M hasta 100 mM.

Se obtuvo el registro correspondiente. Al terminar el tiempo de incubación del anillo de aorta con la solución control y con la solución HDL 50 mg/dL, se realizó el montaje de los tejidos en las cámaras de órgano aislado y se repitió el procedimiento de lavado y estimulación como se describió anteriormente.

Se obtuvieron los registros correspondientes a los anillos de aorta que fueron incubados y se realizó la curva concentración-respuesta correspondiente usando el programa GraphPad Prism versión 6.0.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 21.0 (IBM). Se realizaron pruebas de estadística descriptiva y se descartó que las variables analizadas se comportaban de acuerdo a una distribución normal por lo que se utilizaron pruebas no paramétricas en la mayor parte de los casos: U de Mann-Whitney para dos muestras independientes y Kruskal-Wallis para k muestras independientes. En los casos en los que se observó una distribución normal se utilizaron las pruebas paramétricas t de Student y ANOVA de una vía.

RESULTADOS

Caracterización de células HMEC-1

Después de establecer el cultivo de la línea celular HMEC-1 se compararon sus características con las células HUVEC, el modelo de endotelio de referencia. Verificamos la morfología celular a través de microscopía de campo claro y adicionalmente revisamos que el tamaño y granularidad fueran semejantes usando citometría de flujo. En la figura 3, se observa que las características morfológicas son similares.

HMEC-1

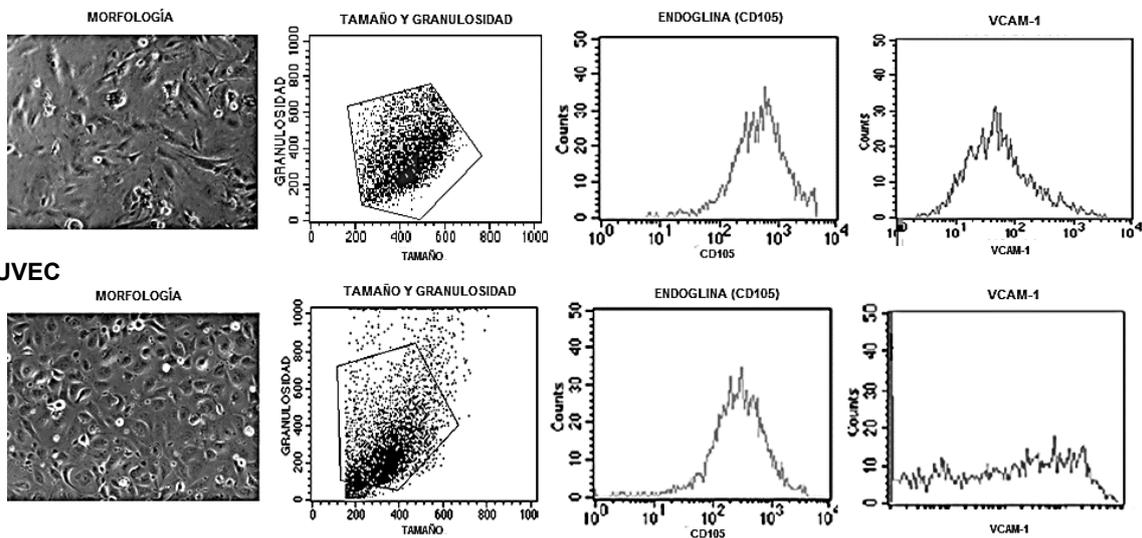


Figura 3. Comparación entre células HMEC-1 y HUVEC. Se establecieron los parámetros de tamaño y granulosidad propios las células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1) en comparación con las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) ello con la finalidad de establecer los controles de calidad necesarios para los ensayos realizados mediante citofluorometría, así como la expresión de marcadores endoteliales típicos como la molécula de adhesión vascular celular (VCAM-1) y endoglina en ambos tipos celulares.

Posteriormente, cuantificamos la expresión de marcadores endoteliales típicos como endoglina (CD 105) y la inducción de VCAM-1 después de un estímulo de TNF-alfa. Ambos tipos celulares expresan endoglina de manera similar (Figura 3). Además, ambas expresan VCAM-1 al ser estimuladas con TNF-alfa pero la expresión de VCAM-1 en HUVEC fue más heterogénea posiblemente debido a la variación interindividual propia de un cultivo primario.

Expresión de SR-BI en células HMEC-1

Debido a que no existen informes de la expresión de SR-BI en las células HMEC-1, en una primera etapa se determinó por citometría de flujo que las células efectivamente expresan esta proteína. Para este ensayo se utilizaron células mononucleares de sangre periférica como control negativo de expresión de SR-BI; como control positivo, se utilizaron células HUVEC. En la figura 4 se presentan los resultados representativos y se observa que las células HMEC-1 y HUVEC expresan en la misma medida el receptor SR-BI. Cuando se llevó a cabo el análisis del histograma obtenido, hay ligeras diferencias debido a que las células HMEC-1 son más heterogéneas en morfología en comparación con las células HUVEC. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia es la misma en ambos casos.

Adicionalmente se probó si la expresión de SR-BI se modificaba por alguno de los tratamientos utilizados en los ensayos; los resultados se muestran en la figura 5; se observa que no existen diferencias en la expresión de SR-BI entre las células del pozo control con respecto de las células provenientes de los tratamientos.

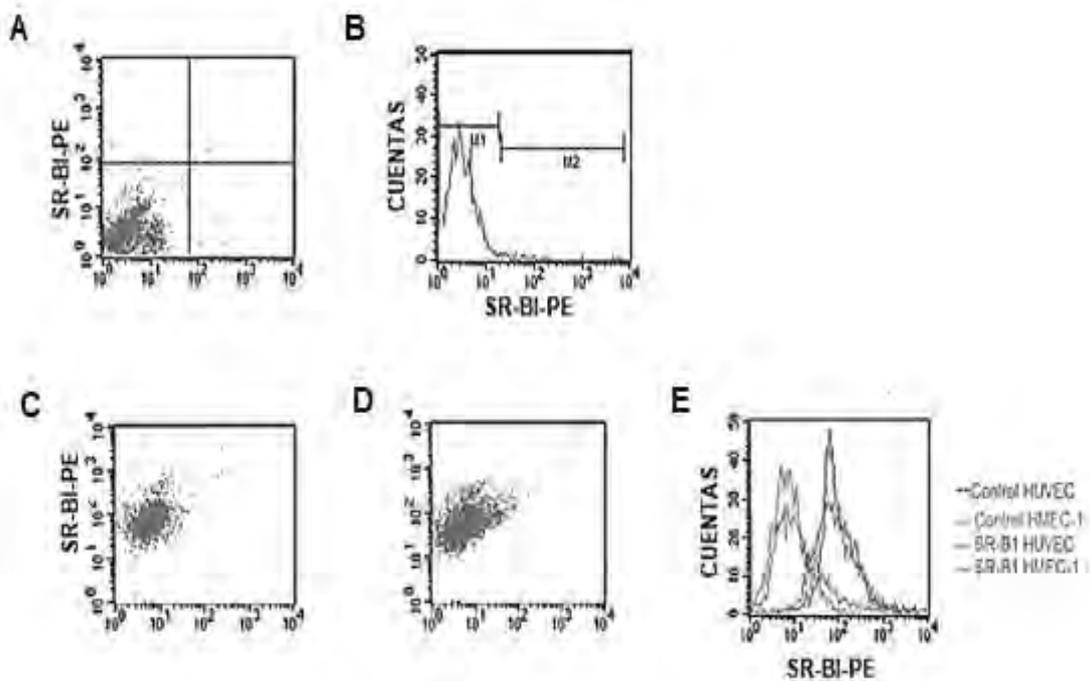


Figura 4. Las células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1) expresan al receptor scavenger clase B tipo I (SR-BI). A) y B) Tinción de células mononucleares de sangre periférica con anticuerpo anti-SR-BI como se observa en el diagrama de puntos e histograma como control negativo. C) Tinción de las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) usando el mismo anticuerpo. D) Tinción de las células (HMEC-1). E) Histograma que representa las tinciones C y D, se muestran los controles sin anticuerpo y la tinción para ambos tipos celulares.

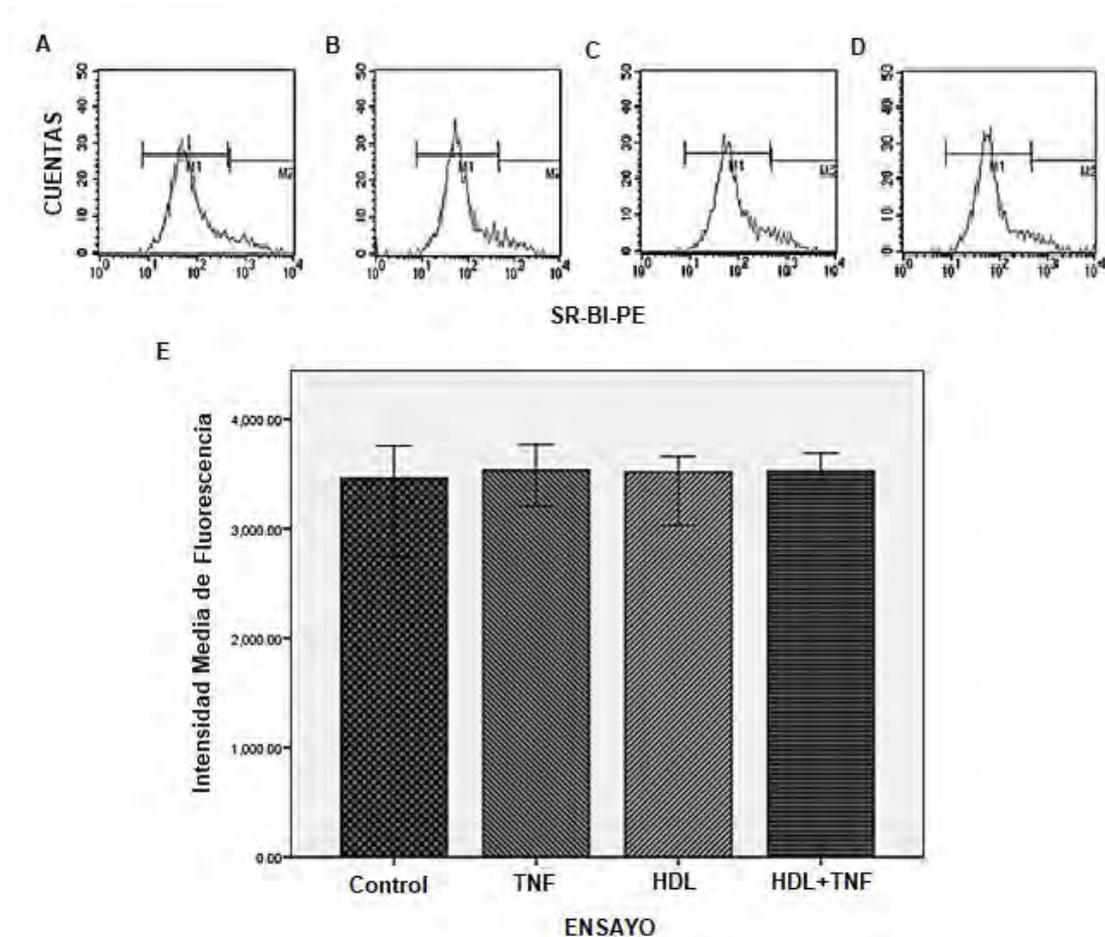


Figura 5. La expresión del receptor scavenger Clase B tipo I (SR-BI) no se modifica por los estímulos utilizados. Histogramas del análisis por citofluorimetría. A) Control. B) Células tratadas con factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) 15 ng/ μ L. C) Células preincubadas con lipoproteínas de alta densidad (HDL) a una concentración de 50 mg/dL. D) Células preincubadas con HDL a una concentración de 50 mg/dL y tratadas posteriormente con TNF-alfa 15 ng/ μ L. E) Gráfica resultados, se muestran las medianas. P de prueba de Kruskal-Wallis, n=7. Las barras de error representan un IC del 95%.

Curva concentración-respuesta de TNF-alfa

Con la finalidad de evaluar la concentración óptima para inducir la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en las células HMEC-1 y HUVEC para estandarizar el resto de nuestros experimentos, se realizó una curva dosis respuesta con cuatro concentraciones diferentes de TNF-alfa. La expresión de ambas moléculas se evaluó mediante los datos obtenidos a través del programa Cell Quest Pro.

En la figura 6 se observa que las concentraciones de 15 y 22.5 ng/mL son las que mejor inducen la expresión de ambas moléculas de adhesión en las células HMEC-1, determinado mediante el incremento de células dobles positivas (cuadrante superior derecho) y corroborado con los datos de intensidad media de fluorescencia. A partir de lo anterior, se determinó usar la primera concentración (15 ng/mL) en los experimentos posteriores. Cabe mencionar que las concentraciones de 30 y 37.5 ng/mL de TNF-alfa no incrementan la expresión de ICAM-1 o VCAM-1 de manera significativa, ello puede deberse a la saturación de receptores para TNF-alfa en la superficie celular (Figura 6).

Por lo tanto las concentraciones de TNF-alfa usadas para las HMEC-1 produjeron muerte celular con las concentraciones, por esa razón la curva de TNF-alfa fue de menor concentración para las HUVEC. Por lo que se realizó la curva dosis-respuesta de TNF-alfa para HUVEC, utilizando un rango más bajo de concentraciones: 0.75, 1.5, 2.25 y 5 ng/mL.. De igual manera, se cuantificaron ICAM-1 y VCAM-1 y se observó una expresión más heterogénea de ambos marcadores en las HUVEC cuando se compara el diagrama de puntos con los obtenidos para HMEC-1 (Fig. 6).

En este caso se determinó que la concentración óptima de TNF-alfa es 0.75 ng/mL, ya que la expresión de ambas moléculas de adhesión no cambia significativamente al incrementarse la dosis del estímulo.

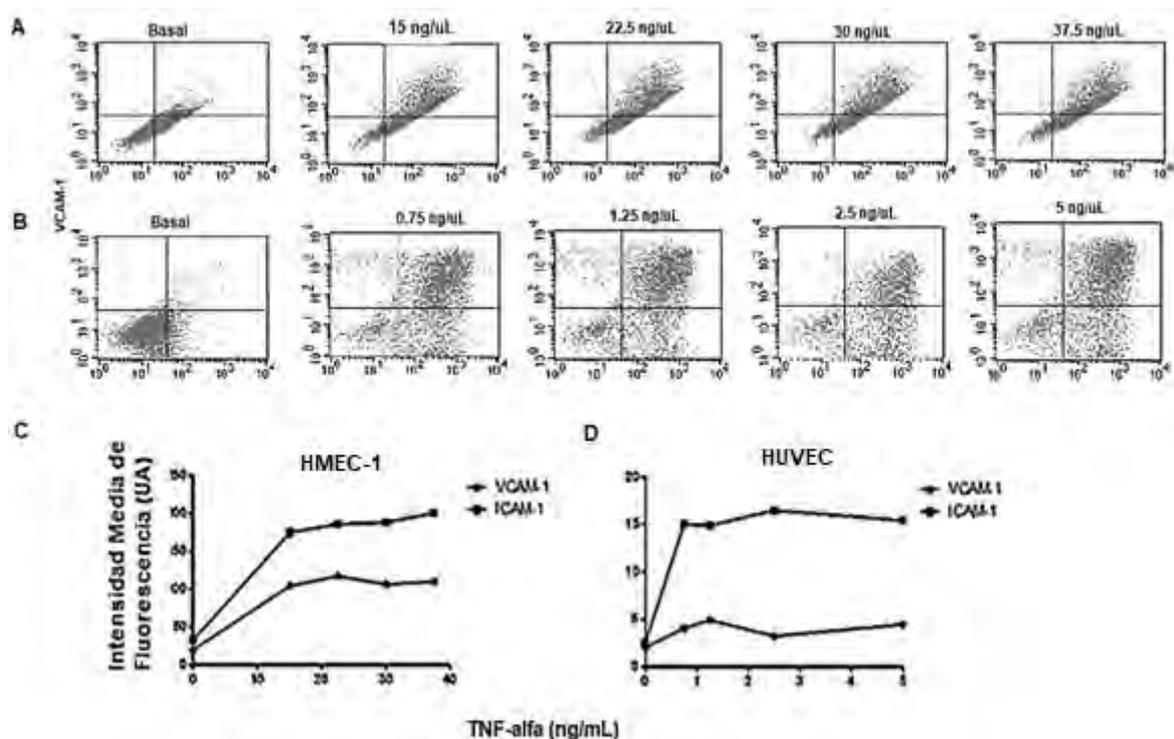


Figura 6. Diagramas de puntos de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en HMEC-1 (A) y HUVEC (B) en respuesta a dosis crecientes de TNF-alfa. En la parte inferior se presentan las curvas dosis-respuesta construidas a partir de las intensidades medias de fluorescencia para cada caso en células HMEC-1 (C) y HUVEC (D).

Efecto de las HDL sobre las células HMEC-1.

Los ensayos globales de células HMEC-1 incubadas con HDL aisladas de plasma de donadores sanos y TNF-alfa fueron analizados a partir de los datos estadísticos provistos por el programa CellQuest Pro, como se indicó en la sección de métodos. Al analizar los datos de expresión de ICAM-1 para cada uno de los ensayos se obtuvieron los resultados mostrados en la figura 7; se observa un incremento, estadísticamente significativo, en la expresión de ICAM-1 en las células que fueron tratadas con TNF-alfa [15 ng/mL]. Además, las células tratadas con HDL [50 mg/dL de colesterol] tienen una expresión significativamente diferente con respecto a las células tratadas con TNF-alfa [10 ng/μL].

Las células tratadas con HDL [50 mg/dL] expresan una menor cantidad de ICAM-1 que las controles. Adicionalmente, las células que recibieron tanto HDL [50 mg/dL] como TNF-alfa [10 ng/μL] expresaron menos ICAM-1 que las células únicamente

tratadas con TNF-alfa, lo que sugiere que las HDL presentan una actividad inhibitoria sobre la activación del endotelio tras un estímulo pro-inflamatorio. El comportamiento descrito se observa de igual manera con la expresión de VCAM-1 (figuras 7 y 8).

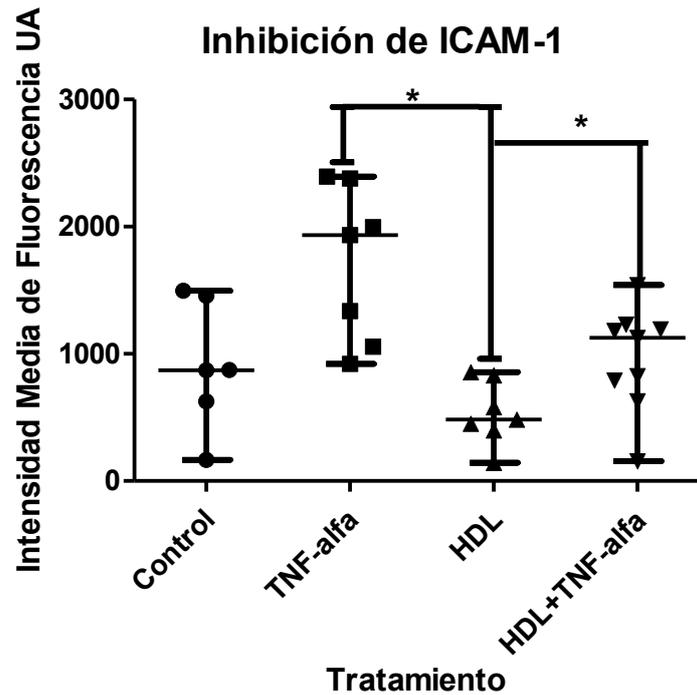


Figura 7. HDL inhiben la expresión de ICAM-1. La gráfica muestra el número de células que expresan ICAM-1 para cada tratamiento. P de U de Mann-Whitney < 0.05. n=7, las barras de error representan un IC de 95%.

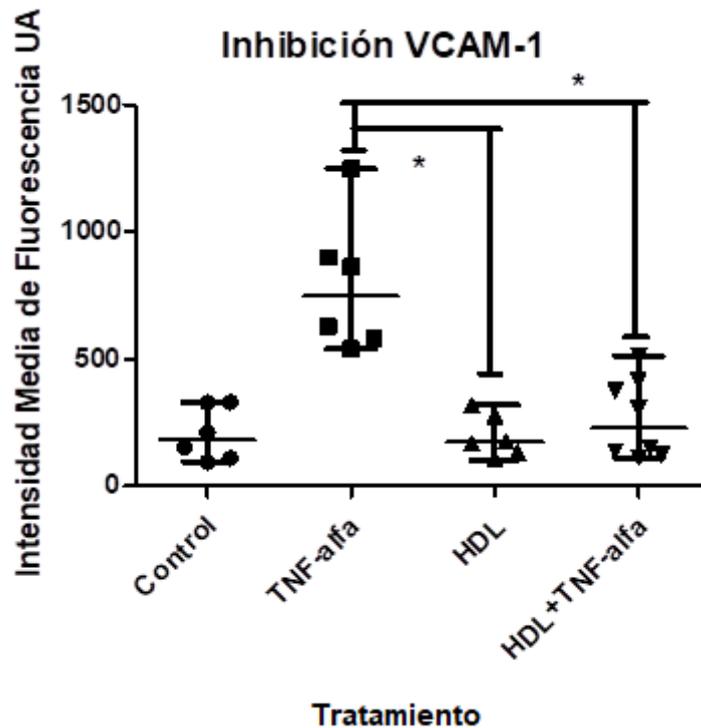


Figura 8. HDL inhiben la expresión de VCAM-1. La gráfica muestra el número de células que expresan ICAM-1 para cada tratamiento. P de U de Mann-Whitney. N=7, las barras de error representan un IC de 95%.

Una de las posibles explicaciones del efecto inhibitorio de la actividad de TNF-alfa por las HDL es que éstas ejerzan una función directamente sobre las células endoteliales o bien, que las partículas de HDL únicamente interactúen físicamente con el TNF-alfa impidiendo que éste se una al receptor membranal. Para probar cuál de éstas dos alternativas se lleva a cabo en nuestro modelo, se decidió agregar una condición en la que las HDL son eliminadas del medio de cultivo previo a agregar el TNF-alfa; estos pozos los identificamos como "lavados". La figura 9 muestra los resultados obtenidos en el ensayo; no existe diferencia en la expresión de ICAM-1 al realizar el procedimiento de lavado, indicando que el efecto de inhibición de la expresión que ejercen las HDL sobre las moléculas de adhesión probadas no se debe a que las lipoproteínas arresten el TNF-alfa.

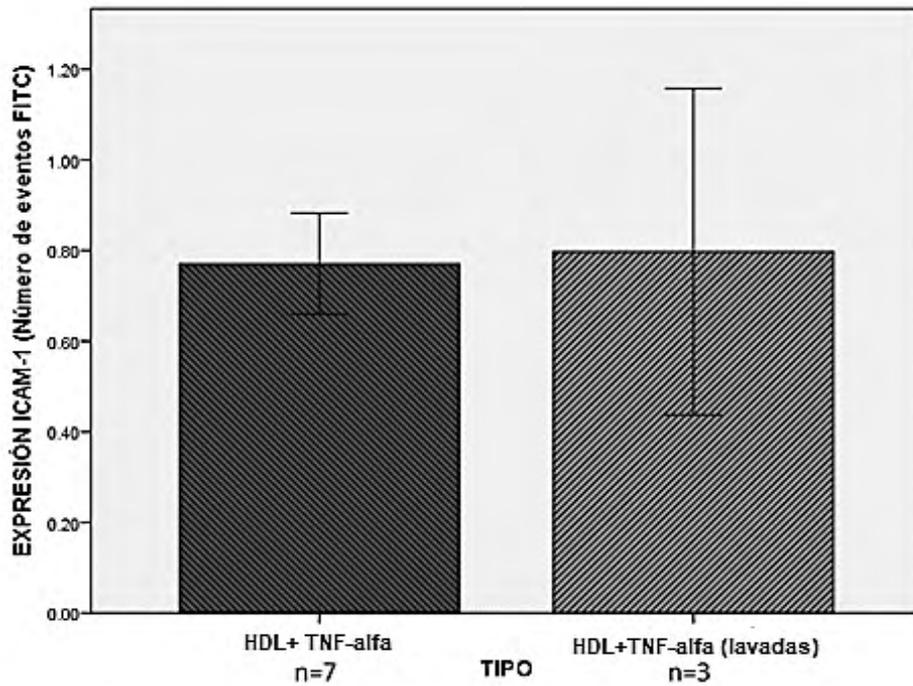


Figura 9. Expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) en células lavadas y con medio + HDL. Se graficaron las medianas \pm DE para cada grupo y al no se observó diferencia estadísticamente significativa tras realizar una prueba U de Mann-Whitney.

Por otra parte, debido a que un contaminante frecuente del aislamiento de HDL es la albúmina sérica, se realizó un ensayo incubando células HMEC-1 con albúmina sérica humana para descartar que parte de la actividad inhibitoria de las moléculas de adhesión se atribuyera a este factor común a los diferentes lotes de HDL. En la figura 10 se observa que no existe diferencia en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 entre las células control y las tratadas con albúmina, por lo que el efecto observado en las células tratadas con HDL no se debe a la albúmina presente.

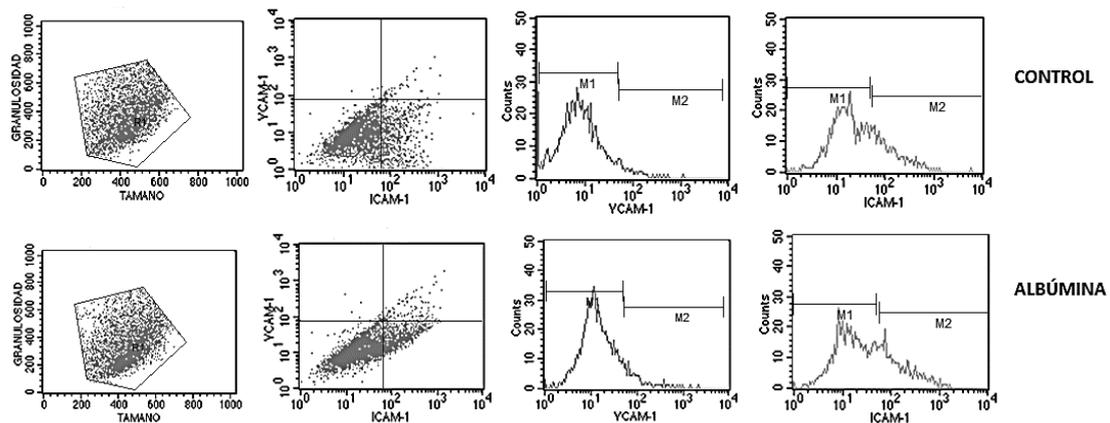


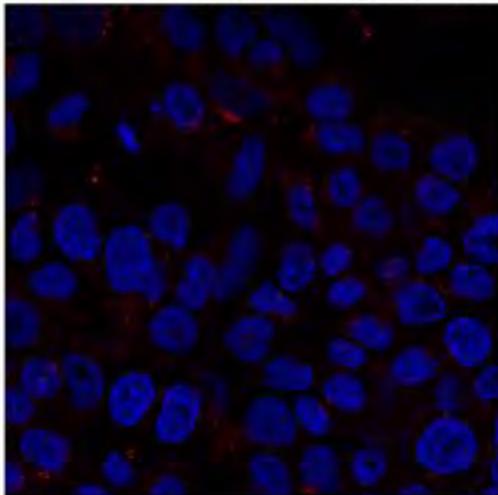
Figura 10. Expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en células incubadas con albúmina sérica humana VS control sin estímulo. Se muestra el diagrama de puntos y el histograma obtenido mediante citofluometría.

Ensayo de internalización de HDL en células HepG2.

Con el fin de estandarizar la técnica en la cual se evalúa la internalización de HDL, se utilizó un cultivo de la línea celular de hepatocarcinoma HepG2. Debido a que se sabe que las HDL son internalizadas por los hepatocitos, utilizamos estos ensayos como controles positivos.

La figura 11 ilustra los resultados obtenidos al marcar la porción proteica de las HDL con Alexa Fluor, la cual se observa en el canal rojo. Con el fin de normalizar la fluorescencia, se marcó en el canal azul a los núcleos celulares usando DAPI. En dicha imagen se puede observar que las células control internalizan menos partículas que las células tratadas. A partir de dicha técnica se realizaron modificaciones para llevar a cabo los ensayos de internalización en los dos tipos de células endoteliales empleados como modelo de estudio.

Control (HDL sin marca * HDL fluorescentes)



Experimento (HDL fluorescentes)

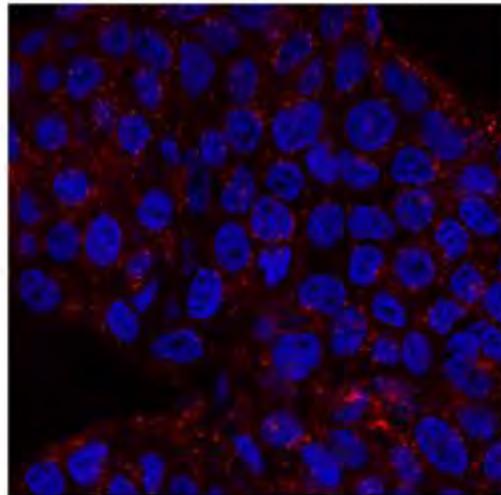


Figura 11. Internalización de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en células HepG2. HDL marcada con Alexa Fluor 58, núcleos celulares teñidos con DAPI.

Ensayos de internalización del HDL en células endoteliales

Posteriormente, se realizó la misma técnica en células HMEC-1 y HUVEC. Usando HDL marcadas con Alexa Fluor o bien, rHDL con 25-NBD-colesterol o NBD-esfingomielina, observamos la internalización de cada componente de las partículas de manera independiente. En la figura 12 se presentan los resultados representativos de los ensayos de internalización de proteína, colesterol y esfingomielina de HDL en células HMEC-1 y puede observarse que los tres componentes se encontraron en el interior de las células después de un periodo de incubación de 20 minutos.

Es importante remarcar el hecho de que este proceso se lleva a cabo en un periodo corto, mucho menor que el utilizado en ensayos de eflujo e colesterol que es de hasta 4h.

De manera interesante, la proteína de HDL se ubica en gránulos discretos en la región perinuclear mientras ambos lípidos utilizados, colesterol y esfingomielina, tienen una distribución mucho más difusa en el citoplasma. Lo anterior sugiere diferentes tipos de transporte y diferente destino para los componentes de la partícula HDL completa.

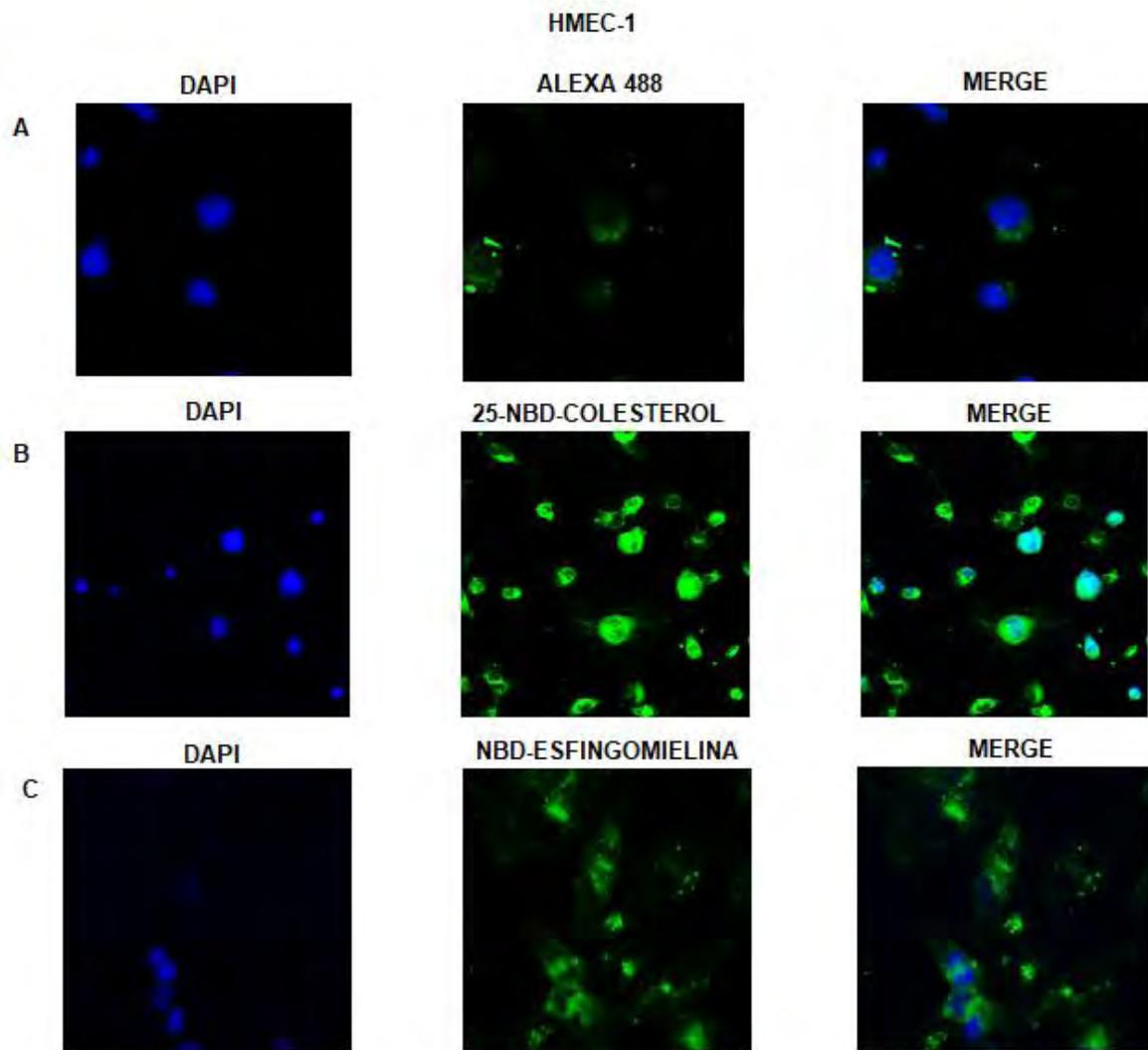


Figura 12. Internalización de los componentes de HDL en HMEC-1. Las HDL aisladas de donadores sanos se marcaron con Alexa Fluor 488 (verde) en su porción proteica (A). Se utilizaron también rHDL preparadas con 25-NBD-colesterol (verde) (B) o NBD-esfingomielina (verde) (C) con el fin de observar la distribución de cada componente. Todos los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI (azul). Imágenes representativas de microscopía confocal.

Por otra parte, en la figura 13 se presentan imágenes representativas obtenidas a través de microscopía confocal de los ensayos de internalización en HUVEC, el modelo endotelial de referencia. El comportamiento de los componentes de HDL es prácticamente el mismo que el de las HMEC-1, lo cual apoya a la validación de nuestro modelo propuesto.

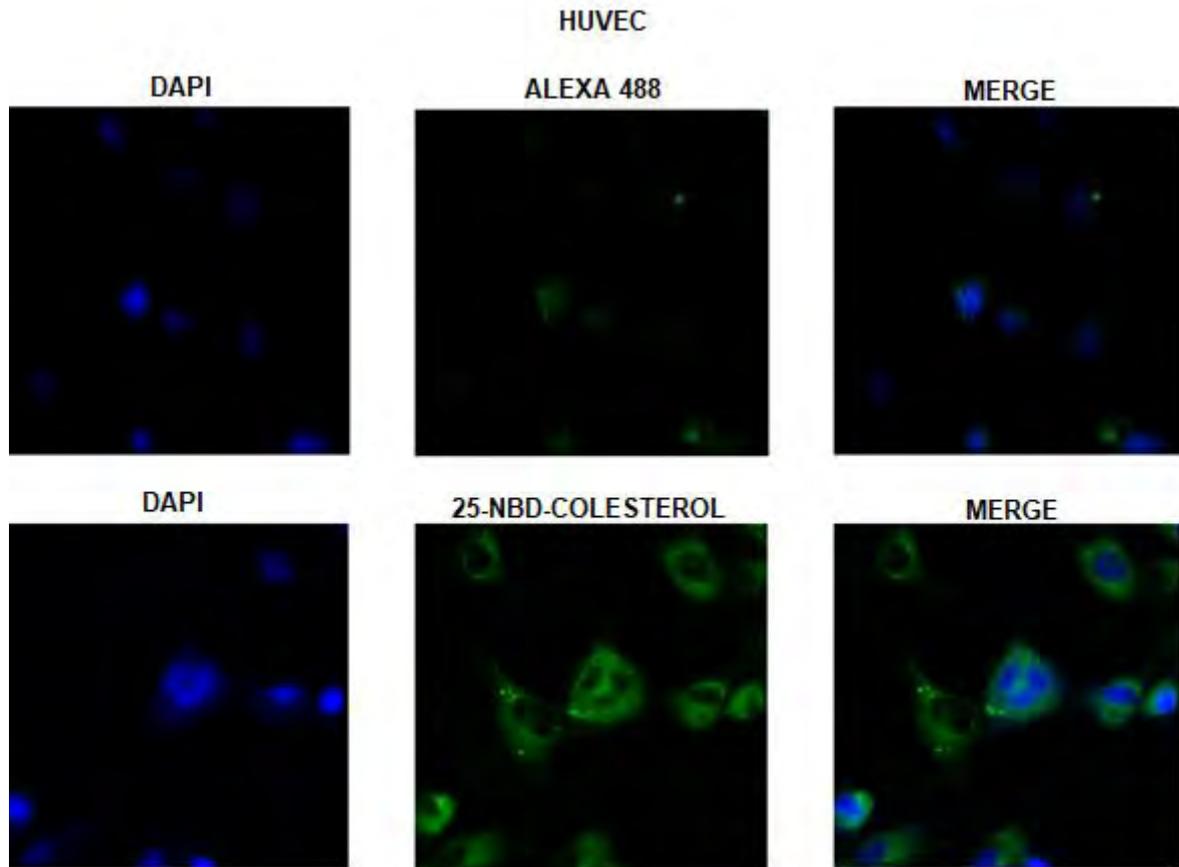


Figura 13. Internalización de los componentes de HDL en HUVEC. Las HDL aisladas de donadores sanos se marcaron con Alexa Fluor 488 (verde) en su porción proteica (A). Se utilizaron también rHDL preparadas con 25-NBD-colesterol (verde) (B) o NBD-esfingomielina (verde) (C) con el fin de observar la distribución de cada componente. Todos los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI (azul). Imágenes representativas de microscopía confocal.

Participación de SR-BI en la internalización de componentes de HDL

Con la finalidad de evaluar la participación del receptor SR-BI en el proceso de internalización de los diferentes componentes de las HDL se realizaron ensayos usando el inhibidor BLT-1, el cual se propone como específico y de unión irreversible.

En la figura 14 se presenta la internalización de la porción proteica de HDL en células HUVEC cuando se utiliza de BLT-1 (100 μ M), así como otras dos concentraciones superiores (150 y 300 μ M) para descartar que los efectos observados se debieran a una subdosis del fármaco.

El análisis célula por célula de la fluorescencia total corregida mostró datos con una alta variabilidad, debido tanto a la presencia de distintos planos focales en las imágenes obtenidas en el microscopio, como a la variación entre células del mismo campo.

Los datos globales obtenidos a través de dicho análisis, después de realizar una normalización, tomando en cuenta la condición sólo con HDL marcadas como el 100% de la respuesta y nos brindan una aproximación hacia el comportamiento de cada uno de los grupos experimentales (Fig. 14).

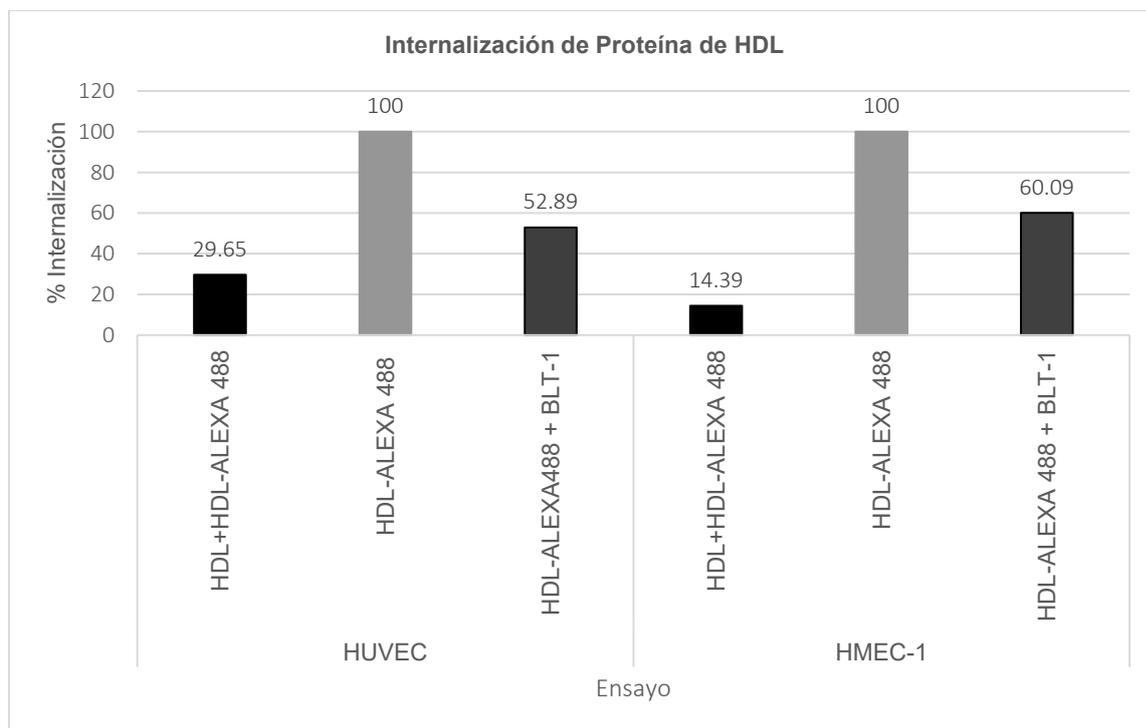


Figura 14. Internalización de HDL marcadas con Alexa 488 en células endoteliales. Comparación realizada con datos del análisis célula por célula en las imágenes obtenidas por microscopía confocal.

Para obtener datos cuantitativos, la técnica se modificó para realizar la lectura a través de citometría de flujo. Siguiendo con el esquema de los ensayos anteriores, se utilizaron HDL aisladas de sujetos sanos y marcadas con Alexa 488 o bien, rHDL preparadas con 25-NBD-colesterol o NBD-esfingomielina y tres concentraciones distintas de BLT-1 utilizando HMEC-1 como modelo y luego corroborando el comportamiento con HUVEC.

En la figura 15 se presentan los resultados para las HMEC-1. La primera fila corresponde a la internalización de proteína de HDL; las células internalizan en diferente proporción el contenido proteico de las partículas marcadas.

Al agregar BLT-1 a 100 μ M la proporción de células que internaliza menos cantidad de proteína HDL aumenta, mientras que el de células que internalizan más proteína marcada disminuye. Este comportamiento se puede interpretar como el efecto inhibitorio de BLT-1 ya que la entrada neta de partículas disminuye.

De manera interesante, al incrementar la dosis de inhibidor, el subgrupo de células que es capaz de internalizar más proteína HDL se incrementa, perdiendo el efecto de inhibición antes observado y este comportamiento se hace aún más notorio cuando se usó 300 μ g/ml de BLT-1.

En cuanto al colesterol y la esfingomielina, observamos que BLT-1 no tiene efecto sobre su internalización a ninguna de las dosis empleadas.

Adicionalmente utilizamos HUVEC para validar los resultados anteriores, y observamos el mismo comportamiento como se observa en la figura 16.

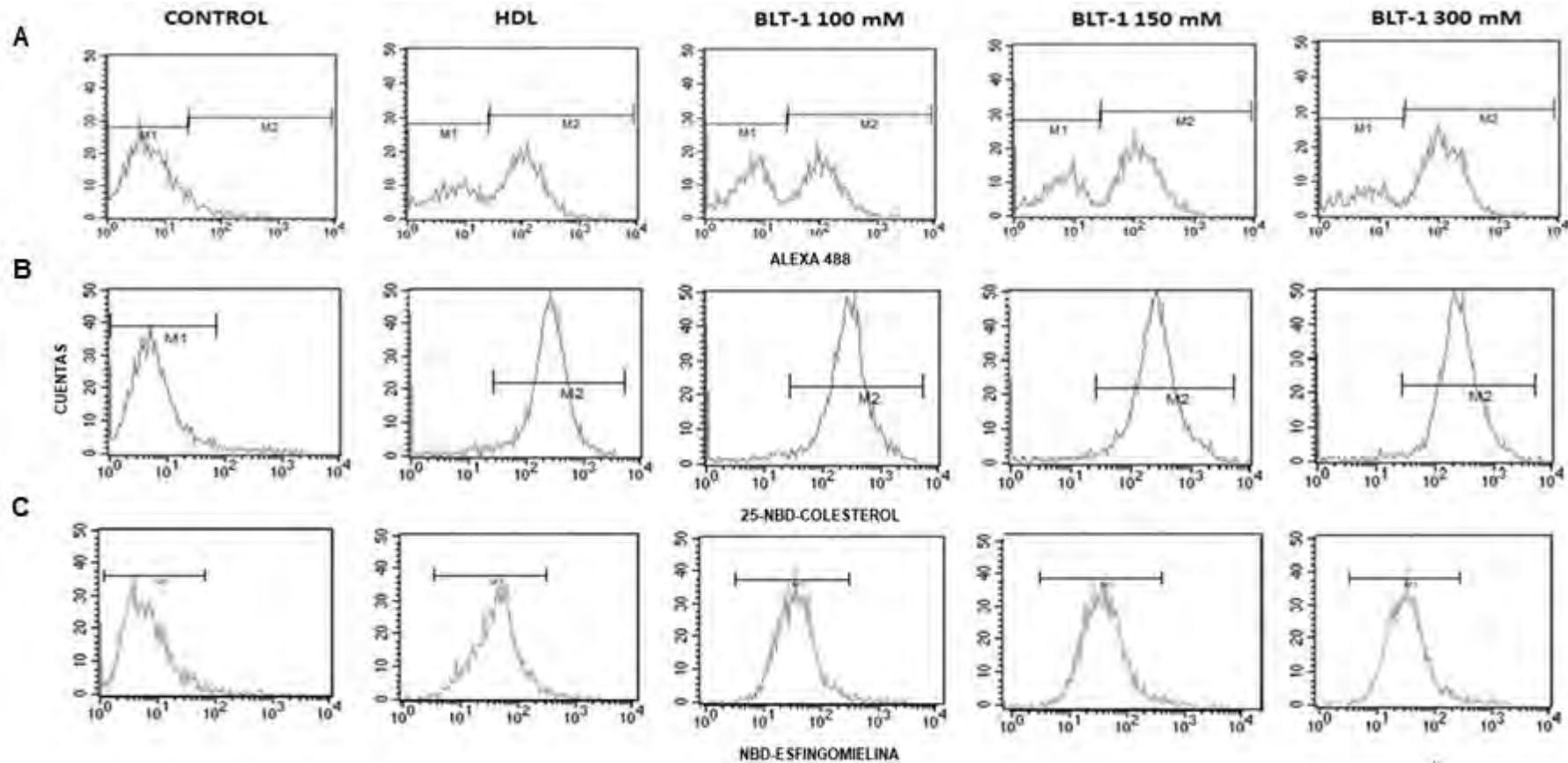


Figura 15. Contribución de SR-BI a la internalización los componentes de HDL en células HMEC-1 A) Efecto del BLT-1 sobre la internalización de proteína HDL marcada con Alexa 488. (B) Efecto de BLT-1 en la internalización de colesterol después de incubar a las HMEC-1 con rHDL preparadas con 25-NBD-colesterol. C) Efecto de BLT-1 en la internalización de esfingomielina usando rHDL sintetizadas con NBD-esfingomielina.

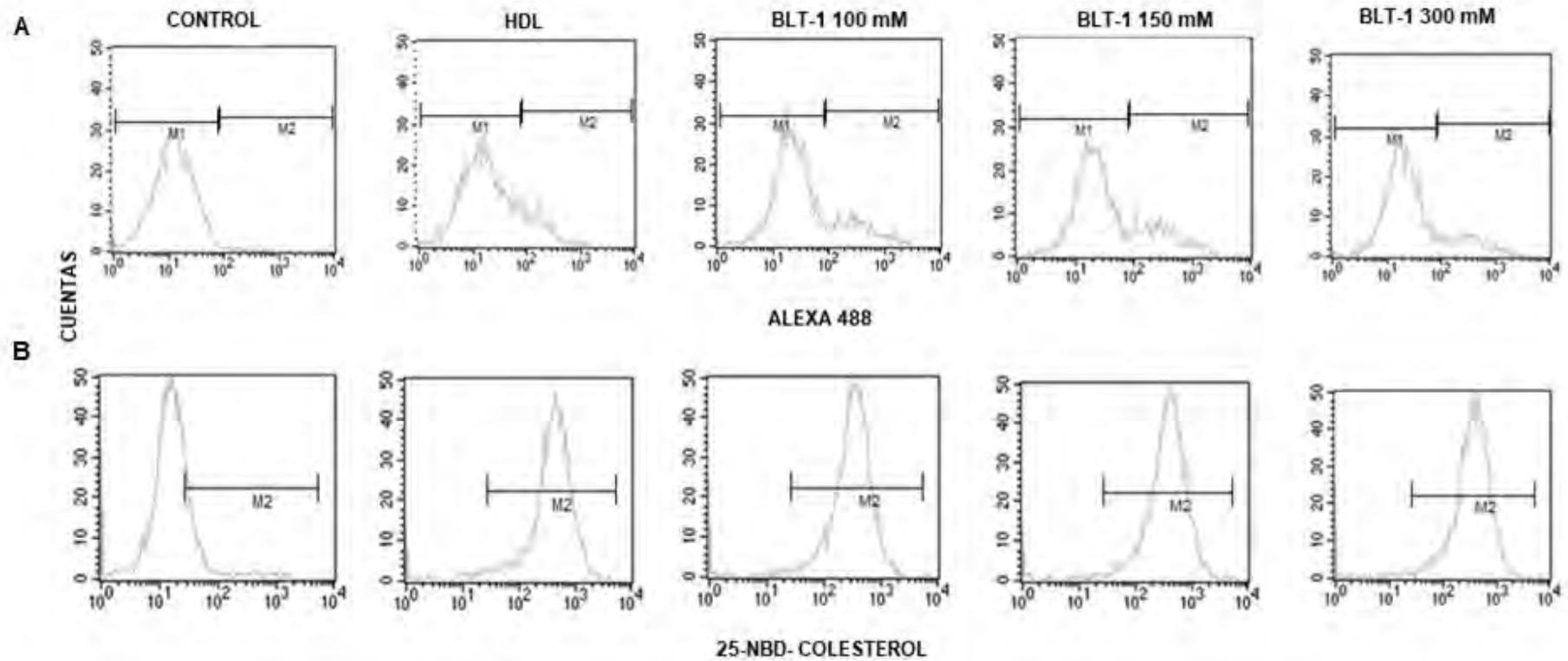


Figura 16. Contribución de SR-BI en la internalización los componentes de HDL en células HMEC-1. A) Efecto del BLT-1 sobre la internalización de proteína HDL marcada con Alexa 488. B) Efecto de BLT-1 en la internalización de colesterol después de incubar a las HUVEC con rHDL preparadas con 25-NBD-colesterol.

Cinética de internalización de componentes de HDL

Para establecer si los componentes de las partículas de HDL se internalizan simultáneamente, se prepararon rHDL marcadas con 25-NBD-colesterol y en su porción proteica con Alexa 568.

En la figura 17 se presentan los resultados de un ensayo de internalización utilizando rHDL con doble marca después de 20 minutos de incubación. Las imágenes revelan que la porción proteica fue internalizada por las células endoteliales siguiendo un patrón completamente distinto al del colesterol marcado. El análisis de imagen demostró que el coeficiente de colocalización fue de 0.006. Este comportamiento se confirmó mediante el seguimiento de la fluorescencia en ambos canales en intervalos de diez y veinte minutos utilizando citometría.

Además se presenta la fluorescencia total para colesterol y proteína (figura 17). La marca de colesterol puede ingresar a la célula de manera independiente a la de la proteína o bien de manera conjunta. Esta última fue interpretada como internalización de partículas HDL completas, mientras que la entrada de colesterol no-asociado a proteína se graficó de manera independiente y se observa en el panel B. Además, la internalización de colesterol no asociado a la proteína HDL comienza rápidamente a partir de los primeros 10 minutos, a diferencia de la entrada de colesterol asociado a proteína HDL, que es significativa después de 30 minutos.

Otro aspecto a considerar es que el proceso de internalización no llega a una meseta dentro de la primera hora de incubación. Además, no se observa un decaimiento de la marca fluorescente, sugiriendo que las células conservan tanto el colesterol como la proteína que han internalizado, al menos durante los periodos estudiado.

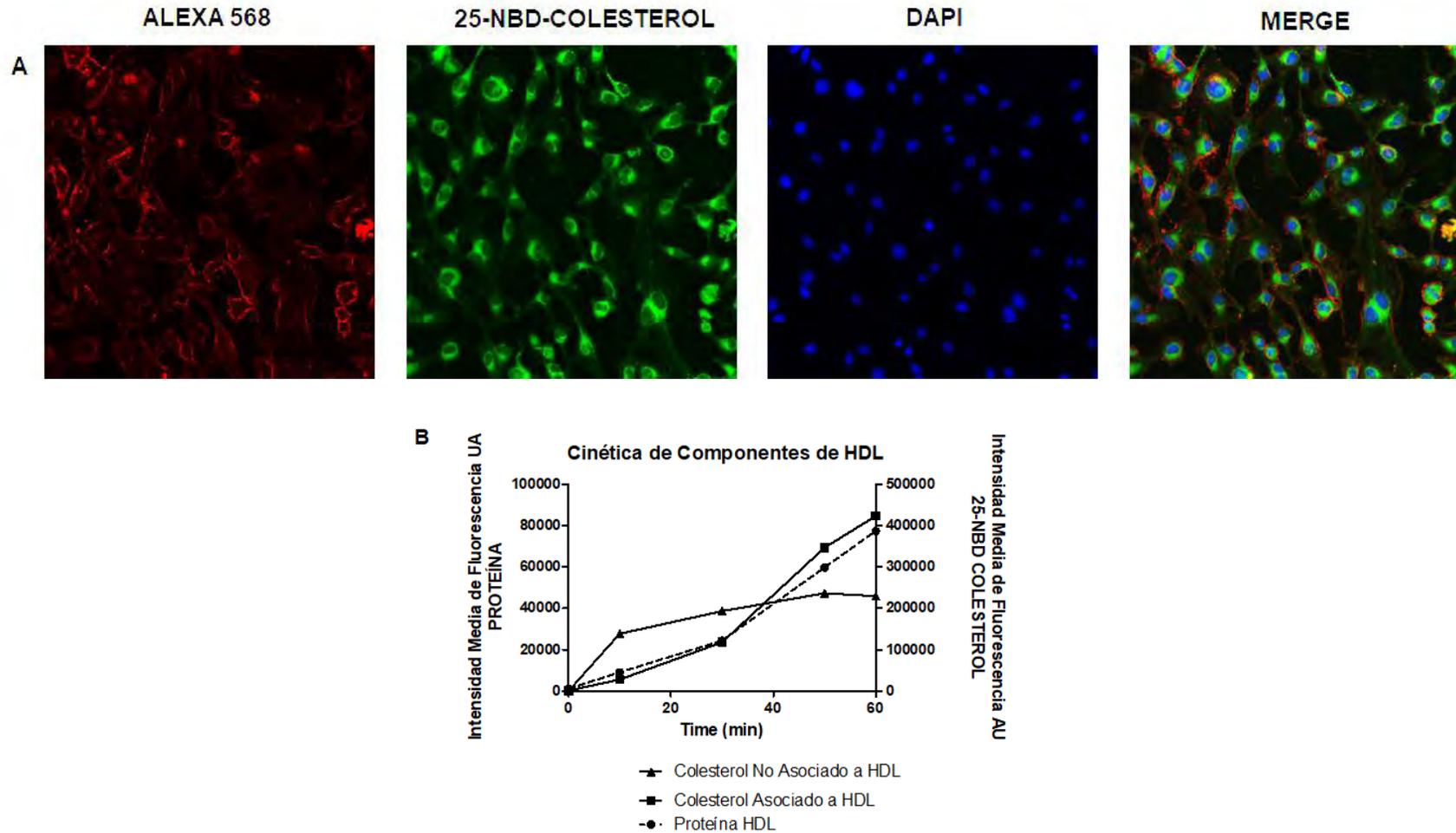


Figura 17. Internalización de colesterol y proteína de HDL. A) Localización intracelular de las rHDL preparadas con 25-NBD-colesterol (verde) y marcadas con Alexa 568 (rojo) en su porción proteica y núcleos celulares teñidos con DAPI (azul) utilizando microscopía confocal. B) Internalización de rHDL a través del tiempo usando citometría de flujo. Se muestra fluorescencia total para cada uno de los tiempos. Se determinó la fluorescencia de 25-NBD-Colesterol y Alexa 568. Los resultados se presentan como mediana de tres experimentos independientes.

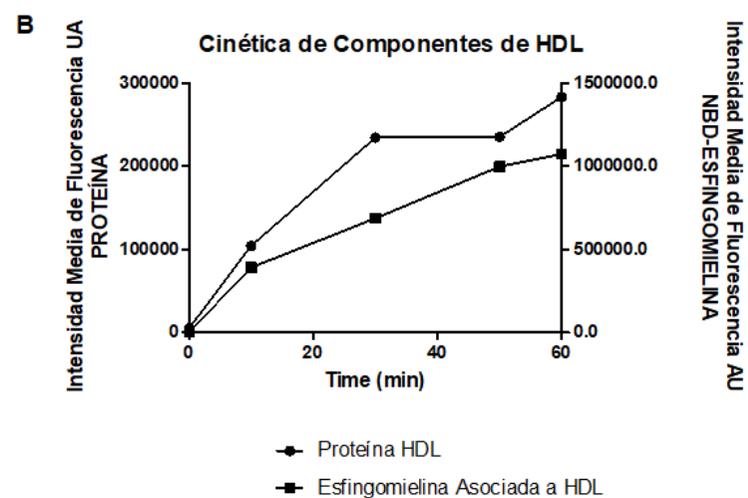
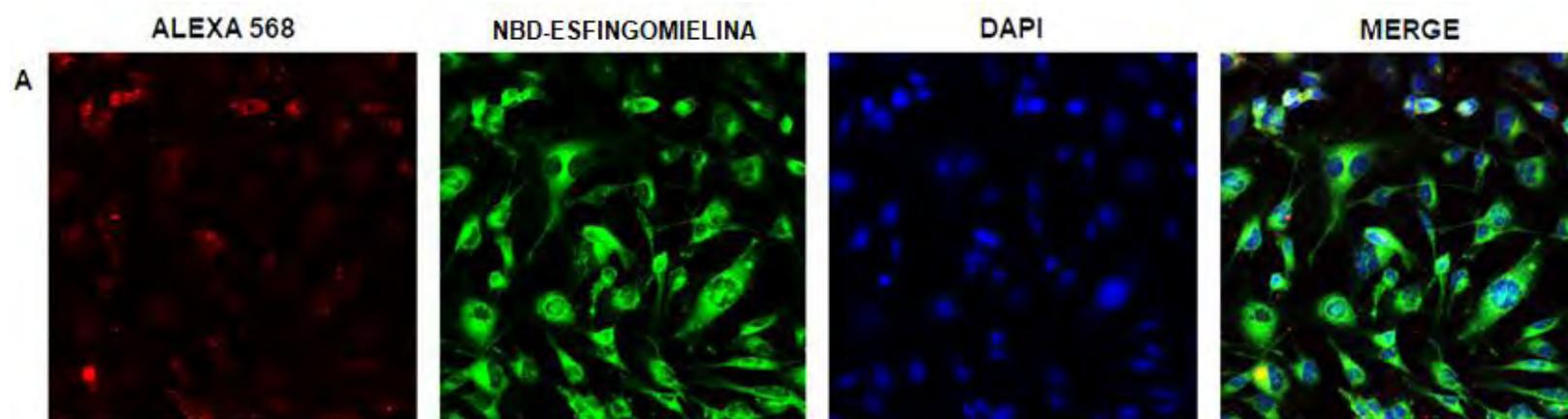


Figura 18. Internalización de colesterol y proteína de HDL. A) Localización intracelular de las rHDL preparadas con NBD-esfingomielina y marcadas con Alexa 568 en su porción proteica y núcleos teñidos con DAPI (azul) utilizando microscopía confocal. B) Internalización de rHDL a través del tiempo usando citometría de flujo. Se muestra fluorescencia total para cada uno de los tiempos. Se determinó la fluorescencia de NBD-esfingomielina y Alexa 568. Los resultados se presentan como mediana de tres experimentos independientes.

A diferencia del colesterol presente en las HDL, las imágenes sugieren que la esfingomielina sigue un patrón de distribución intracelular similar a la proteína HDL. Lo anterior se corroboró mediante el cálculo del coeficiente de colocación, el cual tuvo un valor de 0.999. Posteriormente se realizó un curso temporal de esfingomielina y proteína HDL. Es importante mencionar que no existen informes previos en la literatura acerca de la internalización de la esfingomielina presente en las HDL a través de marcas fluorescentes o utilizando cursos temporales. De igual manera se realizó una cinética para ambos componentes. El comportamiento de la esfingomielina con respecto a la proteína fue muy similar; a los 30 minutos la señal de fluorescencia fue significativa y la marca fluorescente continuó ingresando a las células a los sesenta minutos (figura 18B).

Competencia C-HDL vs C-LDL

Una vez demostrada la internalización de colesterol, esfingomielina y proteína proveniente de partículas de HDL la siguiente pregunta a responder es si este proceso tiene una relevancia fisiológica. En condiciones normales, el C-HDL y el C-LDL se encontrarían en circulación disponibles para que las células del endotelio los internalizaran. Para evaluar si las células endoteliales tienen preferencia por el colesterol proveniente de alguno de estos dos tipos de lipoproteínas, llevamos a cabo un ensayo de competencia utilizando rHDL con 25-NBD-colesterol a concentración constante, equivalente a las concentraciones fisiológicas de colesterol (50 mg/dL) y LDL sin marcar, aisladas de individuos sanos, en concentraciones crecientes desde 50 mg/dL y hasta 2000 mg/dL.

Los resultados de dicho ensayo se presentan en la figura 19 en la que podemos observar que hay un comportamiento lineal en la intensidad de fluorescencia proveniente de las HDL con respecto a la concentración de LDL. Sin embargo, a pesar de usar 20 veces la concentración fisiológica de C-LDL, se sigue observando señal de entrada de C-HDL.

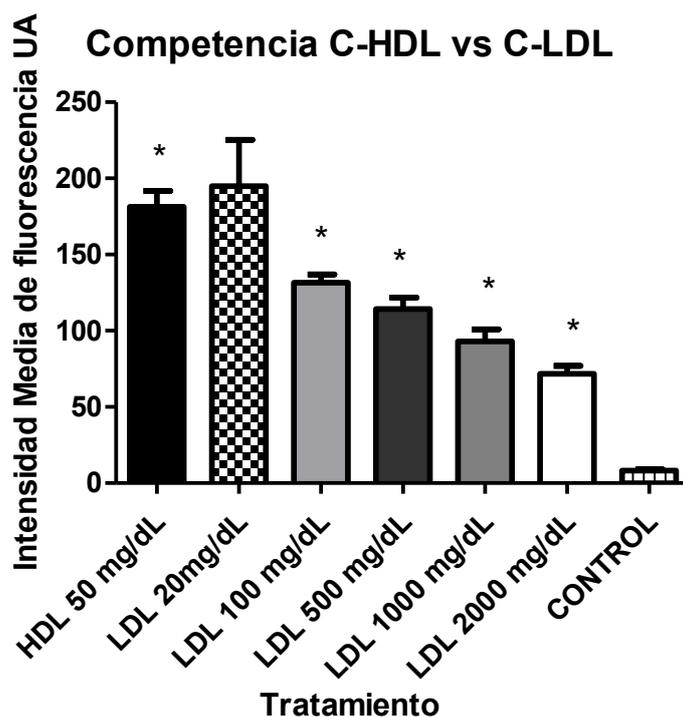


Figura 19. Ensayo de competencia entre el colesterol de lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) vs el colesterol de lipoproteínas de baja densidad (C-LDL). Se cuantificó la entrada de 25-NBD-colesterol al agregar concentraciones variables de LDL sin marcar. Los resultados se presentan como media de tres experimentos independientes \pm DE. $P < 0.05$ con respecto a HDL 50 mg/mL usando ANOVA de una vía.

Composición de HDL y expresión de moléculas de adhesión

A continuación analizamos si los cambios en la composición de lípidos de las HDL afectan su capacidad de inhibir la expresión de moléculas de adhesión. Para ello utilizamos rHDL con composiciones variables de lípidos, todas ellas partiendo de una composición primaria basada en fosfatidilcolina (PC) y Apo AI. En algunas preparaciones se agregó colesterol (CH) 5%, o colesterol 5% y esfingomielina (SM) en proporciones crecientes del 5%, 11% o 16.5% de la masa total de lípidos. Todas ellas fueron puestas a incubar con las HMEC-1 durante cuatro horas, de la misma forma en que se describió el método para HDL aisladas de plasma seguido de un estímulo con TNF- α . Cabe mencionar que 5% y 11% corresponden a una concentración fisiológica mientras que 16.5% representaría un exceso de esfingomielina en la HDL.

En la figura 20 se presentan los resultados expresados como porcentaje de inhibición en la expresión de la proteína ICAM-1 para los diferentes tratamientos. Todas las preparaciones indujeron inhibición en la expresión de ICAM-1; sin embargo, las rHDL que contienen esfingomiélinea la inhiben en mayor medida sin importar en qué porcentaje.

De manera interesante, no se observó un efecto significativo en la inhibición de VCAM-1 al cambiar la cantidad de esfingomiélinea en las rHDL. Sin embargo, observamos un efecto ligero al utilizar rHDL con colesterol el cual es menor que el obtenido para la misma preparación sobre la inhibición de ICAM-1 (figura 20).

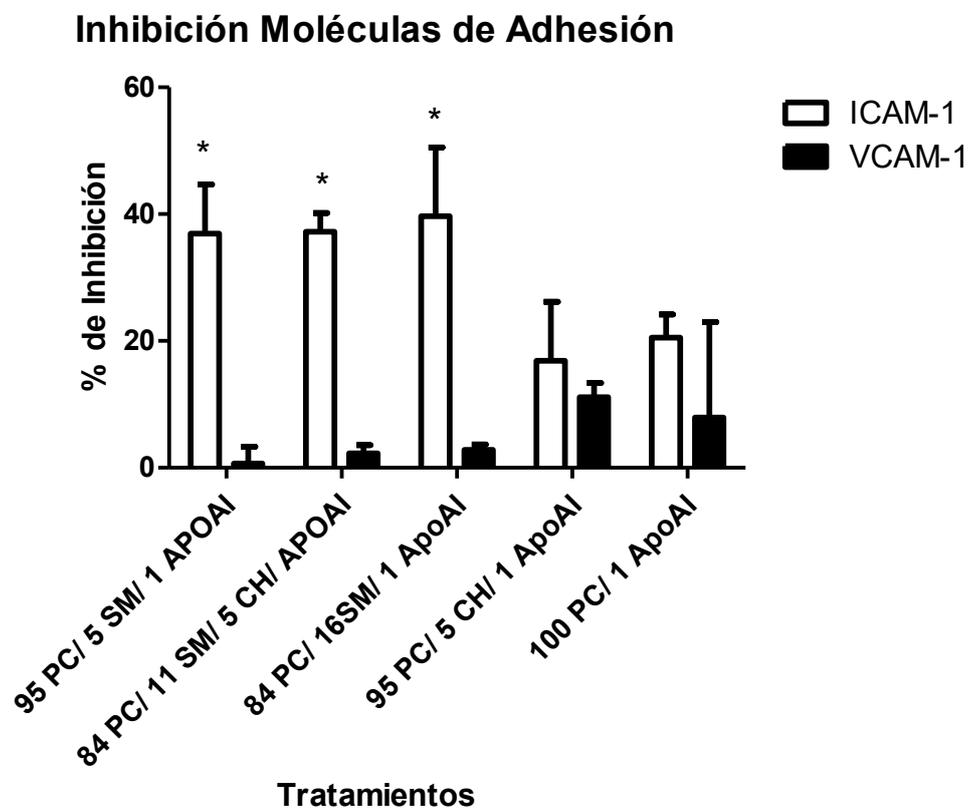


Figura 20. Inhibición de la expresión de moléculas de adhesión al estimular con lipoproteínas de alta densidad reconstituídas (rHDL) preparadas con diferentes contenidos de lípidos y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa). Se detectó la moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) marcado con FITC mediante citometría de flujo. PC: fosfatidilcolina, SM: esfingomiélinea, CH: colesterol. P de Kruskal Wallis <0.005 con respecto a 100 PC/ ApoAI.

Composición de HDL y activación de la eNOS

Una vez demostrado el papel de la composición de lípidos de las HDL, se diseñó un ensayo para evaluar el efecto de la composición sobre la activación de eNOS a través de la fosforilación en la S1177. Para ello se realizó la tinción de la eNOS total y la pS1177 utilizando anticuerpos, como se mencionó en la sección de métodos. En la figura 21 se observan los resultados representativos. Es importante mencionar que la forma fosforilada y la forma no fosforilada de la enzima se encontraban en dos planos focales distintos.

Se realizó la cuantificación de la fluorescencia para ambos anticuerpos y se calculó la relación de la enzima fosforilada en S1177 contra la enzima total después de la estimulación. Los resultados se muestran en la figura 21C en la que se observa que las rHDL con 5% son las que más estimularon la fosforilación de la S1177 de eNOS. A estas le siguen las que contenían 15.5%, que de manera interesante, fosforilaron menos a la enzima y representan un contenido de esfingomielina mayor al fisiológico, sugiriendo un efecto dependiente de la dosis sobre la eNOS.

El resto de los tratamientos no presentó diferencia significativa a los resultados obtenidos para la preparación primaria, únicamente con Apo AI y lecitina.

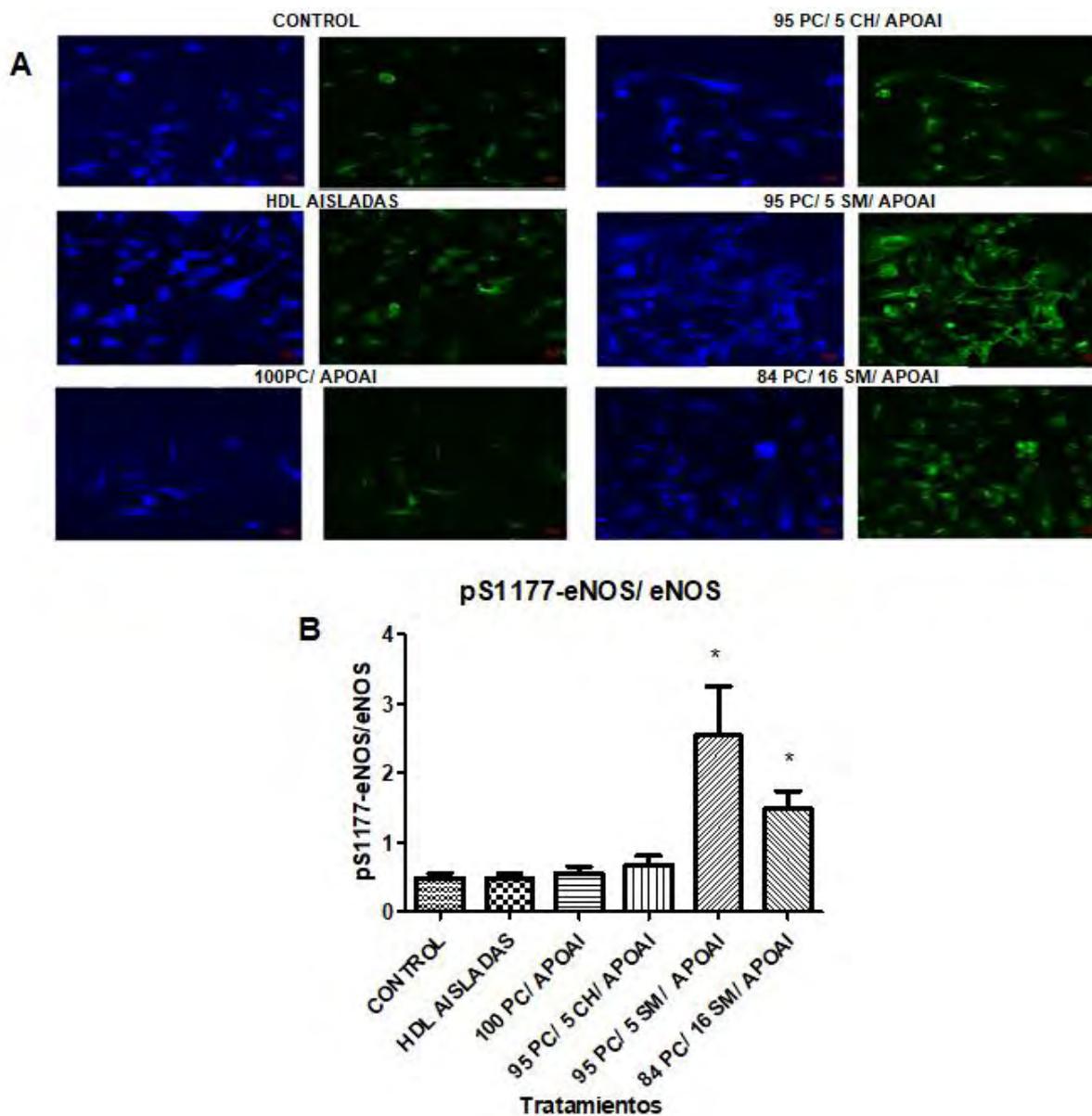


Figura 21. Efecto de la composición de lípidos de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en la fosforilación de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS). Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal, A) eNOS total teñida con Alexa 405 (azul) y pS1177-eNOS con FITC 488 (verde). B) Relación de enzima fosforilada contra el total, datos obtenidos a través de análisis de imagen. PC: fosfatidilcolina, SM: esfingomielina, CH: colesterol. $P < 0.05$ con respecto al control, prueba Kruskal Wallis.

PROYECTOS EN PARALELO

HDL aisladas de sujetos sanos y su efecto sobre el endotelio vascular.

Como ya se mostró anteriormente se realizó un estudio sobre los efectos funcionales de rHDL preparadas con diferentes composiciones de lípidos. Una pregunta obligada al observar los resultados es qué ocurre con las HDL aisladas de sujetos sanos. Para resolverla llevamos a cabo algunos experimentos a manera de primer acercamiento sobre el tema.

Al realizar un análisis de los efectos de las HDL aisladas de diferentes individuos para cada experimento, tanto en cultivo de células HMEC-1 como al ser incubadas con anillos de aorta de rata, se observaron tres comportamientos distintos posiblemente de manera dependiente de la procedencia de la muestra. A continuación se describen los tipos de respuesta observados en las muestras analizadas.

TIPO 1

Las curvas dosis-respuesta elaboradas al estimular las aortas de rata con fenilefrina y acetilcolina después de ser incubadas con este tipo de HDL no presentaron diferencias con respecto del control (Figura 22).

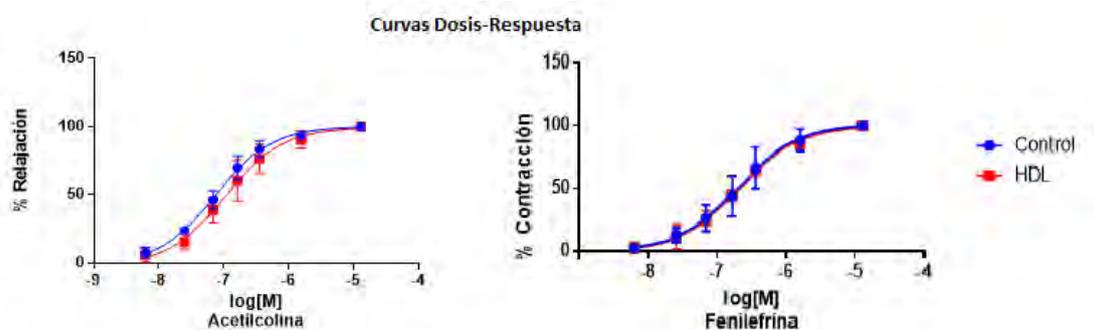


Figura 22. Curvas dosis respuesta con lipoproteínas de alta densidad (HDL) tipo 1. Las aortas de rata fueron estimuladas con acetilcolina y fenilefrina tras ser incubadas con las diferentes condiciones. Curva obtenida mediante la ecuación de Hill. $n=3$.

La expresión de ICAM-1 inducida por el tratamiento con TNF-alfa, es inhibida de manera muy sutil, mientras que la expresión de VCAM-1 no se inhibe por la incubación con el mismo tipo de HDL (Figura 23).

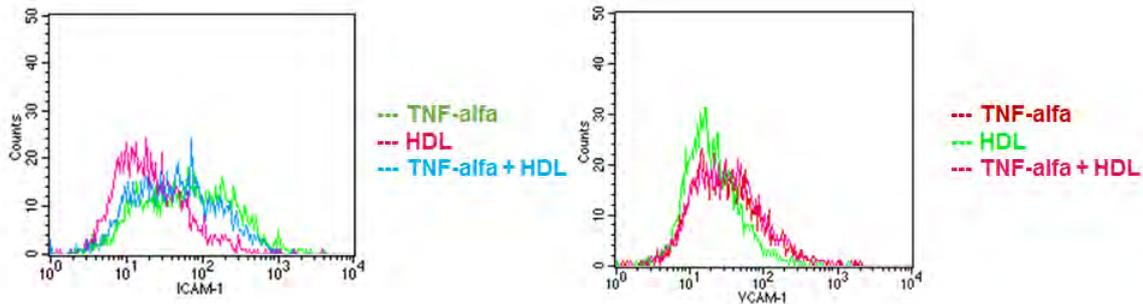


Figura 23. Expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la moléculas de adhesión vascular celular (VCAM-1) de los diferentes tratamientos en células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1). Izquierda ICAM-1 marcada con FITC, derecha VCAM-1 marcada con PE. n=3.

TIPO 2

Para este tipo de HDL las curvas dosis respuesta, revelan que la incubación con HDL seguida de una precontracción con fenilefrina y estimulación con acetilcolina generan contracción sostenida de los anillos de aorta de rata, la cual no observó relajación con ninguna de las concentraciones de acetilcolina administradas. En el caso de la curva de fenilefrina, el cambio es menor, sin embargo también puede observarse que la aorta se contrae en mayor medida que el control. Lo anterior puede observarse en la figura 24.

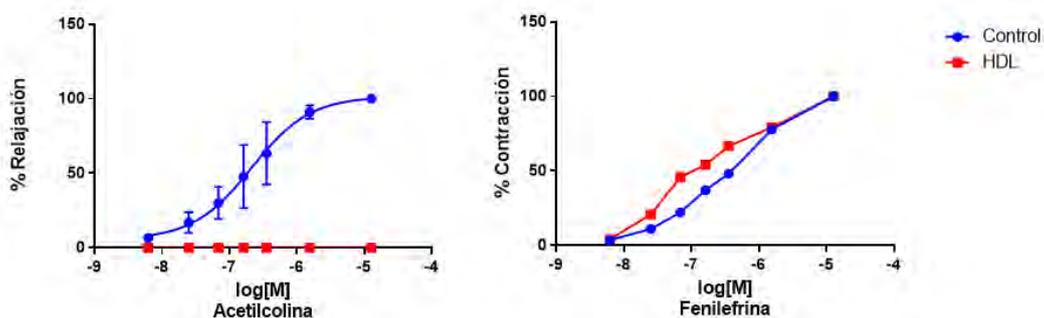


Figura 24. Curvas dosis respuesta HDL tipo 2. Las aortas de rata fueron estimuladas con acetilcolina y fenilefrina tras ser incubadas con las diferentes condiciones. Curva obtenida mediante la ecuación de Hill. n=1

De manera interesante, al incubar a las células HMEC-1 con este tipo de HDL pudimos notar que la morfología de las mismas cambiaba notablemente al ser incubadas con HDL, a diferencia del tipo anteriormente descrito el cual no induce ningún cambio morfológico en las células (datos no mostrados). En la figura 25 se aprecia que en el control así como el tratamiento con TNF-alfa, las células presentan su morfología típica en forma de huso, y se observan bien adheridas a la placa de cultivo. Sin embargo, las células tratadas con HDL y HDL+ TNF-alfa se observan con un borde redondeado y un mayor número de células que parecían flotando en el medio de cultivo. Lo anterior no se observó con los otros tipos de HDL.

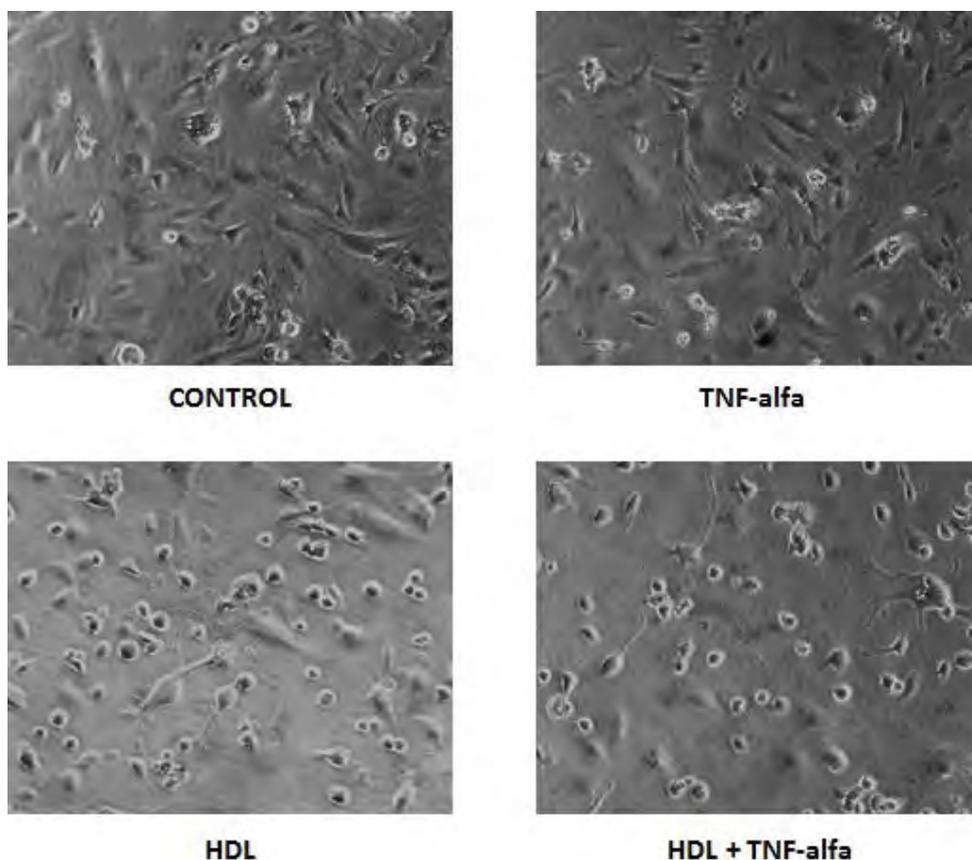


Figura 25. Morfología células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-) para los diferentes estímulos. Se observa una diferencia notable en aquellas tratadas con lipoproteínas de alta densidad (HDL). n=1.

La tinción para ICAM-1 y VCAM-1 en las mismas células reveló un mayor porcentaje de inhibición de la expresión de estas moléculas, inducidas por TNF-alfa, cuando las células fueron tratadas con HDL de este tipo. Lo anterior se ilustra en la figura 26.

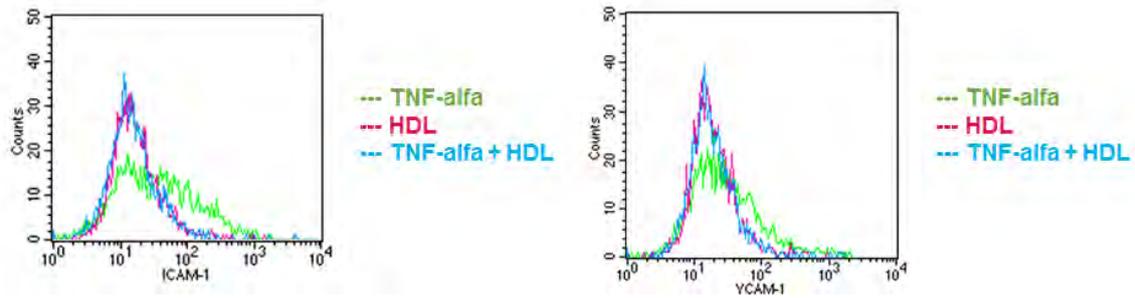


Figura 26. Expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la moléculas de adhesión vascular celular (VCAM-1) de los diferentes tratamientos en células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1). Izquierda ICAM-1 marcada con FITC, derecha VCAM-1 marcada con PE. n=1.

TIPO 3

El último comportamiento observado es el ilustrado por la figura 27, en la que se muestra que el anillo de aorta incubado con HDL de este tipo se relaja en mayor medida que el control. Nuevamente este efecto es más notable en la curva de acetilcolina, sin embargo, a curva de fenilefrina también muestra aparente disminución en la contracción del tejido.

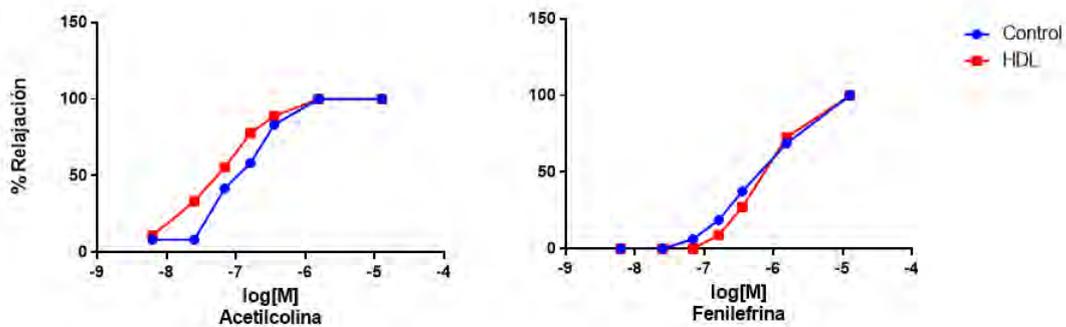


Figura 27. Curvas dosis respuesta HDL tipo 3. Las aortas de rata fueron estimuladas con acetilcolina y fenilefrina tras ser incubadas con las diferentes condiciones. Curva obtenida mediante la ecuación de Hill. n=1.

Las HDL de este tipo inducen una inhibición leve sobre la expresión de ICAM-1 inducida por TNF-alfa, mientras que no se observa inhibición alguna en la expresión de VCAM-1 en células HMEC-1 (Figura 28).

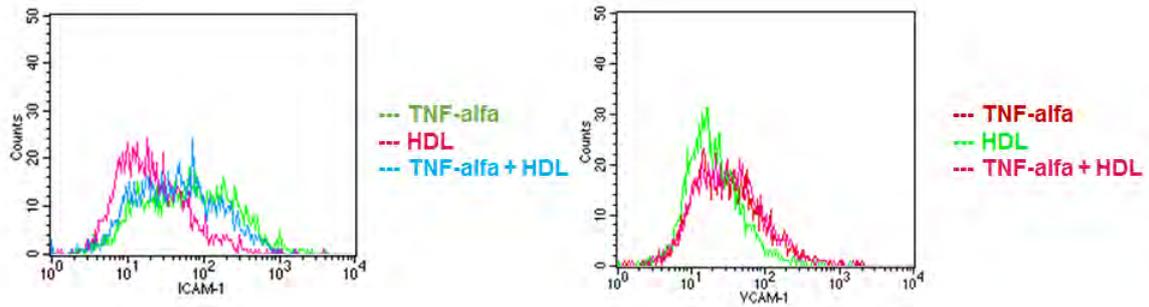


Figura 28. Expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la moléculas de adhesión vascular celular (VCAM-1) de los diferentes tratamientos en células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1). Izquierda ICAM-1 marcada con FITC, derecha VCAM-1 marcada con PE. n=1.

Otros efectos de BLT-1

BLT-1 y la expresión de moléculas de adhesión

Como antecedente meramente observacional, asociamos el comportamiento de las HDL de tipo 2, capaces de inhibir la expresión de moléculas de adhesión con la morfología presentada en la figura 25. Al tratar a nuestras células con BLT-1 observamos el mismo comportamiento y se realizó un pequeño ensayo para probar este concepto.

Para ello se estimuló a las células endoteliales con HDL aisladas de sujetos sanos y TNF- α en presencia del inhibidor. Se utilizaron células HMEC-1 incubadas con TNF-alfa y una combinación de TNF-alfa y diferentes concentraciones de BLT-1 (100, 150 y 300 mM). El resultado final fue una marcada tendencia a la inhibición de la expresión tanto de ICAM-1 como VCAM-1 aunque sin significancia estadística (figuras 29 y 30).

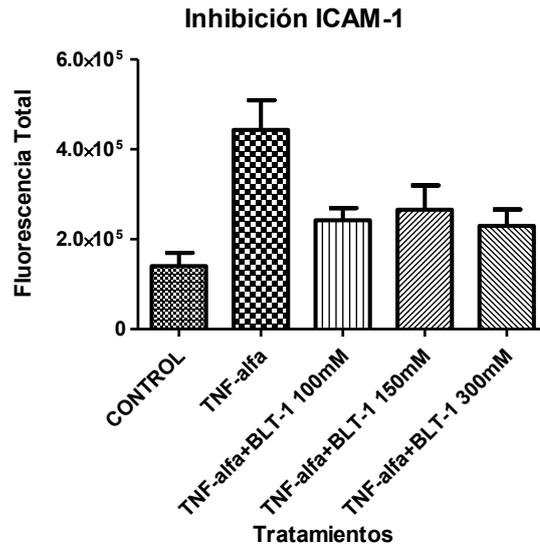


Figura 29. Expresión de la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) en las células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1) tratadas con el bloqueador de transporte de lípidos 1 (BLT-1). Se agregó una concentración constante de factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) 10 ng/mL y una combinación de éste más BLT-1 a 100, 150 y 300 mM. Se presenta la mediana de fluorescencia total para FITC detectada mediante citometría de flujo. N=3.

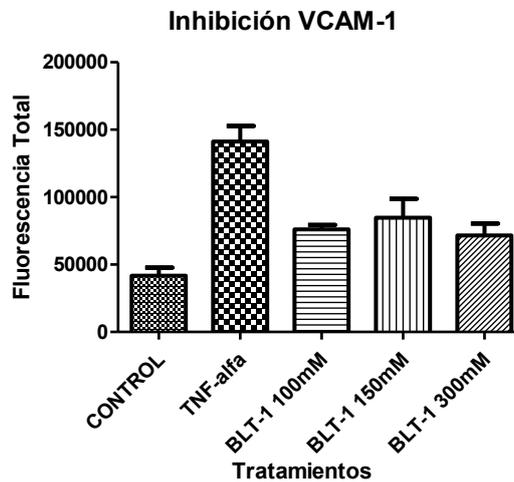


Figura 30. Expresión de la molécula de adhesión vascular celular (VCAM-1) en las células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1) tratadas con el bloqueador de transporte de lípidos 1 (BLT-1). Se agregó una concentración constante de factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) 10 ng/mL y una combinación de éste más BLT-1 a 100, 150 y 300 mM. Se presenta la mediana de fluorescencia total para FITC detectada mediante citometría de flujo. N=3.

BLT-1 y modificaciones del citoesqueleto

Posteriormente y en la misma línea de evidencia observacional decidimos evaluar si el cambio de morfología (figura 25) estaba acompañado con diferencias en la organización de los filamentos del citoesqueleto. SE llevó a cabo una tinción de vimentina con un anticuerpo asociado a FITC. La vimentina es una proteína de citoesqueleto, particularmente del citoesqueleto de filamentos intermedios, específica de ciertos tipos celulares que incluyen al endotelio. La incubación de HMEC-1 con BTL-1 sugiere un cambio en la organización de los filamentos de vimentina que se manifiesta por su agregación en la región media de las células en vez de extenderse de polo a polo de las mismas como se observa en el control (figura 31, arriba).

La incubación con HDL revierte el efecto sobre el citoesqueleto y éste vuelve a observarse en su configuración filamentosa recorriendo todo lo largo de la célula, como en el control (figura 31 abajo).

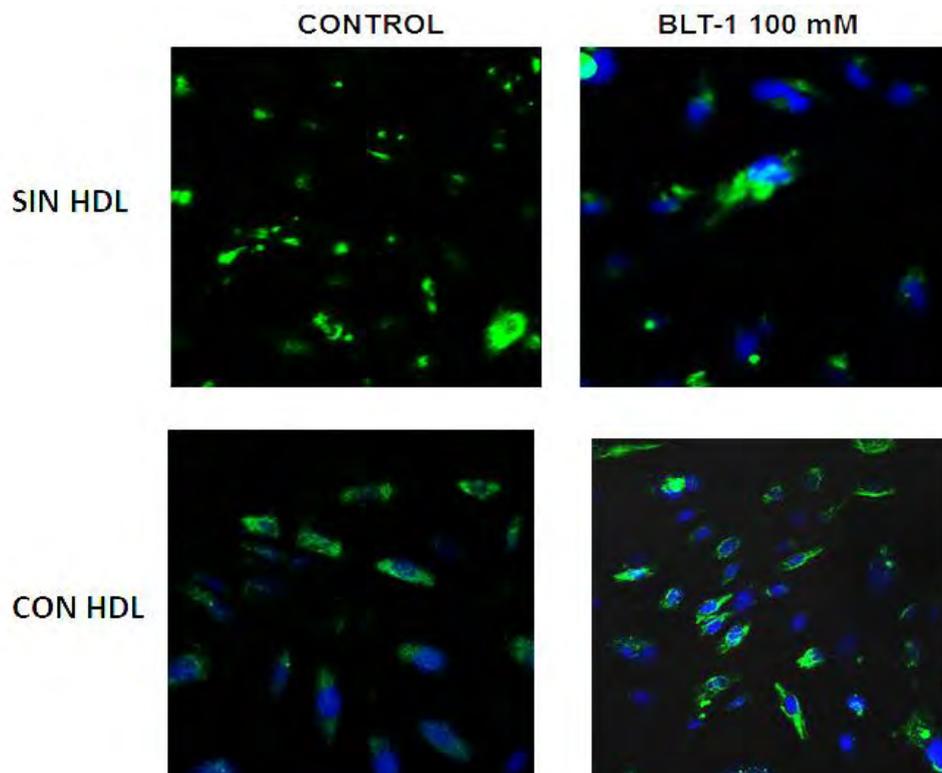


Figura 31. Efecto de la inhibición del receptor scavenger clase B tipo I (SR-BI) en la estructura del citoesqueleto de vimentina en células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1). Las células se incubaron con de bloqueador del transporte de lípidos (BLT-1) 100 mM y lipoproteínas de alta densidad (HDL) aisladas de un sujeto sano en diferentes combinaciones. La vimentina se marcó con FITC, los núcleos semarcaron con DAPI. Imágenes obtenidas a través de microscopía confocal.

DISCUSIÓN

En el presente estudio pusimos de manifiesto que las HDL son internalizadas a las células endoteliales en cultivo y que dicha internalización se asocia con modificaciones tanto de la estructura como de la función celular. Los efectos en la célula son en parte dependientes del contenido de lípidos de las HDL, pero constructos tan sencillos como proteoliposomas de apo AI, fosfatidilcolina y colesterol son capaces de modificar la función celular. Otro de los resultados más destacables del presente estudio es que el colesterol contenido en las HDL se integra a la célula endotelial de manera independiente a la proteína y a la esfingomielina-HDL.

En una primera etapa caracterizamos a las células HMEC-1 como un modelo para el estudio de la funcionalidad de las HDL. Con base en la intensidad media de fluorescencia emitida por el mismo número de células, se demostró que la línea celular HMEC-1 expresa el receptor SR-BI en la misma medida que las células HUVEC. Lo anterior no había sido reportado previamente en la literatura. Esta característica constituye una ventaja del cultivo de la línea celular HMEC-1 como modelo de estudio de SR-BI, con respecto a la utilización de los cultivos primarios de HUVEC, en los cuales se obtiene un número limitado de células y los ensayos están sujetos a la variabilidad interindividual [154].

A continuación demostramos que la expresión de SR-BI permanece constante en las células HMEC-1, independientemente de los tratamientos. Estos resultados también representan una novedad, ya que a nuestro conocimiento, este aspecto no se había reportado previamente. Debido a que existe poca información funcional, estructural o de regulación de la expresión del receptor SR-BI, estos resultados representan un campo novedoso para la investigación.

Los ensayos sobre actividad anti inflamatoria de las HDL, traducida como la inhibición de la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales HMEC-1 también fueron llevados a cabo. Nuestros resultados demuestran que las HDL aisladas de sujetos sanos inhiben la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducida por TNF-alfa en la membrana de células endoteliales. Estos resultados son consistentes con lo reportado por estudios previos [155, 156]; ICAM-1 y VCAM-1 son moléculas

involucradas en la inflamación, en particular en el proceso de arresto y anclaje de leucocitos en los vasos sanguíneos [157].

La asociación inversa entre los niveles plasmáticos de colesterol-HDL y la incidencia de enfermedad aterosclerosa presupone una relación causal entre ambas. El TRC ha sido la explicación más aceptada al papel antiaterogénico de las HDL. Sin embargo, con base en el TRC no ha sido posible disminuir el riesgo cardiovascular. El TRC también es incompatible con la baja incidencia o ausencia de enfermedad aterosclerosa coronaria en los sujetos portadores de mutaciones que resultan en niveles extremadamente bajos de HDL en plasma. Por lo tanto, el papel antiaterogénico de las HDL debe estar relacionado con otras funciones de estas lipoproteínas que no se han explorado. En el presente trabajo de investigación, nuestra hipótesis central fue que la función de HDL es la de entregar lípidos a las HDL. Los fundamentos que sustentan nuestra hipótesis son: 1) la mayor parte del colesterol del organismo se sintetiza en el hígado [105], hecho que presupone un vector para su transporte en el plasma. El hígado sintetiza sólo dos tipos de lipoproteínas capaces de transportar el colesterol de síntesis *de novo*, VLDL y HDL; aunque es aceptado que las células que no sintetizan su propio colesterol lo adquieren a través de las LDL (formadas intravascularmente a partir de las VLDL), no hay argumentos para descartar a las HDL como vectores de ese colesterol de síntesis *de novo*. 2) La mayoría de las células del organismo expresan SR-BI, el único receptor HDL reconocido hasta ahora [152]. 3) Algunos estudios tempranos y relativamente recientes han demostrado que las HDL se internalizan a las células musculares [151], hepáticas [158] y endoteliales [150]. 4) Las circunstancias patológicas relacionadas con daño a tejidos tienden a tener un mal desenlace cuando las HDL plasmáticas se encuentran en niveles muy bajos [159-161]. Estas observaciones pueden estar relacionadas con el hecho que para la reparación del tejido se requieren moléculas de síntesis *in situ* y de colesterol hepático, el cual no puede ser entregado eficientemente por la baja concentración de HDL.

Para empezar a explorar nuestra hipótesis, analizamos la internalización de las HDL en nuestro modelo de células endoteliales previamente validado [publicación anexa]. Con este fin, adaptamos un método de marcado fluorescente en la parte proteica de las HDL anteriormente empleada en hepatocitos [162]. Observamos que la porción proteica de las HDL es internalizada y veinte minutos más tarde se observa delimitada

en gránulos cercanos al núcleo celular, que según una publicación previa, no expresa ningún marcador de organelos de la vía secretoria [163] ni de degradación [150].

En estudios previos se había demostrado esta misma internalización en células endoteliales, asumieron que se debía a un proceso de transcitosis [150]. Sin embargo, cuando analizamos el comportamiento del colesterol contenido en las HDL utilizando un lípido fluorescente, demostramos que el colesterol se distribuye de manera diferente en la célula; en consecuencia, la internalización de la proteína-HDL no es sólo transcitosis, sino que existe una interacción célula-lipoproteína. Además, este proceso de entrega de colesterol a la célula por parte de las HDL es más rápidos y sigue una cinética distinta a la internalización de la proteína HDL, como lo demostramos por citometría de flujo. En el mismo sentido, el colesterol y la proteína marcados con fluorescencia no cofocalizan en la imagen del microscopio. En su conjunto, estos hallazgos indican que la partícula HDL entrega de colesterol a la célula endotelial y posteriormente la partícula es internalizada al citoplasma.

Además de colesterol, las HDL contienen otros lípidos que pueden afectar la función celular; en este contexto, la esfingomielina es esencial para formar las caveolas, y es precursor de ceramidas y de S1P, ambas moléculas implicadas con funciones celulares diversas[164, 165]. Por esta razón, exploramos la posibilidad de que las HDL entregaran esfingomielina a la célula endotelial de la misma manera que el colesterol. Nuestros resultados demuestran que la esfingomielina se internaliza en la célula endotelial siguiendo una cinética que emula a la cinética de proteína. Asimismo, la proteína y la esfingomielina marcadas cofocalizan con un coeficiente muy alto. Estos resultados demuestran que la esfingomielina se internaliza en la célula endotelial, pero a diferencia del colesterol, ingresa a la célula principalmente asociada a la partícula HDL. La importante cofocalización de la esfingomielina y la proteína HDL en las células después de incubarlas con rHDL marcadas tanto en la fracción proteica como en la esfingomielina, dan un soporte adicional a esta interpretación.

Por lo anterior, nuestros resultados demuestran que las HDL entregan selectivamente colesterol a la células, y se internalizan al citoplasma acarreado en este proceso esfingomielina. Sabiendo que el SR-BI es el único receptor de HDL reconocido sin ambigüedad, exploramos la posible contribución del SR-BI en la internalización de las HDL usando BLT-1 como inhibidor específico [166]. A la concentración comúnmente

utilizada de BLT-1 (100 mM), hubo una disminución importante de la señal de las células que contienen la marca de la proteína fluorescente; por lo tanto, el SR-BI está implicado en el proceso de internalización de las partículas HDL al citoplasma de las células endoteliales. No obstante, al utilizar concentraciones crecientes BLT-1 en el medio de cultivo, no observamos un efecto exacerbado de la inhibición de la internalización de partículas HDL en las células HMEC-1, sino al contrario, una subpoblación celular internalizó mayores cantidades de HDL marcadas en su fracción proteica, en función de la concentración de BLT-1. Lo anterior apunta fuertemente a la presencia de mecanismos adicionales de internalización que compensan el bloqueo de SR-BI, que en el caso de las células HMEC-1 cobra gran relevancia; el bloqueo de SR-BI permite la entrada, tal vez desregulada, de partículas HDL al citoplasma de la célula.

Esta última observación podría ser congruente con el papel de SR-BI como sensor de colesterol membranal, que al ser inhibido, la célula pierde regulación y permite su entrada [167]. Sin embargo, la internalización de colesterol y esfingomielina presentes en partículas HDL no fue afectada por el uso de BLT-1. Estas observaciones tienen dos posibles implicaciones; la primera es que el SR-BI no es la principal vía de entrada de colesterol, y posiblemente tampoco de esfingomielina proveniente de estas lipoproteínas. La segunda, que la esfingomielina se internaliza a la célula no sólo asociada a la partícula HDL, sino también de manera independiente; en otras palabras, una fracción de la esfingomielina-HDL se disocia de la partícula y se integra a la célula endotelial y otra fracción se internaliza asociada a la partícula HDL.

Respecto a las otras posibles vías de entrada de colesterol a la célula endotelial independientes de SR-BI, la ecto-F1-ATPasa podría ser una pieza clave, ya que se propone que, el ADP producido por esta enzima, acoplada a la producción a la actividad del receptor P_2Y_{13} está directamente asociada a la endocitosis de partículas HDL [168].

Una cuestión importante es que la internalización aumenta con respecto al tiempo hasta llegar a una hora, y durante ese transcurso no se aprecia una fase de meseta que pudiese indicar una saturación del o los sistemas involucrados ni una pérdida de la fluorescencia. Un reporte previo al respecto [150], menciona que la entrada de partículas de HDL continúa durante tres horas. Se requieren más ensayos para

conocer el destino del material internalizado, un aspecto sobre el cual no se ha llegado a un consenso.

A continuación, analizamos las posibles implicaciones de la internalización de las HDL en la función celular. Se ha asumido durante mucho tiempo que las células periféricas obtienen el colesterol para estructurar sus membranas de las LDL [169]. Por lo tanto, en una primera etapa era necesario demostrar que la entrega de colesterol por parte de las HDL a las células endoteliales tiene relevancia fisiológica. En este sentido, el ensayo sobre la competencia entre el colesterol asociado a las HDL contra el asociado a las LDL, representa un dato fundamental para soportar que la internalización de C-HDL es un mecanismo fisiológicamente relevante. Usando concentraciones fisiológicas de HDL (50 mg/dL de colesterol en el medio de cultivo), nuestros resultados demuestran que la célula internaliza el colesterol-HDL a pesar de que el C-LDL alcance una concentración 20 veces mayor que la fisiológica. Estas observaciones sugieren que la principal fuente de colesterol para las células endoteliales es el asociado a las HDL, soportando la idea de que estas lipoproteínas son un vector de lípidos para las células extra hepáticas.

La función antiinflamatoria de las HDL a través de regulación de la expresión de moléculas de adhesión ha sido descrita previamente [170]. Para establecer si esta función está ligada a la entrega de lípidos a la célula, utilizamos rHDL estructuradas con fosfatidilcolina, colesterol, Apo A1 y esfingomielina en diferentes porcentajes con respecto a la masa total de lípidos. Nuestros resultados demostraron que la inhibición de expresión de ICAM-1 después de estimular a las células HMEC-1 con TNF-alfa, es dependiente de la presencia de esfingomielina en el proteoliposoma. En su conjunto, estos datos indican que la regulación de ICAM-1 sólo depende de la presencia de esfingomielina en el proteoliposoma; una posible explicación a esta inhibición es que la entrega de esfingosina a la célula provoca una alteración de los microdominios membranales necesarios para el anclado de la ICAM-1 [171]. En efecto, existe evidencia acerca de que la expresión de ICAM-1 en la membrana está asociada a dominios ricos en esfingomielina y en esfingomielinasa [172, 173]. Esta última podría jugar un papel importante en la endocitosis mediada por ICAM-1, lo cual podría afectar las funciones de la barrera endotelial pero se requieren más estudios para conocer más detalles sobre este mecanismo.

Otra posibilidad es la generación de derivados de la esfingomielina in situ, como ceramida [172] o esfingosilfosforilcolina [174] que afectan la expresión ICAM-1 en la membrana.

En contraste, la expresión de VCAM-1 no fue inhibida por la esfingomielina de las rHDL, indicando que ICAM-1 y VCAM-1 responden a diferencialmente a estímulos de regulación de su expresión como se ha sugerido previamente [175]. Diversos estudios han demostrado la inhibición de VCAM-1 por HDL aisladas de plasma, usando células en cultivo estimuladas con TNF-alfa; estas evidencias sugieren que las HDL aisladas de plasma contienen algún otro componente que regula la expresión de esta molécula de adhesión, p.e. microRNAs, del cual carecen las rHDL que usamos en este trabajo [136]. Por otra parte, los dominios ricos en esfingomielina podrían jugar un papel importante en la endocitosis mediada por ICAM-1, lo cual podría afectar las funciones de la barrera [173, 176]. La regulación diferencial de ICAM-1 y VCAM-1 mediada por las HDL puede ser clave para entender el papel antiaterogénico real de estas lipoproteínas y surge como una línea de estudio derivada del presente trabajo de investigación.

La señalización intracelular inducida por las HDL se conoce muy poco pero se cree que puede activar a la eNOS, y por lo tanto favorecer la función endotelial, a través de la fosforilación del residuo S1177 [177]. Para determinar si la entrega de lípidos-HDL a la célula tiene impacto a nivel de la actividad eNOS, determinamos la fosforilación de la enzima por microscopía confocal. Al utilizar las rHDL para probar el efecto del contenido de lípidos en la fosforilación de la S1177 de eNOS, observamos que los proteoliposomas que contienen esfingomielina, producen un aumento significativo del grado de fosforilación de la enzima; el contenido fisiológico de esfingomielina en las HDL es el que indujo la mayor respuesta, mientras que los proteoliposomas con mayor contenido del lípido indujeron en menor medida la fosforilación de la eNOS. Esto sugiere que el contenido de esfingomielina no debe exceder ciertos límites para favorecer una respuesta óptima en cuanto a activación de la eNOS. Las rHDL constituyen un modelo simplificado de la complejidad estructural de las HDL con un número limitado de componentes; este modelo reproduce en gran medida la actividad de modulación de moléculas de adhesión y la activación de la eNOS. Lo anterior plantea la posibilidad de que existan pocos componentes relevantes en las HDL y el

resto de sus respuestas obedezcan a efectos de sinergismo e interacción entre moléculas que forma parte de estos complejos.

Existen reportes que demuestran que el metabolismo de esfingolípidos puede inducir la producción de NO, la cual está ligada a la estimulación de la expresión de moléculas de adhesión a través de la estimulación con TNF- α . Es decir, el contenido de esfingolípidos en la célula es importante para regular estas respuestas [178, 179]. En este sentido, hemos demostrado previamente que la disminución de un 25% en la concentración plasmática de esfingomielina-HDL ocurre concomitantemente con una disminución de la presión arterial [180] en pacientes obesos que fueron sometidos a una dieta hipocalórica; la mejoría de otros componentes del síndrome metabólico también se asociaron estadísticamente con la disminución de esfingomielina-HDL. Asimismo, existen estudios que demuestran que el contenido de esfingomielina disminuye durante la fase aguda de la respuesta inflamatoria [181]. En su conjunto, estas evidencias sugieren que la esfingomielina de las HDL puede tener un impacto fisiológico muy importante a nivel de la función vascular y su determinación podría ser más relevante que la determinación del colesterol-HDL en la evaluación del riesgo cardiovascular.

Con la finalidad de observar si existen diferencias claras entre las respuestas de las HDL aisladas de individuos sanos y las rHDL que evaluamos realizamos ensayos de órganos aislado con aortas de rata así como la estimulación de células HMEC-1 para determinar el efecto sobre las moléculas de adhesión. El análisis individual de los experimentos realizados reveló que existen diferencias entre los efectos ejercidos por las HDL aisladas de distintos donadores sanos. Si bien es conocido que se atribuye a las partículas de HDL las funciones anti inflamatoria y vasodilatadora de manera simultánea, nuestros experimentos sugieren que ambos efectos se muestran en manera independiente. Lo anterior podría deberse a que cada una de las actividades atribuidas a las HDL son llevadas a cabo por un componente distinto de las mismas y que dichos componentes son variables en cantidad y actividad entre los individuos incluso si todos ellos son considerados clínicamente sanos.

Un punto interesante sobre el planteamiento anterior, es que la combinación de efectos ejercidos por las HDL genera patrones que aparecieron de manera aleatoria a lo largo los siete lotes de lipoproteínas aisladas. Una parte importante en el

reconocimiento de estos patrones fue la observación de la morfología celular, fenómeno que ocurre únicamente en el grupo de HDL que inhiben mayormente la expresión de moléculas de adhesión pero provocan contracción vascular. La causa en los cambios en la morfología celular no es clara, pero una posible explicación es precisamente la inhibición de moléculas de adhesión.

En resumen de esta primera etapa exploratoria, las HDL pueden ejercer actividades que favorecen la función del endotelio vascular como se ha reportado previamente. No obstante, dichos efectos presentan patrones que difieren en función del individuo. Por esta razón, una buena parte de los estudios posteriores se realizaron usando HDL reconstituídas (rHDL). Estos proteoliposomas se han usado previamente en otros estudios [129] y tienen la ventaja de que se puede controlar su composición lipídica y de proteína [182].

Adicional a lo anterior se realizaron experimentos sobre efectos poco estudiados del BLT-1 basados en evidencia observacional sobre la morfología de las células. En primero lugar observamos una tendencia de BLT-1 a inhibir la expresión de moléculas de adhesión, este dato requiere de mayor estudio. Por otro lado, la inhibición de SR-BI con este compuesto induce cambios en el citoesqueleto de filamentos intermedios, particularmente los filamentos de vimentina, y origina una pérdida de la estructura reticular de los mismos. Esto podría relacionarse con la capacidad de endocitosis de las células y de transporte intracelular pero requiere de estudios más detallados para ser confirmado [183].

De manera interesante podemos apreciar que esta modificación del citoesqueleto es revertida por la incubación con HDL posterior al tratamiento con BLT-1.

Cabe mencionar que son necesarios más estudios sobre el efecto de las HDL en la reorganización del citoesqueleto, ya que es posible que este comportamiento sea modificado de acuerdo con las diferencias interindividuales en la composición de las HDL propuestas previamente en este trabajo. Sin embargo, aún no se conoce si existe relación entre los efectos del BLT-1 descritos.

Todos los resultados mostrados en el presente trabajo porporcionan información novedosa que demuestra el papel de la internalización de las HDL en la función endotelial, poniendo especial énfasis en la composición de lípidos de las partículas.

Ello sugiere que además del TRC, como paradigma actual en el estudio de las funciones antiaterosclerosas de las HDL, existen mecanismos adicionales que contribuyen al correcto funcionamiento del endotelio y que requieren ser investigados. Si bien ya varios autores han sugerido que más que los niveles de HDL, la composición podría ser clave en el entendimiento de sus funciones, los resultados aquí plasmados demuestran el papel fundamental de las proporciones de lípidos, especialmente la esfingomielina, en la modulación de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 y la fosforilación de la eNOS.

..

CONCLUSIONES

- Las células HMEC-1 son un buen modelo para evaluar la función de las HDL en el endotelio. Lo anterior se validó a través de la expresión de marcadores endoteliales típicos, morfología, tamaño y complejidad con respecto a las células HUVEC, el modelo de endotelio más utilizado.
- La porción proteica y lipídica de las HDL son internalizadas por la célula endotelial bajo diferentes patrones de localización subcelular y distintos comportamientos cinéticos. El C-HDL tiene una entrada rápida e independiente de la entrada de la porción proteica. Por otra parte, la esfingomielina colocaliza casi totalmente con la proteína sugiriendo una mayor interacción entre ambos componentes.
- La inhibición de SR-BI afecta parcialmente la internalización de proteína y no así la del colesterol y la esfingomielina, esto podría deberse a la existencia de mecanismos distintos y específicos para la internalización de cada componente.
- La internalización de C-HDL es un evento fisiológicamente relevante ya que tiene lugar incluso cuando existe un exceso de C-LDL disponible en el medio extracelular.
- El contenido de esfingomielina de las rHDL internalizadas modula la expresión de ICAM-1 y la activación de eNOS, lo cual sugiere su importancia en la función de las células endoteliales.
- Al analizar HDL provenientes de individuos sanos, las actividades anti inflamatoria y vasodilatadora de las HDL parecen ser dos propiedades independientes que varían en función del individuo y muy posiblemente en de su composición.

REFERENCIAS

1. Perez-Mendez, O., [*High density lipoproteins (HDL). A therapeutic objective in the atherosclerosis prevention?*]. Arch Cardiol Mex, 2004. **74**(1): p. 53-67.
2. Huang, R., et al., *Apolipoprotein A-I structural organization in high-density lipoproteins isolated from human plasma*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(4): p. 416-22.
3. Vaisar, T., et al., *Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL*. J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 746-56.
4. Shah, A.S., et al., *Proteomic diversity of high density lipoproteins: our emerging understanding of its importance in lipid transport and beyond*. J Lipid Res, 2013. **54**(10): p. 2575-85.
5. Wiesner, P., et al., *Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry*. J Lipid Res, 2009. **50**(3): p. 574-85.
6. Vickers, K.C., et al., *MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(4): p. 423-33.
7. Luscher, T.F., et al., *High-density lipoprotein: vascular protective effects, dysfunction, and potential as therapeutic target*. Circ Res, 2014. **114**(1): p. 171-82.
8. Davidson, W.S., et al., *Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(6): p. 870-6.
9. Lindholm, L.H. and S. Mendis, *Prevention of cardiovascular disease in developing countries*. Lancet, 2007. **370**(9589): p. 720-2.
10. Rodriguez-Saldana, J., et al., *A pathological study of the epidemiology of atherosclerosis in Mexico city*. Cardiol Res Pract, 2014. **2014**: p. 264205.
11. Assmann, G., et al., *High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport*. Atherosclerosis, 1996. **124 Suppl**: p. S11-20.
12. Gordon, D.J., et al., *High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies*. Circulation, 1989. **79**(1): p. 8-15.

13. Kontush, A., *HDL particle number and size as predictors of cardiovascular disease*. Front Pharmacol, 2015. **6**: p. 218.
14. Rye, K.A. and P.J. Barter, *Cardioprotective functions of HDLs*. J Lipid Res, 2014. **55**(2): p. 168-79.
15. Jessup, W., et al., *Roles of ATP binding cassette transporters A1 and G1, scavenger receptor BI and membrane lipid domains in cholesterol export from macrophages*. Curr Opin Lipidol, 2006. **17**(3): p. 247-57.
16. Fisher, E.A., et al., *High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(12): p. 2813-20.
17. Acton, S., et al., *Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor*. Science, 1996. **271**(5248): p. 518-20.
18. Yazdanyar, A., C. Yeang, and X.C. Jiang, *Role of phospholipid transfer protein in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport*. Curr Atheroscler Rep, 2011. **13**(3): p. 242-8.
19. Rosenson, R.S., et al., *HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events*. Clin Chem, 2011. **57**(3): p. 392-410.
20. Rye, K.A. and P.J. Barter, *Predictive value of different HDL particles for the protection against or risk of coronary heart disease*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1821**(3): p. 473-80.
21. *Clofibrate and niacin in coronary heart disease*. JAMA, 1975. **231**(4): p. 360-81.
22. Group, H.T.C., et al., *Effects of extended-release niacin with laropiprant in high-risk patients*. N Engl J Med, 2014. **371**(3): p. 203-12.
23. Anderson, T.J., et al., *Safety profile of extended-release niacin in the AIM-HIGH trial*. N Engl J Med, 2014. **371**(3): p. 288-90.
24. Investigators, A.-H., et al., *Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy*. N Engl J Med, 2011. **365**(24): p. 2255-67.
25. Stone, N.J., et al., *2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(25 Pt B): p. 2889-934.
26. Inazu, A., et al., *Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency caused by two prevalent mutations as a major determinant of increased levels of high density lipoprotein cholesterol*. J Clin Invest, 1994. **94**(5): p. 1872-82.

27. Chiba, H., et al., *Quantitative and compositional changes in high density lipoprotein subclasses in patients with various genotypes of cholesteryl ester transfer protein deficiency*. J Lipid Res, 1997. **38**(6): p. 1204-16.
28. Yamashita, S., et al., *Accumulation of apolipoprotein E-rich high density lipoproteins in hyperalphalipoproteinemic human subjects with plasma cholesteryl ester transfer protein deficiency*. J Clin Invest, 1990. **86**(3): p. 688-95.
29. Matsuura, F., et al., *HDL from CETP-deficient subjects shows enhanced ability to promote cholesterol efflux from macrophages in an apoE- and ABCG1-dependent pathway*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1435-42.
30. Agerholm-Larsen, B., et al., *Common cholesteryl ester transfer protein mutations, decreased HDL cholesterol, and possible decreased risk of ischemic heart disease: The Copenhagen City Heart Study*. Circulation, 2000. **102**(18): p. 2197-203.
31. Curb, J.D., et al., *A prospective study of HDL-C and cholesteryl ester transfer protein gene mutations and the risk of coronary heart disease in the elderly*. J Lipid Res, 2004. **45**(5): p. 948-53.
32. Hogarth, C.A., A. Roy, and D.L. Ebert, *Genomic evidence for the absence of a functional cholesteryl ester transfer protein gene in mice and rats*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2003. **135**(2): p. 219-29.
33. Barter, P.J. and K.A. Rye, *Cholesteryl ester transfer protein inhibition as a strategy to reduce cardiovascular risk*. J Lipid Res, 2012. **53**(9): p. 1755-66.
34. Tall, A.R., L. Yvan-Charvet, and N. Wang, *The failure of torcetrapib: was it the molecule or the mechanism?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(2): p. 257-60.
35. Clark, R.W., et al., *Description of the torcetrapib series of cholesteryl ester transfer protein inhibitors, including mechanism of action*. J Lipid Res, 2006. **47**(3): p. 537-52.
36. Ranalletta, M., et al., *Biochemical characterization of cholesteryl ester transfer protein inhibitors*. J Lipid Res, 2010. **51**(9): p. 2739-52.
37. Brousseau, M.E., et al., *Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol*. N Engl J Med, 2004. **350**(15): p. 1505-15.

38. Forrest, M.J., et al., *Torcetrapib-induced blood pressure elevation is independent of CETP inhibition and is accompanied by increased circulating levels of aldosterone*. Br J Pharmacol, 2008. **154**(7): p. 1465-73.
39. Funder, J.W., *Aldosterone, sodium, and hypertension: lessons from torcetrapib?* Hypertension, 2010. **55**(2): p. 221-3.
40. Jensen, G.B. and J. Hampton, *Early termination of drug trials*. BMJ, 2007. **334**(7589): p. 326.
41. de Grooth, G.J., et al., *Efficacy and safety of a novel cholesteryl ester transfer protein inhibitor, JTT-705, in humans: a randomized phase II dose-response study*. Circulation, 2002. **105**(18): p. 2159-65.
42. Stein, E.A., et al., *Safety and tolerability of dalcetrapib*. Am J Cardiol, 2009. **104**(1): p. 82-91.
43. Schwartz, G.G., et al., *Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome*. N Engl J Med, 2012. **367**(22): p. 2089-99.
44. Fayad, Z.A., et al., *Safety and efficacy of dalcetrapib on atherosclerotic disease using novel non-invasive multimodality imaging (dal-PLAQUE): a randomised clinical trial*. Lancet, 2011. **378**(9802): p. 1547-59.
45. Luscher, T.F., et al., *Vascular effects and safety of dalcetrapib in patients with or at risk of coronary heart disease: the dal-VESSEL randomized clinical trial*. Eur Heart J, 2012. **33**(7): p. 857-65.
46. Cao, G., et al., *Evacetrapib is a novel, potent, and selective inhibitor of cholesteryl ester transfer protein that elevates HDL cholesterol without inducing aldosterone or increasing blood pressure*. J Lipid Res, 2011. **52**(12): p. 2169-76.
47. Krishna, R., et al., *Effect of the cholesteryl ester transfer protein inhibitor, anacetrapib, on lipoproteins in patients with dyslipidaemia and on 24-h ambulatory blood pressure in healthy individuals: two double-blind, randomised placebo-controlled phase I studies*. Lancet, 2007. **370**(9603): p. 1907-14.
48. Castro-Perez, J., et al., *Anacetrapib promotes reverse cholesterol transport and bulk cholesterol excretion in Syrian golden hamsters*. J Lipid Res, 2011. **52**(11): p. 1965-73.
49. Han, S., et al., *Inhibition of cholesteryl ester transfer protein by anacetrapib does not impair the anti-inflammatory properties of high density lipoprotein*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1831**(4): p. 825-33.

50. Yvan-Charvet, L., et al., *Cholesterol efflux potential and antiinflammatory properties of high-density lipoprotein after treatment with niacin or anacetrapib*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(7): p. 1430-8.
51. Cannon, C.P., et al., *Safety of anacetrapib in patients with or at high risk for coronary heart disease*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(25): p. 2406-15.
52. Nicholls, S.J., et al., *Effects of the CETP inhibitor evacetrapib administered as monotherapy or in combination with statins on HDL and LDL cholesterol: a randomized controlled trial*. *JAMA*, 2011. **306**(19): p. 2099-109.
53. Sahebkar, A., et al., *Efficacy and Safety of Evacetrapib for Modifying Plasma Lipids: A systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials*. *Curr Pharm Des*, 2015.
54. Taylor, A.H., et al., *Beneficial effects of a novel thymimetic on lipoprotein metabolism*. *Mol Pharmacol*, 1997. **52**(3): p. 542-7.
55. Liu, Z.M., et al., *Early investigational drugs targeting PPAR-alpha for the treatment of metabolic disease*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2015. **24**(5): p. 611-21.
56. Keech, A., et al., *Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial*. *Lancet*, 2005. **366**(9500): p. 1849-61.
57. Frick, M.H., et al., *Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease*. *N Engl J Med*, 1987. **317**(20): p. 1237-45.
58. Bezafibrate Infarction Prevention, s., *Secondary prevention by raising HDL cholesterol and reducing triglycerides in patients with coronary artery disease*. *Circulation*, 2000. **102**(1): p. 21-7.
59. Rubins, H.B., et al., *Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(6): p. 410-8.
60. Birjmohun, R.S., et al., *Efficacy and safety of high-density lipoprotein cholesterol-increasing compounds: a meta-analysis of randomized controlled trials*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. **45**(2): p. 185-97.

61. Davidson, M.H., et al., *Effects of fenofibrate on atherogenic dyslipidemia in hypertriglyceridemic subjects*. Clin Cardiol, 2006. **29**(6): p. 268-73.
62. Farnier, M., *Update on the clinical utility of fenofibrate in mixed dyslipidemias: mechanisms of action and rational prescribing*. Vasc Health Risk Manag, 2008. **4**(5): p. 991-1000.
63. Staels, B., et al., *Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism*. Circulation, 1998. **98**(19): p. 2088-93.
64. McCullough, P.A., et al., *Treatment of hypertriglyceridemia with fibric acid derivatives: impact on lipid subfractions and translation into a reduction in cardiovascular events*. Rev Cardiovasc Med, 2011. **12**(4): p. 173-85.
65. Rajman, I., et al., *LDL particle size: an important drug target?* Br J Clin Pharmacol, 1999. **48**(2): p. 125-33.
66. Nikolic, D., et al., *Lipoprotein subfractions in metabolic syndrome and obesity: clinical significance and therapeutic approaches*. Nutrients, 2013. **5**(3): p. 928-48.
67. Duval, C., M. Muller, and S. Kersten, *PPARalpha and dyslipidemia*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1771**(8): p. 961-71.
68. Lee, M., et al., *Efficacy of fibrates for cardiovascular risk reduction in persons with atherogenic dyslipidemia: a meta-analysis*. Atherosclerosis, 2011. **217**(2): p. 492-8.
69. Catapano, A.L., et al., *ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS)*. Atherosclerosis, 2011. **217**(1): p. 3-46.
70. Chapman, M.J., et al., *Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management*. Eur Heart J, 2011. **32**(11): p. 1345-61.
71. Jellinger, P.S., et al., *American Association of Clinical Endocrinologists' Guidelines for Management of Dyslipidemia and Prevention of Atherosclerosis*. Endocr Pract, 2012. **18 Suppl 1**: p. 1-78.
72. Bruckert, E., et al., *The replacement of arginine by cysteine at residue 151 in apolipoprotein A-I produces a phenotype similar to that of apolipoprotein A-IMilano*. Atherosclerosis, 1997. **128**(1): p. 121-8.

73. Franceschini, G., et al., *A-Milano apoprotein. Decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family.* J Clin Invest, 1980. **66**(5): p. 892-900.
74. Franceschini, G., et al., *Relationship of the phenotypic expression of the A-Milano apoprotein with plasma lipid and lipoprotein patterns.* Atherosclerosis, 1985. **58**(1-3): p. 159-74.
75. Brouillette, C.G., et al., *Structural models of human apolipoprotein A-I: a critical analysis and review.* Biochim Biophys Acta, 2001. **1531**(1-2): p. 4-46.
76. Li, L., et al., *Rotational and hinge dynamics of discoidal high density lipoproteins probed by interchain disulfide bond formation.* Biochim Biophys Acta, 2012. **1821**(3): p. 481-9.
77. Klon, A.E., et al., *Molecular belt models for the apolipoprotein A-I Paris and Milano mutations.* Biophys J, 2000. **79**(3): p. 1679-85.
78. Sirtori, C.R., et al., *Cardiovascular status of carriers of the apolipoprotein A-I(Milano) mutant: the Limone sul Garda study.* Circulation, 2001. **103**(15): p. 1949-54.
79. Bielicki, J.K. and M.N. Oda, *Apolipoprotein A-I(Milano) and apolipoprotein A-I(Paris) exhibit an antioxidant activity distinct from that of wild-type apolipoprotein A-I.* Biochemistry, 2002. **41**(6): p. 2089-96.
80. Cimmino, G., et al., *Up-regulation of reverse cholesterol transport key players and rescue from global inflammation by ApoA-I(Milano).* J Cell Mol Med, 2009. **13**(9B): p. 3226-35.
81. Favari, E., et al., *A unique protease-sensitive high density lipoprotein particle containing the apolipoprotein A-I(Milano) dimer effectively promotes ATP-binding Cassette A1-mediated cell cholesterol efflux.* J Biol Chem, 2007. **282**(8): p. 5125-32.
82. Franceschini, G., et al., *High density lipoprotein-3 heterogeneity in subjects with the apo-AIMilano variant.* J Biol Chem, 1982. **257**(17): p. 9926-30.
83. Daum, U., et al., *Apolipoprotein A-I (R151C)Paris is defective in activation of lecithin: cholesterol acyltransferase but not in initial lipid binding, formation of reconstituted lipoproteins, or promotion of cholesterol efflux.* J Mol Med (Berl), 1999. **77**(8): p. 614-22.

84. Calabresi, L., et al., *Activation of lecithin cholesterol acyltransferase by a disulfide-linked apolipoprotein A-I dimer*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **232**(2): p. 345-9.
85. Perez-Mendez, O., et al., *Metabolism of apolipoproteins AI and AII in subjects carrying similar apoAI mutations, apoAI Milano and apoAI Paris*. *Atherosclerosis*, 2000. **148**(2): p. 317-25.
86. Roma, P., et al., *In vivo metabolism of a mutant form of apolipoprotein A-I, apo A-IMilano, associated with familial hypoalphalipoproteinemia*. *J Clin Invest*, 1993. **91**(4): p. 1445-52.
87. Ibanez, B., et al., *Recombinant HDL(Milano) exerts greater anti-inflammatory and plaque stabilizing properties than HDL(wild-type)*. *Atherosclerosis*, 2012. **220**(1): p. 72-7.
88. Parolini, C., et al., *Apolipoprotein A-I and the molecular variant apoA-I(Milano): evaluation of the antiatherogenic effects in knock-in mouse model*. *Atherosclerosis*, 2005. **183**(2): p. 222-9.
89. Speidl, W.S., et al., *Recombinant apolipoprotein A-I Milano rapidly reverses aortic valve stenosis and decreases leaflet inflammation in an experimental rabbit model*. *Eur Heart J*, 2010. **31**(16): p. 2049-57.
90. Leberherz, C., et al., *Gene transfer of wild-type apoA-I and apoA-I Milano reduce atherosclerosis to a similar extent*. *Cardiovasc Diabetol*, 2007. **6**: p. 15.
91. Brooks-Wilson, A., et al., *Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency*. *Nat Genet*, 1999. **22**(4): p. 336-45.
92. Marcil, M., et al., *Mutations in the ABC1 gene in familial HDL deficiency with defective cholesterol efflux*. *Lancet*, 1999. **354**(9187): p. 1341-6.
93. Orso, E., et al., *Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abc1-deficient mice*. *Nat Genet*, 2000. **24**(2): p. 192-6.
94. Ferrans, V.J. and D.S. Fredrickson, *The pathology of Tangier disease. A light and electron microscopic study*. *Am J Pathol*, 1975. **78**(1): p. 101-58.
95. Brunham, L.R., et al., *Clinical, Biochemical, and Molecular Characterization of Novel Mutations in ABCA1 in Families with Tangier Disease*. *JIMD Rep*, 2015. **18**: p. 51-62.

96. Clee, S.M., et al., *Age and residual cholesterol efflux affect HDL cholesterol levels and coronary artery disease in ABCA1 heterozygotes*. J Clin Invest, 2000. **106**(10): p. 1263-70.
97. Miller, M. and P.O. Kwiterovich, Jr., *Isolated low HDL-cholesterol as an important risk factor for coronary heart disease*. Eur Heart J, 1990. **11 Suppl H**: p. 9-14.
98. Kolovou, V., et al., *Platelet activating factor levels and metabolism in Tangier disease: a case study*. Lipids Health Dis, 2012. **11**: p. 89.
99. Schmitz, G., et al., *Tangier disease: a disorder of intracellular membrane traffic*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(18): p. 6305-9.
100. Carlson, L.A. and B. Philipson, *Fish-eye disease. A new familial condition with massive corneal opacities and dyslipoproteinaemia*. Lancet, 1979. **2**(8149): p. 922-4.
101. Klein, H.G., et al., *Two different allelic mutations in the lecithin-cholesterol acyltransferase gene associated with the fish eye syndrome. Lecithin-cholesterol acyltransferase (Thr123----Ile) and lecithin-cholesterol acyltransferase (Thr347----Met)*. J Clin Invest, 1992. **89**(2): p. 499-506.
102. Klein, H.G., et al., *Fish eye syndrome: a molecular defect in the lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) gene associated with normal alpha-LCAT-specific activity. Implications for classification and prognosis*. J Clin Invest, 1993. **92**(1): p. 479-85.
103. Kuivenhoven, J.A., et al., *The molecular pathology of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes*. J Lipid Res, 1997. **38**(2): p. 191-205.
104. Calabresi, L., et al., *Functional lecithin: cholesterol acyltransferase is not required for efficient atheroprotection in humans*. Circulation, 2009. **120**(7): p. 628-35.
105. Jeske, D.J. and J.M. Dietschy, *Regulation of rates of cholesterol synthesis in vivo in the liver and carcass of the rat measured using [3H]water*. J Lipid Res, 1980. **21**(3): p. 364-76.
106. de Agostini, A.I., et al., *Localization of anticoagulant active heparan sulfate proteoglycans in vascular endothelium: antithrombin binding on cultured endothelial cells and perfused rat aorta*. J Cell Biol, 1990. **111**(3): p. 1293-304.

107. van Hinsbergh, V.W., *Endothelial permeability for macromolecules. Mechanistic aspects of pathophysiological modulation*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(6): p. 1018-23.
108. Urbich, C. and S. Dimmeler, *Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology*. *Circ Res*, 2004. **95**(4): p. 343-53.
109. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. *Nature*, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
110. Reddy, K.G., et al., *Evidence that selective endothelial dysfunction may occur in the absence of angiographic or ultrasound atherosclerosis in patients with risk factors for atherosclerosis*. *J Am Coll Cardiol*, 1994. **23**(4): p. 833-43.
111. Quyyumi, A.A., et al., *Nitric oxide activity in the human coronary circulation. Impact of risk factors for coronary atherosclerosis*. *J Clin Invest*, 1995. **95**(4): p. 1747-55.
112. Bell, D.M., T.E. Johns, and L.M. Lopez, *Endothelial dysfunction: implications for therapy of cardiovascular diseases*. *Ann Pharmacother*, 1998. **32**(4): p. 459-70.
113. Ludmer, P.L., et al., *Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries*. *N Engl J Med*, 1986. **315**(17): p. 1046-51.
114. Dubey, R.K., E.K. Jackson, and T.F. Luscher, *Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of rat aortic smooth muscle cell. Role of cyclic-nucleotides and angiotensin1 receptors*. *J Clin Invest*, 1995. **96**(1): p. 141-9.
115. Garg, U.C. and A. Hassid, *Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells*. *J Clin Invest*, 1989. **83**(5): p. 1774-7.
116. Lee, J., et al., *Golgi, trafficking, and mitosis dysfunctions in pulmonary arterial endothelial cells exposed to monocrotaline pyrrole and NO scavenging*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009. **297**(4): p. L715-28.
117. Liu, J., T.E. Hughes, and W.C. Sessa, *The first 35 amino acids and fatty acylation sites determine the molecular targeting of endothelial nitric oxide synthase into the Golgi region of cells: a green fluorescent protein study*. *J Cell Biol*, 1997. **137**(7): p. 1525-35.
118. Fulton, D., et al., *Targeting of endothelial nitric-oxide synthase to the cytoplasmic face of the Golgi complex or plasma membrane regulates Akt-*

- versus calcium-dependent mechanisms for nitric oxide release.* J Biol Chem, 2004. **279**(29): p. 30349-57.
119. Patel, H.H. and P.A. Insel, *Lipid rafts and caveolae and their role in compartmentation of redox signaling.* Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(6): p. 1357-72.
 120. Sargiacomo, M., et al., *Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9407-11.
 121. Kukreja, R.C. and L. Xi, *eNOS phosphorylation: a pivotal molecular switch in vasodilation and cardioprotection?* J Mol Cell Cardiol, 2007. **42**(2): p. 280-2.
 122. Michel, J.B., et al., *Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin.* J Biol Chem, 1997. **272**(25): p. 15583-6.
 123. O'Connell, B.J. and J. Genest, Jr., *High-density lipoproteins and endothelial function.* Circulation, 2001. **104**(16): p. 1978-83.
 124. Rohrer, L., M. Hersberger, and A. von Eckardstein, *High density lipoproteins in the intersection of diabetes mellitus, inflammation and cardiovascular disease.* Curr Opin Lipidol, 2004. **15**(3): p. 269-78.
 125. Collins, T. and M.I. Cybulsky, *NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis?* J Clin Invest, 2001. **107**(3): p. 255-64.
 126. Ansell, B.J., et al., *Inflammatory/antiinflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favorably affected by simvastatin treatment.* Circulation, 2003. **108**(22): p. 2751-6.
 127. Besler, C., et al., *Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease.* J Clin Invest, 2011. **121**(7): p. 2693-708.
 128. Riwanto, M., et al., *Altered activation of endothelial anti- and proapoptotic pathways by high-density lipoprotein from patients with coronary artery disease: role of high-density lipoprotein-proteome remodeling.* Circulation, 2013. **127**(8): p. 891-904.
 129. Schwendeman, A., et al., *The effect of phospholipid composition of reconstituted HDL on its cholesterol efflux and anti-inflammatory properties.* J Lipid Res, 2015. **56**(9): p. 1727-37.

130. Kimura, T., et al., *High-density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(7): p. 1283-8.
131. Nofer, J.R., et al., *HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3*. *J Clin Invest*, 2004. **113**(4): p. 569-81.
132. Nakamura, T., et al., *Regulation of SR-BI protein levels by phosphorylation of its associated protein, PDZK1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(38): p. 13404-9.
133. Silver, D.L., *SR-BI and protein-protein interactions in hepatic high density lipoprotein metabolism*. *Rev Endocr Metab Disord*, 2004. **5**(4): p. 327-33.
134. Ziche, M., et al., *Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P*. *J Clin Invest*, 1994. **94**(5): p. 2036-44.
135. Noiri, E., et al., *Podokinesis in endothelial cell migration: role of nitric oxide*. *Am J Physiol*, 1998. **274**(1 Pt 1): p. C236-44.
136. Ashby, D.T., et al., *Factors influencing the ability of HDL to inhibit expression of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. **18**(9): p. 1450-5.
137. Xia, P., et al., *Tumor necrosis factor-alpha induces adhesion molecule expression through the sphingosine kinase pathway*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(24): p. 14196-201.
138. Shimamura, K., et al., *Expression of adhesion molecules by sphingosine 1-phosphate and histamine in endothelial cells*. *Eur J Pharmacol*, 2004. **486**(2): p. 141-50.
139. Kimura, T., et al., *Sphingosine 1-phosphate receptors mediate stimulatory and inhibitory signalings for expression of adhesion molecules in endothelial cells*. *Cell Signal*, 2006. **18**(6): p. 841-50.
140. Kimura, T., et al., *Role of scavenger receptor class B type I and sphingosine 1-phosphate receptors in high density lipoprotein-induced inhibition of adhesion molecule expression in endothelial cells*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(49): p. 37457-67.
141. Bolick, D.T., et al., *Sphingosine-1-phosphate prevents tumor necrosis factor- α -mediated monocyte adhesion to aortic endothelium in mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(5): p. 976-81.

142. Catapano, A.L., et al., *HDL in innate and adaptive immunity*. Cardiovasc Res, 2014. **103**(3): p. 372-83.
143. Cavelier, C., L. Rohrer, and A. von Eckardstein, *ATP-Binding cassette transporter A1 modulates apolipoprotein A-I transcytosis through aortic endothelial cells*. Circ Res, 2006. **99**(10): p. 1060-6.
144. Rohrer, L., et al., *High-density lipoprotein transport through aortic endothelial cells involves scavenger receptor BI and ATP-binding cassette transporter G1*. Circ Res, 2009. **104**(10): p. 1142-50.
145. Martinez, L.O., et al., *Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis*. Nature, 2003. **421**(6918): p. 75-9.
146. Martinez, L.O., et al., *Ecto-F1-ATPase/P2Y pathways in metabolic and vascular functions of high density lipoproteins*. Atherosclerosis, 2015. **238**(1): p. 89-100.
147. Rohrer, L., et al., *Binding, internalization and transport of apolipoprotein A-I by vascular endothelial cells*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1761**(2): p. 186-94.
148. Schmitz, G., et al., *Interaction of high density lipoproteins with cholesteryl ester-laden macrophages: biochemical and morphological characterization of cell surface receptor binding, endocytosis and resecretion of high density lipoproteins by macrophages*. EMBO J, 1985. **4**(3): p. 613-22.
149. Alam, R., et al., *Receptor-mediated uptake and 'retroendocytosis' of high-density lipoproteins by cholesterol-loaded human monocyte-derived macrophages: possible role in enhancing reverse cholesterol transport*. Biochim Biophys Acta, 1989. **1004**(3): p. 292-9.
150. Fruhwurth, S., et al., *High-density lipoprotein endocytosis in endothelial cells*. World J Biol Chem, 2013. **4**(4): p. 131-40.
151. Bierman, E.L., O. Stein, and Y. Stein, *Lipoprotein uptake and metabolism by rat aortic smooth muscle cells in tissue culture*. Circ Res, 1974. **35**(1): p. 136-50.
152. Information, N.C.o.B. *GEO-PROFILES SR-BI*. 2018 [cited 2018 11/03/2018]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/?term=sr-bi>.
153. Webb, N.R., et al., *The fate of HDL particles in vivo after SR-BI-mediated selective lipid uptake*. J Lipid Res, 2002. **43**(11): p. 1890-8.
154. Bouis, D., et al., *Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research*. Angiogenesis, 2001. **4**(2): p. 91-102.
155. Barter, P.J., *Inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression by high density lipoproteins*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1997. **24**(3-4): p. 286-7.

156. Calabresi, L., et al., *Inhibition of VCAM-1 expression in endothelial cells by reconstituted high density lipoproteins*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **238**(1): p. 61-5.
157. Mineo, C. and P.W. Shaul, *Novel biological functions of high-density lipoprotein cholesterol*. *Circ Res*, 2012. **111**(8): p. 1079-90.
158. Rohrl, C., et al., *Bile acids reduce endocytosis of high-density lipoprotein (HDL) in HepG2 cells*. *PLoS One*, 2014. **9**(7): p. e102026.
159. Gonzalez-Pacheco, H., et al., *Levels of High-Density Lipoprotein Cholesterol are Associated With Biomarkers of Inflammation in Patients With Acute Coronary Syndrome*. *Am J Cardiol*, 2015. **116**(11): p. 1651-7.
160. Tanaka, S., et al., *Low HDL levels in sepsis versus trauma patients in intensive care unit*. *Ann Intensive Care*, 2017. **7**(1): p. 60.
161. Wu, B.J., et al., *Cholesteryl ester transfer protein inhibition enhances endothelial repair and improves endothelial function in the rabbit*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015. **35**(3): p. 628-36.
162. Cardouat, G., et al., *Ectopic adenine nucleotide translocase activity controls extracellular ADP levels and regulates the F1-ATPase-mediated HDL endocytosis pathway on hepatocytes*. *Biochim Biophys Acta*, 2017. **1862**(9): p. 832-841.
163. Perisa, D., et al., *Itinerary of high density lipoproteins in endothelial cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2016. **1861**(2): p. 98-107.
164. Simons, K. and E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes*. *Nature*, 1997. **387**(6633): p. 569-72.
165. Martinez-Beamonte, R., et al., *Sphingomyelin in high-density lipoproteins: structural role and biological function*. *Int J Mol Sci*, 2013. **14**(4): p. 7716-41.
166. Nieland, T.J., et al., *Discovery of chemical inhibitors of the selective transfer of lipids mediated by the HDL receptor SR-BI*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(24): p. 15422-7.
167. Saddar, S., et al., *Scavenger receptor class B type I is a plasma membrane cholesterol sensor*. *Circ Res*, 2013. **112**(1): p. 140-51.
168. Cavelier, C., et al., *The beta-chain of cell surface F(0)F(1) ATPase modulates apoA-I and HDL transcytosis through aortic endothelial cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(1): p. 131-9.

169. Pritchard, K.A., Jr., et al., *Effect of low-density lipoprotein on endothelial cell membrane fluidity and mononuclear cell attachment*. Am J Physiol, 1991. **260**(1 Pt 1): p. C43-9.
170. Cockerill, G.W., et al., *High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(11): p. 1987-94.
171. Li, L., et al., *Lipid rafts enhance the binding constant of membrane-anchored receptors and ligands*. Soft Matter, 2017. **13**(23): p. 4294-4304.
172. Lopes Pinheiro, M.A., et al., *Acid Sphingomyelinase-Derived Ceramide Regulates ICAM-1 Function during T Cell Transmigration across Brain Endothelial Cells*. J Immunol, 2016. **196**(1): p. 72-9.
173. Serrano, D., et al., *Intercellular adhesion molecule 1 engagement modulates sphingomyelinase and ceramide, supporting uptake of drug carriers by the vascular endothelium*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(5): p. 1178-85.
174. Imokawa, G., et al., *Sphingosylphosphorylcholine is a potent inducer of intercellular adhesion molecule-1 expression in human keratinocytes*. J Invest Dermatol, 1999. **112**(1): p. 91-6.
175. Hosokawa, Y., et al., *Cytokines differentially regulate ICAM-1 and VCAM-1 expression on human gingival fibroblasts*. Clin Exp Immunol, 2006. **144**(3): p. 494-502.
176. Peters, S.L. and A.E. Alewijnse, *Sphingosine-1-phosphate signaling in the cardiovascular system*. Curr Opin Pharmacol, 2007. **7**(2): p. 186-92.
177. Mineo, C., et al., *High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9142-9.
178. De Palma, C., et al., *Endothelial nitric oxide synthase activation by tumor necrosis factor alpha through neutral sphingomyelinase 2, sphingosine kinase 1, and sphingosine 1 phosphate receptors: a novel pathway relevant to the pathophysiology of endothelium*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(1): p. 99-105.
179. Mogami, K., H. Kishi, and S. Kobayashi, *Sphingomyelinase causes endothelium-dependent vasorelaxation through endothelial nitric oxide production without cytosolic Ca(2+) elevation*. FEBS Lett, 2005. **579**(2): p. 393-7.

180. Martinez-Ramirez, M., et al., *HDL-sphingomyelin reduction after weight loss by an energy-restricted diet is associated with the improvement of lipid profile, blood pressure, and decrease of insulin resistance in overweight/obese patients*. Clin Chim Acta, 2016. **454**: p. 77-81.
181. Pruzanski, W., et al., *Comparative analysis of lipid composition of normal and acute-phase high density lipoproteins*. J Lipid Res, 2000. **41**(7): p. 1035-47.
182. Cukier, A.M.O., et al., *Structure-function relationships in reconstituted HDL: Focus on antioxidative activity and cholesterol efflux capacity*. Biochim Biophys Acta, 2017. **1862**(9): p. 890-900.
183. Ivaska, J., et al., *Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling*. Exp Cell Res, 2007. **313**(10): p. 2050-62.

RESEARCH

Open Access



Characterization of immortalized human dermal microvascular endothelial cells (HMEC-1) for the study of HDL functionality

Mónica Muñoz-Vega¹, Felipe Massó², Araceli Páez², Elizabeth Carreón-Torres¹, Hector A. Cabrera-Fuentes^{3,4,5}, José Manuel Fragoso¹, Nonanzit Pérez-Hernández¹, Laurent O. Martinez⁶, Souad Najib⁶, Gilberto Vargas-Alarcón¹ and Óscar Pérez-Méndez^{1*}

Abstract

Background: Primary cultures endothelial cells have been used as models of endothelial related diseases such atherosclerosis. Biological behavior of primary cultures is donor-dependent and data could not be easily reproducible; endothelial cell lines are emerging options, particularly, human dermal microvascular endothelial cells (HMEC-1), that should be validated to substitute primary cultures for the study of HDL functions.

Methods: Morphology, size and granularity of cells were assessed by phase contrast microscopy and flow cytometry of HMEC-1. The adhesion molecules, ICAM-1 and VCAM-1 after TNF- α stimulation, and endothelial markers CD105 endoglin, as well as HDL receptor SR-B1 were determined by flow cytometry. Internalization of HDL protein was demonstrated by confocal microscopy using HDL labeled with Alexa Fluor 488. HUVECs were used as reference to compared the characteristics with HMEC-1.

Results: HMEC-1 and HUVEC had similar morphologies, size and granularity. HMEC-1 expressed endothelial markers as HUVECs, as well as functional SR-B1 receptor since the cell line was able to internalize HDL particles. HMEC-1 effectively increased ICAM-1 and VCAM-1 expression after TNF- α stimulation. HUVECs showed more sensibility to TNF- α stimulus but the range of ICAM-1 and VCAM-1 expression was less homogeneous than in HMEC-1, probably due to biological variation of the former. Finally, the expression of adhesion molecules in HMEC-1 was attenuated by co-incubation with HDL.

Conclusion: HMEC-1 possess characteristics of endothelial cells, similar to HUVECs, being a cell line suitable to evaluate the functionality of HDL vis-à-vis the endothelium.

Keywords: HDL, HUVEC, Adhesion molecules, Inflammation, Endoglin, Atherosclerosis

Background

Endothelium has been focused as the site of initiation of atherosclerosis [1–6]; endothelial cells perform important inflammatory, apoptotic and thrombotic activities in order to maintain vascular homeostasis [7–10]. To elucidate the cellular and molecular mechanisms of pathologies related with the endothelium such as atherosclerosis, primary cultures of bovine aortic endothelial cells (BAECs) or human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) have been used

as models. However, the biological responses of endothelial cells to different stimulus are donor-dependent [11–15], thus the achievement of reproducible results becomes challenging. This is one of the major disadvantages of these primary cultures and stresses the validity of conclusions obtained with HUVEC of BAECs. In addition, endothelial cell conservation, isolation, as well as a nutritional requirements make these primary cultures technically demanding [15]. Besides the biological variability, and the economic and technical disadvantages, ethical considerations and legislations in some countries make difficult the donation of umbilical cords to isolate HUVECs. However, HUVECs are

* Correspondence: opmendez@yahoo.com

¹Molecular Biology Department, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio

Chávez", Juan Badiano 1, Sección XVI, 14080 Mexico City, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

still considered the reference model in almost several endothelial-based studies.

Some endothelial cell lines have been developed as alternative to primary cell culture with advantages in life span and growth requirements [15]. An example of these alternatives are HMEC-1 cells, a microvasculature endothelial cell line developed from human foreskins and transformed with a vector designated as pSVT. This construct is based in PBR322 containing the sequences encoding the transforming protein SV40 large T, and its expression is driven by the Rous sarcoma virus long terminal repeat [16].

HMEC-1 has a life span 10 times longer than primary culture and their nutritional exigencies are lower. Additionally, HMEC-1 cell line retains endothelial phenotypical characteristics like expression of von Willebrand factor, uptake of acetylated-LDL, and expresses several endothelial markers and adhesion molecules [16]. These characteristics suggest that HMEC-1 would be a suitable model to study lipoproteins endothelium interactions studies, specifically with lipoproteins, an approach that has not been explored yet. Therefore, in the present study we analyzed the feasibility of using HMEC-1 cell line as alternative for the study of some HDL properties *vis-à-vis* the endothelial cells, i.e. regulation of adhesion molecules and HDL internalization.

Methods

Reagents

Fetal calf serum were from GE healthcare (Logan, Utah) and Corning (New York, NY) L-glutamine, N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-hanesulfonic acid (HEPES), endothelial cell growth supplement and porcine heparin were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO); M-199 medium with phenol red, MCDB-131 medium with phenol red, type II collagenase, liquid trypsin EDTA were from Gibco Laboratories (Grand Island, NY). Recombinant TNF- α was from Boehringer-Mannheim Bioquímica (Mexico City), APC conjugated anti-CD105, anti-VCAM-1 labeled with PE and anti-ICAM-1 associated with FITC were purchased from BioLegend (San Diego, CA) and anti-SR-B1 from Novus Biologicals (Littleton, CO). Goat anti-mouse IgG₂ secondary antibody conjugated with PE from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX). Protein labeling kit molecular probes Alexa 488 was purchased from Life technologies (Eugene, OR).

Cell culture

HUVECs were isolated by treatment with 0.2% type II collagenase and cultured using M-199 medium with phenol red supplemented as previously described [12]. Briefly, HUVECs were cultured at 37 °C in a 7% CO₂ humidified atmosphere, in medium M-199 with phenol red and 20% fetal calf serum, penicillin, streptomycin, 1- β -glutamine 10 mM, hydrocortisone 1 μ g/mL, endothelial cell growth

supplement (40 μ g/mL) and heparin. The experiments were performed using pools composed of three different umbilical cords from healthy donors without personal and familiar history of cardiovascular diseases.

HMEC-1 (ATCC CRL-3243) were cultured at 37 °C in a 7% CO₂ humidified atmosphere using MCDB-131 medium with phenol red and supplemented with 15% fetal calf serum, penicillin, streptomycin, L-glutamine 10 mM, hydrocortisone 1 μ g/mL, endothelial cell growth supplement (20 μ g/mL).

Morphology and granularity were assessed using cells without markers or stimuli using flow cytometry in a BD FACs Calibur equipment (Singapore).

Expression of adhesion molecules and endothelial markers

To induce the expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), cells were recovered using PBS solution using 0.5% trypsin/EDTA. After incubation, medium was changed by MCDB-131 or M-199 supplemented with 7% lipid poor serum prepared by ultraconcentration (starvation medium) [17]. Then, cells were incubated during 5 h with TNF α at different concentrations.

After treatment with TNF- α , cells were recovered using collagenase, washed and suspended. Cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde in PBS and then labeled by incubation for 1 h with fluorophore-conjugated anti-ICAM-1, anti-VCAM-1, anti-CD105 antibodies. Alternatively, anti scavenger receptor class B member 1 (SR-B1) and the corresponding secondary anti-mouse phycoerythrin (PE) conjugated antibody were used to determine this receptor. Antibodies were washed and then cells were analyzed by flow cytometry.

HDL isolation and labeling

We obtained plasma of 81 voluntary healthy donors from "Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez" who agreed to participate in our study through signing the correspondent informed consent approved by the institutional research committee. Subjects were excluded if they had personal history of diabetes, hypertension, chronic kidney disease, liver disease, anemia, thyroid abnormalities, if they were taking any medication or if they present any dyslipidemia. Samples were divided by day of obtaining in 7 pools each with an average of 11 samples. HDL₂ were isolated by sequential ultracentrifugation as reported before [18]. Cell stimulation with HDL was performed using a final concentration of 40 μ g/dL of cholesterol for each condition.

HDL internalization assay

HDL protein was labeled using Alexa 488 Molecular Probes according to the specifications of manufacturer (Life Technologies, Eugene, OR). HDL internalization

assays were performed as described before [19] with slight modifications. Briefly, cells were starved and incubated in all steps of the assay with medium MCDB or M-199, accordingly with cell type, containing 7% of lipid poor fetal calf serum, cells were washed with PBS and images were obtained by confocal microscopy using a LSM-700 Zeiss equipment (Baden-Württemberg).

Statistical analysis

Results were expressed as mean fluorescence intensity obtained after analysis of 5000 events. Comparison between groups was performed using Kruskal-Wallis non-parametric test using Graph Pad Prism 5.0 software.

Results

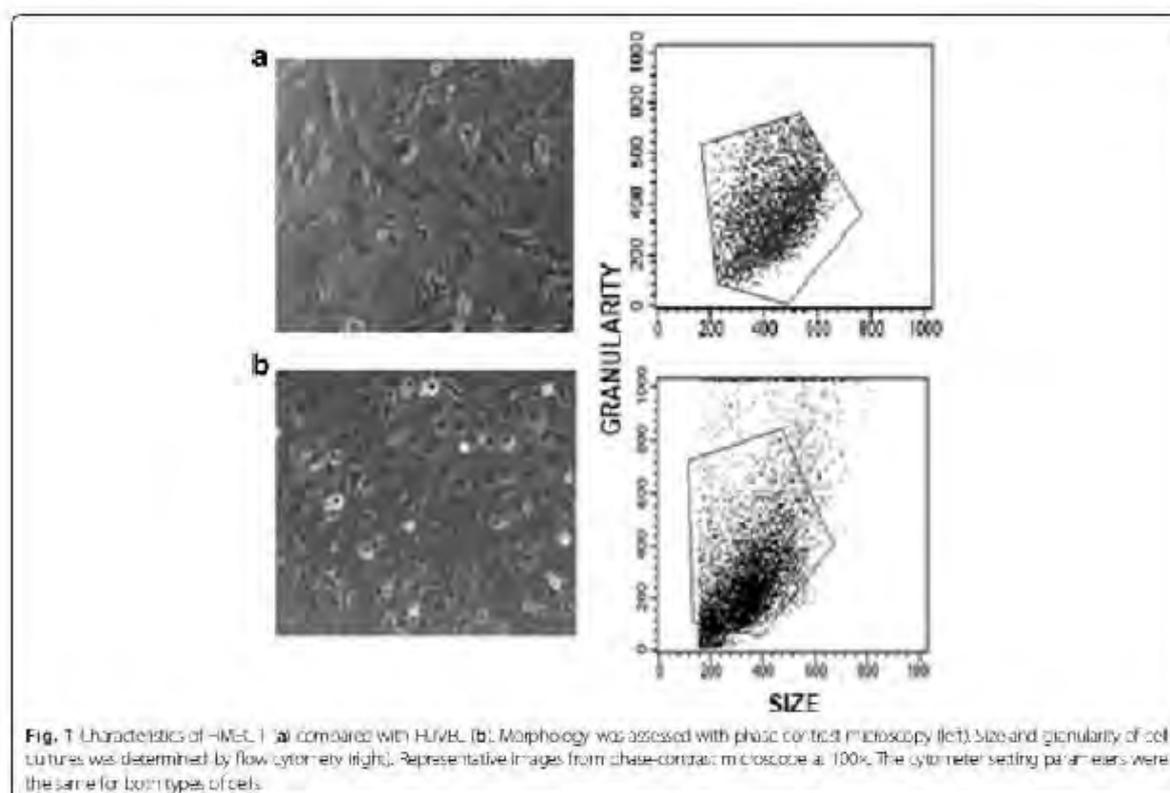
Morphology, size and granularity were similar for both, HMEC-1 and HUVECs (Fig. 1). We determined the optimal concentration of TNF- α to induce ICAM-1 and VCAM-1, by a dose-response curve (Fig. 2); we measured the response through dot plots in terms of quantity of both, ICAM-1 and VCAM-1 expressed as double positive cells (right up quadrant) for HMEC-1 (Fig. 2A) and HUVEC (Fig. 2B). The optimal response of HMEC-1 to TNF- α was reached with a concentration of 15 ng/mL (Fig. 2C);

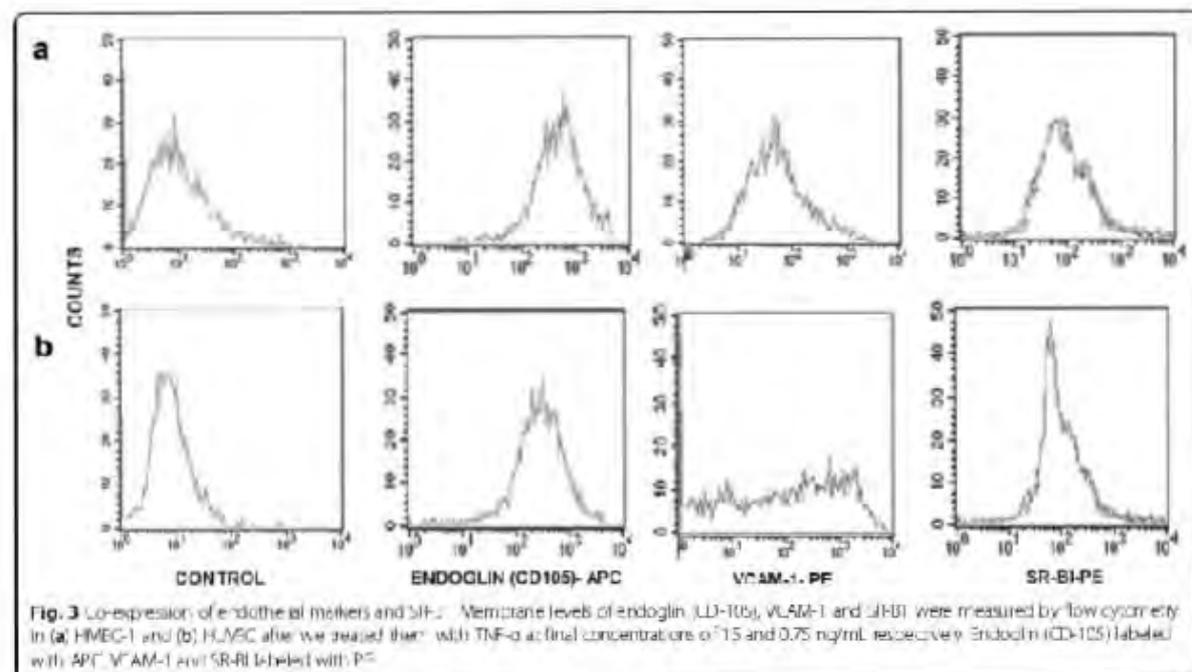
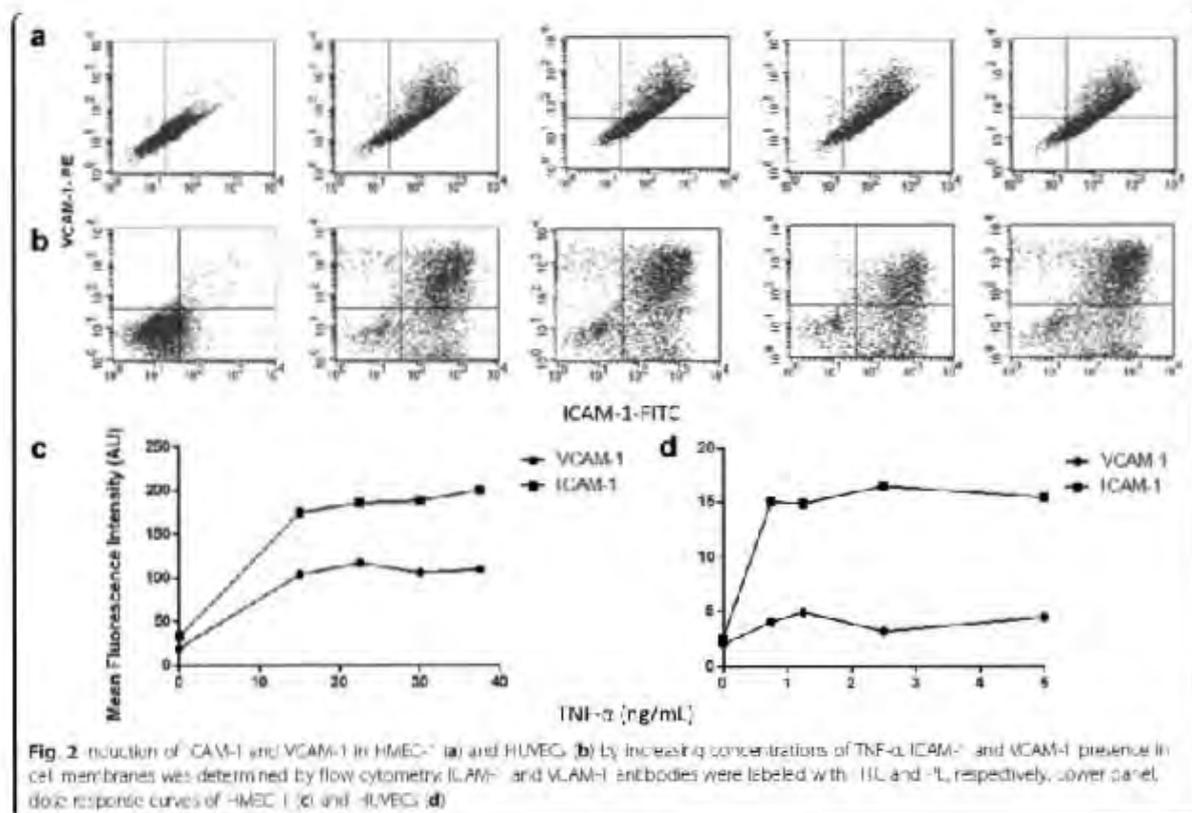
higher doses of TNF- α did not induce a greater expression of adhesion molecules. Therefore we used the concentration of 15 ng/mL of TNF- α in further experiments.

Concerning HUVECs, the dot plots showed a wider range of TNF- α -induced expression of ICAM-1 and VCAM-1 (Fig. 2B); responses were observed from doses of 0.75 ng/mL of TNF- α but the dose-response effect was not as regular as for HMEC-1. We used 0.75 ng/mL of TNF- α concentration for the subsequent experiments with HUVECs.

We further search for the expression of VCAM-1 and CD105, also named endoglin, characteristic of endothelial cells. We observed a co-expression of VCAM-1 and endoglin in both types of endothelial cells after TNF- α stimulation. Endoglin was expressed in the same extent in both types of cells and histograms were very similar for a constitutive marker (Fig. 3). In contrast, VCAM-1 was expressed in a broad range in HUVEC pool of 3 healthy donors whereas such expression was more homogeneous in HMEC-1 cells (Fig. 3).

We further quantified membrane SR-B1 (Fig. 3); both, HUVEC and HMEC-1 were positive for this receptor at similar levels of expression (Fig. 3). To explore functional aspects of HDL on endothelium function, we





incubated HMEC-1 with 7 different HDL pools, TNF- α , or both. ICAM-1 and VCAM-1 tended to be expressed below the basal levels (constitutive expression) when cells were co-incubated with HDL, but the differences did not reach statistical significance. In contrast, HDL significantly attenuated the expression of TNF- α -induced VCAM-1, whereas ICAM-1 HDL inhibition did not reach statistical significance (Fig. 4).

SR-B1 expression in HMEC-1 is relevant in terms of HDL endothelial functionality; previous studies [20, 21] using primary cultures demonstrated that HDL are internalized by endothelial cells. Therefore, we performed HDL internalization assays in HMEC-1 cells and HUVECs using HDL protein labeled with Alexa Fluor 488. Confocal microscopy showed that HMEC-1 and HUVEC are able to internalize HDL (Fig. 5). Interestingly, both endothelial models showed that HDL protein was located in discrete granules inside the cytoplasm.

Discussion

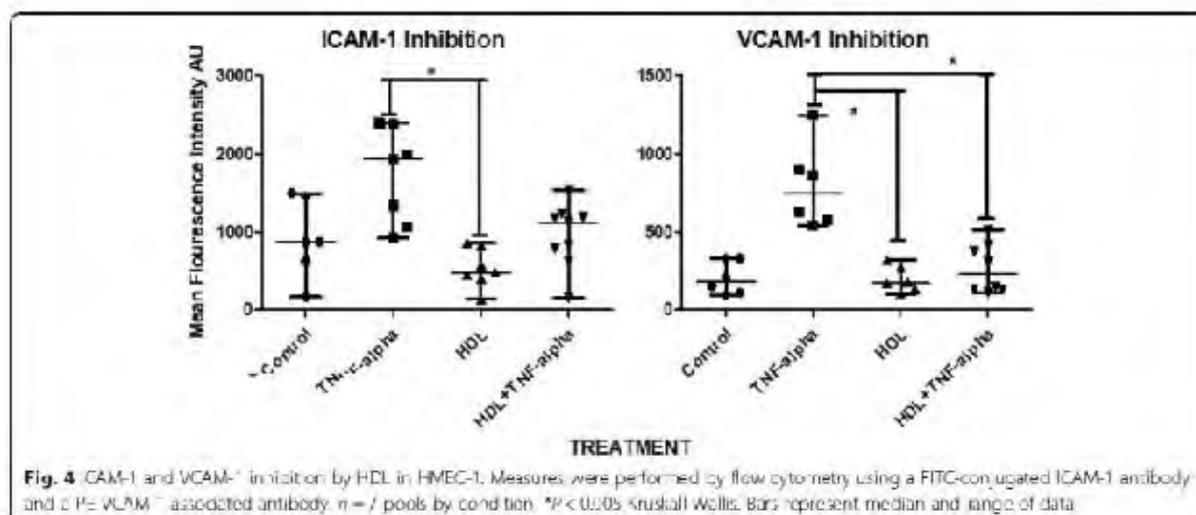
In this study we demonstrated that HMEC1 possess similar properties than HUVECs vis-à-vis HDL interaction. HUVECs have been extensively used for the study of lipoprotein properties with regard to endothelial cells. However, the use of HUVECs represents some disadvantages, particularly related with reproducibility, due to the inter-individual biological variability [11–14] and technical complexity. For this, in the present work we propose the use of HMEC-1 a cell line of endothelium as alternative of HUVECs.

We first demonstrated that both cell types have similar size and granularity; size and granularity are suitable parameters to identify cell types. Granularity is a measure of cell complexity and depends of nucleus size and the

presence of cytoplasmic organelles and vesicles. Therefore, the structure and complexity of HMEC-1 and HUVECs are comparable. Interestingly, HMEC-1 were more homogeneous than HUVECs in terms of size and granularity, suggesting less variability of experimental data obtained with these cells.

ICAM-1 and VCAM-1 are cell adhesion molecules expressed by the endothelium with important roles in cell migration during inflammation. ICAM-1 is expressed constitutively and strongly induced by stimulus like TNF- α , whereas VCAM-1 is mainly expressed after the pro-inflammatory stimulus [22, 23]. In this context, HMEC-1 reached a maximum expression of ICAM-1 and VCAM-1 with 15 ng/mL TNF- α , and such expression remained stable with higher concentrations of TNF- α . In contrast, HUVECs showed a variable expression at increasing doses of the stimulus. The inter-individual variability of HUVECs may be the cause of the less homogeneous dose-response of HUVECs in these experiments, even if we use a pool of umbilical cords from three different donors to obtain more representative results than those obtained with single donor samples. These observations support the idea that HMEC-1 cultures are helpful to obtain more reproducible results. However, it should be emphasized that the HMEC-1 are less sensitive to stimulus, the amount of TNF- α to reach a maximum response in was about 20 times the concentration required for HUVECs. These results should be considered when using HMEC-1 to evaluate endothelial response to inflammatory stimulus.

One of the aims of this study is to determine whether HMEC-1 are suitable for evaluating some HDL properties with regard to endothelial cells; to the best of our knowledge, there are not previous reports with this purpose. Interaction of HDL with



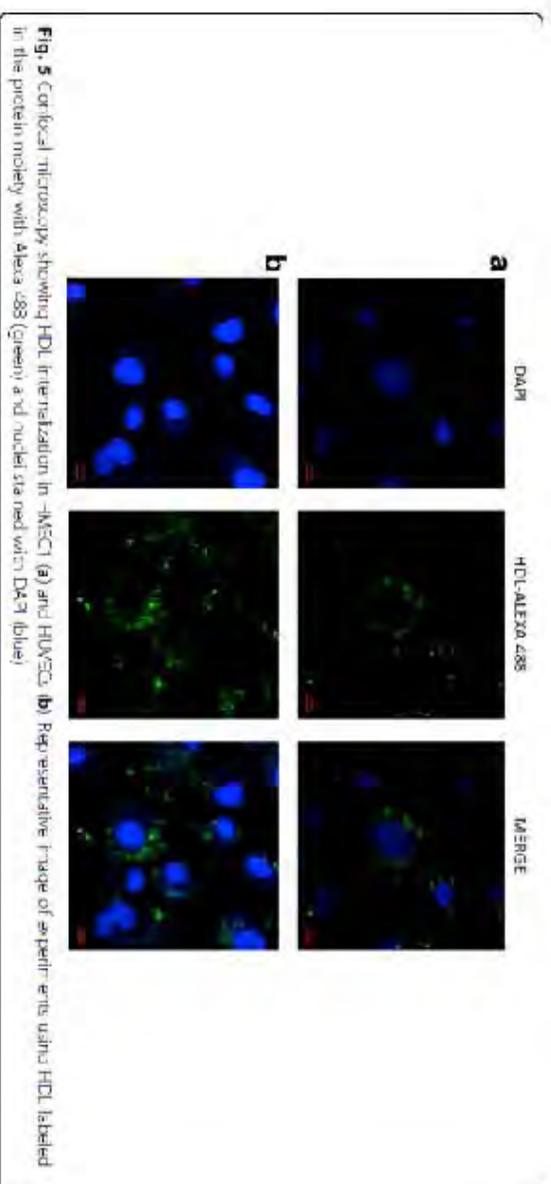


Fig. 5 Confocal microscopy showing HDL internalization in HMEC-1 (a) and HUVEC (b). Representative images of sequential channels showing HDL (labeled in the protein moiety with Alexa 488 (green)) and nuclei (stained with DAPI (blue))

cells is often mediated by SR-B1 also named CLA-1. This is the main known receptor for HDL expressed by the liver, steroidogenic tissues and recently, it has been reported in endothelium [24, 25]. For this reason, we first look for the expression of such receptor in HUVEC and HMEC-1; our results clearly showed that both type of cells expressed SR B1 in a similar extent supporting again the idea that HMEC-1 are useful for the study of HDL properties. In addition, the endothelial marker CD105, also known as endoglin, was expressed on the membrane of both types of endothelial cells. CD105 is a transforming growth factor-beta (TGF-beta) co-receptor expressed mainly on endothelial cells and involved in cardiovascular development, angiogenesis, and vascular remodeling [26].

Once we demonstrated that HMEC-1 express key markers of endothelium and the HDL receptor, SR-B1, we further analyzed the usefulness of this cell line to evaluate the anti-inflammatory property of HDL related with the expression of adhesion molecules induced by TNF- α , [27, 28]. Previous studies have demonstrated that this property of HDL is impaired in some individuals and may be associated with increased risk of coronary heart disease [29–31]. We performed these experiments using pools of plasma obtained from at least 12 different donors in order reduce the heterogeneity of the samples in terms of the regulation of adhesion molecules. We observed that HDL clearly inhibited VCAM-1 expression when incubated with TNF- α as expected, whereas ICAM-1 only showed a tendency to a lower expression. Interestingly, the incubation of HDL inhibited expression of adhesion molecules below control levels. This experiment demonstrated HMEC-1

are suitable for HDL anti-inflammatory function studies as well.

A potential mechanism involved in the regulation of endothelial cell function by HDL, may be the internalization of these lipoproteins as previously demonstrated in HUVECs and bovine aortic endothelial cells [21, 32–34]. Therefore, we look for the capacity of HMEC-1 to internalize HDL particles by labeling the protein moiety; our data clearly showed that HMEC-1 were able to internalize HDL particles. Interestingly, HDL is likely to be inside vesicles in perinuclear area, similar to previous reports [20, 21]. These previous studies have demonstrated that HDL vesicles did not present any typical marker of organelles from secretory pathway, suggesting an additional mechanism for HDL; nevertheless, internalization process at the moment is not totally understood [35] and requires further investigation.

Conclusion

In this study we demonstrated that HMEC-1 possess characteristics of endothelial cells, in some cases more homogeneous than HUVECs, supporting the idea that this cell line is suitable to evaluate the functionality of HDL vis-à-vis the endothelium.

Abbreviations

AMEC: Aortic endothelial cells; CD105: cluster of differentiation 105 (H1); IL-1 β : Interleukin 1 β ; HMEC-1: Human umbilical vein endothelial cells; HUVEC: human umbilical vein endothelial cells; ICAM-1: Intracellular adhesion molecule 1; SR-B1: scavenger receptor class B type 1; TNF- α : tumor necrosis factor α ; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1

Acknowledgments

None declared.

Funding

Mónica Muñoz-Vega is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 261915 from CONACYT.

Availability of data and materials

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article.

Authors' contributions

Conception and design of the study: OP, M, MM, V, FM, AF, LOM. Collection of the samples and generation of data: MM, V, FM, AP, OC, T, GN. Analysis, interpretation of data, critical review of the manuscript: OP, M, FM, AF, JMF, NF-H, GV-A. Drafting and revision of the manuscript: MM, V, OP, FM, GV-A, HAC-F, LOM. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Scientific and Ethics Committees of the National Institute of Cardiology "Ignacio Chávez" Health Sciences Center were informed about the objectives of the study and those who agreed to participate signed a letter of informed consent.

Consent for publication

Not Applicable

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Molecular Biology Department, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Juan Boscó 1, Suroeste 20M, 14090 Mexico City, Mexico. ²Physiology Department, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Mexico City, Mexico. ³Cardiovascular and Metabolic Disorders Program, Duke-NUS Graduate Medical School, Singapore. ⁴Institute of Biochemistry, Medical School, Justus Liebig University, Giessen, Germany. ⁵National Heart Centre Singapore, National Heart Research Institute Singapore, Singapore. ⁶Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, CNRS, Inserm, UMR 1016 Toulouse, France.

Received: 14 September 2017 Accepted: 7 March 2018

Published online: 09 March 2018

References

1. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Shibuya T, Lim SS, Murray CJ. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: a systematic analysis of population health data. *Lancet*. 2002;362(9141):1-11.
2. Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: global burden of disease study. *Lancet*. 1997;349(9145):427-435.
3. Davies MJ, Woolf N, Rowles PM, Pepper J. Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries. *Br Heart J*. 1985;52(430):64-68.
4. Taggino A, Ross R, Libby P. Correlates of hypercholesterolemia in the nonhuman primate: I. Changes that lead to fatty streak formation. *Atherosclerosis*. 1984;49:323-40.
5. Gentry KL. The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol*. 1981;107:167-93.
6. Nishikawa Y, Reyes EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE deficient mouse. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18(4):751-757.
7. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007;115:782-91.
8. Michienzi C. Endothelial cell function. *Curr Physiol*. 2009;196:410-45.
9. Hadi HA, Carr CE, Al-Suwaidi J. Endothelial dysfunction, cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag*. 2005;1:183-95.

10. Rajendran P, Kengharajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthidharan D, Sethi G, Nishigaki I. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci*. 2013;9:1057-68.
11. Mendez-Cruz AR, Paez A, Jimenez-Rios R, Reyes-Rosal J, Varela E, Curbulo Vasquez A, Rodriguez E, Lopez-Marino R, Masso FA, Torres-Romo L, et al. Increased expression of inflammation-related vasculostatic molecules by HUVECs in a murine model of a strong family history of myocardial infarction stimulated with TNF- α and oxLDL. *Immunol Lett*. 2007;111:116-23.
12. Paez A, Rodriguez E, Hendon L, Varela E, Fortou T, Lippincott E, Masso F, Gonzalez J, Montano F. Altered distribution of molecules associated with leukocyte traffic in HUVECs derived from newborns with a strong family history of myocardial infarction. *Acta Histochem*. 2008;110:42-52.
13. Avaredo-Vasquez N, Paez A, Zapata L, Acosta-Leyva S, Cienfuegos E, Masso F, Montano F. HUVECs from newborns with strong family history of diabetes show diminished ROS synthesis in the presence of high glucose concentrations. *Diabetes Metab Res Rev*. 2007;23:71-80.
14. Loddermann A, Schön ME. TNF- α induced leukocyte endothelial cell interactions show marked interindividual differences independent of the clinical response to statin therapy. *Exp Dermatol*. 2014;23:153-4.
15. Bouis C, Hospers GA, Meijer C, Moelma G, Mulder NH. Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel related research. *Angiogenesis*. 2007;10:1-10.
16. Riley PW, Corbett FJ, Swartz MA, George WG, Summers S, Rowe DC, Lemley TH. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial line. *J Invest Dermatol*. 1992;99:683-90.
17. Benoit JJ, Scam AM, Kyzazoglou T, Lombet A, Lemey G, Lazdunski M. Natural variation and expression profiles of genes in different expressions of excitability, corresponding to different stages of differentiation, in chicken cardiac cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79:768-72.
18. Hove JR, Eder HA, Engdon JH. The distribution and chemical composition of fibronectin-fibrinogen complexes in human serum. *J Clin Invest*. 1955;34:1345-53.
19. Cariozat G, Duparc T, Fried S, Perret S, Nikit S, Martinez LD. Ectopic adenosine nucleotide triphosphatase activity controls intracellular ADP levels and regulates the TNF- α -mediated NF- κ B endothelial pathway in macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 1802(2017):832-41.
20. Porro D, Rohrer L, Koch A, von Eckardstein A. Inactivity of high density lipoproteins in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 1861:2016:9-107.
21. Fuhuaith S, Paez-Hua M, Sittum R, Kuvak W, Waiwatt KM, Ratt C, Sae-y H. High-density lipoprotein endocytosis in endothelial cells. *World J Bio Chem*. 2013;4:131-40.
22. Widner O, Lipkow T, Krop J. Increased expression of ICAM-1, E-selectin, and VCAM-1 by cultured human endothelial cells upon exposure to bacteria. *Exp Dermatol*. 1992;11:91-8.
23. Wong L, Dotovini-Zis K. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) by human brain microvessel endothelial cells in primary culture. *Mol Brain Res*. 1997;49:175-79.
24. Yeh YC, Hwang G, Liu JP, Yang WC. Identification and expression of scavenger receptors SR-B1 in endothelial cells and smooth muscle cells of rat aorta in vitro and in vivo. *Atherosclerosis*. 2002;167:105-108.
25. Aron S, Scheer PE, Luthi HF, Birger M. Expression cloning of GPR109A (CD36-related class B scavenger receptor). *J Biol Chem*. 1994;269:11003-9.
26. Sanchez-Bliner T, Botella LM, Ydozo B, Langa C, Bernabou C. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem*. 2002;277(43):799-803.
27. Cooke MW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Baner PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:1987-94.
28. Ren H. Inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression by high density lipoproteins. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1997;24:286-7.
29. Selstad TF, Holven IB, Orntoft K, Ottavali J, Halvorsen B, Myhre AM, Ose L, Nordest MG. Altered composition of HDL in FH subjects during a HDL infusion with an antioxidant function. *Clin Chim Acta*. 2007;379:171-80.
30. Hsu YR, He D, Meng J, He Y, Zhou C, Ren H, He X, Wang C, Jin L, Li, et al. High-density lipoprotein of patients with breast cancer complicated with type 2 diabetes mellitus promotes cancer cell adhesion to vascular endothelium via ICAM-1 and VCAM-1 upregulation. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;154:441-55.
31. Liu G, Arveiler D, Evans A, Amouyel P, Ferrières J, Bard JM, Eliaoui L, Prichard JC, Ducimetiere P, Group PS. Circulating soluble adhesion

- molecules (LDL and VLDL) and incident coronary heart disease: the FRAXI study. *Atherosclerosis*. 2008;170:169–76.
32. Rohrer L, Omszorg PM, Lehner M, Landolt F, Pittiniqer F, von Eckardstein A. High-density lipoprotein transport through aortic endothelial cells involves scavenger receptor BI and ATP-binding cassette transporter ABCA1. *Circ Res*. 2009;104:1142–50.
 33. von Eckardstein A, Rohrer L. Transendothelial lipoprotein transport and regulation of endothelial permeability and integrity by lipoproteins. *Curr Opin Lipidol*. 2009;20:197–205.
 34. Cavalleri C, Omszorg PM, Rohrer L, von Eckardstein A. The beta-chain of cell surface P2F(1) ATPase modulates apoA- and HDL transport through aortic endothelial cells. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:131–9.
 35. Roth J C, Stangl H. HDL embryonic and resecretion. *Biochim Biophys Acta*. 1831;2013:1625–33.