

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas



Trabajo Final

Laboratorio de Procesos Biotecnológicos

**Generación y caracterización de complejos HDL discoidales con
fosfolípidos insaturados**

Alumno
Lucio Alfonso Chirillano

Tutora
Dra. Luz Ángela Cuellar

Co-Directora
Dra. Marina Cecilia González

Director
Dr. Horacio Alberto Garda

La Plata, 2019

El presente Trabajo Final fue realizado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata "Profesor Doctor Rodolfo R. Brener" (INIBIOLP), dependiente del CONICET y de la Universidad Nacional de La Plata, con sede en la Facultad de Ciencias Médicas de la misma, bajo la dirección del Dr. Horacio Alberto Garda, la co-dirección de la Dra. Marina Cecilia González, y la tutoría de la Dra. Luz Ángela Cuellar.

Indice

Agradecimientos	iii
Índice de Figuras	v
Índice de Tablas	vii
Abreviaturas	viii
Introducción	1
ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES	3
ATEROSCLEROSIS Y COLESTEROL	3
Transporte de colesterol en el organismo	4
Destino alternativo de las LDL y lesión aterosclerótica	5
Colesterol intracelular y su citotoxicidad.....	7
Mecanismos de defensa ante la citotoxicidad de colesterol libre.....	9
RCT, HDL y EFLUJO DE COLESTEROL.....	9
HDL: Heterogeneidad y clasificación	9
Eflujo celular de colesterol libre y RCT	11
Relación entre aterosclerosis, HDL-C y RCT.....	14
HDL nacientes y apo A-I	16
ESTUDIOS UTILIZANDO nHDL.....	20
Objetivos	23
OBJETIVOS	25
Materiales y Métodos	27
OBTENCION DE APOLIPOPROTEINA A-I	29
Sistema de expresión.....	29
Construcción genética utilizada	29
Expresión de apolipoproteína A-I	32
Purificación de apolipoproteína A-I	33
Control del proceso	34
OBTENCION DE rHDL.....	34
Por diálisis de micelas mixtas con colato	34
Por reacción espontánea a la temperatura de transición del fosfolípido	34
Por reacción espontánea a pH ácido	35
Control de la reacción.....	35
ENSAYO DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS rHDL OBTENIDAS	35
Cultivo celular	35
Ensayo con rHDL	36
ANÁLISIS DE DATOS.....	37

Resultados y Discusión	39
RESULTADOS	41
Obtención de Apo A-I	41
Obtención de las rHDL.....	44
Ensayo de actividad biológica de las rHDL obtenidas.....	47
DISCUSIÓN	49
Obtención de Apo A-I	49
Obtención de las rHDL.....	50
Remoción de colesterol.....	67
Conclusiones	75
Bibliografía.....	79

Agradecimientos

A Verónica, a quien elijo día a día para acompañarme en la vida, por impulsarme y ayudarme a terminar esta etapa de mi formación. Pero especialmente por su amor, compañía, tolerancia y apoyo incondicional. A sus hijas, hermosas personas que me incorporaron a su vida de una manera increíble.

A mi familia, por estar y apoyarme siempre y en todo, sin importar nada. En especial a mi papá y mi mamá, porque gracias a ellos soy la persona que soy, me aconsejaron y guiaron de la mejor manera, impulsándome siempre a hacer lo que sintiera.

Al INIBIOLP, por brindarme el espacio y los recursos para realizar el presente trabajo. En particular al Laboratorio 7, y especialmente a Horacio, Marina y Ángela, quienes me permitieron realizar este trabajo con ellos, guiándome, apoyándome y enseñándome, invirtiendo desinteresadamente su tiempo, conocimiento, dedicación y paciencia durante el mismo.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, por haber podido formarme académicamente en ella.

A los amigos que he cosechado durante mi vida.

Índice de Figuras

Figura 1.	Causas de Mortalidad, según OMS.....	3
Figura 2.	Enfermedades cardiovasculares	3
Figura 3.	Transporte directo de colesterol	5
Figura 4.	Inicio de la lesión aterosclerótica	6
Figura 5.	Etapas de la lesión aterosclerótica	7
Figura 6.	Transporte Reverso de Colesterol	12
Figura 7.	Secuencia de Apo A-I, sus hélices y clasificación de las mismas	16
Figura 8.	Modelo de “Doble Cinturón” de las dHDL.....	17
Figura 9.	Periodicidad de las hélices de apo A-I	18
Figura 10.	Esquemas de partículas de dHDL de diferentes diámetros.....	19
Figura 11.	Estructuras moleculares del colesterol, colato de sodio, DMPC y POPC	21
Figura 12.	Esquema de la construcción genética utilizada para expresión de apo A-I	29
Figura 13.	Cambio de secuencia respecto a apo A-I WT	29
Figura 14.	Secuencias de los promotores <i>E. coli</i> , <i>lac</i> y <i>lac UV5</i>	30
Figura 15.	Esquema de la regulación de la expresión del promotor <i>lac UV5</i>	31
Figura 16.	Esquema expresión de his-apo A-I	32
Figura 17.	SDS-PAGE de control de inducción de la expresión de apo A-I	41
Figura 18.	Esquema primer cromatografía de purificación de apo A-I	42
Figura 19.	SDS-PAGE de las fracciones de la primer cromatografía	43
Figura 20.	SDS-PAGE de la reacción de clivaje del his-tag.....	43
Figura 21.	Esquema segunda cromatografía y SDS-PAGE de control de la misma	44
Figura 22.	Seguimiento espectrofotométrico de la reacción de reconstitución a la T_m de POPC.....	45
Figura 23.	PAGE nativa de los productos de la reacción a la T_m	46
Figura 24.	Seguimiento espectrofotométrico de la reacción de reconstitución a pH ácido	47
Figura 25.	PAGE nativa de los productos de la reacción a pH ácido	47
Figura 26.	Porcentajes de colesterol removido.....	48
Figura 27.	Mecanismo de generación de nHDL <i>in vivo</i> por ABCA1	51
Figura 28.	Esquema de defectos de membrana por curvatura de la bicapa.....	52
Figura 29.	Modelo esquemático del ramillete intermolecular del dímero de apo A-I.....	52
Figura 30.	Estructura de las micelas mixtas fosfolípido/sal biliar.....	54
Figura 31.	Estructura de membranas lipídicas en fases gel y líquido cristalina	55
Figura 32.	Esquema de las conformaciones <i>trans</i> y <i>gauche</i> de las cadenas hidrocarbonadas	56
Figura 33.	Esquema de defectos de membrana por coexistencia de fases.....	58
Figura 34.	Esquema de los estados L_o y L_d	61

Figura 35.	Perfil de presiones laterales en bicapas lipídicas	62
Figura 36.	Efectos del pH sobre apo A-I y reconstitución de dHDL	64
Figura 37.	Esquema de las configuraciones LL5/5 y LL5/2 de las rHDL	66
Figura 38.	Esquema de forma de las moléculas de fosfolípidos y curvatura espontánea	70
Figura 39.	Clasificación de DMPC y POPC según su forma	71
Figura 40.	Inserción de colesterol en membranas	72
Figura 41.	Esquema de distribución de colesterol en membranas insaturadas y en rHDLcolato	73

Índice de Tablas

Tabla 1	Factores de riesgo de aterosclerosis	4
Tabla 2	Características HDL ₂ y HDL ₃ humanas	10
Tabla 3	Subclases HDL ₂ y HDL ₃	10
Tabla 4	Características de las subespecies pre- β HDL humanas	11
Tabla 5	HDL-C y RCT como predictores de la aterosclerosis	15
Tabla 6	Áreas de sección transversal de DMPC y POPC en fases gel y líquido-cristalina	57

Abreviaturas

$\gamma_{L/W}$	Tensión Interfacial
ΔH	Cambio de entalpía
$\Delta T_{1/2}$	Amplitud de pico del termograma a la mitad de altura del mismo
ABCA1	Transportador ATP Binding Cassette A1
ABCG1	Transportador ATP Binding Cassette G1
ACAT	Acil-CoA:Colesterol Aciltransferasa
ACV	Accidente Cerebrovascular
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ANS	Ácido 8-anilino-1-naftalensulfónico
Apo A-I	Apolipoproteína A-I
Asp	Residuo de ácido aspártico
ATP	Adenosin Trifosfato
cAMP	Adenosin Monofosfato cíclico
cDNA	ADN complementario
CE	Éster de colesterol
CETP	Cholesteryl Ester Transport Protein (Proteína de Transporte de Ésteres de Colesterol)
CoA	Coenzima A
dHDL	Partícula de HDL discoidal
DMPC	Dimiristoil-fosfatidilcolina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPPC	Dipalmitoil-fosfatidilcolina
DPM	Desintegraciones por minuto
DSC	Differential Scanning Calorimetry (Calorimetría de Escaneo Diferencial)
DSPC	Diestearoil-fosfatidilcolina
ECV	Enfermedad Cardiovascular
ER	Retículo Endoplásmico
FC	Colesterol libre
F_{chain}	Fuerza en la región de las cadenas hidrocarbonadas en una bicapa lipídica
F_{head}	Fuerza en la zona de las cabezas polares de una bicapa lipídica
$F_{L/W}$	Fuerza atractiva en la interface lípido/agua en una bicapa lipídica
FL	Fosfolípido
Glu	Residuo de ácido glutámico
HDL	High Density Lipoprotein (Lipoproteína de Alta Densidad)
HDL-C	Colesterol contenido en partículas de HDL
His-Apo A-I	Apolipoproteína con un His-Tag unido a su extremo N-terminal
His-Tag	Segmento de poli-histidina
IPTG	Isopropil- β -D-1-galactopiranosido
LB	Luria Bertani
LCAT	Lecitina:Colesterol Aciltransferasa
L_d	Líquido desordenado
LDL	Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de Baja Densidad)
LDL-C	Colesterol contenido en partículas de LDL
LDLR	LDL Receptor (Receptor de LDL)

L _o	Líquido ordenado
LUV	Large Unilamellar Vesicle (Vesícula Grande Unilamellar)
mRNA	RNA mensajero
nHDL	Partículas de HDL nacientes
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPPC	Oleoil-palmitoil-fosfatidilcolina
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Electroforesis en Gel de Poliacrilamida)
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
pH	Negativo del logaritmo decimal de la concentración molar de protones
pI	Punto isoeléctrico
pK	Negativo del logaritmo decimal de la constante de disociación de un electrolito debil
POPC	Palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina
Pro	Residuo de prolina
RCT	Reverse Cholesterol Transport (Transporte Reverso de Colesterol)
rHDL	Partícula de HDL reconstituida
rHDL _{colato}	Partícula de HDL reconstituida a partir de micelas mixtas fosfolípido/colato
rHDL _{pH}	Partícula de HDL reconstituida por reacción en medio ácido
rHDL _T	Partícula de HDL reconstituida a la temperatura de transición de fases del fosfolípido
RNA	Ácido Ribonucleico
SM	Esfingomielina
SOPC	Estearoil-oleoil-fosfatidilcolina
SR-BI	Scavenger Receptor Class B Type I
TG	Trigliceridos
TICE	Trans-Intestinal Cholesterol Efflux (Eflujo de Colesterol Trans-Intestinal)
T _m	Temperatura de transición de fase
VLDL	Very Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de Muy Baja Densidad)
WT	Wild Type

Introducción

ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la mayor causa de muerte a nivel mundial (**Figura 1**), siendo la lesión aterosclerótica la causa más importante de muchas de ellas (**Figura 2**) (Mendis et al, 2011).

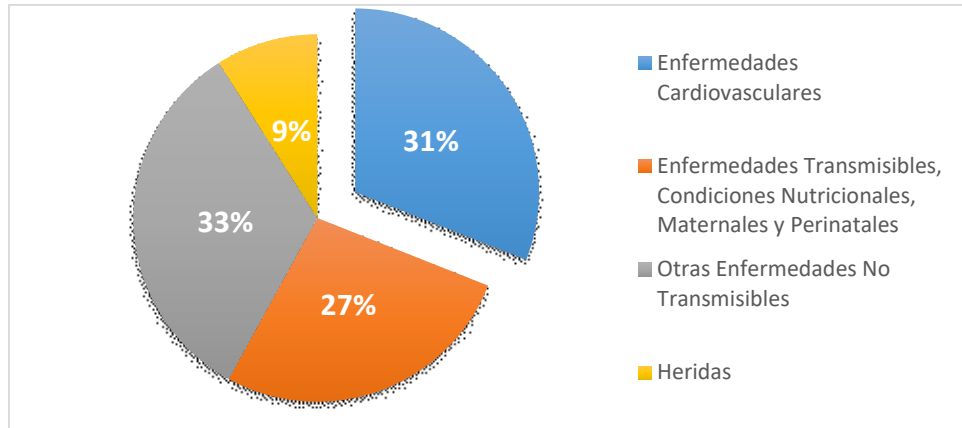


Figura 1 – Causas de mortalidad, según OMS (a partir de Mendis et al, 2011).

Por ejemplo, los ataques al corazón y los accidentes cerebrovasculares (ACV) se deben sobre todo a obstrucciones de los vasos sanguíneos del corazón y el cerebro, respectivamente, que impiden que la sangre fluya hacia estos órganos. Su principal causal es la aterosclerosis.

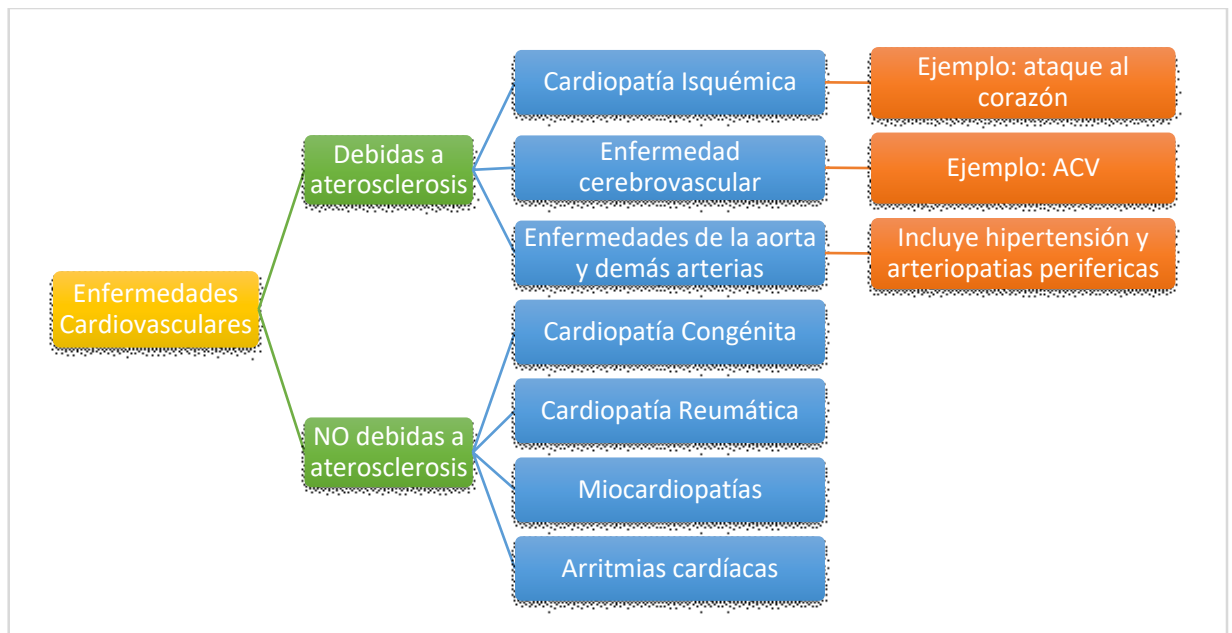


Figura 2 – Enfermedades Cardiovasculares (a partir de Mendis et al, 2011).

ATEROSCLEROSIS Y COLESTEROL

La aterosclerosis es una enfermedad focal de la pared arterial que afecta arterias de tamaño medio y grande, principalmente en donde se producen perturbaciones del flujo laminar de la sangre como, por ejemplo, bifurcaciones arteriales (Moore & Tabas, 2011). Es un proceso patológico complejo que se

desarrolla a lo largo de muchos años, siendo la principal enfermedad humana relacionada al metabolismo del colesterol. Aquellos factores que promueven el proceso aterosclerótico se denominan factores de riesgo (**Tabla 1**), siendo los más importantes los factores conductuales. La hipercolesterolemia (hereditaria y/o inducida por la dieta) es un factor de riesgo muy importante de la aterosclerosis (*Mendis et al, 2011*). Para comprender la importancia de la hipercolesterolemia en el desarrollo de la aterosclerosis se debe comprender el transporte del colesterol en el organismo, y de los efectos celulares de su acumulación.

Tabla 1. Factores de riesgo de aterosclerosis (a partir de Mendis et al, 2011)

Conductuales	Metabólicos	Otros
Consumo de tabaco	Hipertensión	Avance de la edad
Sedentarismo	Diabetes	Sexo
Dieta poco saludable (rica en sal, grasas y calorías)	Hiperlipidemia	Pobreza y bajo nivel educativo
Consumo nocivo de alcohol	Sobrepeso y obesidad	Predisposición genética
		Factores psicológicos (estrés, depresión, etc)

Transporte de colesterol en el organismo

Existen dos fuentes de colesterol para las células del organismo: la síntesis *de novo* y el colesterol proveniente de la dieta (**Figura 3**). La síntesis *de novo* de colesterol puede ser llevada a cabo por todas las células nucleadas del organismo (*Ikonen, 2008*) a partir de acetil-coenzima A (acetil-CoA) a través de la ruta del mevalonato y es responsable del 70% del colesterol total del organismo. La producción de colesterol por parte de los tejidos extrahepáticos es similar a la producción hepática (*Chang et al, 2006*). La mayoría de las células del organismo satisfacen sus requerimientos de colesterol mediante este proceso (*Tabas, 2002*).

El colesterol de los alimentos es absorbido por los enterocitos del intestino delgado e incorporado, junto a triglicéridos (TG), en los quilomicrones para su transporte hacia el hígado. Los quilomicrones son las lipoproteínas de mayor tamaño y menor densidad, compuestas aproximadamente 85% de TG, 9% de fosfolípidos (FL), 4% de colesterol y 2% de proteína, siendo la apolipoproteína B48 la proteína principal (*Ikonen, 2008*). A lo largo de su camino hacia el hígado, parte de los triglicéridos son hidrolizados y se incorporan otras apolipoproteínas, como la apolipoproteína E. Este proceso convierte a los quilomicrones en lo que se denomina “quilomicrones remanentes”, los cuales son captados por los hepatocitos.

El colesterol incorporado a través de la captación de los quilomicrones remanentes, es secretado por los hepatocitos en lipoproteínas de muy baja densidad (very low density lipoproteins, VLDL), compuestas aproximadamente 50% de TG, 20% de colesterol, 20% de FL y 10% de proteínas, siendo la apolipoproteína B100 la principal (*Ikonen, 2008*). En su paso por la circulación, las VLDL pierden progresivamente TG, por lo que, proporcionalmente, su contenido de colesterol aumenta, convirtiéndose en última instancia en lipoproteínas de baja densidad (low density lipoproteins, LDL). Las LDL son las principales lipoproteínas involucradas en el transporte de colesterol hacia los tejidos, donde son captadas e internalizadas mediante

endocitosis mediada por receptor. Este proceso de transporte del colesterol, desde su síntesis y/o absorción (Annema & Tietge, 2012) hasta su captación por parte de las células recibe el nombre de Transporte Directo del Colesterol.

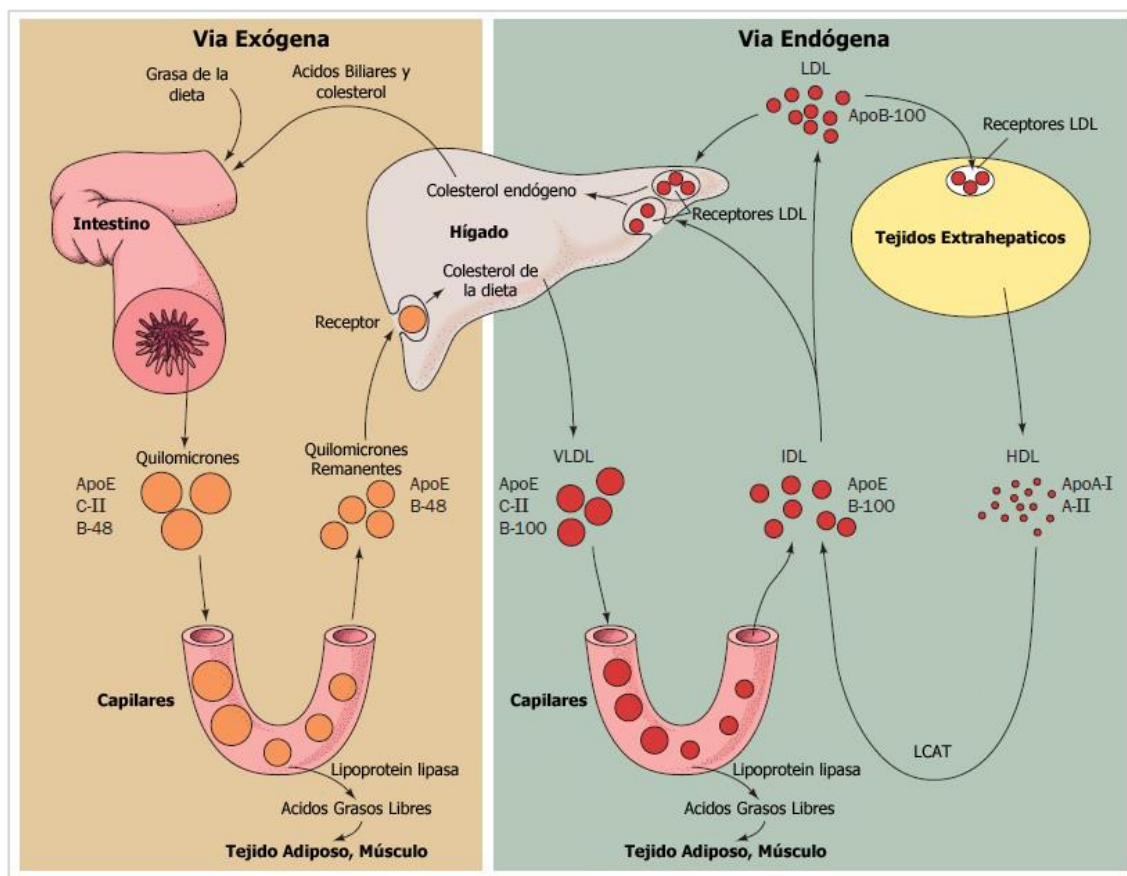


Figura 3 – Transporte Directo de Colesterol, mostrando el camino seguido por el colesterol de la dieta hasta el hígado (Vía Exógena) y el transporte del mismo, por el organismo (Vía Endógena). Modificado de Voet & Voet, 2010 (Capítulo 12).

En humanos, aproximadamente dos tercios del colesterol total es transportado por las LDL, mientras que alrededor de un 20% por las Lipoproteínas de Alta Densidad (High Density Lipoprotein, HDL) (Attie, 2007), llevando el exceso del colesterol celular desde los tejidos hacia el hígado e intestino (ver más adelante). El resto del colesterol es transportado por las demás lipoproteínas.

Destino alternativo de las LDL y lesión aterosclerótica

Sin embargo, además de ser internalizadas por las células, las LDL pueden tener otro destino. Ante la presencia de factores de riesgo, tales como altos niveles de LDL, tabaquismo, hipertensión, diabetes o sedentarismo, se produce una disfunción en el endotelio arterial, por lo que las LDL pueden atravesarlo y quedar atrapadas en la matriz extracelular del sub-endotelio o íntima de las arterias, en donde pueden sufrir una gran variedad de modificaciones, como oxidación o agregación. Algunos de los productos de la oxidación de las LDL activan la secreción de sustancias quimioatrayentes y la expresión de moléculas de adhesión por parte de las células del endotelio arterial. Los monocitos circulantes del torrente sanguíneo reconocen estas señales, migran hacia el sub-endotelio y una vez allí se diferencian en macrófagos (Figura 4). Estos macrófagos a su vez segregan proteoglicanos que unen más LDLs, jugando un importante

rol en la amplificación de la retención de dichas lipoproteínas. Esta amplificación contribuye a que la aterosclerosis sea una enfermedad inflamatoria no resolutive, debido a que los monocitos continúan ingresando a la zona afectada y diferenciándose en macrófagos a medida que la lesión aterosclerótica progresa.

Los macrófagos encuentran tanto LDL nativas como modificadas y las fagocitan. La mayor parte del colesterol contenido en las LDL fagocitadas se encuentra en forma de ésteres de ácidos grasos de colesterol, los cuales son hidrolizados a colesterol y ácidos grasos dentro de los endosomas de los macrófagos. El principal destino de dicho colesterol es su re-esterificación mediada por la enzima acil-CoA:colesterol aciltransferasa (ACAT). Los ésteres de colesterol (CE) resultantes son almacenados en gotículas lipídicas en el citoplasma. La acumulación excesiva de dichas gotículas da origen al término de célula espumosa con el que se denomina a los macrófagos cargados de colesterol. La presencia de células espumosas por debajo de la íntima arterial es una característica distintiva de la lesión aterosclerótica. Esta acumulación de ésteres de colesterol en el interior de los macrófagos es el punto de partida de la lesión aterosclerótica.

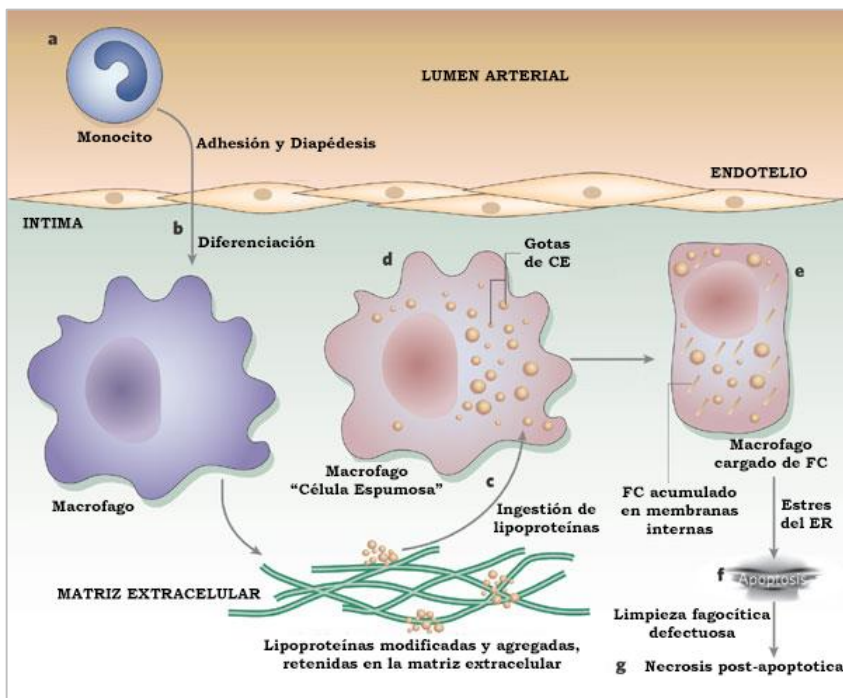


Figura 4 – Inicio de la lesión aterosclerótica. Los monocitos presentes en el torrente sanguíneo migran al subendotelio (a), en donde se diferencian a macrófagos (b), que comienzan a captar las LDL retenidas por la matriz extracelular (c). Esta captación de lipoproteínas produce una acumulación de gotículas de ésteres de colesterol, dando origen a lo que se denomina célula espumosa, características de la lesión aterosclerótica (d). La acumulación de CE puede conducir a una acumulación de FC si los mecanismos de eliminación del mismo fallan o son deficientes (e). Estas células pueden proseguir una vía apoptótica, desestabilizando la lesión aterosclerótica, lo que conduce a una trombosis vascular (f y g)

La acumulación de células espumosas conduce a una lenta y progresiva oclusión del lumen arterial (Figura 5). La lesión aterosclerótica temprana es asintomática debido a que la oclusión del lumen arterial no compromete el flujo sanguíneo. Luego de años de progresión de la lesión, las células espumosas, la matriz extracelular, las células del músculo liso y el tejido cicatrizal derivado de éstas lentamente conducen a un aumento de la oclusión arterial, aunque solo existen síntomas ante exigencias físicas. Esto se debe a que la oclusión arterial va aumentando tan lentamente que se dan mecanismos compensatorios, como remodelación vascular y formación colateral de vasos (Tabas, 2004). Además, el tejido cicatrizal forma una cubierta fibrosa que protege la lesión subyacente, haciéndola estable.

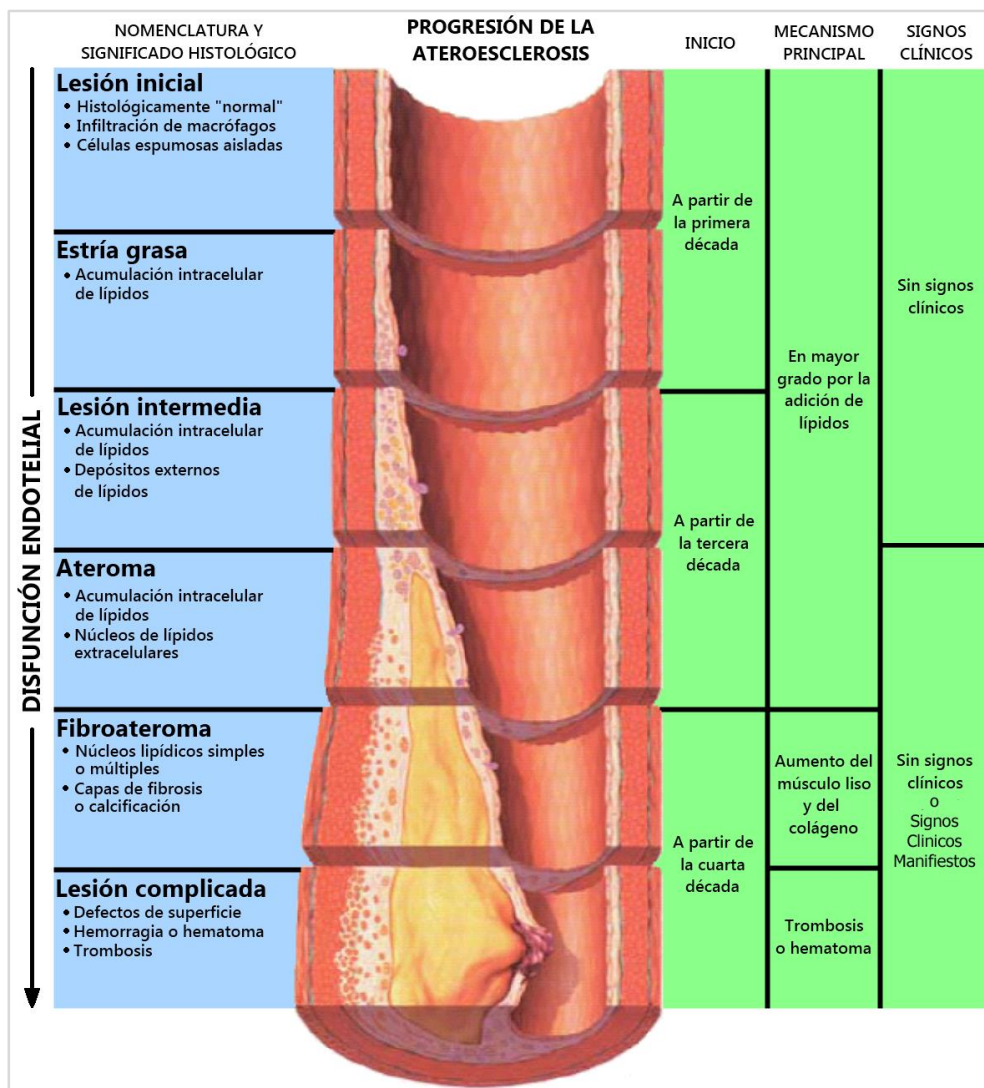


Figura 5 – Etapas de la lesión aterosclerótica.

Una minoría de las lesiones progresa a un punto en el cual generan eventos vasculares agudos. Estos eventos se deben a trombosis lumbinales agudas, que conducen a daños en el órgano afectado. Una posible explicación propone que una minoría de las lesiones se vuelve necrótica y altamente inflamatoria, desestabilizándose la placa aterosclerótica, lo que eventualmente conduce a la ruptura de su cubierta fibrosa protectora. Esto pone en contacto la sangre que circula por el lumen de la arteria con el material de la placa aterosclerótica, lo que promueve la coagulación y trombosis.

La causa por la cual la lesión aterosclerótica se vuelve necrótica es la acumulación de FC en los macrófagos presentes en el subendotelio (Figura 4).

Colesterol intracelular y su citotoxicidad

La internalización de las LDL conduce a un aumento en el contenido celular de colesterol. El mantenimiento de concentraciones intracelulares óptimas de colesterol es esencial para el desarrollo, funcionamiento y viabilidad celular, siendo tóxico un exceso del mismo (Rader et al, 2009).

En condiciones normales, las células mantienen un gradiente de colesterol a través de las vías de secreción, con las menores concentraciones de colesterol en el retículo endoplásmico (ER) y las mayores en la membrana celular (*Ikonen, 2008; Schimitz & Grandl, 2009*), movilizándose el colesterol entre la membrana, el ER y la mitocondria. Sin embargo, la acumulación excesiva de colesterol libre (FC) en las células (incluidas las espumosas) puede conducir a su apoptosis (*Zhang & Kaufman, 2003*), como a su necrosis. Ambos procesos han sido observados tanto por criterios morfológicos como bioquímicos en macrófagos cargados de FC (*Tabas, 2002; Tabas, 2004*). Del análisis de material proveniente de lesiones ateroscleróticas se ha determinado que a medida que avanza la lesión se produce un aumento en el contenido de FC intracelular y una disminución de los niveles de CE (*Tabas, 2002*). Esto se puede explicar considerando que uno o más de los mecanismos que posee la célula para evitar la acumulación de FC fallan (*Tabas, 2002; Tabas, 2004*).

Para mantener un rango de fluidez de membrana correcto existe una relación fisiológica FC/FL en las membranas de las células (*Tabas, 2002*). Cuando esta relación se eleva sobre el valor fisiológico la fluidez de las membranas comienza a disminuir, lo que afecta el funcionamiento de las proteínas integrales, que requieren una determinada libertad conformacional. Si la rigidez de membrana aumenta demasiado, la actividad de estas proteínas puede ser inhibida por completo. Algunas de estas proteínas son la Na⁺-K⁺-ATPasa, adenilato ciclasa, transportadores de glucosa y aniones orgánicos, etc. Esto no solo ocurre en la membrana celular, sino que también se han observado fenómenos similares en proteínas que se encuentran en membranas internas de las células. Es por ello que se considera que los altos niveles de FC intracelular producen la muerte de la célula en parte inhibiendo una o varias proteínas integrales de membrana mediante la disminución de la fluidez de membrana.

Sin embargo, existen resultados que sugieren que el ER es más importante en la muerte celular inducida por colesterol que la membrana celular (*Zhang & Kaufman, 2003*). El ER es responsable de la maduración, plegamiento, transporte y almacenamiento de proteínas y es el principal almacén celular de calcio. La acumulación de colesterol en la membrana del ER conduce a una disminución de las reservas de calcio, lo que induce la vía de señalización UPR (Unfolded Protein Response), la cual media la apoptosis celular inducida por colesterol. La vía UPR se induce ante situaciones de estrés del ER, como una acumulación de proteínas mal plegadas, síntesis elevada de proteínas de secreción, alteración de la homeostasis de calcio o privación de glucosa. Esta vía genera respuestas adaptativas que permiten la supervivencia celular mientras dure la situación de estrés. Sin embargo, si la situación de estrés continúa, la activación prolongada de la vía UPR conduce a la apoptosis celular por múltiples caminos.

Además de lo anterior, la acumulación de FC puede bloquear vías de señalización. También pueden formarse cristales intracelulares de colesterol cuando la relación FC/FL llega a niveles muy elevados. Estos cristales pueden producir daños físicos en las células. Otro efecto de la acumulación de colesterol es su oxidación y formación de oxisteroles, muchos de los cuales son citotóxicos (*Tabas, 2002*).

Tanto la necrosis como la apoptosis de las células espumosas conduce a la liberación del contenido intracelular en la placa aterosclerótica, lo que puede contribuir a desestabilizarla, provocar su ruptura y posterior generación del trombo (Tabas, 2002; Tabas, 2004).

Mecanismos de defensa ante la citotoxicidad de colesterol libre

La acumulación de CE en gotículas lipídicas por parte de los macrófagos es un mecanismo de defensa ante la acumulación del FC intracelular, aunque como se ha explicado, es el punto de partida de la lesión aterosclerótica. Sin embargo, existe otro mecanismo de defensa ante la acumulación del FC: La mayoría de las células en los tejidos extra-hepáticos (a excepción de los tejidos estereidogénicos), incluidos los macrófagos, no pueden catabolizar el colesterol y solo pueden eliminarlo mediante su eflujo hacia aceptores extracelulares como las HDL, que transportan el exceso de colesterol celular hacia el hígado para su catabolismo. Este proceso de transporte del colesterol desde los tejidos extra-hepáticos hacia el hígado para su eliminación en la bilis y las heces recibe el nombre de Transporte Reverso de Colesterol (Reverse Cholesterol Transport, RCT).

En el inicio de la lesión aterosclerótica, un desbalance entre la captación de colesterol por los macrófagos y el eflujo del mismo es lo que conduce a la acumulación de las gotículas lipídicas y posterior formación de las células espumosas. Es por ello que, aunque muchos factores afectan el desarrollo de la aterosclerosis, la principal causa de la enfermedad es la desproporción entre las lipoproteínas ateroprotectoras, como las HDL, y las pro-aterogénicas, como las LDL. Numerosos estudios epidemiológicos muestran que los niveles de colesterol en las HDL (HDL-C) se encuentran inversamente relacionados con el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular.

Es por ello que el mayor interés biomédico respecto del RCT se debe a su relación con la aterosclerosis, ya que se cree que es el principal proceso por el cual las HDL protegen al organismo de las enfermedades cardiovasculares ateroscleróticas: el eflujo de colesterol de las células espumosas de la íntima arterial puede proteger contra la progresión y complicaciones de la enfermedad.

RCT, HDL y EFLUJO DE COLESTEROL

La velocidad de eflujo de colesterol depende del estado del colesterol celular, los niveles de transportadores y del tipo y concentración de aceptores extracelulares (Rader *et al*, 2009). El paso limitante de la velocidad del RCT es el eflujo del colesterol celular hacia los aceptores extracelulares (Fu, 2010), siendo las HDL los principales.

HDL: Heterogeneidad y clasificación

Las HDL del plasma humano generalmente se definen como aquellas lipoproteínas con densidades en el rango de 1,063 g/ml a 1,21 g/ml. Debido a esta definición tan simple en la cual solo se tiene en cuenta

su densidad, las HDL son en realidad un grupo muy heterogéneo de partículas que pueden ser separadas dentro de subclases bien definidas en base a diferentes propiedades fisicoquímicas (Wróblewska, 2011). Mediante ultracentrifugación las HDL pueden ser divididas en dos subfracciones, HDL₂ y HDL₃, de diferentes densidades, tamaños y composición (Tabla 2). A su vez, estas pueden ser subdivididas en diferentes clases mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente en condiciones no desnaturizantes (Tabla 3). Más allá de las diferencias entre las distintas clases de HDL, la principal apolipoproteína constituyente es la apolipoproteína A-I (apo A-I).

Fracción	HDL ₂	HDL ₃
Densidad (g/ml)	1,063 – 1,125	1,125 – 1,210
Diámetro de partícula (nm)	8,8 – 12,9	7.2 – 8.8
Composición química (% p/p)		
- Proteína total	38,6	50,9
- Fosfolípidos	32,5	29,0
- Colesterol libre	5,2	2,5
- Esteres de colesterol	19,3	15,1
- Triglicéridos	4,5	2,6
Apo A-I (% p/p de proteína total)	80,1	65,7
Apo A-II (% p/p de proteína total)	12,0	25,7

Subfracción	Densidad media (g/ml)	Tamaño de partícula medio (nm)
HDL _{2b}	1,085	10,57
HDL _{2a}	1,115	9,16
HDL _{3a}	1,136	8,44
HDL _{3b}	1,154	7,97
HDL _{3c}	1,171	7,62

Aunque se utiliza normalmente esta definición, la fracción de densidad indicada no contiene la totalidad de las partículas de HDL. Se han observado partículas de HDL de densidades mayores a 1,21 g/ml que pueden actuar como aceptores del colesterol celular. Además, dichas partículas poseen una menor velocidad de migración en ensayos de electroforesis en geles de agarosa (movilidad electroforética pre-β) que la mayoría de las HDL (movilidad electroforética α). Esta diferencia fue atribuida a la ausencia de un núcleo de lípidos neutros en las partículas con movilidad pre-β (Davidson et al, 1994). La ausencia de dicho núcleo hace que estas partículas posean forma de discos en lugar de ser esféricas. Se ha propuesto que el colesterol incorporado en el centro de las partículas esféricas reduce la penetración de las proteínas estructurales en la superficie lipoproteica, lo que tiene como efecto una normalización del pK de ciertos residuos cargados (Jayaraman et al, 2010). Esta normalización de los pK confiere a las partículas esféricas una mayor carga neta negativa con respecto a las partículas discoidales, por lo que su movilidad electroforética es mayor. A las partículas discoidales con movilidad electroforética pre-β se las denomina pre-β HDL, las que pueden ser a su vez subdivididas en pre-β₁ y pre-β₂ (Tabla 4). La única proteína encontrada en estas partículas es apo A-I. Existe un tercer tipo de pre-β HDL, las pre-β₃, que a diferencia de las otras presenta asociada a su estructura la lecitina:colesterol aciltransferasa (lecithin:cholesterol acyltransferase, LCAT), la proteína transportadora de ester de colesterol (cholesterol ester transport

protein, CETP) y apolipoproteína D además de apo A-I. Sin embargo, el término pre- β HDL no hace referencia solo a estas partículas lipoproteicas, sino que también abarca a la apo A-I libre de lípidos, ya que se ha reportado su presencia en el plasma humano y la misma también migra con movilidad pre- β cuando se la somete a electroforesis en geles de agarosa.

Tabla 4. Características de subespecies pre- β HDL humanas		
	pre- β_1	pre- β_2
Fracción de apo A-I total en sujetos sanos (%)	4,6 – 6,3	0,9 – 4,3
Masa molecular (kDa)	65 - 80	325
Contenido apo A-I (% p/p)	47,5	21,5
Contenido fosfolípidos (% p/p)	44,6	73,8
Contenido Colesterol libre (% p/p)	7,6	5,7
Subfracción; diámetro de partícula (nm)	Pre- β_{1a} ; 5,79	Pre- β_{2a} ; 13,74
	Pre- β_{1b} ; 5,37	Pre- β_{2b} ; 12,58
		Pre- β_{2c} ; 12,17

Las pre- β HDL son los primeros aceptores extracelulares del colesterol en el RCT. El mayor porcentaje del eflujo de colesterol depende de estas partículas, aunque sean la fracción minoritaria de partículas de HDL circulantes en el plasma [1% a 25% del total en sujetos normolipidémicos (*Wróblewska, 2011*)]. Los diferentes tipos de partículas (apo A-I libre de lípidos, pre- β_1 HDL, etc.) representan estados sucesivos del RCT y maduración de las HDL. Aunque se encuentran en baja concentración en el plasma, se encuentran en una concentración relativamente alta en la linfa (*Tricerri et al, 1998*).

Eflujo celular de colesterol libre y RCT

El Transporte Reverso de Colesterol es la vía por la cual el colesterol en exceso en los tejidos extrahepáticos es transportado hacia el hígado e intestino para su eliminación (*Figura 6*). Existen diferentes vías por las cuales el colesterol libre puede abandonar las células, las cuales incluyen (*Rader et al, 2009*):

- 1) El eflujo hacia apolipoproteínas, principalmente apo A-I libre de lípidos, mediada por el transportador ATP Binding Cassette A1 (ABCA1).
- 2) El eflujo hacia partículas de HDL mediado por el transportador ABCG1.
- 3) El eflujo hacia partículas de HDL por otros mecanismos, como posiblemente el transporte mediado por el Scavenger Receptor class B type I (SR-BI) y la difusión pasiva.

Los transportadores ABCA1 y ABCG1 actúan de forma cooperativa: ABCA1 lipida apo A-I libre de lípidos (o pobremente lipitada) para generar las partículas de HDL nacientes (nHDL), las cuales sirven de sustrato para el eflujo de colesterol mediado por ABCG1. Este transportador facilita el eflujo de colesterol hacia las HDL maduras, pero no hacia apo A-I pobremente lipitada (*Rader et al, 2009*).

El transportador SR-BI puede promover el eflujo de colesterol hacia partículas de HDL maduras *in vitro*, aunque también puede promover la captación del colesterol (libre o esterificado) contenido en partículas de HDL (HDL-C). Por este motivo, SR-BI es un transportador bidireccional (*Rader et al, 2009*). La dirección del flujo de colesterol depende de las cantidades de colesterol libre en las células y en los aceptores.

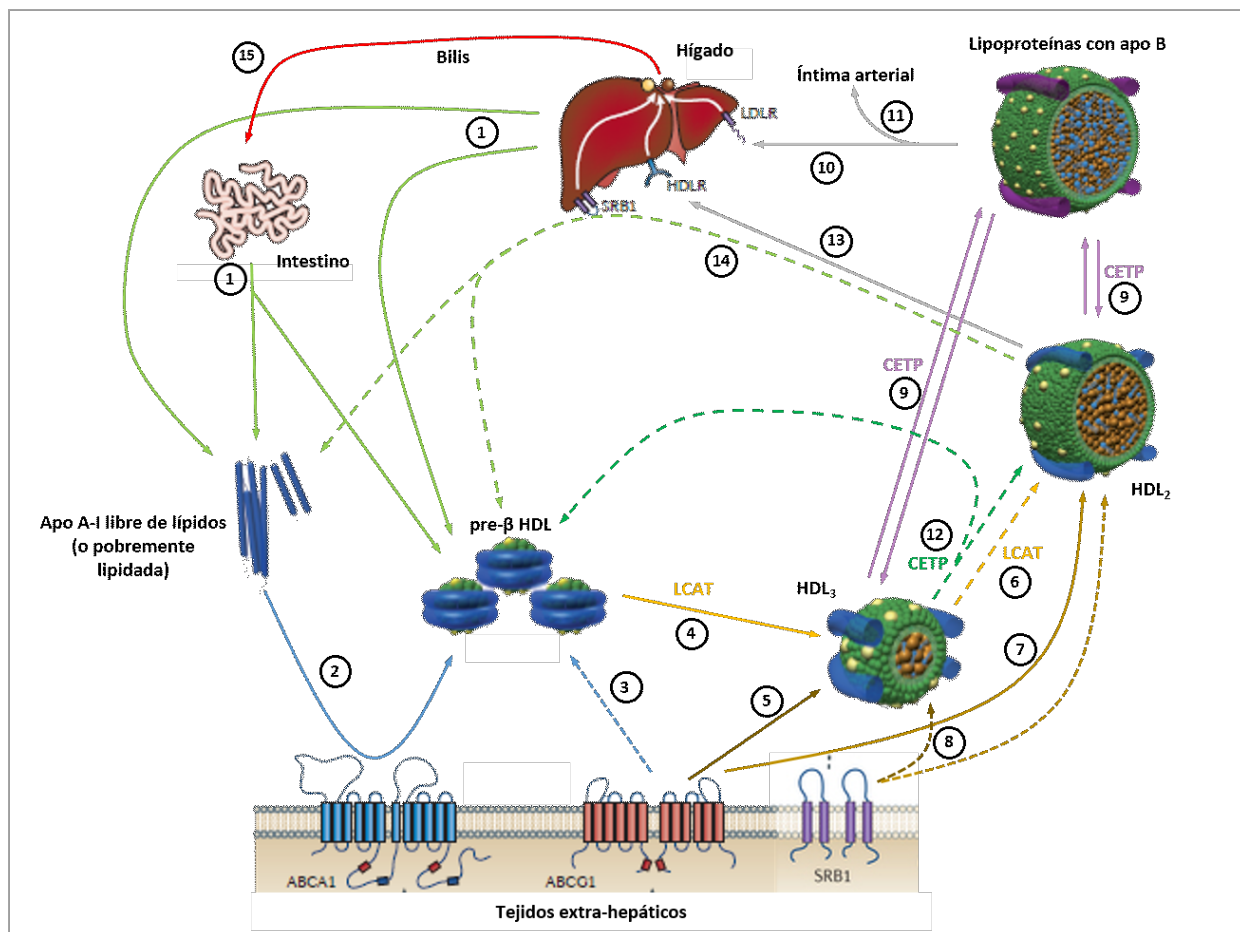


Figura 6 – Transporte Reverso de Colesterol (RCT). El hígado y el intestino delgado sintetizan y liberan al torrente sanguíneo apo A-I libre de lípidos, pobremente lipidadas y partículas de pre-β HDL (1). Las moléculas de apo A-I libres de lípidos y pobremente lipidadas forman más partículas de pre-β HDL al adquirir fosfolípidos y colesterol libre por acción del transportador ABCA1 de los tejidos extra-hepáticos (2). Estas partículas, actúan como aceptores del colesterol de las células periféricas a través del transportador ABCG1 (3). Sobre las partículas de pre-β HDL cargadas de colesterol actúa la enzima LCAT (4), que esterifica el colesterol, formando partículas esféricas de HDL₃ con un núcleo neutro de CE. Estas partículas esféricas también pueden actuar como aceptores del colesterol celular a través del transportador ABCG1 (5). Las partículas esféricas generadas inicialmente (HDL₃) también son sustrato de LCAT (6), generándose partículas esféricas de mayor tamaño (HDL₂), que también son aceptores de colesterol de ABCG1 (7). En los macrófagos, el receptor SR-BI actúa transportando el exceso de colesterol hacia las partículas de HDL esféricas (8). Las partículas esféricas de HDL pueden intercambiar ésteres de colesterol con lipoproteínas que contienen apo B (LDL, VLDL, IDL) por acción de la proteína CETP (9). Esta proteína transporta los CE desde las partículas de HDL hacia las lipoproteínas que contienen apo B, y triglicéridos en la dirección inversa (transferencia heterotípica). El colesterol de estas partículas (con apo B) puede ser captado por el hígado mediante el receptor LDL (10), aunque el aumento del LDL-C puede tener efectos pro-aterogénicos, al poder tener como destino la íntima arterial (11). CETP también transfiere CE entre las diferentes partículas de HDL (transferencia homotípica), generándose partículas de HDL₂ y pre-β HDL a partir de partículas de HDL₃ (12). El colesterol transportado por las partículas de HDL₂ puede ser captado por dicho órgano mediante el receptor de HDL (13) o por acción del receptor SR-BI, liberándose partículas de pre-β HDL o apo A-I pobremente lipidadas (14). El colesterol captado por el hígado mediante las distintas vías es eliminado a través del intestino en forma de ácidos biliares (15). En la figura no se ilustra el "TICE" (ver texto), por el cual parte del HDL-C se excreta directamente hacia el intestino. Apo A-I no lipidadas se elimina de la circulación y es catabolizada por los riñones.

La lipidación extracelular de apo A-I antes mencionada no es el único mecanismo de generación de nHDL *in vivo*. Apo A-I puede ser lipidadas intracelularmente, ya sea por lipidación de la proteína recién sintetizada (en células hepáticas e intestinales), o mediante la internalización de apo A-I del medio y su posterior retroendocitosis como partículas de nHDL.

Se considera que de un 20% a un 50% de la apo A-I recién sintetizada es lipídada intracelularmente (Wróblewska, 2011). En el ER, apo A-I sufre una fosfolipidación temprana independiente de ABCA1, probablemente durante o inmediatamente después de su traducción. El ER es el lugar de síntesis de FL, por lo que existe una alta actividad específica de PC sintetizadas. Debido a la avidéz de apo A-I que se está sintetizando/traslocando por FL para conseguir un plegamiento correcto, se forma un complejo transicional apo A-I/FL. A medida que el complejo transita desde el ER hacia el Golgi, y a través de éste, pierde el exceso de FL, resultando en un complejo luminal estable. El colesterol sintetizado *de novo* es transferido a éstas partículas en el Golgi (Maric et al, 2005).

Respecto de la vía de retroendocitosis, se considera que apo A-I puede ser internalizada en endosomas, en donde puede adquirir lípidos y posteriormente ser re-secretada al medio en forma de nHDL. Si se tiene en cuenta la cantidad de apo A-I internalizada y la fracción de la misma que es secretada nuevamente al medio sin degradar, y considerando el tiempo que demora apo A-I en interaccionar con las membranas (tanto membrana plasmática como de la vía endocítica) y ser liberada, las partículas de nHDL generadas por esta vía representan aproximadamente un 1,4% del total de partículas de nHDL generadas (Denis et al, 2008).

Aproximadamente un 70% de las partículas de nHDL circulantes se originan en el hígado, y el 30% restante en el intestino (Wróblewska, 2011).

Una vez que el colesterol celular ha sido removido y se encuentra en las partículas de HDL, la enzima LCAT lo convierte en ésteres de colesterol. Esto permite mantener el gradiente de colesterol libre entre las células periféricas y las HDL plasmáticas. Sin embargo, la esterificación no es un paso crítico para el catabolismo del colesterol, ya que el colesterol sin esterificar contenido en las HDL también puede ser captado por los hepatocitos para su catabolismo.

El HDL-C puede llegar al hígado de dos formas diferentes en humanos. La ruta más directa involucra la captación del HDL-C (esterificado o no) por los receptores SR-BI, con la consecuente liberación de partículas de HDL pobres en colesterol que pueden volver a participar del RCT. La otra ruta es la que involucra la acción de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) (Figura 6). En la denominada transferencia "heterotípica", CETP transfiere ésteres de colesterol de las HDL a lipoproteínas que contienen apolipoproteína B, las cuales son captadas por el hígado mediante el Receptor de LDL (LDLR) (Rader et al, 2009). Esta transferencia de lípidos puede tener efectos pro-aterogénicos debido al incremento de los niveles de colesterol en las LDL (LDL-C), el cual puede tener como destino alternativo la íntima arterial. El otro mecanismo de acción de CETP, involucra la transferencia de CE entre diferentes partículas de HDL, con la generación de partículas de HDL₂ y pre-β HDL a partir de partículas de HDL₃. Esta transferencia de CE, denominada "homotípica" por involucrar solo especies de HDL, posee efectos anti-aterogénicos al aumentar los niveles de pre-β HDL, disponibles para intervenir en el inicio del RCT, y de HDL₂, que pueden ser captadas por el hígado.

Además del hígado, el intestino juega un papel fundamental en el RCT. No solo parte de la apo A-I libre plasmática y parte de las nHDL son sintetizadas en él, sino que además es el órgano encargado de la excreción final del colesterol derivado de los tejidos periféricos. Esta excreción final de colesterol no se realiza solo en la forma de ácidos biliares generados en el hígado, sino también parte del HDL-C puede ser excretado directamente hacia el intestino, sin pasar por el hígado, proceso denominado eflujo de colesterol trans-intestinal (Trans-Intestinal Cholesterol Efflux, TICE) (*Brufau et al, 2011; Temel & Brown, 2012*), que representa un cambio de paradigma respecto del modelo de RCT antes indicado (*Rader et al, 2009*).

Relación entre aterosclerosis, HDL-C y RCT

Se ha publicado una revisión (*Rader et al, 2009*) en la que se resumen resultados experimentales en animales que indican los efectos de los diferentes transportadores, aceptores, vías de transporte y receptores de colesterol (o CE) sobre los niveles de HDL-C, RCT y aterosclerosis:

- a) La sobre-expresión de apo A-I promueve el RCT de los macrófagos, disminuyendo el desarrollo de aterosclerosis. Deficiencia en la expresión de apo A-I aumenta el desarrollo de aterosclerosis.
- b) Mutaciones que generan pérdida de función en ambos alelos del gen que codifica para ABCA1 en humanos produce lo que se conoce como enfermedad de *Tangier*, que se caracteriza por deficiencias severas de HDL y acumulación de colesterol en macrófagos de tejidos periféricos.
- c) Ratones trasplantados con médula ósea de ratones knock-out para ABCA1 presentaron mayores desarrollos de lesiones ateroscleróticas, aun cuando presentan niveles normales de HDL-C. En el caso de ratones trasplantados con médula ósea de ratones que sobre-expresaban ABCA1 se observó un menor desarrollo de lesiones ateroscleróticas. Adicionalmente, macrófagos deficientes en ABCA1 demuestran un RCT significativamente reducido *in vivo*.
- d) Macrófagos que no expresaban ABCG1 poseen un menor eflujo hacia HDL maduras *ex vivo*, como así también RCT reducido *in vivo*. Sin embargo, la falta de expresión de ABCG1 ha sido relacionada a un desarrollo reducido de lesiones ateroscleróticas, aunque esto puede deberse a otros efectos compensatorios de ABCA1 y/o de susceptibilidad hacia la apoptosis debida a LDL oxidadas.
- e) Ratones knock-out doble para ABCA1 y ABCG1 presentaron mayores niveles de aterosclerosis que ratones knock-out simple para cada uno de estos transportadores.
- f) El colesterol recién transportado hacia las HDL es esterificado por la enzima plasmática LCAT, lo que ayudaría a mantener un gradiente de FC entre las membranas plasmáticas y las partículas de HDL circulantes. La sobre-expresión de LCAT en ratones eleva los niveles de HDL-C pero, sin embargo, no produce cambios en los niveles de desarrollo de lesiones

ateroscleróticas o incluso se ha relacionado a niveles elevados. Adicionalmente a esto, la sobre-expresión de LCAT reduce el RCT *in vivo*, aun elevando los niveles de HDL-C, ya que esto se produce, en parte, a expensas de la reducción de los niveles de apo A-I pobremente lipídada y consecuentemente el eflujo de colesterol mediado por ABCA1.

- g) Ratones knock-out para LCAT, con niveles extremadamente bajos de HDL-C, han presentado tanto reducción como aumento de aterosclerosis. Curiosamente este tipo de ratones han mostrado niveles normales de RCT *in vivo* debido, en parte al menos, a altos niveles de apo A-I pobremente lipídada y el eflujo de colesterol vía ABCA1.
- h) Los roedores, a diferencia de los humanos, carecen de CETP, que transfiere los CE de las HDL hacia lipoproteínas que contienen apo B, lo que constituye una vía alternativa de transporte del HDL-C hacia el hígado. La sobre-expresión de LCAT acompañada de la expresión de CETP reduce la aterosclerosis. Similares resultados se observaron mediante la sobre-expresión de LCAT en conejos que expresan CETP. Adicionalmente, la expresión de CETP en ratones provoca un aumento del RCT de los macrófagos.
- i) En ratones que expresan receptores de LDL, la expresión de CETP aumenta el RCT y reduce la aterosclerosis. En ratones que no expresan receptores de LDL, la expresión de CETP reduce o no afecta el RCT y aumenta la aterosclerosis.
- j) La sobre-expresión hepática de SR-BI genera una gran disminución de los niveles de HDL-C, aunque esta sobre-expresión está relacionada a una disminución sustancial de la aterosclerosis. Ratones knock-out para SR-BI presentan niveles aumentados de HDL-C, como así también de aterosclerosis. Adicionalmente, la sobre-expresión hepática de SR-BI provoca un aumento del RCT, mientras que su eliminación produce una disminución del mismo. Ratones knock-out para SR-BI que expresan CETP poseen niveles normales de RCT.

Tabla 5. HDL-C y RCT como predictores aterosclerosis				
Manipulación Genética	Tejido	Efecto en HDL-C	Efecto en RCT de macrófagos	Efecto en aterosclerosis
Sobre-expresión apo A-I	Hígado	Incremento	Incremento	Disminución
Knock-out apo A-I	Todo el organismo	Disminución	Disminución	Incremento
Sobre-expresión SR-BI	Hígado	Disminución	Incremento	Disminución
Knock-out SR-BI	Todo el organismo	Incremento	Disminución	Incremento
Expresión CETP	Hígado			
Ratón LDLR ^{+/+}		Disminución	Incremento	Disminución
Ratón LDLR ^{-/-}		Disminución	Neutro/disminución	Incremento
Sobre-expresión LCAT	Hígado	Incremento	Disminución	Incremento
Expresión LCAT + CETP	Hígado	Variable	Neutro	Neutro
Knock-out LCAT	Todo el organismo	Disminución	Neutro	Variable
Knock-out ABCA1	Macrófago	Sin Cambio	Disminución	Incremento
Knock-out ABCG1	Macrófago	Sin Cambio	Disminución	Disminución
Knock-out ABCA1 + ABCG1	Macrófago	Sin Cambio	Disminución	Incremento
Knock-out SR-BI	Macrófago	Sin Cambio	Neutro	Variable

De lo anterior se deduce que el RCT se encuentra íntimamente relacionado al desarrollo y evolución de la aterosclerosis, siendo un mejor indicador de la misma que el HDL-C. Adicionalmente, no solo es un mejor indicador, sino que el aumento del RCT de los macrófagos es una mejor herramienta terapéutica que el aumento de los niveles de HDL-C.

A modo de resumen en la **Tabla 5**, se indicaron aquellos casos en los que se ha determinado que el RCT es un mejor predictor de aterosclerosis (ambos parámetros en verde) que el nivel estacionario de HDL-C (en rojo).

HDL nacientes y apo A-I

Las nHDL contienen dos moléculas de apo A-I en su estructura. Sin embargo, algunos autores han demostrado que existen partículas conteniendo solo una molécula de apo A-I. Estos dos tipos de partículas pueden representar estados sucesivos de la generación de las nHDL (*Wróblewska, 2011*).

La molécula de apo A-I es un polipéptido de 243 aminoácidos (**Figura 7**), con un peso molecular de 28,1 kDa. Se estima que el 80% de apo A-I es sintetizada por el hígado, y el 20% restante por el intestino. La lipidación de apo A-I está acompañada por una transición desde una estructura compacta hacia una estructura más extendida de conformación estable. Dicha transición implica un incremento del contenido de α -hélice desde 40-50% hasta 70-80% (*Wróblewska, 2011*).

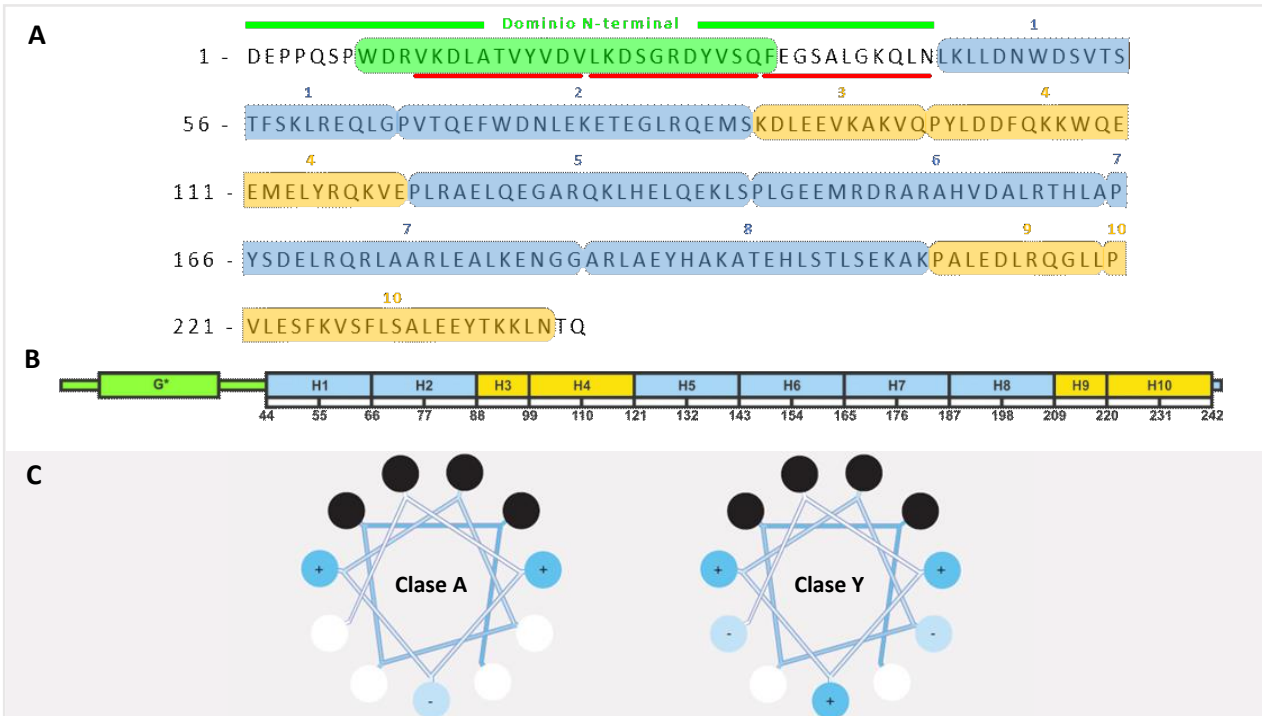


Figura 7 – A, secuencia de apo A-I WT. Los aminoácidos 1 a 43 forman el dominio N-terminal, mientras que los aminoácidos 44 a 243 forman el dominio C-terminal. En verde se indica la hélice de clase “G*” predicha en el dominio N-terminal de apo A-I libre de lípidos, en azul se indican las hélices de clase “A”, y en naranja se indican las hélices de clase “Y” de las partículas lipoproteicas discoidales. Los números superiores indican la hélice correspondiente. Las líneas rojas indican las hélices predichas (*Klon et al, 2002a*) que podrían participar en la formación de dHDL de diferentes tamaños. B, Representación gráfica de la secuencia de apo A-I, con indicación de las hélices y su clasificación (*de Mei & Atkinson, 2011*). C, distribución de cargas en las hélices de clase “A” y de clase “Y”. En negro se muestran los residuos hidrofóbicos, en blanco los residuos polares no cargados, en azul los cargados positivamente y en celeste los cargados negativamente (*de Garda, 2007*).

Apo A-I contiene un dominio N-terminal globular compuesto por 43 aminoácidos (aminoácidos 1 a 43), codificado por el exón 3 del gen, y un dominio C-terminal compuesto por 200 aminoácidos (aminoácidos 44 a 243), codificado por el exón 4 del gen. Los aminoácidos del dominio C-terminal conforman diez repeticiones con periodicidad de α -hélices, separadas comúnmente por prolinas. Ocho de las repeticiones están compuestas por 22 residuos y las dos repeticiones restantes por 11 residuos (Segrest et al, 1999; Klon et al, 2002a). Todas estas repeticiones constituyen hélices anfipáticas dentro de la estructura de apo A-I, por lo que las mismas han sido numeradas de 1 a 10. Las hélices 3, 4, 9 y 10 se clasifican como hélices de “Clase Y”, mientras que las restantes se clasifican como hélices de “Clase A” (Figura 7C). Las hélices de clase “A” presentan aminoácidos cargados positivamente en ambos límites entre las caras hidrofóbica e hidrofílica de la hélice, y aminoácidos cargados negativamente en el centro de esta última cara, con residuos polares neutros en la región comprendida entre los aminoácidos cargados. Las hélices de clase “Y” presentan aminoácidos cargados positivamente en ambos límites entre las caras de la hélice, como así también en el centro de la cara polar, con residuos negativos y polares neutros en la región comprendida entre las cargas positivas.

En el dominio N-terminal de apo A-I, se ha predicho la existencia de una hélice anfipática de clase G* cuando la proteína se encuentra libre de lípidos (Garda, 2007), como así también, según se indicará más adelante, se ha postulado la posible formación de hasta tres hélices de 11 aminoácidos en partículas de dHDL de diferentes tamaños (Klon et al, 2002a). En cristales de apo A-I truncada (Δ 185-243), se determinó la presencia en el extremo N-terminal de dos hélices anfipáticas, una mayor (residuos 7-34) y una menor (residuos 37-41) (Mei & Atkinson, 2011).

Actualmente el modelo más aceptado de partícula discoidal es el llamado modelo de “doble cinturón”, en el cual dos moléculas de apo A-I, dispuestas de forma anti-paralela una de otra, cubren la periferia de una pequeña porción discoidal de bicapa lipídica, formando dos anillos continuos de α -hélices anfipáticas paralelos al plano de la bicapa (Segrest et al, 1999) (Figura 8).

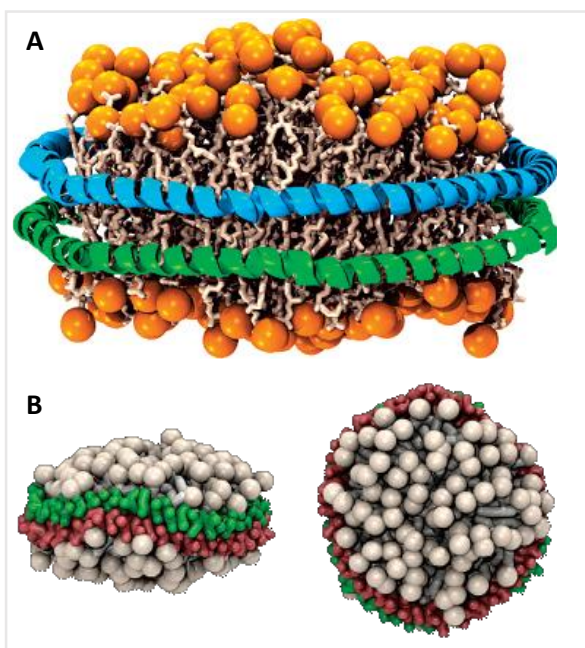


Figura 8 – **A**, Esquema del modelo de “doble cinturón” de dHDL. Dos moléculas de apo A-I (en azul y verde, visualizadas como cintas), dispuestas de forma antiparalela, cubren la periferia de un disco de bicapa lipídica (cabezas polares en naranja, cadenas hidrocarbonadas en gris), protegiendo las cadenas hidrocarbonadas de los FL de entrar en contacto con el medio acuoso. **B**, Imagen generada a partir de una simulación de dinámica molecular de tipo “coarse-grained” (de grano grueso), en la cual se muestra la estructura de un nanodisco de bicapa lipídica con estructura de doble cinturón desde vistas lateral y superior. En verde y rojo se muestran las moléculas de apo A-I, en gris las moléculas de FL.

Las α -hélices “ideales” poseen una periodicidad de 3,6 aminoácidos por vuelta. Sin embargo, si las α -hélices de apo A-I tuvieran dicha periodicidad, los aminoácidos hidrofóbicos no se alinearían unos con otros formando una cara, sino que generarían una “línea” que se curvaría a lo largo de la hélice, lo que haría que parte de las cadenas laterales hidrofóbicas quedaran expuestas al medio acuoso y algunas de las cadenas laterales polares quedarán en contacto con las cadenas hidrocarbonadas de los FL (*Figura 9A*). Se ha determinado que una periodicidad de aproximadamente 3,67 aminoácidos por vuelta hace que la totalidad de los aminoácidos hidrofóbicos formen una cara continua a lo largo de todas las hélices (*Figura 9B*) (*Segrest et al, 1999*). Estas hélices de periodicidad 3,67 se denominan $\alpha_{11/3}$, debido a que se necesitan 11 aminoácidos para producir 3 vueltas de hélice. Las hélices ideales (3,6 aminoácidos por vuelta) requieren 18 aminoácidos para producir 5 vueltas, por lo que se denominan $\alpha_{18/5}$. De lo anterior, puede verse que las repeticiones de 11 aminoácidos de apo A-I se corresponden a tres giros de hélice, mientras que las repeticiones de 22 aminoácidos corresponden a seis giros de hélice.

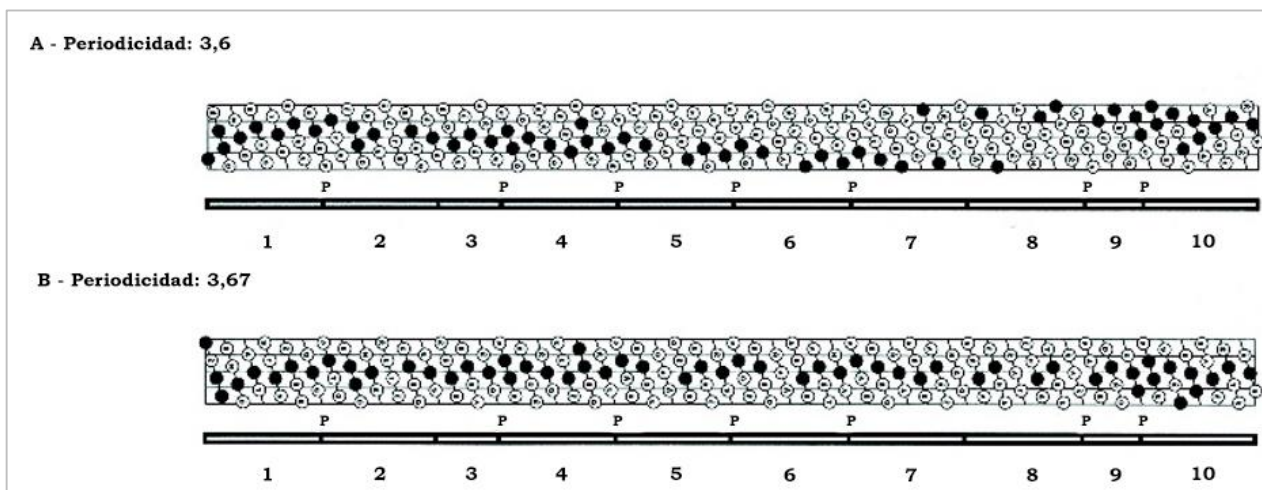


Figura 9 – Periodicidad de hélices de apo A-I y formación de una cara hidrofóbica del dominio C-terminal (residuos 44 a 243). Los círculos negros indican aminoácidos hidrofóbicos. Solo con una periodicidad de 3,67 aminoácidos por vuelta se logra formar una cara hidrofóbica a lo largo de la molécula de apo A-I. Los números indican la denominación que recibe cada una de las hélices formadas por las repeticiones aminoacídicas (cada uno de los segmentos de las barras). Puede verse que las hélices 3 y 9 corresponden a las repeticiones de 11 aminoácidos. Las letras “P” indican las posiciones de residuos de prolina. Modificado de Segrest et al, 1999.

Debido a que la fuerza de los enlaces de hidrógeno aumenta en ambientes de menor constante dieléctrica, la cara hidrofóbica de las hélices, en contacto con las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos de las partículas discoidales, hace que las α -hélices de apo A-I se curven. Esto hace que las mismas “abracen” las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos (*Segrest et al, 1999*). Adicionalmente, se considera que los residuos de prolina introducen pliegues regulares que permiten la correcta orientación de las hélices al encontrarse en el exterior de cada anillo helicoidal, con un ángulo promedio de 40° (desvío estándar de 17°) en la estructura cristalina determinada (*Klon et al, 2002a*).

El modelo de doble cinturón permite explicar los diferentes tamaños de partículas de dHDL observadas (**Figura 10**). Los modelos moleculares actuales de doble cinturón se basan en la estructura de α -hélice del dominio C-terminal. Los 200 aminoácidos de dicho dominio son suficientes para generar una partícula de rHDL de una circunferencia de 105 Å sin espacio entre los extremos N y C-terminal de cada molécula. Sin embargo, el análisis de la secuencia completa de apo A-I sugiere la existencia de hasta 3 hélices anfipáticas de 11 aminoácidos en el dominio N-terminal (correspondientes a los aminoácidos 11 a 21, 22 a 32 y 33 a 43, las que se denominan G*¹, G*² y G*³, respectivamente). La adición secuencial de cada una de estas hélices en el anillo antes mencionado permite obtener una partícula de rHDL con una circunferencia 5 Å mayor, por lo que la adición de dos hélices permite obtener partículas discoidales de hasta 115 Å.

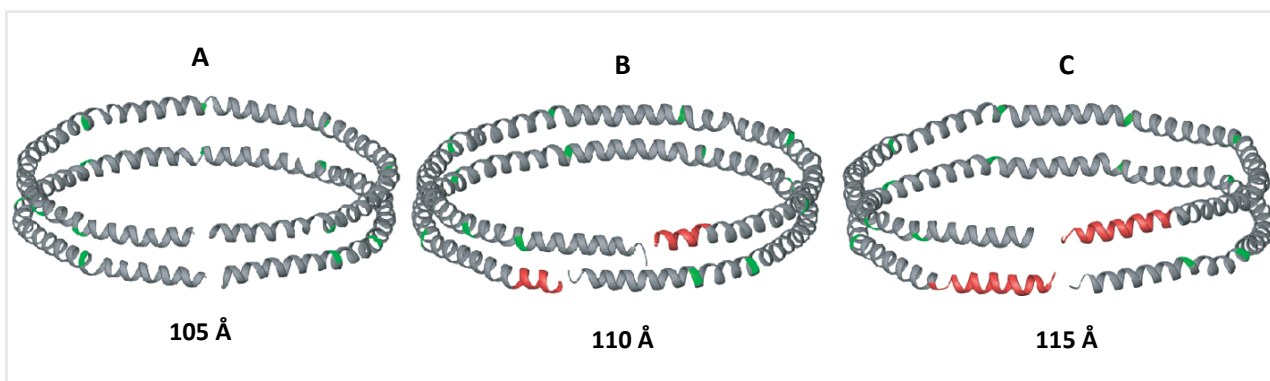


Figura 10 – Esquemas de partículas de dHDL de diferentes diámetros. Solo se muestran las moléculas de apo A-I como cintas grises (no se muestran las moléculas de FL). **A**, partícula de 105 Å de diámetro, formada por las 10 hélices anfipáticas del dominio C-terminal. **B**, partícula de 110 Å de diámetro, formada por las 10 hélices del dominio C-terminal y una de las hélices predichas del dominio N-terminal, la hélice G*³ (rojo). **C**, partícula de 115 Å de diámetro, formada por las 10 hélices del dominio C-terminal y dos de las hélices predichas del dominio N-terminal, las hélices G*³ y G*² (rojo).

Las partículas de menor tamaño pueden ser explicadas considerando que no todas las hélices anfipáticas del dominio C-terminal intervienen en el anillo (*Klon et al, 2002a*). Se ha determinado que, en las partículas de dHDL de menor tamaño, las hélices 3 y 4 de las moléculas de apo A-I interaccionan en menor medida que las restantes con las cadenas hidrocarbonadas de los FL presentes en las partículas, quedando “fuera” del anillo (*Corsico et al, 2001*).

Basados en cálculos computacionales de interacciones iónicas, se ha postulado que la configuración energéticamente más favorable es aquella en la que la hélice 5 de una molécula de apo A-I se encuentra enfrentada a la hélice 5 de la molécula anti-paralela (*Segrest et al, 1999*). Sin embargo, se ha propuesto que una única configuración posible (“registro de hélice fijo”) no permite explicar muchos de los resultados obtenidos experimentalmente, sino que en realidad las moléculas de apo A-I pueden rotar una sobre otra (cambiando el registro) o presentar diferentes registros inter-hélices. Esta situación se ha denominado “registro de hélice variable” (*Li et al, 2002*).

Aunque la configuración en la cual las hélices 5 de ambas moléculas de apo A-I se encuentran enfrentadas, denominada LL5/5, es la utilizada como base para los diferentes modelos moleculares de las

dHDL, se ha determinado la existencia de partículas en las cuales la hélice 5 de una de las moléculas de apo A-I se encuentra enfrentada a la hélice 2 de la otra, configuración que se denomina LL5/2.

ESTUDIOS UTILIZANDO nHDL

Como las nHDL son uno de los primeros intermediarios en el RCT, y el mayor porcentaje del eflujo de colesterol depende de estas partículas, se ha puesto gran esfuerzo en su estudio. Sin embargo, al encontrarse en tan baja proporción en el plasma se hace difícil su obtención en cantidades suficientes. Además, existe una gran variación en su composición lipídica dependiendo del estado metabólico del individuo donante del plasma. También existen diferentes variantes alélicas de apo A-I. Estas variaciones pueden producir cambios de diferente magnitud en la estructura y/o funcionamiento de las nHDL, que deben evitarse en la realización de estudios funcionales.

Para solucionar estos inconvenientes, se han desarrollado diferentes metodologías que permiten la generación de complejos lipoproteicos que se asemejan a las nHDL, tanto en estructura como en función. A estas partículas lipoproteicas se las denomina HDL reconstituidas o rHDL. La obtención de rHDL por estos métodos es reproducible y gracias a ellos se pueden obtener partículas de igual composición en cantidades suficientes para estudios.

La más difundida de estas metodologías es la generación de las rHDL a partir de micelas mixtas de fosfolípidos y un detergente dializable. Para llevar a cabo la misma se mezclan fosfolípidos, el detergente y apo A-I, y luego se realiza la diálisis de dicho sistema, a fin de eliminar el detergente. Una vez eliminado el mismo se obtienen las partículas de rHDL. El detergente más ampliamente utilizado es el colato de sodio (**Figura 11**). En gran parte de la bibliografía se utiliza dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC) como fosfolípido (**Figura 11**). Sin embargo, los fosfolípidos con dos cadenas hidrocarbonadas asimétricas, con una saturada en la posición 1 del glicerol y otra mono-cis-insaturada o poli-cis-insaturada en la posición 2 son los más comunes en la naturaleza (Róg *et al*, 2004; Ichimori *et al*, 1999). Entre las fosfatidilcolinas, la palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) es la más abundante (Li *et al*, 1994; Róg *et al*, 2004). La POPC posee una cadena saturada de 16 carbonos de longitud (derivada del ácido palmítico) en la posición 1 del glicerol, y una cadena de 18 carbonos de longitud, con un único doble enlace *cis* entre los carbonos 9 y 10 (derivada del ácido oleico), en la posición 2 del glicerol (**Figura 11**). Por ello, también se han generado rHDL por esta metodología utilizando como fosfolípido POPC. Al comparar la capacidad de remoción de colesterol celular de las rHDL generadas con DMPC y POPC se ha observado que las rHDL de POPC tienen una mayor capacidad que las de DMPC (Davidson *et al*, 1995a).

Durante su tesis doctoral, la Dra. Cuellar, realizó la reconstitución de partículas de rHDL con DMPC mediante una metodología diferente. En dicha metodología, se lleva una suspensión de DMPC a su temperatura de transición de fase y se le agrega apo A-I. En estas condiciones también se obtienen rHDL. Sin embargo, se demostró que las partículas de rHDL obtenidas con DMPC utilizando ambas metodologías

son diferentes, tanto estructural como funcionalmente, poseyendo una mayor capacidad de remoción de colesterol las obtenidas mediante la reacción espontánea a la temperatura de transición del fosfolípido. Se ha considerado que esta metodología puede asemejarse más a la forma propuesta por la cual las nHDL son generadas *in vivo*.

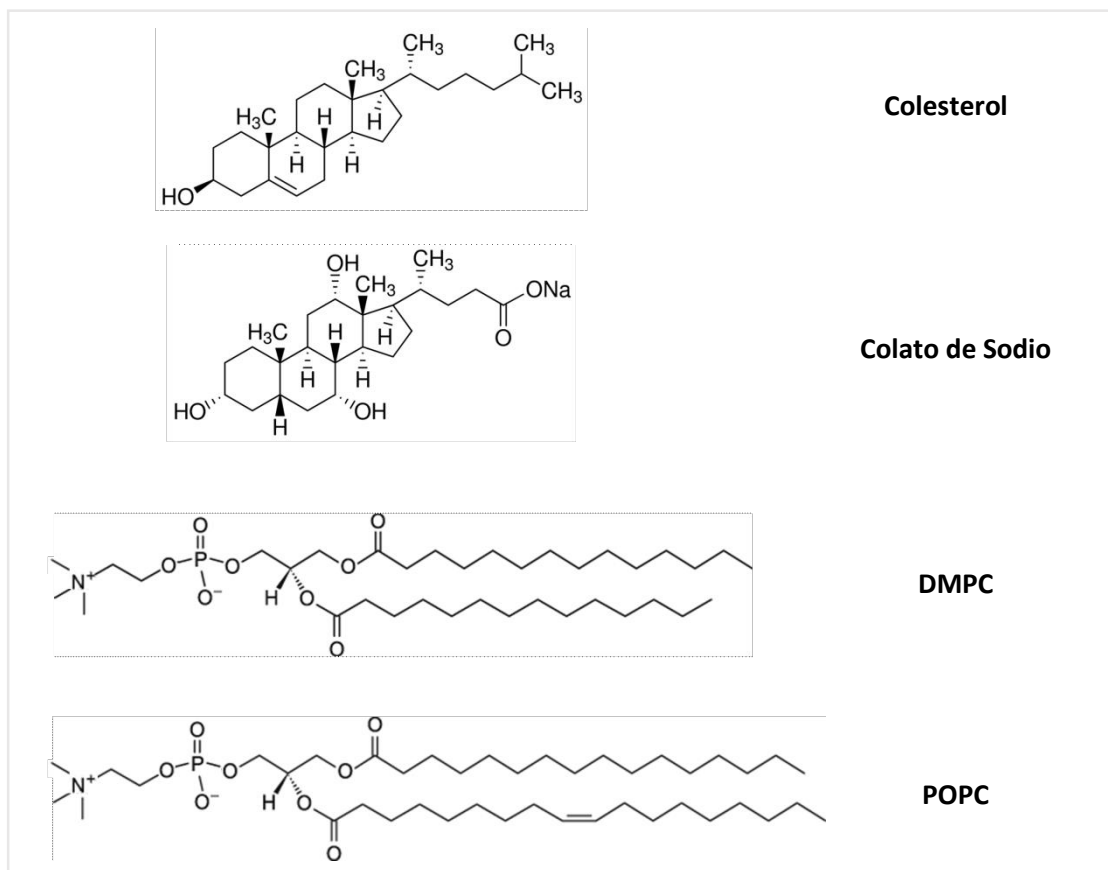


Figura 11 – Estructuras moleculares de colesterol, colato de sodio, DMP y POPC.

Si se tienen en cuenta las diferencias en la capacidad de remoción de colesterol de las partículas de rHDL generadas a partir de DMPC y POPC por el método de diálisis de micelas mixtas (*Davidson et al, 1995a*) y las de las rHDL de DMPC generadas por las dos metodologías es de esperar que, de poder obtenerse, partículas de rHDL obtenidas con POPC por reacción espontánea a su temperatura de transición sean las que mayor capacidad de remoción posean. Sin embargo, no se ha encontrado bibliografía en la cual se intentará realizar la reconstitución de las partículas de rHDL con este fosfolípido a su temperatura de transición. La temperatura de transición de la DMPC es de aproximadamente 24°C, y la de la POPC es de -2°C a -3°C (según la bibliografía consultada), lo que dificulta llevar a cabo la reacción.

Adicionalmente, se ha descrito la obtención de partículas de rHDL mediante la reacción espontánea de apo A-I con una suspensión de vesículas de fosfatidilcolina de yema de huevo a un pH menor a 5 (*Fukuda et al, 2008*). La fosfatidilcolina de yema de huevo tiene aproximadamente un 70% de POPC (*Seelig & Waespe-Sarcevic, 1978*). Se ha propuesto que estas condiciones se asemejarían a la formación intracelular de las nHDL en el organismo.

Es por todo ello que en este trabajo se llevaron a cabo las distintas metodologías antes mencionadas para obtener partículas de rHDL de POPC a fin de comparar su capacidad de remover colesterol de macrófagos murinos.

Objetivos

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

- 1) Obtener complejos discoidales de rHDL con POPC en ausencia de detergentes.
- 2) Comparar la capacidad de remover colesterol de macrófagos murinos de los complejos rHDL obtenidos en ausencia de detergentes con la de los complejos obtenidos por diálisis de micelas mixtas POPC/colato.

Materiales y Métodos

OBTENCION DE APOLIPOPROTEINA A-I

Sistema de expresión

La apolipoproteína A-I fue obtenida por purificación de la proteína recombinante utilizando como sistema de expresión la cepa *BL21 (DE3)* de *E. coli*. Esta cepa, un lisógeno del bacteriófago DE3, es ampliamente utilizada para la obtención de proteínas recombinantes debido a que es deficiente en las proteasas OmpT y Lon, y a la capacidad de control que permite sobre la expresión del transgen.

Construcción genética utilizada

Las células de *E. coli* utilizadas poseen un plásmido pET-30 que contiene como inserto una secuencia modificada del cDNA de apo A-I humana (**Figura 12**). Dicha cepa fue desarrollada previamente en el laboratorio (*Prieto et al, 2012*) a fin de facilitar el proceso de purificación de la proteína. Al inducir la expresión de apo A-I en este plásmido se obtiene la proteína fusionada por su extremo N-terminar a un segmento de poli-histidina (His – Apo A-I).

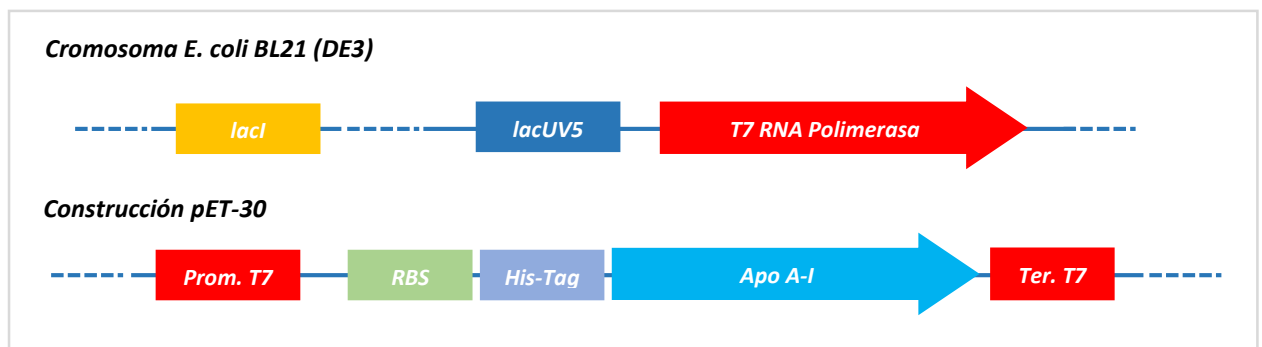


Figura 12 – Esquema de la construcción genética utilizada para expresar la His – Apo A-I.

Además, la mutación que posee la construcción respecto de la secuencia del cDNA de apo A-I humana crea un enlace peptídico Asp-Pro entre los aminoácidos 2 y 3 (**Figura 13**).

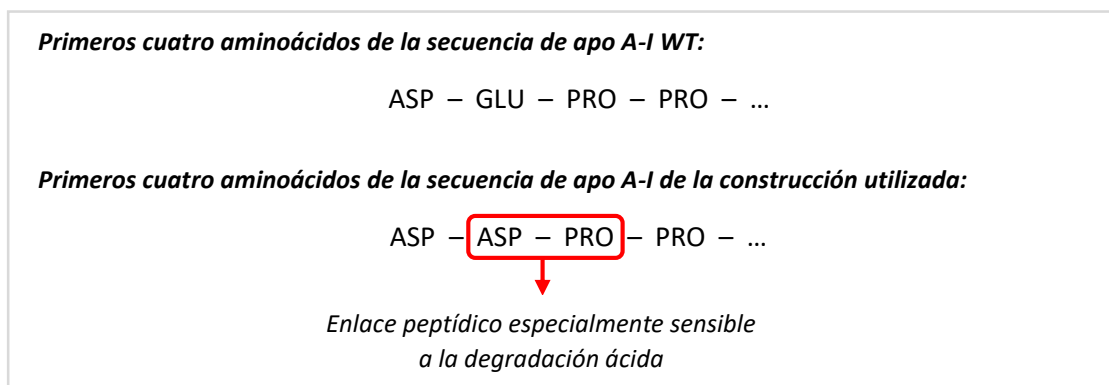


Figura 13 – Cambio de secuencia respecto de la apo A-I WT que produce un enlace peptídico lábil a la degradación por tratamiento ácido en la construcción utilizada.

Este enlace peptídico es particularmente lábil frente al tratamiento ácido, lo que permite una fácil remoción del segmento fusionado al extremo N-terminal de apo A-I. Se obtiene así una proteína que carece de los dos aminoácidos iniciales de la secuencia de la proteína *wild type* (WT). Sin embargo, la misma ha sido caracterizada y se ha demostrado que no hay diferencias con respecto a la proteína WT (Prieto et al, 2012).

Como la cepa utilizada es un lisógeno del bacteriófago DE3, posee integrado a su genoma el genoma de dicho fago. Es por ello que en el cromosoma de las células de *E. coli* BL21 (DE3) existe una copia del gen *lacI* y una copia del gen de la T7 RNA polimerasa regulado por un promotor fuerte *lacUV5*, el cual es un promotor *lac* modificado (Figura 14A). La transcripción del inserto en el plásmido pET-30 se encuentra regulada por un promotor T7, por lo que solo se transcribe en presencia de la T7 RNA polimerasa del genoma. Esto permite un gran control de la expresión de transgen.

A)	Elemento -35	Elemento -10
Promotor consenso <i>E. coli</i>	... T T G A C A N ₁₆₋₁₉	T A T A A T ...
Promotor <i>lac</i>	... T T T A C A N ₁₆₋₁₉	T A T G T T ...
Promotor <i>lacUV5</i>	... T T T A C A N ₁₆₋₁₉	T A T G A T ...
B)	...TTTACA N ₁₆₋₁₉ TATGAT N ₅₋₈ AATTGTGAGCGGATAACAATT ...	

Figura 14 – A) Secuencias de los elementos -35 (izquierda) y -10 (derecha) de los promotores *lac*, *lacUV5* y el promotor consenso de *E. coli*. En rojo se muestran las mutaciones de los promotores *lac* y *lacUV5* respecto del promotor consenso. **B)** Secuencia de un promotor *lacUV5* (elementos -35 y -10 marcados en verde) mostrando la secuencia del Operador (en azul). A partir de Voet & Voet, 2010 (Capítulo 31); Nelson & Cox, 2013 (Capítulo 28) y Brown, 2006 (Capítulo 11).

El gen *lacI* codifica constitutivamente la proteína LacI, represor del promotor *lac*, que se une a una secuencia de ADN que se encuentra inmediatamente corriente abajo del promotor (Operador, Figura 14B), bloqueando la región conservada centrada en -10 del promotor, impidiendo la unión de la RNA polimerasa y por tanto imposibilitando la transcripción de los genes regulados. LacI también reprime al promotor *lacUV5* debido a que la diferencia entre este promotor y el *lac* se encuentra en la región -10 y no en el Operador. De esta forma, la transcripción de todos los genes regulados por un promotor *lac* (o *lacUV5*) normalmente se encuentra reprimida. Para que se produzca la transcripción a niveles significativos a partir de un promotor *lac* se requiere la ausencia de LacI, para que no interaccione con el operador, y la presencia del activador CRP-cAMP (o CAP-cAMP). En el caso del promotor *lacUV5* solo es necesaria la ausencia de LacI.

Naturalmente, en presencia de lactosa, las células transforman la misma en alolactosa por acción de la enzima β -galactosidasa codificada por el gen *lacZ* del operon *lac*. El represor *LacI* interacciona con la alolactosa, produciéndose en él un cambio conformacional que lo inactiva, impidiendo su unión al Operador y, por tanto, evitando la represión de la transcripción. Sin embargo, análogos sintéticos de la alolactosa, como el análogo no hidrolizable isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), también interaccionan con *LacI* y lo inactivan: al agregar IPTG al medio, éste interacciona con el represor *LacI* e impide que el mismo se una a los operadores de los promotores *lac* y *lacUV5* y los reprima. Como se indicó antes, en el caso del promotor *lacUV5* esto es suficiente para obtener altos niveles de transcripción del mRNA del gen que regula (*Figura 15*).

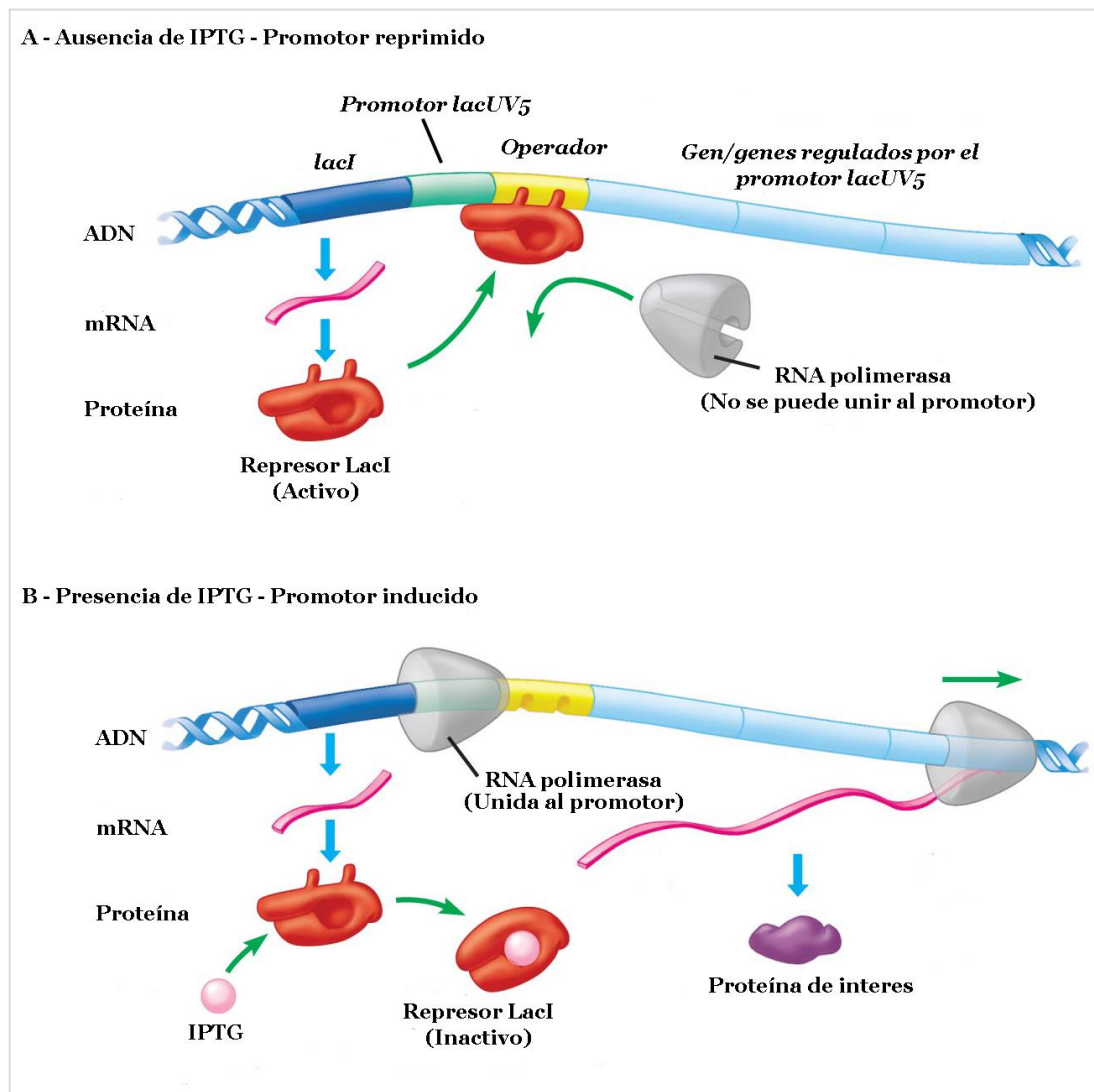


Figura 15 – Esquema de la regulación de la expresión del promotor *lacUV5*. En ausencia de IPTG (**A**) el represor *LacI* es activo, se une al operador e impide la unión de la RNA polimerasa al promotor, reprimiendo la transcripción de los genes regulados por el mismo. En presencia de IPTG (**B**), este se une a *LacI*, produciendo en el mismo un cambio conformacional que inactiva al represor, impidiendo su interacción con el operador. Al no unirse *LacI* al operador, la RNA polimerasa puede unirse al promotor y realizar la transcripción de los genes regulados (en nuestro caso dicho gen es el de la T7 RNA polimerasa).

En nuestro sistema de expresión, el agregado de IPTG induce el promotor *lacUV5*, lo que conduce a la expresión de la T7 RNA polimerasa. La expresión de dicha polimerasa produce la transcripción de la

construcción de interés (**Figura 16**). Por lo tanto, el agregado de IPTG produce la expresión de la apolipoproteína A-I humana fusionada por su N-terminal a un His-Tag (His-Apo A-I).

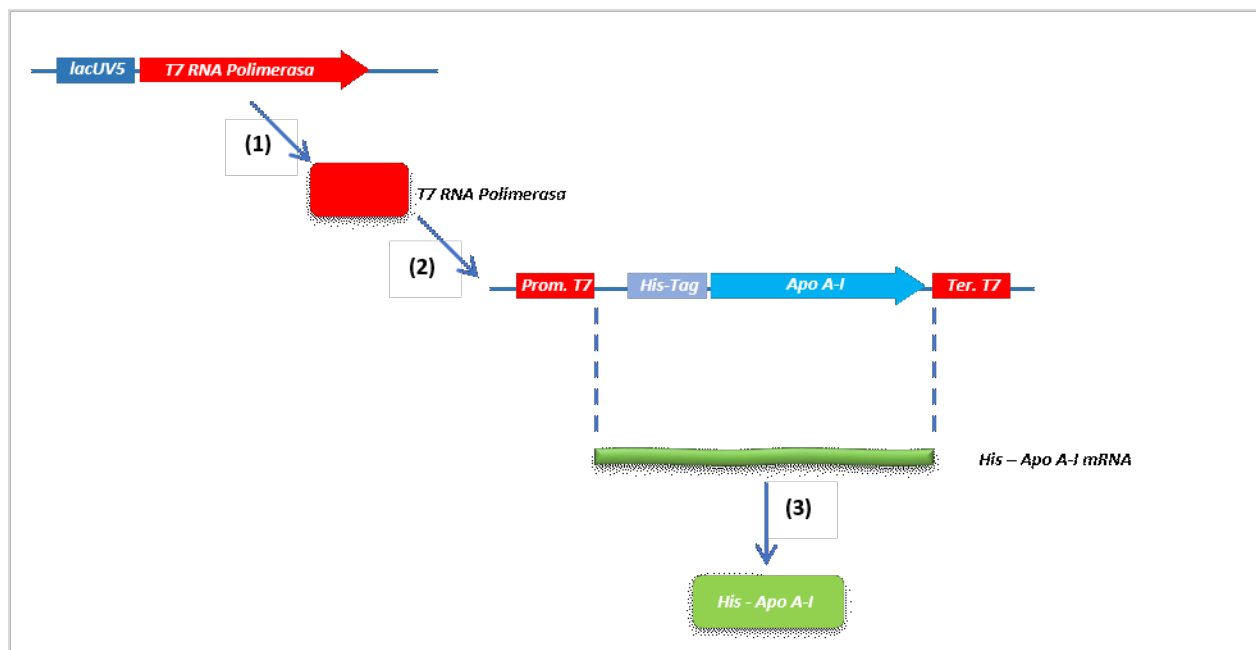


Figura 16 – En presencia de IPTG, se induce la expresión de la T7 RNA polimerasa (1), la cual se une al promotor del vector *pET-30* y transcribe la construcción de la *His-Apo A-I* (2), lo que finalmente conduce a su expresión (3).

Expresión de apolipoproteína A-I

Se tomó una alícuota de un stock de glicerol almacenado a -80°C de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo el plásmido con la construcción genética antes indicada, se colocó en 5 ml de medio LB estéril (10g/l de triptona, 5g/l de extracto de levadura, 5g/l de cloruro de sodio; esterilizado en autoclave) al que se le agregó kanamicina en una concentración final de $50\ \mu\text{g/ml}$ y se dejó crecer overnight a 37°C con agitación. Se tomaron alícuotas de 1 ml y se colocaron en erlenmeyers de 1 litro conteniendo 500 ml de medio LB estéril con $50\ \mu\text{g/ml}$ de kanamicina y se dejaron crecer a 37°C con agitación (150 rpm) por aproximadamente 2 horas. Una vez que el cultivo alcanzó una DO_{600} de aproximadamente 0,5 se procedió a la inducción de la expresión de la apolipoproteína A-I mediante el agregado de IPTG a una concentración final de 0,5 mM. Luego de tres horas de agregado el IPTG se procedió a centrifugar el cultivo a 5000 RPM durante 15 minutos a 4°C en una centrífuga Avanti JE (rotor JLA 16.250). Luego de la centrifugación se descartó la mayoría del sobrenadante, conservando aproximadamente unos 10 ml totales en los cuales se resuspendió el pellet bacteriano obtenido de la totalidad del medio de cultivo. La suspensión así obtenida se colocó en un tubo de 50 ml y se le agregó la cantidad necesaria de hidrocloreuro de guanidina sólido para alcanzar una concentración final de 6M de guanidina. Se dejó overnight con agitación a 4°C para producir la lisis bacteriana. Luego se centrifugó a 5000 RPM durante 30 minutos a 4°C en una centrífuga Avanti JE (rotor JS 5.3), descartándose el pellet y continuando la etapa de purificación con el sobrenadante.

Purificación de apolipoproteína A-I

La purificación de apo A-I recombinante a partir del sobrenadante obtenido de la centrifugación del lisado bacteriano consta de un proceso de cuatro etapas:

Cromatografía de afinidad: En esta etapa se utilizaron columnas de cromatografía de afinidad de níquel inmovilizado (IMAC). Por una columna lista para usar se hicieron eluir las diferentes soluciones y la muestra (sobrenadante de la centrifugación anterior) en el siguiente orden:

1. Buffer de equilibrado (buffer EQB; KH_2PO_4 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,4).
2. Muestra que contiene la proteína a purificar.
3. Buffer de lavado (Buffer EQB + imidazol 5 mM final).
4. Buffer de elución (Buffer EQB + imidazol 500 mM final).
5. Solución de cloruro de sodio 0,5 M.
6. Solución de sulfato de níquel 0,2 M.

La solución de sulfato de níquel se utiliza para regenerar la columna. Todos los buffers y soluciones se pasaron en volúmenes equivalentes a cuatro veces el volumen del relleno de la columna y nunca se pasó más de 10 ml del sobrenadante con la proteína por la columna. Con un detector UV (EM-1 Econo UV Monitor, Bio-Rad) se monitoreó la absorbancia a 280 nm del eluato. En base a dicha información se registró un cromatograma y el eluato se dividió en diferentes fracciones.

Tratamiento con ácido fórmico: Las fracciones que contenían la apolipoproteína fusionada al His-Tag se juntaron en un único tubo y se les agregó ácido fórmico concentrado hasta una concentración final de 45% (v/v). Una vez agregado el ácido, se colocó el tubo en un baño termostático a 55°C por 4 horas.

Neutralización del ácido fórmico: Una vez transcurridas las 4 horas se dializó la solución de apo A-I con ácido fórmico contra un gran volumen de buffer fosfato al que se le había añadido el volumen necesario de NaOH para neutralizar la totalidad del ácido. La diálisis se realizó overnight a 4°C.

Segunda cromatografía de afinidad: En esta etapa se realizó el mismo procedimiento que en la primera, utilizando como material de partida la solución de apo A-I neutralizada en la etapa anterior.

Control del proceso

Todo el proceso de expresión y purificación se controló mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se utilizaron geles de poliacrilamida 12%.

Para controlar la inducción de la expresión se tomaron muestras del cultivo antes y después del agregado de IPTG y se sembraron en el gel, junto a un estándar de apo A-I humana recombinante fusionada al His-Tag previamente obtenida en el laboratorio.

Para corroborar las fracciones de la primera columna cromatográfica que contienen apo A-I recombinante se sembraron alícuotas de las fracciones junto a un estándar de apo A-I sérica humana previamente obtenida en el laboratorio.

Para corroborar que se haya producido el clivaje del His-Tag de la proteína con el tratamiento con ácido fórmico se sembró una alícuota de la solución de apo A-I recombinante después de haber sido tratada con el ácido, junto a un estándar de apo A-I sérica humana.

Para corroborar las fracciones de la segunda etapa cromatográfica que contienen la proteína de interés se sembraron alícuotas de las fracciones junto a un estándar de apo A-I sérica humana.

En todos los casos la corrida electroforética se realizó bajo las mismas condiciones. Una vez sembrado el gel se realizó una corrida electroforética a 120 V hasta que el frente de corrida alcanzó el extremo final del gel. Los geles fueron teñidos con una solución de Coomassie Brilliant Blue G-250.

OBTENCION DE rHDL

Por diálisis de micelas mixtas con colato

Se tomó el volumen necesario de un stock de POPC en cloroformo y se evaporó el solvente bajo un flujo de N₂. Una vez evaporado completamente el solvente se agregó buffer fosfato y se resuspendió la POPC mediante agitación vigorosa prolongada. Se colocó la suspensión en hielo, se agregó colato y se incubó durante 30 minutos. Se agregó la apo A-I a una concentración final de 0,1 mg/ml y se incubó durante 30 minutos. La relación molar final de POPC: colato: Apo A-I fue de 80: 50: 1. Luego se dializó extensivamente frente a buffer fosfato a 4°C.

Por reacción espontánea a la temperatura de transición del fosfolípido

Se tomó el volumen necesario de un stock de POPC en cloroformo y se evaporó el solvente bajo un flujo de N₂. Una vez evaporado completamente el solvente se agregó buffer fosfato y se resuspendió la POPC mediante agitación vigorosa prolongada. Se agregó la apo A-I a una concentración final de 0,1 mg/ml, en una relación molar POPC: Apo A-I de 80:1. Luego se colocó la suspensión de POPC con apo A-I en un

baño termostatzado a $-2,5^{\circ}\text{C}$ durante 2 días. De igual forma se ensayó una suspensión con una relación POPC: Apo A-I de 40:1.

Por reacción espontánea a pH ácido

Se tomó el volumen necesario de un stock de POPC en cloroformo y se evaporó el solvente bajo un flujo de N_2 . Una vez evaporado completamente el solvente se agregó buffer fosfato y se resuspendió la POPC mediante agitación vigorosa prolongada. Se agregó apo A-I a una concentración $1\ \mu\text{M}$, en una relación molar POPC: Apo A-I de 100:1 y 40:1. Se dializó overnight contra un buffer glicina/HCl de pH 4,5. Luego se dializó extensivamente contra buffer fosfato de pH 7,4.

Control de la reacción

Se controló el desarrollo de las reacciones para los métodos de la temperatura y de cambio de pH. Para los tres métodos se controlaron los productos finales obtenidos.

Control espectrofotométrico: A diferentes tiempos de la reacción espontánea a la temperatura de transición de POPC y de la reacción a pH ácido se tomaron medidas de la absorbancia de la suspensión, a una longitud de onda de 340 nm.

Control mediante gel de poliacrilamida: Una vez finalizada la reacción se realizó un gel en gradiente de poliacrilamida 8 – 25 % en condiciones nativas. Se sembraron en paralelo los productos obtenidos por diálisis con colato y los productos de cada método de obtención restante junto a estándares de peso molecular.

ENSAYO DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS rHDL OBTENIDAS

Cultivo celular

En el ensayo celular para determinar la capacidad de remoción de las diferentes partículas de rHDL obtenidas se utilizaron macrófagos murinos RAW 264.7 como modelos celulares. Dichas células se cultivaron en medio DMEM con un 10% de suero fetal bobino adicionado con penicilina/estreptomicina. Se tomó un vial de un stock de células RAW que se encontraba almacenada en nitrógeno líquido y se lo colocó en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bobino y penicilina/estreptomicina, se colocaron en una botella de cultivo estéril y se dejaron a 37°C con atmósfera con 5 % de CO_2 . El medio de cultivo se cambió cada 24 horas hasta que se observó que las células alcanzaron confluencia. Luego se las repicó a una nueva botella de cultivo con medio DMEM adicionado con suero fetal bobino y penicilina/estreptomicina. A continuación, se levantó la monocapa de la botella de cultivo y se tomaron alícuotas que se utilizaron para generar monocapas en los pocillos de placas de seis pocillos. Estas placas son las que se utilizan en adelante en los ensayos.

Ensayo con rHDL

El ensayo de remoción de colesterol por las partículas de rHDL consiste de varias etapas, en las cuales se deben cargar los macrófagos con colesterol, tratarse los mismos con suspensiones de rHDL y luego determinar la cantidad de colesterol removido por las partículas.

Carga celular: Para cargar las células con colesterol se les quitó el medio DMEM con suero fetal bobino, se lavaron las monocapas con buffer PBS dos veces y se agregó 2 ml de medio de carga a cada pocillo de la placa. El medio de carga consiste de medio de cultivo DMEM sin suero fetal bobino, con ^{14}C -colesterol (0,05 $\mu\text{Ci/ml}$), colesterol (50 $\mu\text{g/ml}$) y albúmina libre de ácidos grasos (0,2 g de albúmina cada 100 ml de medio DMEM). Las monocapas se dejan en este medio por 24 horas a 37 °C y atmosfera con 5 % de CO_2 .

Equilibrado: Pasadas las 24 horas se retiró el medio de carga. Las monocapas se lavaron dos veces con buffer PBS y se les agregó 2 ml de medio de equilibrado. El medio de equilibrado consiste de medio de cultivo DMEM sin suero fetal bobino, albúmina libre de ácidos grasos y bromo-cAMP (inductor de la expresión de ABCA1). Las monocapas se dejan en este medio por 8 horas a 37 °C y atmosfera con 5 % de CO_2 .

Tratamiento con rHDL: Pasadas las 8 horas se eliminó el medio de equilibrado, se lavaron las monocapas dos veces con buffer PBS y a cada pocillo de la placa se le agregó 2 ml de medio DMEM sin suero fetal bobino conteniendo aceptores de colesterol, según cada uno de los tratamientos ensayados. Los tratamientos fueron medio control (sin aceptores), medio con apo A-I libre, medio con rHDL_{colato}, y medio con rHDL_{pH}. Los aceptores se agregaron a una concentración final de 30 $\mu\text{g/ml}$ de apolipoproteína A-I (libre o en partículas de rHDL). Cada uno de los tratamientos se realizó por triplicado. Las monocapas con cada uno de los medios se colocaron a 37 °C y atmosfera con 5 % de CO_2 .

Obtención de muestras: Pasadas 4 horas de iniciado el tratamiento con los diferentes medios se tomó una alícuota de 300 μl de medio de cada pocillo y se las almacenó a -20°C hasta su posterior procesamiento. Pasadas 12 horas del agregado de los medios con aceptores de colesterol se retiró la totalidad del medio de cultivo de cada pocillo y a las monocapas se las lavó con buffer PBS y se almacenaron secas a -20°C hasta su posterior procesamiento. Con las muestras de medio correspondiente a las 4 y 12 horas de tratamiento se prosiguió con la etapa de medida de la radiactividad. Las monocapas fueron sometidas posteriormente a un procedimiento de extracción de lípidos y luego a la medida de radiactividad.

Extracción de lípidos: A cada pocillo se le agregaron 700 μl de agua Milli-Q y las monocapas se levantaron por raspado. Se colocó la suspensión celular en un tubo de vidrio y se agregó 1,3

ml de agua Milli-Q. A los 2 ml de suspensión acuosa se le adicionaron 8 ml de solución de Folch (mezcla de cloroformo y metanol en relación 2 a 1 respectivamente) y se vortexearon vigorosamente. Las muestras fueron gaseadas con nitrógeno y se las almacenó a -20°C durante 72 horas aproximadamente. Una vez separadas las fases acuosa y orgánica, se tomó esta última y se la colocó en un nuevo tubo de vidrio, donde se le evaporó el solvente. Las muestras secas fueron resuspendidas en 500 µl de solución de Folch, y se procedió a la medida de radiactividad.

Medida de radiactividad: Las muestras de medio de cultivo tomadas a las 4 y 12 horas se centrifugaron para eliminar posibles restos celulares presentes. Se tomaron viales plásticos y se les agregó líquido de centelleo. A cada uno de los viales con líquido de centelleo se les agregó un volumen fijo de muestra. En el caso de las muestras de medio tomado a las 4 horas se agregaron 250 µl, 300 µl para las muestras de medio tomado a las 12 horas y 100 µl de solución de Folch en la que se habían resuspendido los lípidos extraídos de las monocapas. Se vortexearon los viales y se realizó la determinación de las desintegraciones por minuto (DPM) correspondientes al ^{14}C -colesterol.

ANÁLISIS DE DATOS

A partir de los valores de DPM obtenidos, y considerando el volumen de las alícuotas tomadas y el volumen total de medio, se calcularon las DPM en el medio de cultivo para la totalidad de las condiciones y tiempos ensayados.

Se calcularon las DPM totales de ^{14}C -colesterol en cada muestra como la suma de las DPM correspondientes a las alícuotas tomadas a las 4 y 12 horas y de las monocapas.

Se calculó el porcentaje de las DPM totales que representan las DPM de cada alícuota, lo que indica el porcentaje de eflujo de colesterol en cada una de las condiciones y tiempos ensayados.

Los porcentajes de eflujo de colesterol para cada una de las condiciones y tiempos ensayados se compararon mediante el análisis de ANOVA, a fin de determinar si las diferencias entre los distintos tratamientos resultaron ser significativas.

Resultados y Discusión

RESULTADOS

Obtención de Apo A-I

La expresión se pone de manifiesto al observar la diferencia en la intensidad de la banda correspondiente al peso molecular de la His-Apo A-I en la SDS-PAGE de las muestras del medio de cultivo antes y después del agregado de IPTG (**Figura 17**). En dicha imagen se puede ver claramente una mayor intensidad de tinción para el peso molecular correspondiente a la His-Apo A-I en la muestra luego del agregado de IPTG con respecto a la muestra antes de la inducción.

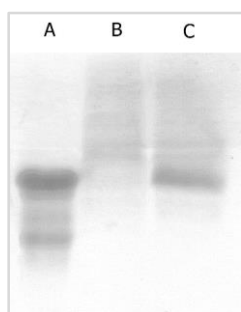


Figura 17 – SDS-PAGE para control de inducción de la expresión de apo A-I. **Calle A**, estándar de apo A-I con y sin His-Tag. **Calle B**, muestra del cultivo antes del agregado de IPTG. **Calle C**, muestra del cultivo bacteriano luego del agregado de IPTG. Se observa claramente una mayor intensidad de tinción para el peso molecular correspondiente a la His-Apo A-I luego del agregado de IPTG.

Luego de inducir la expresión de la proteína fusionada se procedió a la centrifugación de los cultivos bacterianos y a eliminar el medio de cultivo sobrenadante. Al resuspender el pellet bacteriano en un volumen de medio menor, unos 10 ml aproximadamente, aumenta en gran medida la concentración bacteriana en la suspensión. Esto favorece un aumento en la concentración de la proteína, ya que la misma se encuentra en cuerpos de inclusión dentro de las bacterias. Además, esto hace que se tenga que procesar un pequeño volumen para obtener la proteína pura y no la totalidad del medio de cultivo de partida.

Luego se lisaron las células de la suspensión bacteriana concentrada obtenida mediante la adición de hidrocloreuro de guanidina sólido, hasta alcanzar una concentración de guanidina 6 M. Además de producir la lisis bacteriana, la guanidina 6 M solubiliza completamente los cuerpos de inclusión de His-Apo A-I.

Al centrifugar el lisado se obtiene un pellet que contiene restos celulares y un sobrenadante en el que se encuentra nuestra proteína de interés junto a gran cantidad de otras proteínas y compuestos bacterianos solubles. El siguiente paso para obtener la apo A-I es separarla de dichos contaminantes. Para ello se utilizó una columna de afinidad con níquel inmovilizado. En las condiciones en las que se eluye el sobrenadante del lisado por la columna, el His-Tag que se encuentra fusionado al extremo N-terminal de la apolipoproteína forma un complejo con los átomos de níquel inmovilizados en la resina del relleno de la columna cromatográfica. Esto hace que las proteínas que poseen este segmento de poli-histidina se unan a la matriz de la resina y permanezcan retenidas en ellas. Aquellas proteínas que no poseen este segmento de poli-histidina, no son retenidas por la matriz de la resina y eluyen de la columna junto con la solución que pasa a través de ella. De esta forma, al hacer pasar el sobrenadante por la columna, la proteína de

fusión permanece retenida a la columna y el resto de las proteínas que se encontraban en el sobrenadante pasan a través de ella sin ser retenidas.

Los aminoácidos aromáticos de las proteínas absorben luz de 280 nm de longitud de onda, por lo que el proceso de elución se monitoreó utilizando un detector UV. Se registró la señal enviada por el detector en función del tiempo de la corrida cromatográfica. A medida que las proteínas no retenidas por la columna pasan por el detector UV, la absorción de luz de 280 nm de longitud de onda aumenta, aumentando también la señal registrada. Cuando todas estas proteínas han pasado por el detector UV, la señal disminuye. Esto es lo que da origen al primer “pico” del cromatograma de la [Figura 18](#).

En nuestro caso, la absorción a 280 nm del primer pico llega a una meseta y luego aumenta nuevamente. Esto puede deberse a que la cantidad de proteína que ha sido retenida en la matriz de la columna es tal que ha saturado la misma y ya no puede retener más moléculas de apo A-I, las que eluyen junto al resto de las proteínas y provocan el segundo aumento en la absorción registrado en el cromatograma.

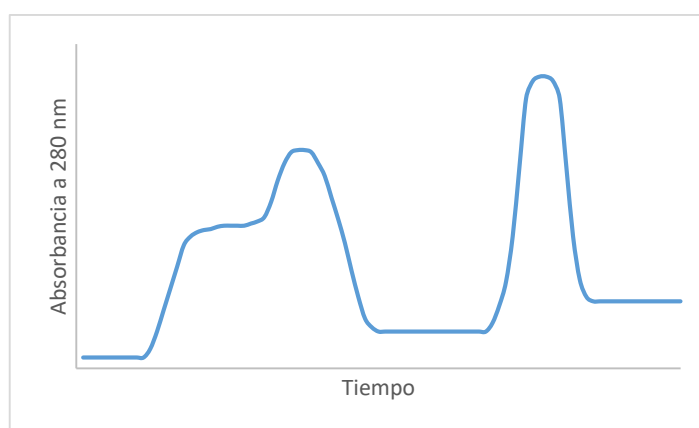


Figura 18 – Esquema del cromatograma obtenido durante la primera corrida cromatográfica del proceso de purificación de apo A-I.

Una vez que se ha hecho eluir el volumen de sobrenadante por la columna se agrega el buffer de lavado, que contiene una baja concentración de imidazol (0,05M). El imidazol compite con los aminoácidos de las diferentes proteínas presentes por formar complejos con los átomos de níquel de la columna, teniendo incluso una mayor afinidad que la histidina. A la concentración utilizada, el buffer de lavado es capaz de desplazar a aquellas proteínas que hayan formado complejos débiles con el níquel (las proteínas bacterianas que carecen del His-Tag pero que poseen aminoácidos capaces de formar complejos). Esto elimina cualquier proteína que haya quedado retenida en la matriz de la columna inespecíficamente. De producirse este tipo de interacción inespecífica se observaría un nuevo pico en el cromatograma. En nuestro caso esto no ha ocurrido. Sin embargo, se observa que la línea de base del cromatograma luego del agregado del buffer de lavado aumenta. Esto se debe a que el imidazol también absorbe a 280 nm de longitud de onda.

El buffer de elución posee una concentración de imidazol de 0,5 M (diez veces superior al buffer de lavado). Esta concentración de imidazol desplaza la histidina del His-Tag complejada con el níquel, lo que libera la proteína de fusión de la matriz de la columna, permitiendo su elución. Esto es lo que da origen al segundo pico del cromatograma. El resto de las soluciones eluidas por la columna se utilizan para regenerar la matriz con níquel de la columna y dejarla en condiciones óptimas de uso nuevamente.

La pureza de la proteína de fusión obtenida puede verse en el gel de la **Figura 19**, al comparar las calles correspondientes a las diferentes fracciones colectadas durante a corrida cromatográfica. Las fracciones que contenían His-Apo A-I pura se unieron y se las sometió a tratamiento con ácido fórmico. Este tratamiento ácido permite la ruptura del enlace Asp-Pro lábil que posee la proteína de fusión, permitiendo la eliminación del His-Tag.

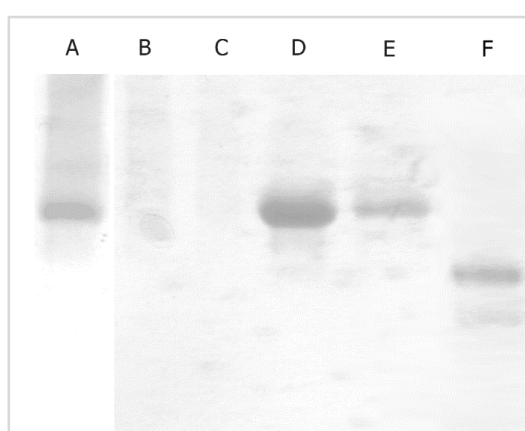


Figura 19 – SDS-PAGE para control de las fracciones colectadas durante la cromatografía. **Calle A**, muestra pasada, en donde se observa que además de proteínas de diferentes pesos moleculares, gran cantidad de proteína del peso molecular de la apo A-I lo que indica que con el volumen de muestra pasado se ha saturado la columna de afinidad. **Calles B y C**, fracciones del buffer de lavado. **Calle D y E**, fracciones del buffer de elución. **Calle F**, estándar de apo A-I sérica.

El utilizar una construcción que posea un enlace lábil al tratamiento ácido para eliminar la secuencia de poli-histidina utilizada para la purificación hace que esta operación sea mucho más rápida y fácil de realizar con respecto a la utilización de enzimas proteolíticas específicas utilizadas con otras construcciones. Sin embargo, la ruptura de este enlace genera una apo A-I humana que carece de los dos primeros aminoácidos de su secuencia. Esta proteína ya ha sido caracterizada y se comprobó que la ausencia de esos dos aminoácidos no la afectan estructural o funcionalmente respecto de la proteína de secuencia completa (Prieto *et al*, 2012). El clivaje del His-Tag se monitoreó mediante SDS-PAGE, en un gel de poliácridamida 12% (**Figura 20**).

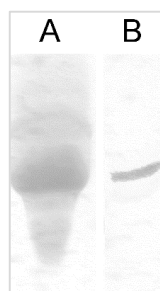


Figura 20 – SDS-PAGE para control de la reacción de clivaje del His-Tag mediante ácido fórmico. **Calle A**, apo A-I luego del tratamiento con ácido fórmico. **Calle B**, estándar de apo A-I sérica humana.

Previamente a correr el gel anterior la muestra debió ser resuspendida en guanidina debido a que durante el proceso de neutralización y diálisis del ácido fórmico la proteína precipitó. Se puede observar que la mayor parte de la proteína ha perdido el His-Tag.

Una vez clivado el His-Tag fue necesario llevar a cabo una segunda cromatografía de afinidad para eliminarlo y así obtener la proteína de interés pura. El cromatograma correspondiente se observa en la **Figura 21**. A diferencia de la primera corrida cromatográfica, el primer pico del cromatograma se debe a apo A-I, ya que al carecer del segmento de poli-histidina no interacciona con la matriz de la columna y por tanto eluye primero de la columna. La absorción a dicha longitud de onda se debe a los cuatro residuos de triptófano que posee en su secuencia.

La fracción eluída correspondiente a dicho pico se sometió a SDS-Page para comprobar la pureza de la apo A-I humana mutante obtenida (**Figura 21**).

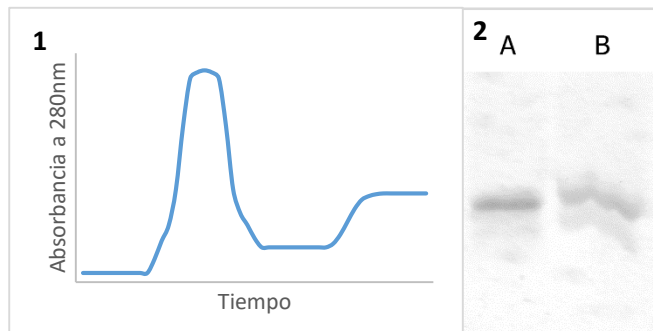


Figura 21 – 1) Esquema del cromatograma obtenido durante la segunda corrida cromatográfica. 2) SDS-PAGE para control de pureza de la apolipoproteína A-I. **Calle A**, proteína purificada. **Calle B**, estándar de apolipoproteína A-I sérica.

Obtención de las rHDL

Las partículas de rHDL se pueden generar de diferentes formas. Los métodos más utilizados consisten en la reacción de apolipoproteínas con micelas mixtas de fosfolípidos y el detergente colato.

Uno de los métodos más utilizados para la obtención de rHDL se basa en la diálisis de un sistema que contiene apo A-I y micelas mixtas de fosfolípidos/colato (Matz & Jonas, 1982). A una suspensión de vesículas de fosfolípidos se le adiciona el detergente colato, obteniéndose micelas mixtas de fosfolípido/colato. A esa suspensión de micelas mixtas que se agrega apo A-I y se incubaba. Luego, el sistema se somete a diálisis a fin de eliminar el detergente. Al final del proceso de diálisis se obtienen complejos discoidales de fosfolípido y apo A-I, los cuales han sido caracterizados ampliamente y se ha demostrado que se comportan estructural y funcionalmente como las nHDL.

En otro método (Bonomo & Swaney, 1988), se generan de manera similar las micelas mixtas de fosfolípido/colato y, luego del agregado de apo A-I, se obtienen las partículas lipoproteicas eliminando el detergente del sistema mediante cromatografía.

Podemos ver entonces, que en ambos métodos se sigue básicamente el mismo lineamiento general: Se forman micelas mixtas de fosfolípido/colato, se les agrega apo A-I y luego se elimina el detergente. Este esquema básico de trabajo es el esquema de obtención más ampliamente utilizado en la literatura.

También se han preparado mediante métodos que prescinden de la utilización de colato u otros detergentes. Uno de estos métodos consiste en la reacción espontánea de apo A-I con vesículas de

fosfolípidos a la temperatura de transición de fase de los mismos. Este método se ha utilizado con éxito con fosfolípidos sintéticos como, por ejemplo, dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC). A pesar de ello, hasta el momento no se han obtenido rHDL mediante este método con fosfolípidos hallados con frecuencia en las membranas plasmáticas, como la POPC. En el presente trabajo se utilizó esta metodología para realizar la reacción de reconstitución de apo A-I con POPC.

El proceso de formación de los complejos se ha seguido espectrofotométricamente. El seguimiento se realiza determinando la absorbancia a 340 nm, ya que la misma es un indicador de la cantidad de vesículas de fosfolípido en suspensión. Las vesículas no absorben la luz a dicha longitud de onda, sino que la dispersan, haciendo que la cantidad de luz detectada por el equipo disminuya. Se utiliza una longitud de onda de 340 nm debido a que a la misma los componentes del buffer utilizado y la proteína no la absorben. A medida que la reacción avanza, parte de las vesículas se desintegran al formarse los complejos lipoproteicos, como las rHDL. Estos complejos no dispersan la luz en la medida que lo hacen las vesículas. A medida que disminuye la cantidad de vesículas en suspensión, disminuye la dispersión de luz, por lo que se determina experimentalmente una menor absorbancia.

Durante el seguimiento de la reacción de generación de complejos lipoproteicos a la temperatura de transición de fase de POPC (**Figura 22**) se observó una disminución de la absorbancia a 340 nm para la suspensión con una relación 80:1. Para la suspensión 40:1 se observa inicialmente una disminución de la absorbancia a las 24hs de ensayo, aumentando a las 48hs. Sin embargo, dichas medidas representan aproximadamente ± 5 % del valor inicial, lo que podría deberse a error experimental, indicando que no se han formado partículas lipoproteicas de interés. Debido a esta situación, solo la suspensión de relación 80:1 se analizó mediante PAGE a las 48hs de iniciado el ensayo.

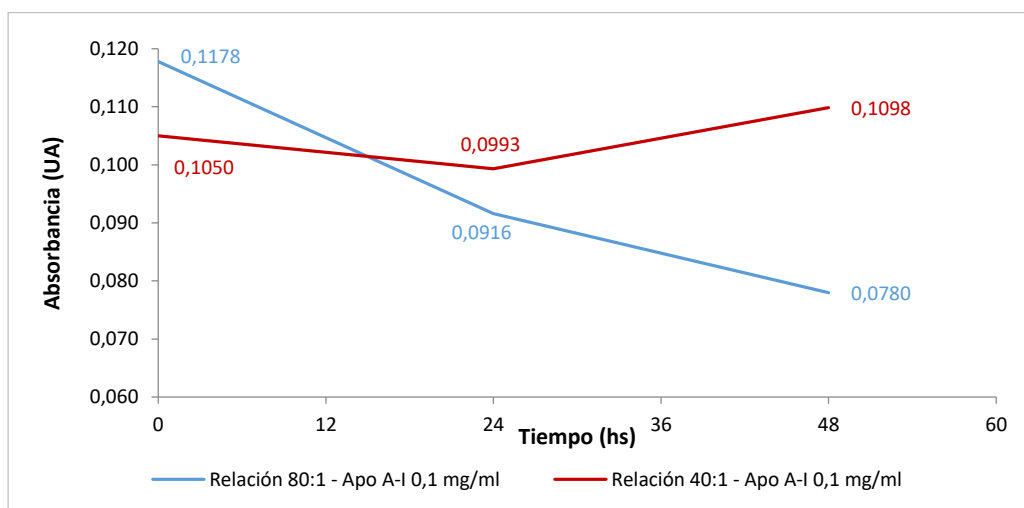


Figura 22 – Seguimiento espectrofotométrico de la reacción de apo A-I con vesículas de POPC a la temperatura de transición del fosfolípido.

Se puede ver que, aunque se obtuvo una disminución de la absorbancia, la misma solo representa un 33,79 % del valor inicial de absorbancia.

Las partículas de rHDL generadas a partir de micelas mixtas con colato son las más utilizadas en los estudios de las HDL sintéticas y se consideran las partículas estándar. Por lo tanto, cualquier partícula generada por un método distinto a estos puede ser comparada con ellas, por ejemplo, en su capacidad de remoción de colesterol celular. Sin embargo, como este proceso depende del tamaño de la partícula aceptora (*Davidson et al, 1995b*), es indispensable que las partículas obtenidas por ambos métodos sean de tamaños similares. La **Figura 23** muestra un gel de poliacrilamida en gradiente en condiciones no desnaturizante en el cual se comparan los tamaños de complejos de apo A-I con POPC obtenidos por el método de diálisis de micelas mixtas con colato (rHDL_{colato}) y por reacción espontánea a la temperatura de transición de fases de la POPC (rHDL_T).

Se observa que las partículas obtenidas a la temperatura de transición de fases no solo tienden a ser menores que las obtenidas a partir de micelas mixtas, sino que las mismas no son homogéneas en cuanto a tamaño. Adicionalmente, la banda de menor peso molecular de la calle B (rHDL_T) podría tratarse de apo A-I libre de lípidos monomérica. La relación molar 80:1 de POPC: Apo A-I utilizada en el ensayo es la esperada para las partículas de rHDL, ya que las mismas contendrían 160 moléculas de POPC y dos moléculas de apo A-I (*Segrest et al, 1999*). La posible presencia de apo A-I libre determinada mediante PAGE concuerda con la reducción de menos del 35 % en la absorbancia.

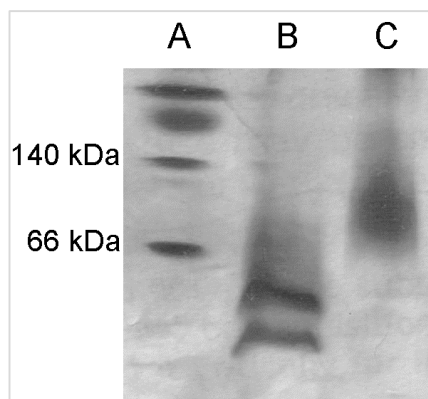


Figura 23 – PAGE en condiciones no desnaturizantes de las rHDL obtenidas por reacción espontánea a la temperatura de transición de fase de POPC y por diálisis de micelas mixtas con colato. **Calle A**, marcador de peso molecular (los pesos se indican a la izquierda). **Calle B**, complejos lipoproteicos obtenidos a la temperatura de transición de POPC. **Calle C**, rHDL generadas por diálisis de micelas mixtas POPC/colato. Se observa claramente la diferencia de tamaño de los complejos obtenidos por las diferentes metodologías.

Debido a estas diferencias en las partículas obtenidas por ambos métodos, las mismas no pueden ser comparadas entre sí en cuanto a su capacidad de remoción de colesterol celular. Por ello, no se continúa trabajando con las rHDL_T.

Otro método de obtención de rHDL descrito (*Fukuda et al, 2008*) consiste en la reacción espontánea de apo A-I con fosfatidilcolina de huevo a pH ácido, entre pH 3,5 y 5. En el presente trabajo se aplicó dicha metodología para la obtención de rHDL por reacción espontánea de apo A-I con POPC, ya que la fosfatidilcolina de yema de huevo tiene aproximadamente un 70% de POPC (*Seelig & Waespe-Sarcevic, 1978*).

En la **Figura 24** se muestran los valores de absorbancia a 340 nm obtenidos durante el proceso de reconstitución a pH ácido para las suspensiones con relaciones POPC:apo AI 100:1 y 40:1. Se puede observar

que, al finalizar el ensayo, la absorbancia final era un 44% respecto a la inicial en el caso de la suspensión 100:1, y del 84% para la suspensión 40:1.

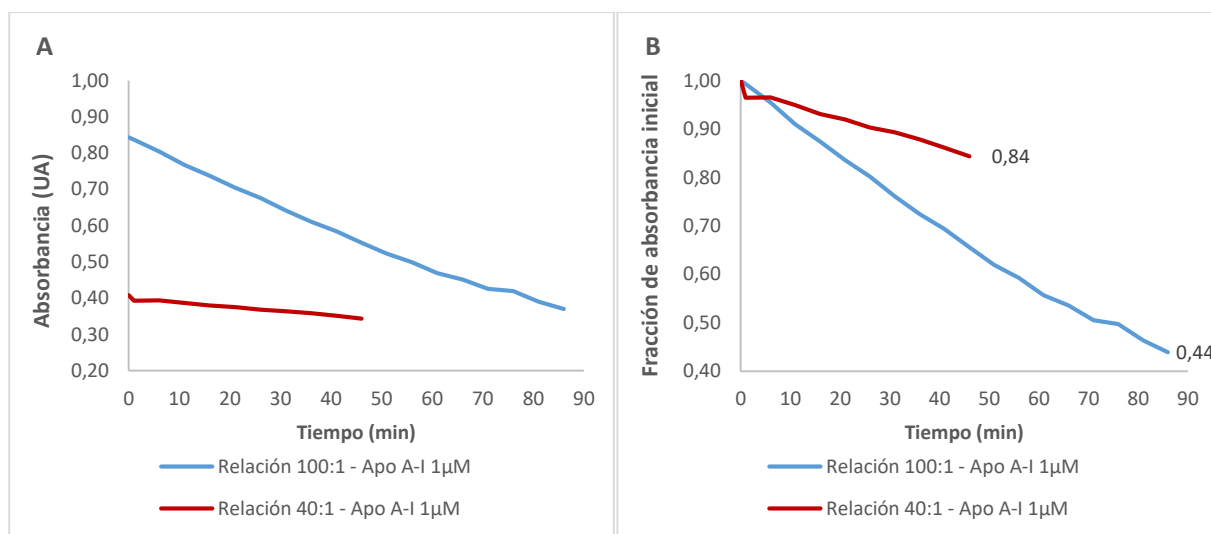


Figura 24 – Seguimiento espectrofotométrico de la reacción de apo A-I con vesículas de POPC en medio ácido. **A**, cambio en la absorbancia a 340 nm a lo largo del tiempo de ensayo. **B**, fracción de la absorbancia inicial a 340 nm a lo largo del tiempo de ensayo.

En la **Figura 25** se muestra un gel de poliacrilamida en gradiente en condiciones no desnaturizante en el cual se comparan los tamaños de complejos de apo A-I con POPC obtenidos por el método de diálisis de micelas mixtas con colato (rHDL_{colato}) y por reacción espontánea a pH ácido (rHDL_{pH}) en suspensiones de relación POPC:apo A-I 100:1. A diferencia de los complejos lipoproteicos rHDL_T, los complejos rHDL_{pH} poseen un tamaño similar a las rHDL_{colato}. Adicionalmente, los complejos obtenidos por ambas metodologías han sido caracterizados como complejos discoidales (Jonas et al, 1989; Fukuda et al, 2008). Es por ello que se compararon las rHDL obtenidas por ambos métodos en cuanto a su capacidad de promover la remoción del colesterol celular.

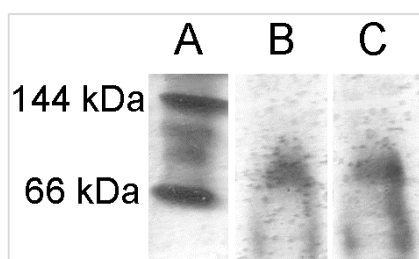


Figura 25 – PAGE en condiciones no desnaturizantes de las rHDL obtenidas por reacción espontánea a pH ácido y por diálisis de micelas mixtas con colato. **Calle A**, marcador de peso molecular (los pesos se indican a la izquierda). **Calle B**, complejos lipoproteicos obtenidos a pH ácido. **Calle C**, rHDL generadas por diálisis de micelas mixtas POPC/colato.

Ensayo de actividad biológica de las rHDL obtenidas

Las células utilizadas en este ensayo son macrófagos murinos RAW 264.7 a los que se cargó previamente con colesterol. Una vez cargados con colesterol se permitió que los diferentes pools celulares de colesterol se equilibraran. Realizado esto se trataron las monocapas con diferentes aceptores extracelulares de colesterol: sin aceptores extracelulares (control negativo), apo A-I libre (control positivo), rHDL_{colato} y rHDL_{pH}.

La determinación del eflujo de colesterol se realizó a partir de medidas de radiactividad del $[^{14}\text{C}]$ -colesterol incorporado por las células junto al colesterol no radiactivo. Para ello fue necesario determinar la radiactividad total del medio de cultivo de las monocapas luego del tratamiento con los diferentes aceptores y de las monocapas mismas. Para las medidas de radiactividad de las monocapas se realizó primero la extracción de los lípidos de las mismas por el método Folch. En la **Figura 26** se muestran los resultados obtenidos de porcentaje de colesterol removido, calculados a partir de las determinaciones de DPM de $[^{14}\text{C}]$ -colesterol.

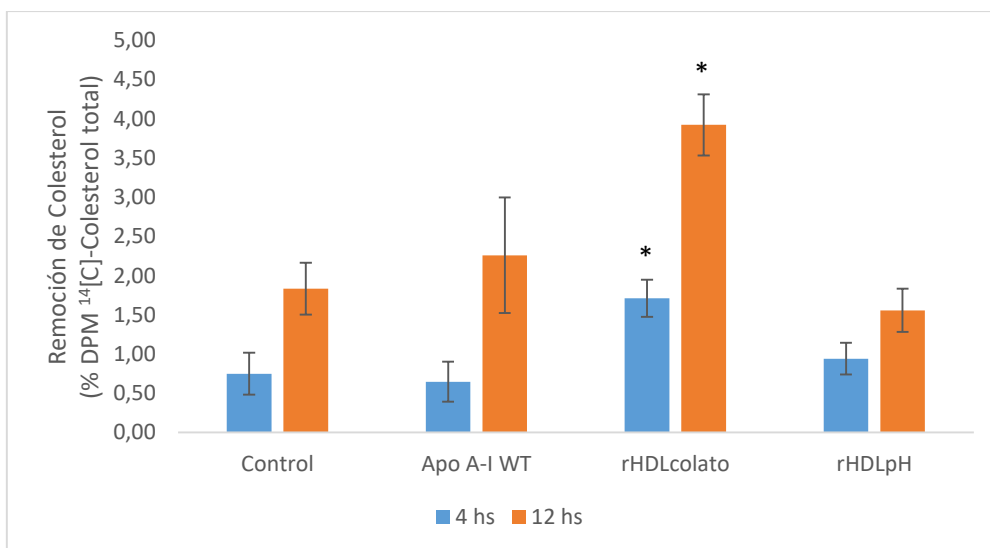


Figura 26 – Porcentaje de colesterol removido para cada tratamiento a ambos tiempos, calculado como porcentaje de las DPM de ^{14}C -Colesterol total. * Indica una diferencia estadísticamente significativa respecto al resto de los tratamientos para el mismo tiempo de incubación ($p < 0,01$).

DISCUSIÓN

Obtención de Apo A-I

Si se obtiene la proteína a partir de plasma humano, luego de cada proceso de purificación se deben secuenciar las proteínas obtenidas a partir de cada muestra para conocer su secuencia específica. Adicionalmente, no siempre se logrará obtener proteínas de igual secuencia que ensayos previos, por lo que la comparación de los resultados se dificulta, ya que mutaciones puntuales pueden generar grandes cambios estructurales y/o funcionales.

La obtención de apo A-I mediante expresión de la proteína recombinante en bacterias permite una gran reducción de los tiempos de obtención de la proteína pura, como así también permite su producción en grandes cantidades con facilidad. Además, esta metodología permite obtener la proteína de secuencia conocida en cada proceso de purificación, como así también obtener mutantes específicos fácilmente mediante técnicas de biología molecular.

La mayoría de las estrategias de producción de proteína recombinante incluyen la expresión de la proteína fusionada a un segmento peptídico de características específicas (His-Tag, S-Tag, etc.) que facilita el proceso de purificación. Muchas veces es necesario eliminar dicho segmento y para ello se utilizan normalmente proteasas que clivan a la proteína de fusión en la región entre el Tag y la proteína propiamente dicha. Aunque las proteasas utilizadas son específicas, su uso presenta ciertas complicaciones, ya sea por la posibilidad de clivaje inespecífico o por la necesidad de gran cantidad de tiempo. Una alternativa a la utilización de proteasas es el clivaje químico. Existen enlaces peptídicos que son especialmente lábiles a ciertos tipos de tratamientos. Uno de estos es el enlace Asp-Pro, el cual es especialmente lábil frente al tratamiento ácido y, adicionalmente, es poco común en las proteínas (*Piszkiwicz et al, 1970; Jauregui-Adell & Marti, 1975; Landon, 1977*). Se ha propuesto que el mecanismo de la reacción de hidrólisis de este enlace ocurre por catálisis intramolecular debida al grupo carboxilo del residuo de Asp.

En el caso de la purificación de apo A-I recombinante se pueden aprovechar estas dos características del enlace Asp-Pro. Apo A-I WT no posee en su secuencia este enlace, pero es posible introducirlo mediante mutación. Mediante una mutación puntual en el cDNA de apo A-I se genera un cambio del segundo aminoácido de apo A-I madura, de Glu por Asp (**Figura 13**). Este cambio en la secuencia aminoacídica genera un enlace Asp-Pro entre los aminoácidos 2 y 3, el cual puede ser clivado fácilmente en medio ácido para eliminar el His-Tag utilizado en la purificación de la proteína recombinante. El resultado final es una apo A-I que carece de los dos primeros aminoácidos respecto de la WT. La falta de estos dos aminoácidos no genera cambios estructurales o funcionales apreciables respecto de la apo A-I WT (*Prieto et al, 2012*).

En la construcción que hemos utilizado el clivaje del His-Tag se realiza mediante el tratamiento con ácido fórmico, un reactivo más económico que las proteasas. Además, las condiciones de reacción son tales que se evita la proteólisis inespecífica y la reacción se realiza completamente en un tiempo menor. Mediante el uso de esta construcción y columnas cromatográficas de afinidad con iones metálicos inmovilizados (Ni^{+2}) se obtiene la proteína recombinante pura de manera relativamente sencilla (**Figura 21**).

Obtención de las rHDL

Generación in vivo

Se considera actualmente que la gran mayoría de las nHDL se generan in vivo mediante la acción del transportador ABCA1 en el hígado y el intestino (*Vedhachalam et al, 2007b*). Se ha determinado que ABCA1 genera dos sitios de unión de apo A-I a las membranas plasmáticas (*Vedhachalam et al, 2007a*). Uno de ellos es un sitio de baja capacidad, generado por la interacción directa entre apo A-I y ABCA1. El otro es un sitio de alta capacidad, generado por la actividad de ABCA1, que implica la interacción de apo A-I con los fosfolípidos. Básicamente, el mecanismo de generación de nHDL por la acción de ABCA1 actualmente más aceptado (*Vedhachalam et al, 2007b*) consiste de tres etapas (**Figura 27**):

Etapas 1. Apo A-I interacciona con ABCA1 en la superficie celular, aparentemente en una región hidrofóbica del bucle extracelular mayor del transportador, cuando el mismo se encuentra en su conformación activa oligomérica. Este sitio de unión de baja capacidad también presenta baja especificidad por apo A-I, ya que el motivo de unión son las hélices anfipáticas y no alguna secuencia específica de apo A-I. Una importante consecuencia de la interacción apo A-I/ABCA1 es la estabilización del transportador en la superficie celular. El transportador tiene una vida media de aproximadamente 1 hora, y la unión de apo A-I lo protege de la degradación, prolongando su vida media (*Attie, 2007*). Al aumentar la vida media del transportador en la superficie celular, aumenta la actividad traslocasa en la misma. Este aumento de la actividad traslocasa induce una acumulación de fosfolípidos en la hemicapa externa de la membrana plasmática a expensas de una depleción de la hemicapa interna. La distribución asimétrica de fosfolípidos en ambas hemicapas produce una compresión en el empaquetamiento de los fosfolípidos en la externa y una expansión en la interna, lo que conduce a tensiones en la membrana.

Etapas 2. Estas tensiones generadas por la actividad de ABCA1 son aliviadas mediante la curvatura de la membrana hacia el espacio extracelular. La inducción en la formación de dominios exovesiculados conlleva un desorden en el empaquetamiento de los fosfolípidos, creándose espacios entre las cabezas polares de los mismos (**Figura 28**), en los cuales pueden penetrar las hélices anfipáticas de apo A-I. Estos sitios generados por la acción de ABCA1 son de alta capacidad y alta afinidad. La afinidad de apo A-I por estos sitios de

unión depende del radio de curvatura: a menor radio de curvatura, mayor tamaño de los defectos generados, con la consiguiente mayor capacidad de penetración de las hélices de apo A-I y, por ello, mayor afinidad. La unión de apo A-I a estos sitios de alta afinidad en los dominios exovesiculados genera condiciones favorables para formación de los complejos discoidales de nHDL.

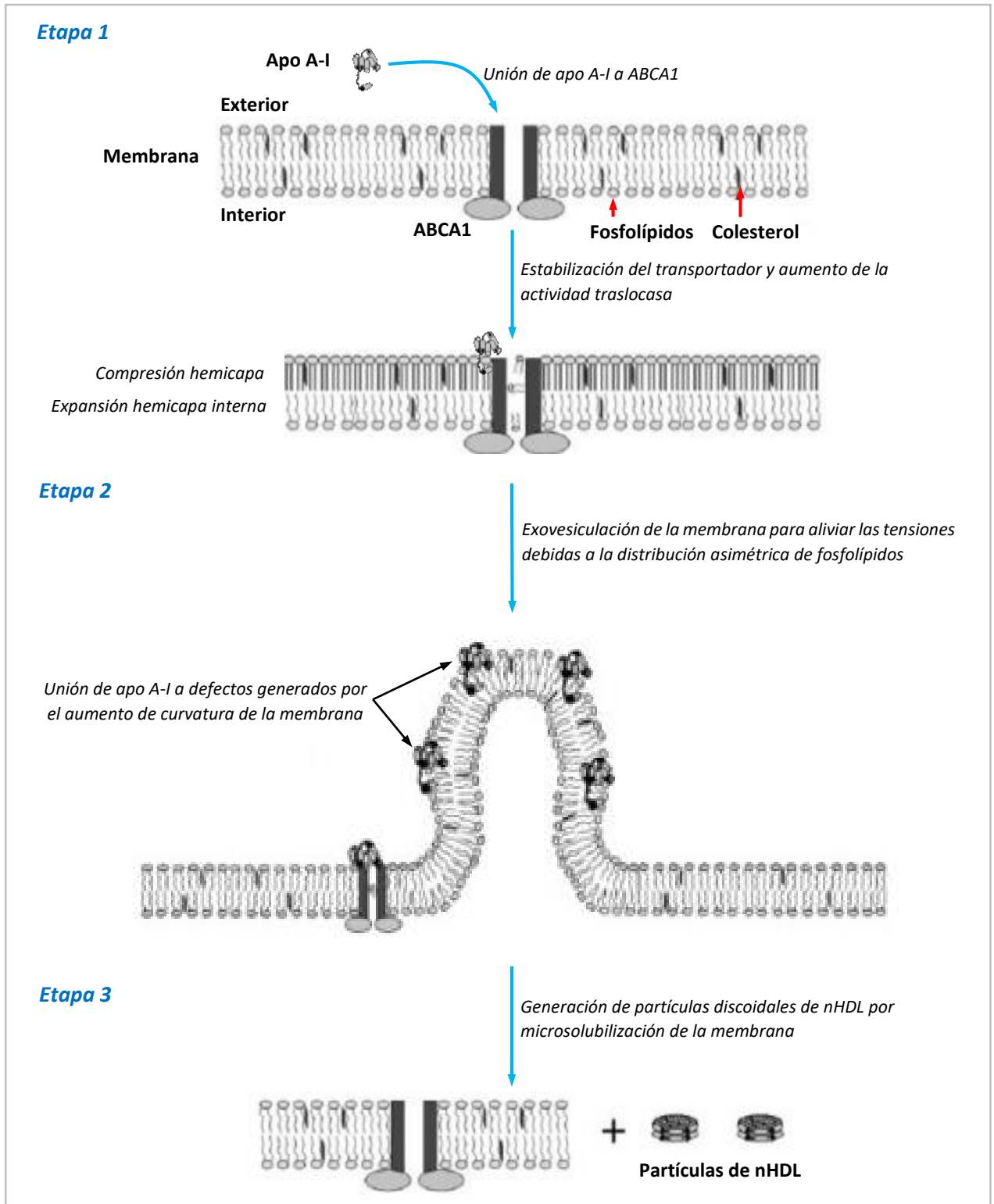


Figura 27 – Mecanismo de generación de nHDL in vivo por acción de ABCA1.

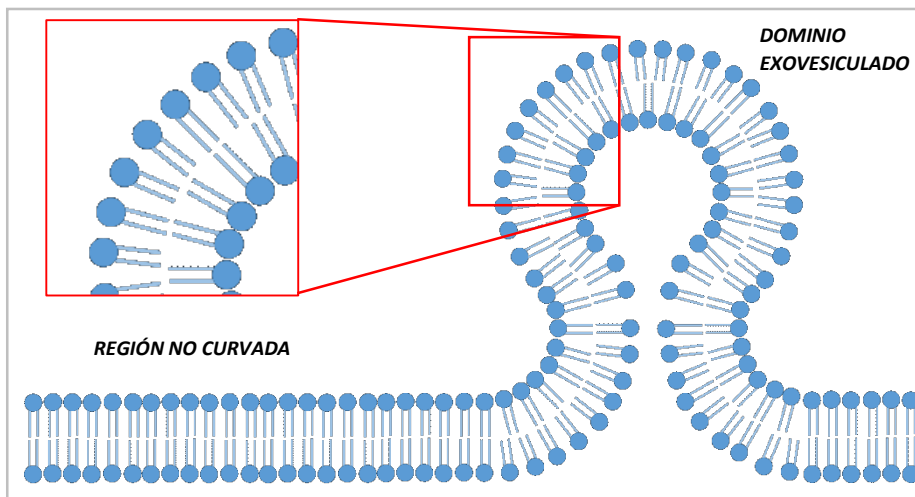


Figura 28 – Defectos de membrana generados por curvatura de la bicapa. Se observa un mayor espaciamento de las moléculas de fosfolípido en las regiones exovesiculadas con respecto a las zonas no curvadas.

Etapa 3. La tercera etapa conlleva la solubilización espontánea de los fosfolípidos de la hemicapa externa de los dominios exovesiculados, proceso denominado *microsolubilización de membrana*. Este proceso implica la inserción de las hélices de apo A-I, seguida de un reordenamiento de las moléculas que conduce a la destabilización de la membrana y formación de los complejos discoidales nHDL. Se ha postulado que en la inserción de las hélices anfipáticas de apo A-I en los defectos de membrana interviene un ramillete intermolecular formado por las hélices 3 y 4 de dos moléculas de apo A-I (Prieto & Garda, 2011) (**Figura 29**).

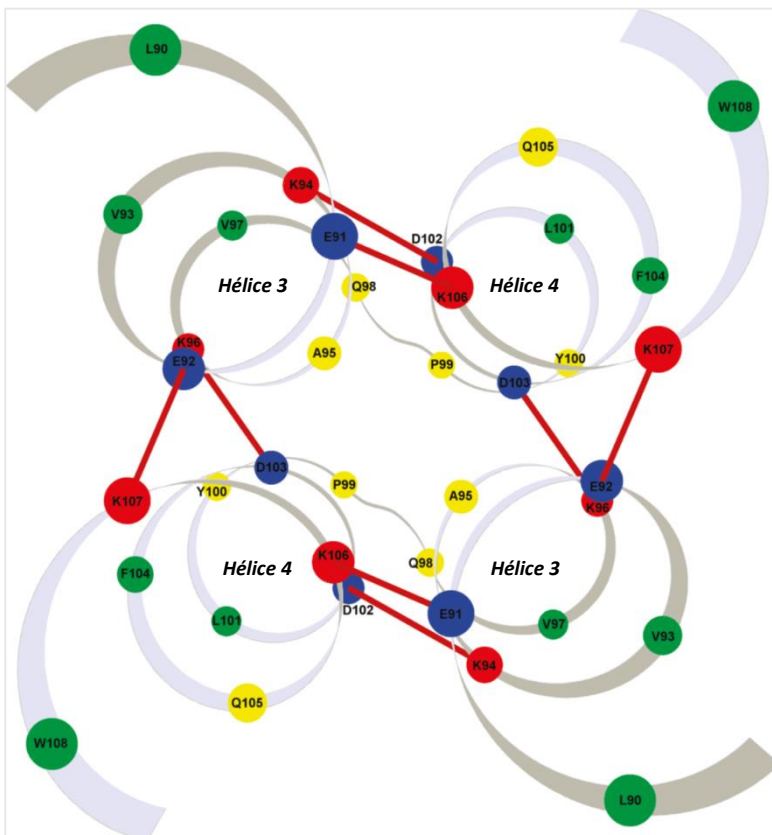


Figura 29 – Modelo esquemático del ramillete helicoidal intermolecular que interviene en la inserción de los dímeros de apo A-I en los defectos de membrana. En dicho ramillete intervienen las hélices 3 y 4 de dos moléculas de apo A-I. las hélices del ramillete se insertan perpendiculares al plano de la membrana. La posición de los carbonos α se muestra como círculos coloreados: rojos los pertenecientes a residuos cargados positivamente, azules los cargados negativamente, amarillos los neutros y verdes los hidrofóbicos. Las líneas rojas indican posibles puentes salinos. De Prieto & Garda, 2011.

Diálisis de micelas mixtas

Este método (*Matz & Jonas, 1982; Jonas et al, 1989*) se ha utilizado como el método estándar de obtención de rHDL para estudios. Resumidamente, en él se adiciona colato de sodio (sal biliar) a una suspensión de vesículas de fosfolípidos, obteniéndose micelas mixtas de fosfolípido/colato. A la suspensión de dichas micelas se le agrega apo A-I y luego se dializa el sistema a fin de eliminar el detergente. Una vez eliminado el detergente se obtienen los complejos discoidales de rHDL.

Debido a la similitud del estado inicial del sistema (micelas mixtas de fosfolípido/sales biliares) y al proceso al que se lo somete (eliminación gradual de las sales biliares) se puede considerar que el proceso de reconstitución de vesículas de fosfolípidos a partir de micelas mixtas de fosfolípidos/sales biliares es útil para entender un posible mecanismo de generación de las rHDL por diálisis de las micelas mixtas.

A partir de trabajos en relación a la estructura de las micelas mixtas de fosfolípidos/sales biliares y el proceso de reconstitución de vesículas de fosfolípidos a partir de ellas (*Almog et al, 1986; Leng et al, 2003; Lichtenberg et al, 1983; Long et al, 1994; Mazer et al, 1980; Mueller, 1981; Schurtenberger et al, 1985; Shankland, 1970; Walter et al, 1991*) se puede proponer un mecanismo para este método de obtención de las rHDL. Para obtener las micelas mixtas se parte de una suspensión de vesículas de fosfolípidos a la cual se le adiciona una sal biliar, en nuestro caso colato de sodio. Cuando la cantidad de colato es baja, las moléculas del mismo interaccionan con las vesículas y se generan vesículas de fosfolípido que contienen colato. A medida que la cantidad de colato aumenta se producen cambios significativos en el sistema. A una determinada relación fosfolípido/colato [menor a 2 para PC de yema de huevo (*Matz & Jonas, 1982*)], el detergente disrumpe las vesículas, obteniéndose micelas mixtas de fosfolípido/colato. El proceso de distribución del colato entre el medio y las bicapas lipídicas es rápido, al igual que la disrupción de las vesículas y formación de las micelas mixtas (*Almog et al, 1986*).

En un principio, se consideraba que la estructura de las micelas mixtas obtenidas se asemejaba a discos de bicapa lipídica, con las moléculas de sal biliar ocupando los bordes de dichos discos [relación PC/colato entre 0,5 y 2 para PC de yema de huevo (*Matz & Jonas, 1982*)], con sus caras apolares en contacto con las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos y sus caras polares en contacto con el medio acuoso. Posteriormente se determinó que la estructura de las micelas mixtas finalmente obtenidas no era la antes mencionada, sino que pueden adoptar estructuras similares a cilindros flexibles, estructuras elipsoidales o esféricas. Sin embargo, si se elimina gradualmente el detergente, en el camino a su conversión a vesículas, las micelas adoptan estructuras intermedias discoidales similares a las descritas en un principio. La diferencia estructural entre estas micelas y el modelo de micela mixta previo se encuentra en la región ocupada por el detergente. En un principio se consideraba que las caras apolares de las moléculas del detergente interaccionaban directamente con las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, formando lo que podría asemejarse a “paredes” que ocupaban la periferia del disco. En el nuevo modelo estructural, las moléculas de detergente forman una estructura de anillo semi-toroidal altamente curvado alrededor

del disco de bicapa lipídica (**Figura 30**). El intercambio de las moléculas de sal biliar entre el anillo que circunda el disco y la solución acuosa es muy rápido (*Leng et al, 2003*).

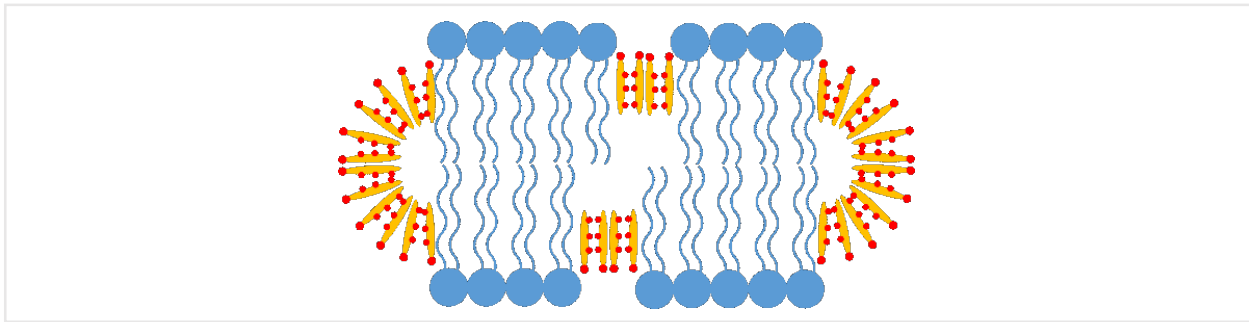


Figura 30 – Estructuras de micelas mixtas fosfolípido/sal biliar. En azul las moléculas de fosfolípido. En naranja y rojo las moléculas de colato (naranja anillo esteroideo, rojo grupos polares).

Al continuar eliminándose el detergente del sistema, los discos comienzan a fusionarse, evitando así que las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos entren en contacto con la solución acuosa circundante. A medida que el tamaño de los discos fusionados aumenta, éstos comienzan a curvarse. Esto ocurrirá hasta alcanzar un punto en el cual, por el tamaño de los discos alcanzados, sumado a su curvatura, los bordes libres de un mismo disco se fusionan y se vuelven a formar las vesículas. El proceso de formación de las micelas discoidales es mucho más rápido que el proceso de fusión de las mismas y la reconstitución de las vesículas (*Leng et al, 2003*), por lo que mientras transcurre la eliminación del detergente existen en suspensión grandes cantidades de estas estructuras intermedias.

La fuerza impulsora de todo este proceso es el exceso de energía que se generaría en el sistema si las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos entraran en contacto con la solución acuosa circundante al ser eliminadas las moléculas de sal biliar de los bordes de los discos.

En presencia de apo A-I en el medio, puede considerarse que, al existir un intercambio alto de moléculas de detergente entre la solución acuosa y el anillo y, debido a la afinidad de las hélices anfipáticas de apo A-I por las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, la proteína puede ir reemplazando gradualmente al detergente en la periferia del disco. Este reemplazo del colato por la proteína se ve favorecido al ir disminuyendo la cantidad de detergente en solución, hecho que se logra, por ejemplo, mediante la diálisis del sistema. Por lo tanto, si la eliminación del detergente se realiza en presencia de apo A-I en el medio, los lugares que ocupaban las moléculas de colato en la periferia de los discos pasan a ser ocupados por las hélices de la proteína. Debido a que de esta forma no se exponen las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos al medio acuoso, sino que se ponen en contacto con la cara apolar de las hélices anfipáticas de apo A-I, no se genera un exceso de energía en el sistema, por lo que las moléculas de colato se reemplazan completamente de la periferia de los discos por apo A-I antes que se puedan comenzar a reconstituir las vesículas. Una vez que las moléculas de apo A-I ocuparon todas las posiciones antes ocupadas por moléculas de colato quedan formados discos de bicapa fosfolipídica con moléculas de apo A-I ocupando el borde. Estos complejos lipoproteicos son las rHDL.

Reacción espontánea a la temperatura de transición de fases

Dependiendo de sus características estructurales, sus interacciones intermoleculares y de las condiciones del sistema, como por ejemplo, temperatura, presión, nivel de hidratación de los fosfolípidos y composición de la solución acuosa (pH, tipo y concentración de solutos, etc.), las moléculas de fosfolípidos adoptan conformaciones con una dinámica intramolecular específica (configuraciones de los enlaces C-C, capacidad de rotación de los mismos, etc.), como así también forman agregados intermoleculares con estructuras, configuraciones y dinámicas intermoleculares (capacidad de rotación y traslación molecular, etc.) características. Cada uno de estos conjuntos de configuraciones intra e intermoleculares con estructuras y dinámicas características se denominan fases.

Para comprender el proceso de reacción espontánea de apo A-I con fosfolípidos a la temperatura de transición de fase de los mismos, son de interés las características de las suspensiones de fosfolípidos en un medio acuoso en diferentes fases y la transición entre las mismas (Cevc, 1991; Ichimori et al, 1999; Kanehisa & Tsong, 1978; Koynova & Caffrey, 1998; Leekumjorn & Sum, 2007; Marsh, 1991; Róg et al, 2004; Wang et al, 1995). Variaciones en las condiciones que permiten la existencia de una fase pueden producir una transición hacia otra, existiendo condiciones específicas en las que pueden coexistir fases. Para un sistema de dos componentes (suspensión de fosfolípidos en medio acuoso) a presión constante, dos fases pueden coexistir a una cierta temperatura (para una determinada composición del sistema). Para el proceso de obtención de rHDL que se analiza se utiliza un sistema con una composición específica a presión constante, por lo que la transición de una fase a otra se produce por modificaciones en la temperatura. De todas las posibles fases que pueden adoptar estos sistemas, las relevantes para la reacción espontánea de apo A-I a la temperatura de transición de fases (T_m) son las fases gel y líquido-cristalina, como así también la transición entre ambas (Figura 31). A continuación, se analizan las características de estas fases como así también las características del proceso de transición entre ambas.

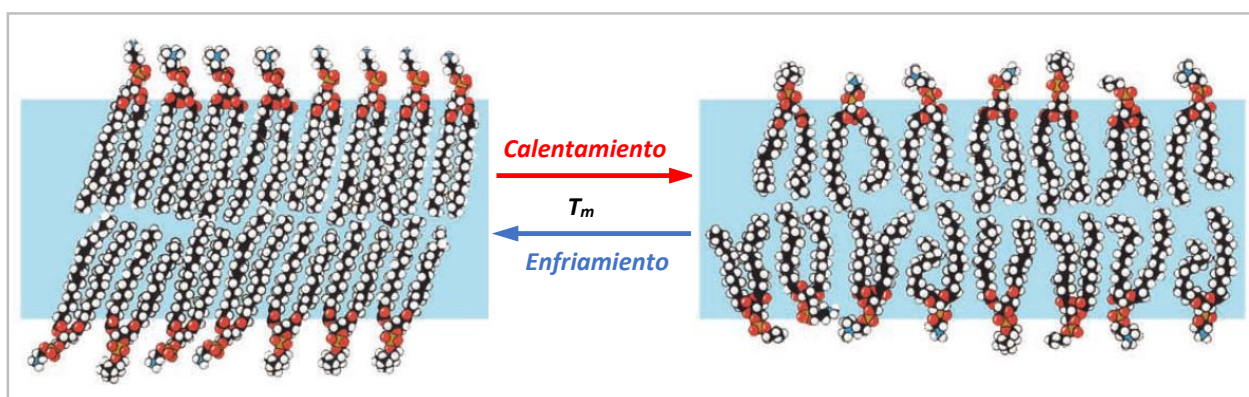


Figura 31 – Esquemas de las estructuras de las moléculas de fosfolípidos de bicapas lipídicas en fase gel (izquierda) y líquido-cristalina (derecha). Se aprecia un mayor espesor de bicapa en la fase gel. En la fase líquido-cristalina, las cadenas hidrocarbonadas presentan un menor orden, lo que produce un aumento del área ocupada por cada fosfolípido en la superficie de la bicapa.

Como una primera aproximación al análisis de estas fases y su transición se considerarán moléculas de fosfolípidos en las cuales ambas cadenas hidrocarbonadas son saturadas. En el estado gel, las cadenas

hidrocarbonadas de las moléculas de fosfolípidos se encuentran completamente extendidas (todos los enlaces C-C en conformación *trans*, **Figura 32**), paralelas entre sí y alineadas perpendicularmente (o levemente desviadas) al plano de la bicapa. De esta forma, las moléculas de fosfolípido adyacentes se encuentran densamente empaquetadas, y las interacciones de Van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas de las mismas son máximas. El ordenamiento lateral de las moléculas de fosfolípido en cada hemicapa es hexagonal. Debido a la conformación de las cadenas hidrocarbonadas, a la orientación respecto del plano de la bicapa y al ordenamiento de las moléculas entre sí, en el estado gel las moléculas de fosfolípidos poseen un área de sección transversal pequeña y el máximo espesor de bicapa posible. En este estado, el movimiento tanto intra como intermolecular se encuentra restringido. Los esqueletos de glicerol de cada fosfolípido se encuentran alineados (*Davis & Keough, 1985*).

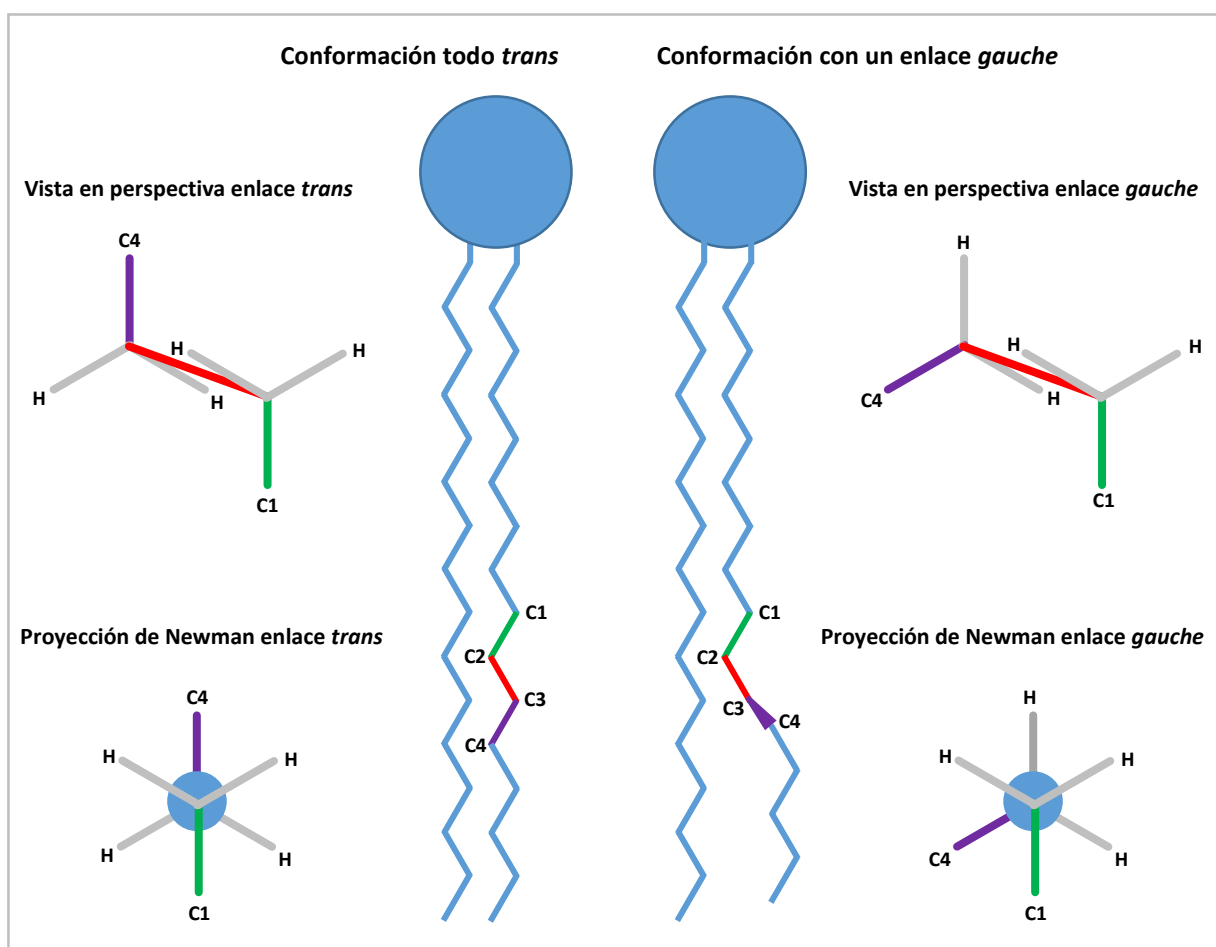


Figura 32 – Esquemas de rotámeros *trans*/*gauche* de las cadenas alquílicas de fosfolípidos. Se muestran los rotámeros *trans* (a la izquierda) y *gauche* (a la derecha) de un enlace C-C individual cualquiera (enlace entre los denominados C2 y C3, en rojo). Se indican el enlace anterior (enlace C1-C2, en verde) y posterior (enlace C3-C4, en violeta) a fin de visualizar mejor la configuración de la cadena. A la izquierda se muestra un fosfolípido con todos sus enlaces C-C en configuración *trans*, con la correspondiente vista en perspectiva del enlace tomado como ejemplo y la proyección de Newman de dicho enlace. A la derecha se muestra un fosfolípido en el cual el enlace de ejemplo presenta configuración *gauche*, con las correspondientes vista en perspectiva y proyección de Newman. Puede verse que en la conformación *trans*, la distancia entre los C1 y C4 es máxima y la totalidad de los enlaces C-C otorga al eje longitudinal de la molécula el mayor largo posible. En la conformación *gauche*, la distancia entre C1 y C4 es menor que en la otra conformación, y este enlace produce una “deformación” en el esqueleto de la cadena, que produce una disminución del largo del eje longitudinal molecular y un ensanchamiento del área de sección transversal ocupada por la cadena, que inducirá un aumento en el área de sección transversal de toda la molécula. A medida que aumenta el número de enlaces en conformación *gauche* en las cadenas, aumentan estos efectos.

En el estado líquido-cristalino el movimiento intra e intermolecular (tanto rotacional como traslacional) es mayor que en el estado gel. El movimiento molecular de las cadenas alquílicas es mínimo para el carbono carbonílico y aumenta progresivamente hacia el metilo terminal en el centro de la bicapa lipídica. Este aumento en la movilidad se debe a que los enlaces C-C no solo pueden adoptar la conformación *trans* sino que también pueden rotar y adoptar conformaciones *gauche*. Debido a este aumento en la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas en el estado líquido-cristalino aumenta el área de la sección transversal de las moléculas de fosfolípidos con respecto a la fase gel (**Tabla 6**).

Tabla 6. Áreas de sección transversal de DMPC y POPC en fases gel y líquido-cristalina(*)				
Lípido	Temperatura	Fase	Sección Transversal	Referencia
DMPC	30°C (T _m + 6°C)	Líquido-cristalina	60,0 Å ²	<i>Petrache et al, 2000</i>
			59,9 ± 1,2 Å ²	<i>Kučerka et al, 2011</i>
DMPC	10°C (T _m - 14°C)	Gel	47,2 ± 0,5 Å ²	<i>Tristram-Nagle et al, 2002</i>
POPC	4°C (T _m + 6°C)	Líquido-cristalina	60,3 Å ²	A partir de <i>Leekumjorn & Sum, 2007</i>
			60,5 Å ²	A partir de <i>Kučerka et al, 2011</i>
POPC	-16°C (T _m - 14°C)	Gel	58,7 Å ²	A partir de <i>Leekumjorn & Sum, 2007</i>

(*) Aunque se muestran los valores de área a distintas temperaturas para ambos lípidos, las mismas corresponden a iguales temperaturas relativas respecto a la T_m de cada uno (indicada entre paréntesis), a fin de poder comparar este parámetro correctamente. La T_m de POPC es de -2 °C aproximadamente y la de DMPC es de 24°C aproximadamente.

Adicionalmente al aumento en el área de la sección transversal de cada molécula de fosfolípido, el aumento de la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas hace que el espesor de la bicapa disminuya, ya que las cadenas dejan de encontrarse en su conformación más extendida (todo *trans*) para adoptar conformaciones (tanto enlaces C-C *trans* como *gauche*) que producen desviaciones respecto del eje de la conformación todo *trans*, disminuyendo la longitud de su eje mayor, lo que se traduce en una menor longitud efectiva de la molécula de fosfolípido y por consiguiente menor espesor de bicapa. Debido a sus diferencias estructurales (espesor de bicapa y área ocupada por cada fosfolípido), la generación de dominios en fase líquido-cristalina al alcanzar la T_m en una bicapa que se encontraba completamente en fase gel, produce una reorganización de las moléculas que permanecen en dicha fase, dando origen a pequeños defectos en el empaquetamiento (**Figura 33**), principalmente en las regiones en donde se encuentran en contacto los lípidos en ambas fases. Debido a la fluctuación de fases, el dominio líquido-cristalino tiene una alta probabilidad de volver a la fase gel. Gracias a la reorganización de las moléculas antes mencionada, y a la reducción en el área ocupada por los fosfolípidos que retornan a la fase gel, se generan defectos de empaquetamiento de la bicapa de gran tamaño (*Swaney, 1980*).

Como se indicó, por debajo de la temperatura de transición de fases se considera que todas las cadenas hidrocarbonadas se encuentran en la conformación de mínima energía todo-*trans*. Si cada molécula de fosfolípido se encontrara aislada de las restantes, sin que existieran interacciones

intermoleculares, a medida que aumentara la temperatura cada una de las cadenas podría ir modificando gradualmente sus conformaciones rotaméricas. Sin embargo, las moléculas de fosfolípidos que se encuentran empaquetadas en bicapas no pueden modificar sus conformaciones rotaméricas gradualmente, debido a que una rotación de un enlace C-C produciría un desplazamiento espacial del resto de la cadena, siendo más notorio el desplazamiento a la altura del metilo terminal, el cual colisionaría con las cadenas vecinas que se encuentran a muy poca distancia en la bicapa. Es por ello que la rotación de una cadena hidrocarbonada en una bicapa es en realidad un proceso cooperativo y no independiente, involucrando a más de una molécula de fosfolípido simultáneamente.

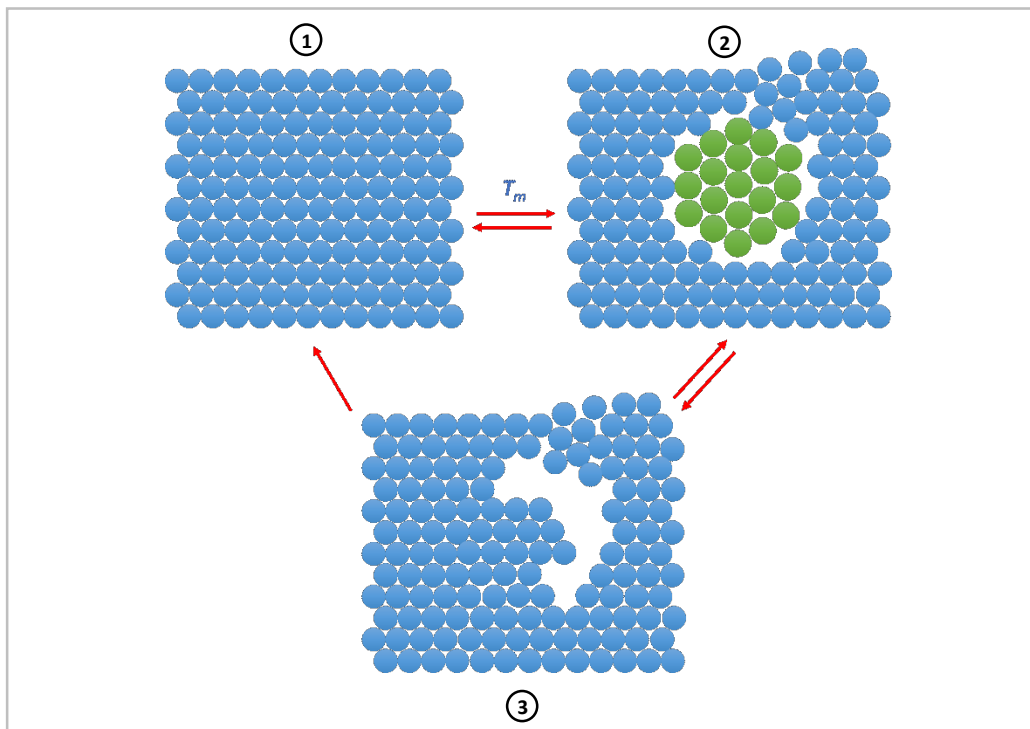


Figura 33 – Esquema (vista superior) de las estructuras de las bicapas lipídicas en fase gel (1) y de la coexistencia de fases al alcanzar la T_m (2). Se muestra una unidad cooperativa (ver texto) de fosfolípidos que pasaron de la fase gel (círculos azules) a la líquido-cristalina (círculos verdes). Debido a las diferencias estructurales de los fosfolípidos en ambas fases, se producen pequeños defectos en el empaquetamiento. El dominio líquido-cristalino puede regresar espontáneamente a la fase gel (3) debido a la fluctuación de fases. Esto genera defectos de empaquetamiento de gran tamaño, que perduran un cierto tiempo y luego se cierran, regenerándose la bicapa en fase gel intacta.

El cambio de entalpía (ΔH) de la transición es una medida de la cooperatividad del proceso de transición de fase: a mayor ΔH mayor es la cooperatividad de la transición. La cooperatividad es una medida de la cantidad de moléculas de fosfolípido que sufren la transición simultáneamente, lo que se conoce como unidad cooperativa. A mayor número de fosfolípidos que cambian de fase en un instante dado, mayor es la unidad cooperativa y, por tanto, mayor es la cooperatividad del proceso. Cuanto mayor es la cooperatividad de la transición, mayor es la cantidad de moléculas que cambian de fase, por lo que mayor es la cantidad y/o tamaño de los defectos que se generan.

Se considera que en los defectos de gran tamaño generados (Swaney, 1980) se inserta el ramillete intermolecular del dímero de apo A-I, dándose las condiciones necesarias para la formación de las partículas

de rHDL por microsolubilización de las bicapas. Sin embargo, en el presente trabajo no fue posible obtener por este método partículas de rHDL de tamaños comparables a las obtenidas a partir de micelas mixtas de POPC/colato. En la calle B del gel (*Figura 23*) se observan dos tipos de estructuras: la inferior, de menor peso molecular, podría tratarse de apo A-I libre y la superior, de mayor peso, de apo A-I pobremente lipídada formada por el proceso de reconstitución a la temperatura de transición de POPC.

Se ha observado que el estudio de la transición de fases de bicapas lipídicas con respecto a la temperatura presenta histéresis, es decir, depende si el proceso se hace por aumento o por descenso de la temperatura, iniciando con las bicapas en fase gel o líquido-cristalina, respectivamente. Adicionalmente las transiciones por calentamiento y enfriamiento poseen diferentes características. Por ejemplo, para el caso de POPC (92% POPC, 8% OPPC) se han determinado por calorimetría de escaneo diferencial (*Differential Scanning Calorimetry, DSC*) los valores de T_m por enfriamiento y calentamiento, siendo los mismos $-2,6 \pm 0,4$ °C y $-0,8 \pm 0,5$ °C (*Davis et al, 1981*). La amplitud del pico del termograma a la mitad del mismo ($\Delta T_{1/2}$) es mayor para el proceso de enfriamiento ($2,6 \pm 0,4$ °C) que para el de calentamiento ($2,4 \pm 0,3$ °C) (*Davis et al, 1981*). La $\Delta T_{1/2}$ se relaciona inversamente con el ΔH del proceso: al aumentar la $\Delta T_{1/2}$ disminuye ΔH . Para el ejemplo anterior, se obtienen valores de ΔH de $5,1 \pm 0,1$ Kcal/mol por enfriamiento y $5,4 \pm 0,3$ Kcal/mol por calentamiento, lo que indicaría una menor cooperatividad del proceso de transición realizado por enfriamiento (*Davis et al, 1981*).

En el caso de POPC pura, la $\Delta T_{1/2}$ tiene un valor de 6°C y un ΔH de $5,8 \pm 1,0$ Kcal/mol (*Koynova & Caffrey, 1998*). En el caso de DMPC, se han informado valores de ΔH de entre 5,4 Kcal/mol (*Kanehisa & Tsong, 1978*) y $6,0 \pm 2,4$ Kcal/mol (*Koynova & Caffrey, 1998*). Los valores de T_m y ΔH para la transición de la fosfatidilcolina saturada con cadenas hidrocarbonadas de igual número que la POPC (16 en la posición 1 y 18 en la posición 2) son de $49,0 \pm 0,3$ °C y $9,2 \pm 0,1$ Kcal/mol (*Koynova & Caffrey, 1998*). Debido a que a medida que aumenta el ΔH de la transición aumenta la cooperatividad del proceso, puede verse que la presencia del doble enlace en la molécula de POPC hace que el proceso de transición sea menos cooperativo. Esto puede deberse a que el doble enlace genera un quiebre en el eje de la cadena hidrocarbonada derivada del ácido oleico en la fase gel, con la consiguiente formación de “huecos” dentro de la bicapa, lo que permitiría cierta movilidad de las cadenas a medida que aumenta la temperatura (*Surovtsev et al, 2012*).

Una posible explicación para no haber obtenido los complejos de rHDL esperados con POPC a la temperatura de transición es la histéresis de la misma, como así también a las características desfavorables de realizar dicho proceso por enfriamiento (disminución de T_m , disminución de ΔH y aumento de $\Delta T_{1/2}$). Se ha descrito que apo A-I puede unirse a membranas que se encuentran en fase líquido-cristalina, pero la solubilización efectiva de la membrana ocurre solamente cuando la membrana está compuesta por pequeños dominios fluidos dentro de una fase gel continua, situación en la cual los defectos de empaquetamiento son máximos (*Sanchez et al, 2010*). Según se ha propuesto, los defectos en los que se

inserta apo A-I se producen debido a la reorganización de las moléculas en fase gel por la expansión lateral de las moléculas de la unidad cooperativa que pasan a la fase líquido-cristalina y la posterior disminución de su área al regresar a la fase inicial. Estos defectos perduran un cierto tiempo debido a la menor movilidad de las moléculas en fase gel. En cambio, si se inicia el proceso con la bicapa en fase líquido-cristalina, la reducción del área ocupada por los fosfolípidos de la unidad cooperativa que pasan a la fase gel, posiblemente genera defectos pequeños o de menores dimensiones, con una vida media menor que en el caso anterior, debido a la mayor movilidad de las moléculas en fase líquido-cristalina, que ocuparían rápidamente los huecos. Adicionalmente, el área de sección transversal y el espesor de bicapa de membranas de POPC y otros fosfolípidos insaturados son menos sensibles a los cambios de fase que en fosfolípidos saturados como DMPC, debido al menor empaquetamiento que genera la presencia de la insaturación (*Leekumjorn & Sum, 2007*). Por lo tanto, el cambio en estos dos parámetros con la transición de fases es menor en POPC que en DMPC (*Tabla 6*, no se indican espesores de bicapa). Al ser menor el cambio, se espera que sean menores los defectos generados por la coexistencia de fases. Como se indicó previamente, la presencia del doble enlace en POPC hace que sus membranas presenten un menor empaquetamiento, con la formación de “huecos” internos que reducen la cooperatividad de su transición, situación que contribuiría también a la reducción de los defectos de empaquetamiento por coexistencia de fases.

También debe tenerse en cuenta que la transición de las bicapas lipídicas es afectada por las proteínas con las que interacciona. Dependiendo de la proteína y del tipo de interacción con la bicapa, la misma puede afectar la temperatura de transición, la entalpía del proceso, o ambos parámetros (*Papahadjopoulos et al, 1975*). En el caso de vesículas multilamelares de DPPC, la presencia de apo A-I produce un ensanchamiento y disminución de la amplitud de la transición, como así también aumento de la T_m , siendo más notorios los efectos en membranas con colesterol (*Matz & Jonas, 1982*). Como se indicó, la entalpía de la transición se encuentra relacionada con la cooperatividad de la misma y, por consiguiente, con el tamaño de la unidad cooperativa. La reducción de la entalpía de transición implica la reducción de dicha unidad. Si la unidad no es del tamaño suficiente como para generar defectos de membrana lo suficientemente grandes como para permitir la inserción del ramillete intermolecular de apo A-I no se formarán los complejos discoidales de rHDL, aunque no se excluye la posible formación de complejos de apo-AI pobremente lipidada.

Por todo lo anterior, sería necesario estudiar con un poco más de detalle la transición de la bicapa en el sistema completo (vesículas de POPC en presencia de apo A-I), tanto por enfriamiento como por calentamiento, a fin de determinar las mejores condiciones de reacción. Los complejos podrían ser obtenidos mediante el enfriamiento del sistema por debajo de la temperatura de transición, logrando una bicapa homogénea en fase gel, para luego calentar el sistema hasta la misma. Se debe considerar que la composición del sistema sea tal que no se congele.

Reacción espontánea a bajo pH

Una disminución del pH produce un aumento de la T_m de las fosfatidilcolinas, pudiendo conducir a una transición de fase isotérmica en una fracción de segundos (Cevc, 1987). Esto ocurre a un valor de pH de aproximadamente 2 en bicapas de PC. Se podría asumir que valores de pH mayores a 3 no producen cambios en el estado de ionización de las cabezas polares de las bicapas de PC, ya que el oxígeno del grupo fosfato presenta un pK de alrededor de 1 – 2 (Koynova & Caffrey, 1998). Debido a esto, se ha propuesto que las bicapas de PC, no sufren cambios en el empaquetamiento de los fosfolípidos a pH mayores a 3.

Sin embargo, se ha determinado que en membranas de POPC a pH 5, ya sea por generación a dicho pH o por disminución del pH del medio de 7 a 5, se observa una separación de dominios similar a una separación de fases (Suresh & Edwardson, 2010), con la generación de dominios de fosfolípidos en estado líquido-ordenado (L_o) a partir de los fosfolípidos que se encontraban en estado líquido-desordenado (L_d). Estos estados de los fosfolípidos se han descrito principalmente en membranas formadas por mezclas ternarias de fosfolípidos saturados, insaturados y colesterol. La incorporación de colesterol en membranas que se encuentran en fase líquido cristalina produce un aumento del empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, con la consecuente disminución del área molecular y aumento del espesor de bicapa (Figura 34). Esto provoca un aumento del ordenamiento de las moléculas en fase líquido-cristalina, sin alcanzar el orden de la fase gel, por lo que dicho estado se denomina L_o . Los fosfolípidos en fase líquido-cristalina que no sufren un cierto grado de ordenamiento se encuentran en estado L_d . En los dominios L_o existe un orden orientacional de las moléculas a corta distancia, pero un desorden traslacional a larga distancia. En los dominios L_d , los lípidos poseen una total libertad orientacional y traslacional tanto a corta como a larga distancia.

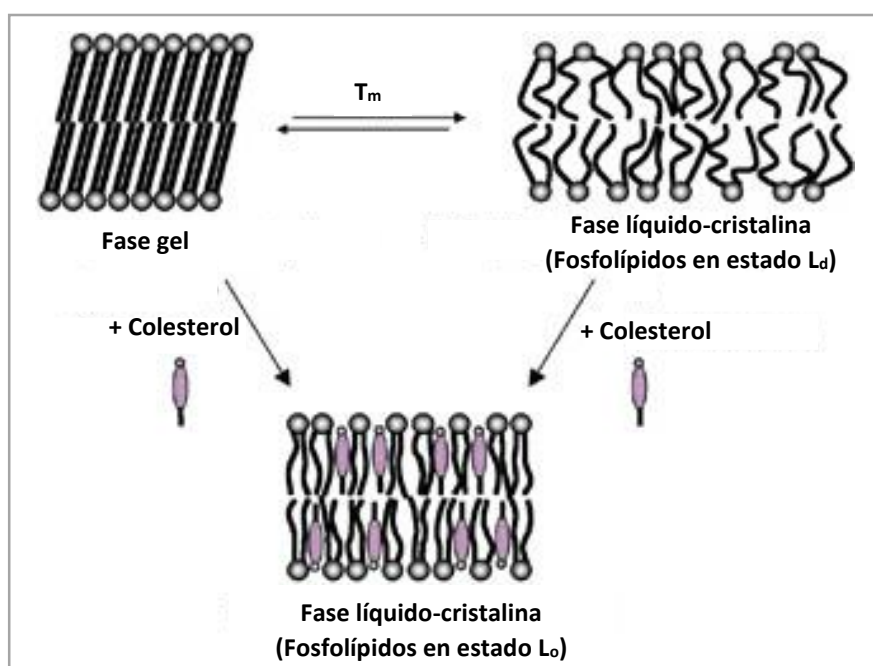


Figura 34 – Esquema de los estados L_o y L_d de los fosfolípidos..

La diferencia de altura promedio (espesor de bicapa) entre ambos tipos de dominio generados por cambios en el pH en membranas de POPC es de 3,3 Å aproximadamente (Suresh & Edwardson, 2010). Estos dominios L_0 de mayor espesor de bicapa poseían un diámetro típico de 50-100 nm. Considerando un espesor total de bicapa de 50 Å para membranas de POPC en estado líquido-cristalino (Maiorano & Davidson, 2000), un aumento de 3,3 Å de espesor corresponde a un 6,6 % de aumento aproximadamente.

Aunque el estado de ionización de las cabezas polares de las moléculas de PC no cambia a pH mayores a 3, si lo hace la carga neta de la membrana, por adsorción de protones o hidroxilos, dependiendo del pH del medio (Zhou & Raphael, 2007; Petelska & Figaszewski, 2003). En medio ácido, los centros de adsorción de los protones son los átomos de oxígeno de los grupos fosfato que unen el glicerol y la colina. En medio alcalino, los centros de adsorción de los hidroxilos son los nitrógenos cuaternarios de las moléculas de colina. Estos iones se adsorben a sus centros junto a sus capas de hidratación.

El cambio en la carga neta de la membrana puede relacionarse a cambios en la tensión interfacial de la bicapa. La tensión interfacial determinada experimentalmente en membranas es una medida de la diferencia entre interacciones atractivas y repulsivas a través del espesor de la bicapa (Figura 35).

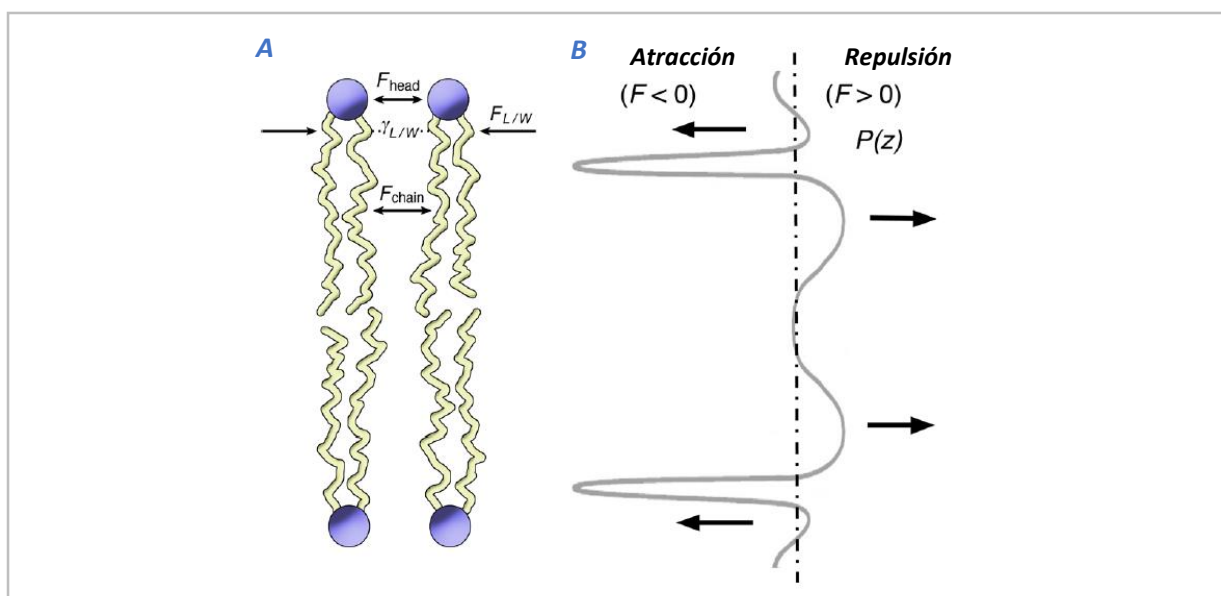


Figura 35 – Tensión interfacial y perfil de presiones laterales. **A**, Esquema de las fuerzas que afectan a las moléculas de fosfolípidos en bicapas. $F_{L/W}$ es una fuerza atractiva que actúa a nivel de la interfase agua/cadenas hidrocarbonadas, debida al efecto hidrofóbico. F_{head} y F_{chain} son fuerzas, normalmente repulsivas, debido a efectos estéricos. Aunque son normalmente repulsivas, pueden tener componentes atractivas. La tensión interfacial medida experimentalmente ($\gamma_{L/W}$) es el balance de estas fuerzas. **B**, Perfil de las fuerzas anteriormente mencionadas, denominadas presiones laterales, a lo largo del espesor de la bicapa.

La tensión interfacial de membranas de PC de yema de huevo aumenta con una disminución del pH, iniciando dicho aumento de forma rápida a un pH de aproximadamente 5,8, con un máximo a un pH de 4,15 (Petelska & Figaszewski, 2000). Adicionalmente, se ha determinado que, a pH neutro, las membranas de SOPC se encuentran cargadas negativamente. A medida que disminuye el pH, aumenta la cantidad de

protones que interaccionan con la membrana. A un pH de aproximadamente 4, la membrana es prácticamente neutra, poseyendo una carga positiva a valores menores de pH (*Zhou & Raphael, 2007*).

Todos los efectos en las propiedades de las membranas, debidas a cambios en el pH del medio acuoso en el que se encuentran, se deben principalmente a la interacción de protones e hidroxilos con las especies cargadas de las cabezas polares de los fosfolípidos. Al estar constituidas por lípidos con la misma cabeza polar (PC) y conteniendo ambos una cadena saturada y una insaturada, los efectos del pH sobre las propiedades de PC de yema de huevo [70% POPC o (16:0-18:1 Δ 9)PC] y SOPC [(18:0-18:1 Δ 9)PC] pueden ser integrados:

- a. A medida que el pH del medio en que se encuentran membranas de PC disminuye desde valores alcalinos, la carga negativa neta de la membrana disminuye, por lo que la repulsión total de las cabezas polares de los fosfolípidos también disminuye. Al disminuir la repulsión de las cabezas polares, la tensión interfacial medida aumenta.
- b. Al alcanzar un pH en el cual las membranas son eléctricamente neutras (pH aproximadamente 4), las repulsiones no existen, por lo que la tensión interfacial es máxima.
- c. Cuando el pH disminuye por debajo de 4, las membranas poseen una carga neta positiva, que aumenta a medida que disminuye el pH. Al aumentar la carga neta de las membranas, aumentan las repulsiones de las cabezas polares, lo que hace que disminuya la tensión interfacial determinada experimentalmente.

Al ser el resultado del balance entre fuerzas cohesivas y repulsivas, la tensión interfacial puede ser considerada una medida de la distancia entre las cabezas polares de las moléculas de fosfolípidos. A mayor tensión interfacial, menor es la distancia entre moléculas. Se ha determinado que la adsorción de hidroxilos en medio alcalino implica una distancia entre centros de adsorción de unos 14 Å, y la adsorción de protones en medio ácido implica una distancia de solo 9,9 Å (*Petelska & Figaszewski, 2003*), por lo que la reducción del pH implica una reducción de aproximadamente un 29 % en la distancia intermolecular entre las cabezas polares de los fosfolípidos.

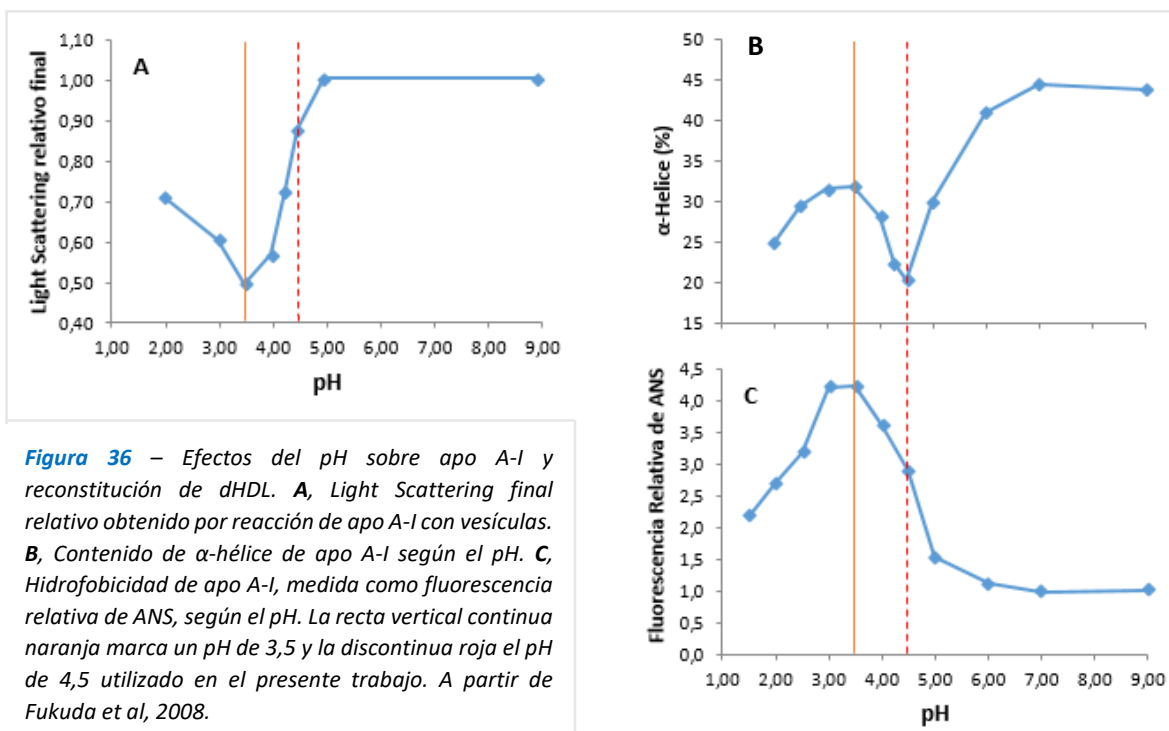
Por lo tanto, un cambio en el pH del medio podría generar dominios de POPC con un espesor 6,6% mayor (3,3 Å) y 29 % menos distancia intermolecular (4,1 Å). La separación de los dominios L_o y L_d generaría las condiciones para que se formen defectos en los que podría insertarse el ramillete de hélices intermolecular de los dímeros de apo A-I, conduciendo a la generación de partículas de rHDL.

En el presente trabajo se logró una reducción de la turbidez (medida mediante la absorbancia a 340 nm) de aproximadamente 56 %. En un sistema similar al usado (fosfatilcolina pura) se ha descrito una reducción de solo un 10% aproximadamente llevando a cabo la reacción a un pH de 4,5; y una reducción similar (aproximadamente 50%) llevando a cabo la reacción a un pH de 3,5 (*Fukuda et al, 2008*)

(Figura 36A). La reducción de la turbidez nunca fue mayor al 50%, alcanzándose un *plateau* antes de 5 minutos de iniciada la reacción.

Esto puede deberse no solo a los efectos sobre la bicapa lipídica, sino que adicionalmente, el cambio del pH del medio produce cambios en las propiedades de apo A-I (Fukuda et al, 2008):

1. **Contenido de α -hélice:** A valores de pH 7 o mayores, apo A-I posee aproximadamente un 45% de contenido de α -hélice. Dicho contenido disminuye hasta un mínimo de aproximadamente 20% a un pH de alrededor de 4,5. A valores menores, el contenido de α -hélice aumenta hasta aproximadamente 32% a valores de pH de entre 3 y 3,5. A pH menores el contenido de α -hélice disminuye nuevamente (Figura 36B).
2. **Hidrofobicidad:** Al reducir el valor de pH desde 9 a 3, aumenta la intensidad relativa de fluorescencia de ANS, lo cual es una medida del aumento de la hidrofobicidad de apo A-I. A pH 5, el aumento es de un 50% respecto a la fluorescencia a pH 7 o mayores. A pH 4,5, la fluorescencia es casi el triple. Para pH de entre 3 y 3,5 se alcanza la mayor hidrofobicidad, con una intensidad de fluorescencia de más de 4 veces. A pH menores, la intensidad de fluorescencia disminuye (Figura 36C).



Puede verse que la disminución del pH desde 7 hasta 4,5 produce un aumento de la hidrofobicidad y una disminución del contenido de α -hélice de apo A-I libre. Debido a que durante la interacción e inserción de apo A-I con las membranas de fosfolípidos su contenido de α -hélice aumenta, siendo este fenómeno parte de la fuerza impulsora del proceso (Arnulphi et al, 2004), el menor contenido de α -hélice inicial beneficia el proceso de interacción, ya que el cambio total es mayor. Se ha determinado que la interacción

de apo A-I con DMPC a su T_m y diferentes valores de pH presenta distintos parámetros termodinámicos (Pownall *et al*, 1977). A pH 7,4 apo A-I libre presenta 10% más de contenido de α -hélice respecto de la proteína a pH 3,1. A ambos valores de pH, se obtuvieron complejos discoidales similares (en cantidad y estructura) con el mismo contenido de α -hélice. La entalpía de unión de apo A-I a DMPC es de -90 Kcal/mol a pH 7,4 y de -170 Kcal/mol a pH 3,1, siendo gran parte de esa diferencia atribuida a la mayor ganancia de contenido de α -hélice al generar los complejos a menor pH.

Adicionalmente a ello, al aumentar la hidrofobicidad de apo A-I, aumenta su afinidad por las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, lo que también es beneficioso para la realización del proceso de interacción e inserción de apo A-I en bicapas lipídicas.

Debe considerarse también que el punto isoeléctrico (pI) de apo A-I se alcanza a un valor de pH de aproximadamente 5,2 – 5,6 (Heuck *et al*, 1983; Pownall *et al*, 1977). A valores menores de pH, como el utilizado en el presente trabajo, la proteína tendrá una carga neta positiva. Como se indicó, el pI de las membranas de PC se alcanza a un valor de pH de aproximadamente 4, por lo que a un valor de 4,5 la membrana presenta una leve carga neta negativa. Esta situación favorece la interacción de apo A-I con la membrana, ya que el primer paso del incremento en el contenido de α -hélice inducido por membranas es la atracción electrostática entre la proteína (con bajo contenido de α -hélice) y la membrana, para luego dar paso al plegamiento de la proteína ya unida, con el consiguiente aumento del contenido de α -hélice (Seelig, 2004).

Las diferencias observadas entre el presente trabajo y el antes indicado (Fukuda *et al*, 2008) respecto de la disminución relativa de la turbidez de la suspensión por reacción de apo A-I a pH 4,5 puede deberse al fosfolípido utilizado y/o a la proteína utilizada. En el presente trabajo se utilizó POPC pura y apo A-I WT, mientras que en el otro utilizaron PC de yema de huevo, una mezcla compleja de moléculas de PC con diferentes tipos y combinaciones de cadenas hidrocarbonadas, siendo POPC el fosfolípido mayoritario, y apo A-I obtenida a partir de plasma humano, por lo que se desconoce si se trata de una única variante o una mezcla de variantes, ni sus identidades o las consecuencias funcionales del uso de las mismas.

Comparación de los procesos

Actualmente el modelo de rHDL más aceptado es el de doble cinturón en el cual las hélices 5 de cada una de las moléculas de apo A-I se encuentran enfrentadas en orientación antiparalela. Esta configuración se denomina LL 5/5 (Segrest *et al*, 1999) (Figura 37). Sin embargo, se ha indicado la posible formación, a partir de micelas mixtas de POPC/colato, de partículas en las cuales la hélice 2 de una molécula de apo A-I se encuentra enfrentada a la hélice 5 de la otra molécula de apo A-I, configuración que se denomina LL 5/2 (Silva *et al*, 2005) (Figura 37). También se ha determinado que dicha conformación se obtiene al generar partículas de rHDL con DMPC a su T_m (Cuellar, Tesis Doctoral). Estas partículas poseen una mayor capacidad

de remoción de colesterol celular que las partículas equivalentes generadas a partir de micelas mixtas de DMPC/colato. La diferencia puede deberse al mecanismo de formación de las rHDL por ambos métodos.

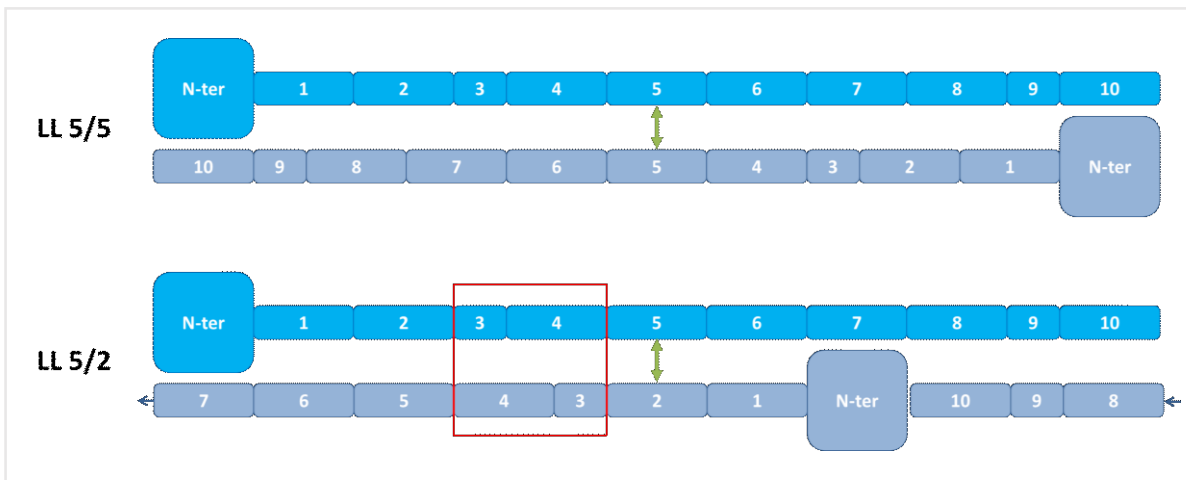


Figura 37 – Esquemas de las configuraciones LL5/5 y LL5/2 de las partículas de rHDL. Las hélices se indican como rectángulos de puntas redondeadas. Los números indican el número de hélice correspondiente. Los extremos N-terminales de cada una de las moléculas se representan como cuadrados de puntas redondeadas. Las flechas verdes de dos puntas indican las hélices enfrentadas que dan nombre a la configuración correspondiente. Las flechas azules de una punta en la configuración LL 5/2 indica la continuidad de la molécula de apo A-I entre las hélices 7 y 8 que se encuentran separadas en el esquema. La superposición de las hélices 3 y 4 de ambas moléculas de apo A-I en la configuración LL 5/2 (cuadro rojo) permitiría la formación del ramillete helicoidal que no puede formarse en la configuración LL 5/5.

En el proceso de reconstitución de las rHDL a la temperatura de transición de fases se considera que el mismo procede a partir de la inserción del ramillete de hélices intermolecular en defectos de membrana, de forma similar a lo que ocurre *in vivo*. Estos defectos son generados por la coexistencia de fases a la temperatura de transición. Las partículas así obtenidas, con conformación LL5/2, son compatibles con la formación del ramillete intermolecular compuesto por las hélices 3 y 4 de dos moléculas de apo A-I, que se ha postulado es el responsable de la inserción de las moléculas de apo A-I en las bicapas lipídicas (Prieto & Garda, 2011).

La mayor afinidad de la región de apo A-I que incluye dichas hélices por membranas que contienen altos niveles de colesterol (Toledo et al, 2004) concuerda con ello, ya que la presencia de grandes cantidades de colesterol en bicapas de PC genera una separación de dominios L_d (pobres en colesterol) y L_o (ricos en colesterol), lo que genera defectos de empaquetamiento y las condiciones necesarias para la inserción del ramillete. Adicionalmente, se ha determinado que los complejos discoidales de 78Å de diámetro presentan una mayor afinidad por las bicapas que los de 96Å. Esto se ha relacionado a la necesidad de una menor cantidad de hélices de cada molécula de apo A-I para cubrir la periferia de las partículas discoidales menores. La región central de apo A-I, específicamente la correspondiente a las hélices 3 y 4, interacciona en menor medida con los fosfolípidos presentes en las partículas de 78 Å, quedando “fuera” del anillo, con posibilidad de interactuar con bicapas. Cuando las partículas de dHDL se cargan de colesterol, cambia la conformación de la región central de apo A-I, produciendo una disminución de su exposición y disminución de la capacidad de interactuar con membranas (Toledo et al, 2004).

En cambio, el proceso de reconstitución de las partículas lipoproteicas por diálisis de micelas mixtas de POPC/colato no impone ningún tipo de restricción a la configuración que deben adoptar las moléculas de apo A-I para poder generar los complejos discoidales, ya que las partículas se generan por el intercambio del colato de la periferia de los discos de bicapa por dos moléculas de apo A-I. Por lo tanto, la configuración relativa de las moléculas de apo A-I en cada uno de los discos estará determinada solamente por la configuración que adopten al momento de ocupar su posición. Esta configuración será aquella cuyo registro de hélice sea el energéticamente más favorable, siendo el mismo el registro LL5/5 (Segrest *et al*, 1999). Sin embargo, dicha configuración no es compatible con la formación del ramillete intermolecular. El cambio en el registro inter-hélice es limitado, ya que en simulaciones de complejos discoidales de rHDL en las que se hizo rotar una molécula de apo A-I respecto de la otra (Klon *et al*, 2002b) se observó que pequeñas modificaciones en el registro inter-hélice pueden producir cambios estructurales en los anillos proteicos que impiden la rotación posterior de las proteínas. Estos dos hechos podrían explicar la diferencia en la capacidad de remoción de colesterol de las partículas de rHDL_T y rHDL_{colato} generadas utilizando DMPC como fosfolípido.

En el presente trabajo no fue posible generar partículas de rHDL_T, utilizando POPC, de tamaños comparables a las rHDL_{colato}. Sin embargo, se supone que el proceso de generación de rHDL realizando las reacciones en medio ácido también involucra la inserción del ramillete intermolecular en defectos de membrana. En este caso, los defectos se forman por las diferentes características estructurales de los dominios L_d y L_o que coexisten en membranas de PC a pH bajo. Por ello, se supone que este método de reconstitución impone la misma restricción al registro de hélice de las moléculas de apo A-I que la formación de las rHDL a la temperatura de transición. Esto haría suponer que las partículas de rHDL_{pH} tendrían una capacidad de remoción de colesterol mayor que las de rHDL_{colato}. Sin embargo, este no fue lo observado (*ver más adelante*).

Remoción de colesterol

Se ha determinado que apo A-I humana preferentemente interacciona y remueve fosfolípidos que se encuentran en fase líquido-cristalina (Triccerri *et al*, 2005). Como ABCA1 se distribuye preferentemente en regiones de membrana con fosfolípidos en fase L_d, se ha propuesto que esta situación favorece la interacción de apo A-I con dicho transportador, lo que finalmente da origen a partículas de nHDL formadas principalmente por fosfolípidos en fase L_d. Como el colesterol se distribuye principalmente en zonas de la membrana que se encuentran en fase L_o, se ha sugerido que la solubilización de los fosfolípidos por apo A-I ocurre en primer término, con la formación de las nHDL. Luego de ello, estas partículas aceptan el colesterol de las regiones L_o al interactuar con otros transportadores, como ABCG1 o SR-BI.

Debido a que se utilizaron células RAW264.7 estimuladas de la misma forma en todos los tratamientos, las diferencias observadas en la remoción de colesterol no pueden deberse a los

transportadores, sino solo a los aceptores utilizados en cada tratamiento. Adicionalmente, como los tamaños de los complejos rHDL_{pH} y rHDL_{colato} son similares, la diferencia en la remoción de colesterol no se debe a una mayor disponibilidad de hélices anfipáticas libres capaces de interactuar con membranas en un tratamiento respecto al otro.

Como apo A-I extrae preferentemente lípidos de la fase L_d, y el colesterol se encuentra en los dominios L_o, esto podría explicar que no exista diferencia significativa en la remoción del mismo por parte del tratamiento con apo A-I WT libre con respecto al tratamiento control. Al formarse las partículas de nHDL por acción del transportador ABCA1 en el tratamiento con apo A-I WT, estas se forman a expensas de fosfolípidos principalmente, por lo que la remoción de colesterol en este proceso no es significativa. La posterior remoción de colesterol por las partículas de nHDL así formadas no es significativamente diferente al tratamiento control, ya que una vez formadas las nHDL, la remoción de colesterol depende de transportadores diferentes a ABCA1, como por ejemplo ABCG1.

La incorporación de colesterol en las partículas discoidales se ve influenciada por la interacción entre las moléculas de colesterol y POPC. Debido a que en el sistema *in vitro* no se cuenta con la actividad de LCAT, que esterifica las moléculas de colesterol y genera un núcleo neutro de CE en las partículas de HDL, las moléculas de colesterol se acumulan en las hemicapas de las partículas discoidales. Se ha determinado que el núcleo esteroideo de la molécula de colesterol cubre una longitud equivalente a 9 o 10 átomos de carbono de las cadenas hidrocarbonadas completamente extendidas de los fosfolípidos, cubriendo una mayor longitud en el caso de encontrarse los mismos en fase líquido-cristalina (*Pasenkiewicz-Gierula et al, 1990*), como en nuestro sistema. Esto genera una incompatibilidad estructural con respecto a los fosfolípidos que presentan cadenas mono-cis-insaturadas con el doble enlace entre los carbonos 9 y 10, como la POPC, ya que la molécula de colesterol no puede acomodarse en contacto con las cadenas insaturadas sin exponerse parcialmente al medio acuoso. Esta situación es desfavorable hacia su incorporación en las partículas discoidales utilizadas, ya que al interactuar con las moléculas de POPC, la molécula de colesterol se “inclina” (ángulo entre el vector que va de C21 a C5 del colesterol con la normal a la bicapa), aumentando la exposición de su cadena hidrocarbonada al medio acuoso (*Aittoniemi et al, 2007*). La localización del grupo 3β-OH del colesterol se encuentra 3Å más cerca de la fase acuosa en membranas de POPC que en membranas de DMPC (*Róg & Pasenkiewicz-Gierula, 2006*).

Debido a que tanto el proceso de obtención de rHDL_T y rHDL_{pH} supondrían la generación de defectos de empaquetamiento en las bicapas, en los cuales se inserta el ramillete intermolecular del dímero de apo A-I, es de suponer que estas partículas se asemejen más a las nHDL que las partículas de rHDL_{colato}, por lo que se esperaría una mayor capacidad de remoción de colesterol. Esta situación concuerda con las observaciones que las partículas de rHDL_T preparadas con DMPC presentan una mayor capacidad de remover colesterol celular que las partículas rHDL_{colato} del mismo fosfolípido. Adicionalmente, se ha determinado que las partículas de rHDL_{colato} generadas con POPC tienen una mayor capacidad de remover

el colesterol celular que las generadas por el mismo método con DMPC. Por todo ello, se esperaría que las partículas de rHDL_{pH} de POPC tuvieran una mayor capacidad de remover colesterol que las de rHDL_{colato} de POPC, aunque eso no es lo observado. Es de suponer que la reacción de reconstitución de las partículas discoidales a pH ácido genera algún efecto en las mismas que disminuye su funcionalidad, ya sea en las moléculas de apo A-I, en los discos de bicapa de POPC, o en ambas.

Se ha propuesto que el desorden estructural localizado en la superficie de la lipoproteína es un mejor determinante del remodelamiento funcional requerido por las rHDL que la fluidez de las cadenas hidrocarbonadas (Jayaraman et al, 2010). Este desorden estructural, se encuentra relacionado inversamente a la estabilidad de las partículas. A menor estabilidad de las partículas generadas mayor es su funcionalidad como aceptor de colesterol (Guha et al, 2008), debido posiblemente a que esta inestabilidad facilita aperturas momentáneas de la superficie de la partícula. Moléculas de PC de cadenas cortas o insaturadas forman partículas menos estables. Por lo tanto, el desorden estructural se refiere a un mayor espaciamiento (momentáneo o permanente) entre las cabezas polares de los fosfolípidos, que permitiría una mejor inserción de las moléculas de colesterol entre ellas.

Esto permitiría explicar la diferencia en la capacidad de remoción de colesterol de las rHDL obtenidas con DMPC y POPC por diálisis de micelas mixtas con colato, como también en parte la aparentemente contradictoria menor capacidad de remoción de las rHDL_{pH} respecto de las rHDL_{colato} obtenidas con POPC en el presente trabajo.

En el caso de las partículas generadas a partir de micelas mixtas de FL/colato utilizando DMPC y POPC, la presencia del doble enlace cis en las moléculas de POPC genera un quiebre de aproximadamente 30° (Pasenkiewicz-Gierula et al, 1990) en la cadena hidrocarbonada en la posición 2 del glicerol, lo que produce una mayor separación de las cabezas polares en comparación a la DMPC. Las moléculas de fosfolípidos pueden clasificarse según su “forma” en (Strandberg et al, 2012) (**Figura 38**):

1. **Conos**: moléculas de fosfolípidos con cabezas polares pequeñas y gran área de sección transversal de las cadenas hidrocarbonadas.
2. **Cilindros**: moléculas de fosfolípidos con áreas de sección transversal de la cabeza polar y las cadenas hidrocarbonadas similares.
3. **Conos invertidos**: Moléculas de fosfolípidos con cabezas polares de mayor área de sección transversal que las cadenas hidrocarbonadas.

Esta forma hace que las estructuras macromoleculares de los distintos tipos de moléculas, como las monocapas y bicapas, adopten características distintas. Por ejemplo, las monocapas de fosfolípidos clasificados como conos poseen una curvatura espontánea negativa (**Figura 38**), mientras que los clasificados como conos invertidos presentan una curvatura espontánea positiva (**Figura 38**).

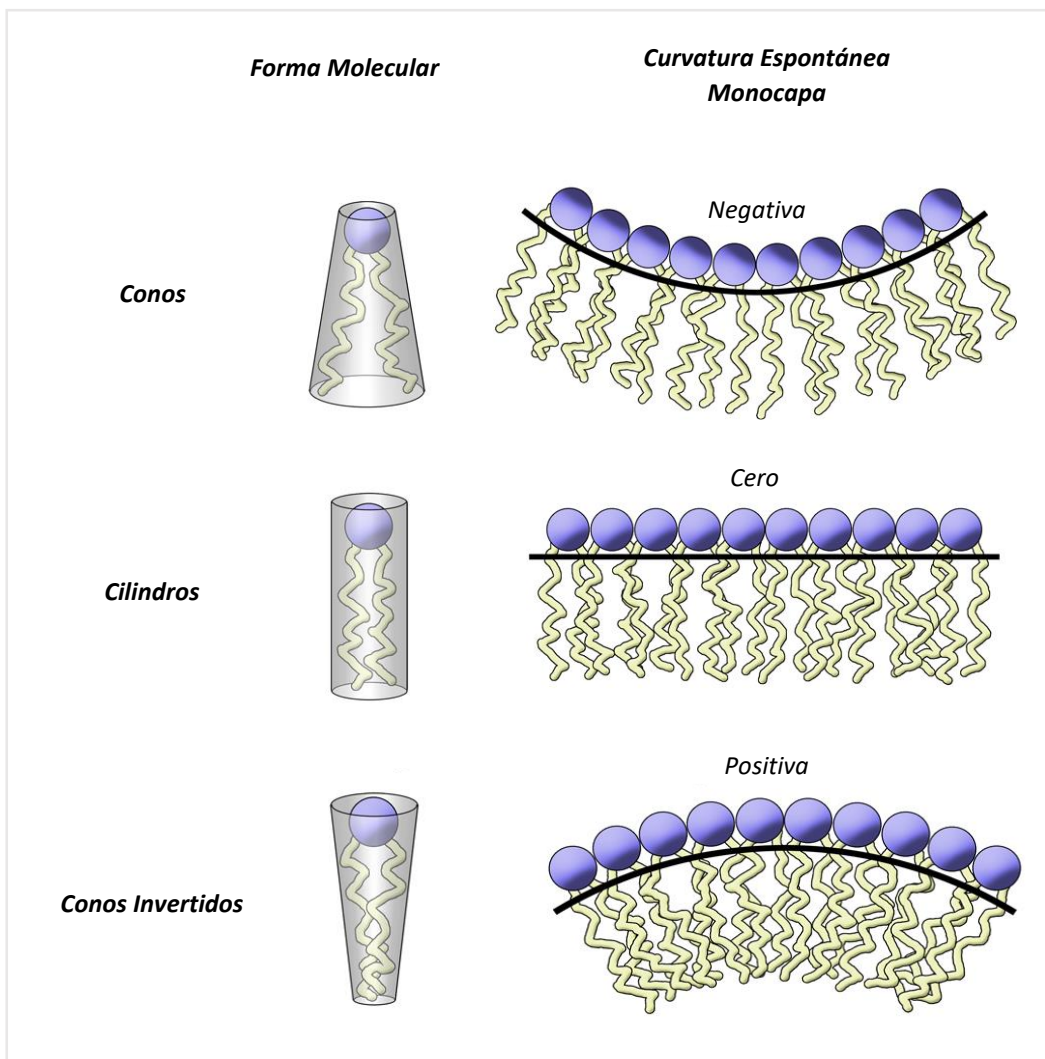


Figura 38 – Esquema de la forma molecular de los fosfolípidos y su correspondiente curvatura espontánea en monocapas.

Cuando estos fosfolípidos forman bicapas, las hemicapas que la constituyen no pueden adoptar la estructura debida a su curvatura espontánea, ya que las bicapas son estructuras planas. Esta imposibilidad de adoptar estructuras curvas tiene efectos en el ordenamiento molecular de los fosfolípidos.

Esto hace que, en una bicapa plana, se generen “espacios vacíos” que tiendan a compensar la curvatura espontánea de las hemicapas. En los fosfolípidos con curvatura negativa, se generan espacios entre las cabezas polares, es decir, aumenta el espaciamiento entre ellas. En el caso de los fosfolípidos con curvatura positiva, los espacios vacíos se generan entre las cadenas hidrocarbonadas, por lo que el espaciamiento entre las cabezas polares es mínimo.

Debido al quiebre de aproximadamente 30° generado por la insaturación en las moléculas de POPC, este fosfolípido se clasifica como cono (**Figura 39**), con una curvatura espontánea levemente negativa. La molécula de DMPC, en cambio, se clasifica como un cono invertido (**Figura 39**), con una curvatura espontánea positiva, debido a que presenta dos cadenas insaturadas relativamente cortas (14 átomos de carbono).

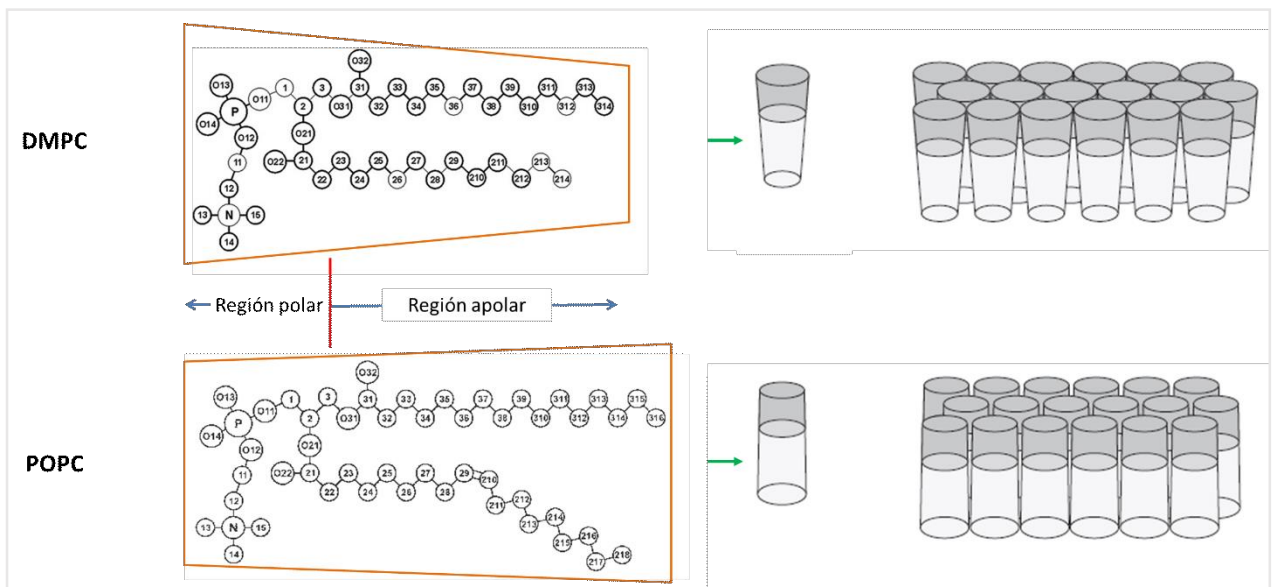


Figura 39 – Clasificación de DMPC y POPC según su forma. Se muestra la estructura molecular de ambos fosfolípidos, indicando la forma de la misma (en naranja). A la derecha se muestran esquemas de la estructura de una única molécula de cada fosfolípido y del ordenamiento de las mismas en una de las hemicapas de una bicapa plana (no se muestra la segunda hemicapa). En gris oscuro se indica la región polar de las moléculas, mientras que en gris claro se indica la región apolar. Se observa que el espaciamiento entre las cabezas polares de bicapas de POPC es mayor que en el caso de DMPC.

Esto hace que el empaquetamiento superficial de los fosfolípidos sea mayor en las rHDL de DMPC que en las de POPC. Puede pensarse que la inserción del colesterol en membranas se da gracias a la posibilidad de separar las cabezas polares de las moléculas de fosfolípido entre las que se produce la inserción, con la consiguiente disminución de la distancia entre estas cabezas y las aledañas (**Figura 40**). De ello se ve que el colesterol puede insertarse más fácilmente en membranas con mayor espaciamiento entre cabezas polares, ya que las mismas pueden acercarse entre sí al insertarse el colesterol. Por lo tanto, la inserción de colesterol será más fácil en las partículas de rHDL generadas con POPC que con DMPC y, por consiguiente, las rHDL generadas con POPC tendrán mayor capacidad de remoción de colesterol que las de DMPC cuando ambas son generadas a partir de micelas mixtas PC/colato.

En relación a la diferencia en la capacidad de remoción de colesterol entre las rHDL_{pH} y las rHDL_{colato} generadas con POPC en el presente trabajo, parte de dicha diferencia puede deberse a los efectos del pH sobre la estructura de la bicapa de las partículas. En condiciones fisiológicas (pH neutro y 37°C) las membranas de POPC se encuentran en estado líquido-cristalino. Como se ha indicado, la generación de membranas de POPC en medio ácido (pH 5) produce una separación de fases L_o y L_d. Esta separación de fases perdura aun cuando el pH del medio se lleva a un valor de 7 (*Suresh & Edwardson, 2010*). La formación de dominios de POPC en estado L_o en las rHDL conduce a una disminución del espaciamiento entre las cabezas polares de las moléculas en los mismos. La coexistencia de dominios de moléculas de POPC en estado L_o y L_d en las rHDL_{pH} conduce a una disminución de la fracción de moléculas de POPC con el mismo espaciamiento entre cabezas polares que las rHDL_{colato}, en las cuales se supone que todas las moléculas de fosfolípido se encuentran en estado L_d. Esto hace que disminuya la cantidad de moléculas de colesterol que

pueden insertarse en cada partícula de rHDL_{pH} respecto de las rHDL_{colato}. Esto da como resultado una menor capacidad de remoción de colesterol en las primeras.

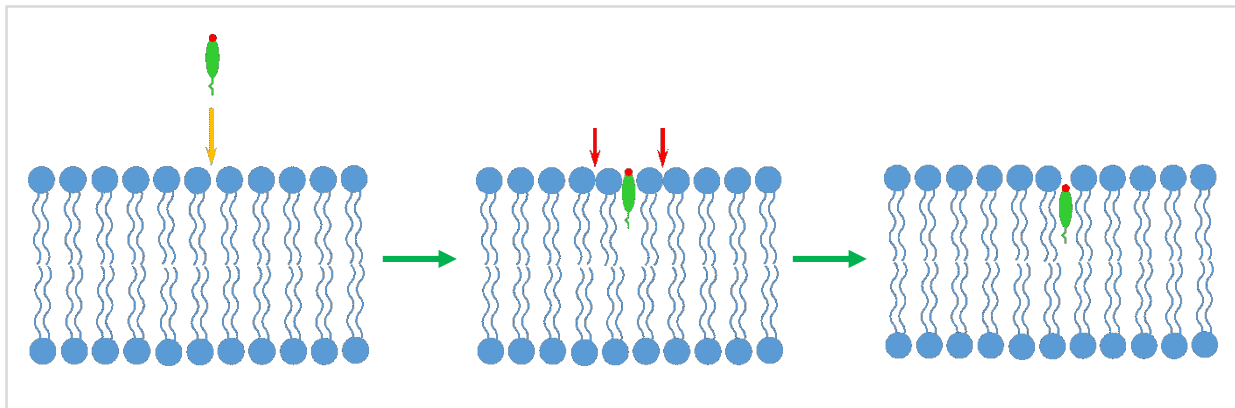


Figura 40 – Inserción de colesterol en membranas. Las cabezas de los fosfolípidos entre los que se inserta el colesterol (flecha naranja) deben alejarse entre sí (flechas rojas) y, por ende, acercarse a los circundantes.

Adicionalmente, parte de la diferente capacidad de remoción de colesterol entre las rHDL_{pH} y las rHDL_{colato} del presente trabajo podría deberse a la posibilidad de la existencia en las partículas discoidales de “restos” de colato, es decir, que la partícula de rHDL_{colato} esté formada por una bicapa de fosfolípido/colato rodeada por las moléculas de apo A-I. Esto puede deberse a que a altas relaciones PC/colato (mayor a 2), el sistema consiste de una membrana de fosfolípido con colato incorporado en ella (Matz & Jonas, 1982), situación que se puede dar al ir eliminando el detergente del sistema por diálisis durante la preparación de las partículas discoidales. Se ha propuesto que durante la diálisis de micelas mixtas PC/sal biliar, la eliminación de la sal biliar se produce a partir de las moléculas que se encuentran en la periferia y no en el centro de la membrana, quedando la cantidad de dichas moléculas prácticamente inalterada (Long et al, 1994). En experimentos con muestras de bilis, la cual es básicamente una mezcla de colesterol, sales biliares y fosfatidilcolina, luego de dializar las mismas durante 18 horas se detectaron restos de sales biliares (Somjen & Gilat, 1983), siendo los mismos de al menos un 0,7% del contenido inicial. En las bicapas de fosfolípidos con cadenas insaturadas las moléculas de colesterol son segregadas, es decir, se forman agregados de moléculas de colesterol (Pasenkiewicz-Gierula et al, 1990) (Figura 41A), ocurriendo algo similar con las de colato.

Se ha propuesto que las moléculas de colato en estas situaciones se encuentran formando dímeros, en los cuales ambas moléculas interactúan entre sí a través de sus caras polares, exponiendo sus caras apolares a las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos (Mazer et al, 1980) (Figura 30). La presencia del colato en las hemicapas de las partículas podría contribuir en parte a la incorporación de las moléculas de colesterol que se remueven de las células RAW264.7, protegiéndolas del contacto con el medio acuoso, debido a una mejor interacción del colesterol con las caras apolares de las moléculas de colato con respecto a la interacción colesterol/POPC (Figura 41B). En base a lo determinado en sistemas de sales biliares y fosfatidilcolina, más de un 80% del colesterol que es solubilizado se debe al fosfolípido, mientras que el

resto se debe a la presencia de la sal biliar (Neiderhiser & Roth, 1968; Somjen & Gilat, 1983), pudiendo suceder algo similar en las rHDL_{colato}.

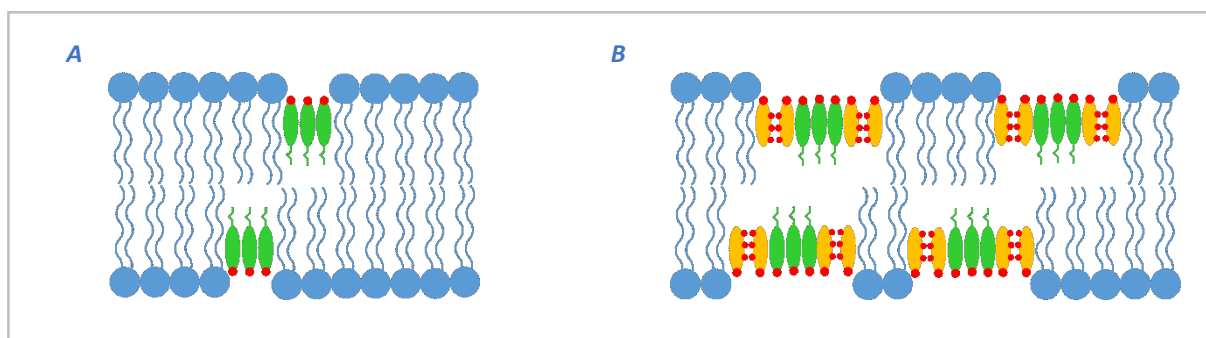


Figura 41– Esquema de distribución de colesterol en membranas insaturadas (A) y en rHDL_{colato} (B). En azul se muestran los fosfolípidos. En naranja y rojo las moléculas de colato (naranja anillo esteroideo, rojo grupos polares). En verde y rojo las moléculas de colesterol (verde anillo esteroideo y cadena alifática, rojo grupo hidroxilo).

Aunque la posible contribución de los restos de colato a la capacidad de remoción de colesterol de las partículas podría ser baja debe ser considerada.

Como se ha indicado previamente, las partículas de rHDL generadas con DMPC a la T_m de dicho fosfolípido presentan una configuración de las moléculas de apo A-I (LL5/2) diferente a la configuración obtenida con dicho fosfolípido a partir de micelas mixtas DMPC/colato. Esta diferencia estructural tiene una consecuencia funcional importante: en las partículas generadas a la T_m se puede formar el ramillete intermolecular entre las hélices 3 y 4 de ambas moléculas de apo A-I que permite la interacción de las partículas con membranas que contienen colesterol, mientras que en las obtenidas a partir de micelas mixtas dicho ramillete no puede formarse. Como se indicó, la generación de rHDL a la T_m y a pH ácido impone la restricción de la formación de dicho ramillete por parte de dos moléculas de apo A-I a fin que el mismo se inserte en defectos de membrana. Por lo tanto, se esperaría que la configuración de las moléculas de apo A-I en las rHDL obtenidas por ambos métodos sea la misma (LL5/2). Sin embargo, en el presente trabajo no se determinó la configuración obtenida, por lo que no se puede conocer si la misma tiene algún efecto sobre la diferencia en la remoción de colesterol entre las rHDL_{pH} y las rHDL_{colato} generadas con POPC.

Conclusiones

CONCLUSIONES

Las capacidades de remoción de colesterol de las partículas de rHDL se comparan principalmente en base a su tamaño y composición. Sin embargo, se ha visto que partículas de igual composición, de tamaños y estructura similar, generadas por diferentes métodos, presentan distintas capacidades de remoción de colesterol.

Estas diferentes capacidades pueden deberse a diferencias en los mecanismos de formación de las de rHDL por los métodos que se han utilizado, siendo algunos más similares al mecanismo propuesto de generación *in vivo* de las partículas de nHDL que otros.

El método más utilizado para la obtención de rHDL, la diálisis de micelas mixtas, es el mecanismo que menos se asemeja al proceso *in vivo*. En este proceso no se impone ningún tipo de restricción a la conformación intermolecular que deben adoptar las moléculas de apo A-I durante la formación de las partículas discoidales. Como consecuencia, y según se ha descrito en la bibliografía actual, la configuración que adoptan las moléculas de apo A-I en la periferia de las partículas es aquella en la cual se forman la mayor cantidad de interacciones iónicas entre ambas, siendo la más estable (configuración LL5/5). Sin embargo, dicha configuración no permite la formación del ramillete intermolecular de las hélices 3 y 4 que permite la interacción de las dHDL de menor tamaño con las membranas que contienen colesterol.

Los métodos de obtención de rHDL a la temperatura de transición de fase o a pH ácido serían los más similares al proceso de generación *in vivo* de las nHDL, debido a que se basan en la inserción del ramillete intermolecular de apo A-I en defectos en el empaquetamiento de las membranas, al igual que el proceso *in vivo*. Sin embargo, la forma en que se generan dichos defectos podrían tener consecuencias en la obtención de partículas o en las características de las mismas:

- a. En la reconstitución a la temperatura de transición de fases, se debe tener en cuenta no solo la temperatura de transición de fase del fosfolípido que se utiliza, sino también las condiciones iniciales del sistema (fase de la bicapa), ya que la transición de fase es un proceso que presenta histéresis. Las características de la transición (T_m , ΔH , $\Delta T_{1/2}$, cooperatividad) depende si la misma se realiza por calentamiento o enfriamiento del sistema. Asimismo, las proteínas pueden afectar la transición de los fosfolípidos, como en el caso de apo A-I. Debido a estos factores podría no haberse obtenido partículas de rHDL con POPC comparables a las obtenidas por diálisis de micelas mixtas de POPC/colato. Por lo tanto, para generar partículas de rHDL por este método, debería determinarse experimentalmente las mejores condiciones para llevar a cabo la reacción.
- b. En la reconstitución a pH ácido, se obtienen partículas discoidales de características similares a las obtenidas por diálisis de micelas mixtas. Sin embargo, su funcionalidad podría verse afectada por la presencia de moléculas de fosfolípidos en fase L_d y L_o dentro de la partícula,

ya que la coexistencia de dichas fases en las membranas, iniciada por una disminución de pH, perdura luego de neutralizar el medio. En este método también se debería estudiar la transición de fases de las membranas, en presencia de apo A-I, como así también las características estructurales de las partículas obtenidas (configuración de las moléculas de apo A-I, características de la superficie de la bicapa de las rHDL)

Las partículas de rHDL más utilizadas en los estudios se generan principalmente a partir de fosfolípidos puros que poco se asemejan a los presentes en las membranas de las células como, por ejemplo, DMPC. Se debería aplicar lo indicado precedentemente, respecto al estudio de la transición de fases, en sistemas compuestos no solo por PC, sino también con esfingomiélin (SM) y/o fosfatidiletanolamina (PE), a fin que las membranas utilizadas en la generación de las rHDL se asemejen aún más en composición a las membranas celulares.

Bibliografía

- Aittoniemi, J., Niemelä, P. S., Hyvönen, M. T., Karttunen, M., & Vattulainen, I. (2007). *Insight into the putative specific interactions between cholesterol, sphingomyelin, and palmitoyl-oleoyl phosphatidylcholine. **Bioophysical journal**, 92(4), 1125-1137.*
- Almog, S., Kushnir, T., Nir, S., & Lichtenberg, D. (1986). *Kinetics and structural aspects of reconstitution of phosphatidylcholine vesicles by dilution of phosphatidylcholine-sodium cholate mixed micelles. **Biochemistry**, 25(9), 2597-2605.*
- Annema, W., & Tietge, U. J. (2012). *Regulation of reverse cholesterol transport-a comprehensive appraisal of available animal studies. **Nutrition & metabolism**, 9(1), 25.*
- Arnulphi, C., Jin, L., Tricerri, M. A., & Jonas, A. (2004). *Enthalpy-driven apolipoprotein AI and lipid bilayer interaction indicating protein penetration upon lipid binding. **Biochemistry**, 43(38), 12258-12264.*
- Attie, A. D. (2007). *ABCA1: at the nexus of cholesterol, HDL and atherosclerosis. **Trends in biochemical sciences**, 32(4), 172-179.*
- Bonomo, E. A., & Swaney, J. B. (1988). *A rapid method for the synthesis of protein-lipid complexes using adsorption chromatography. **Journal of lipid research**, 29(3), 380-384.*
- Brown, M. F. (2012). *Curvature forces in membrane lipid-protein interactions. **Biochemistry**, 51(49), 9782-9795.*
- Brown, T.A. (2006). *Genomes, 3rd edition*. Garland Science. New York
- Brufau, G., Groen, A. K., & Kuipers, F. (2011). *Reverse Cholesterol Transport Revisited. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, 31(8), 1726-1733.*
- Cevc, G. (1987). *How membrane chain melting properties are regulated by the polar surface of the lipid bilayer. **Biochemistry**, 26(20), 6305-6310.*
- Cevc, G. (1991). *How Membrane Chain-Melting Phase-Transition Temperature Is Affected by the Lipid Chain Asymetry and Degree of Unsaturation: An Effective Chain-Legth Model. **Biochemistry**, 30: 7186 – 7193.*
- Chang, T. Y., Chang, C. C., Ohgami, N., & Yamauchi, Y. (2006). *Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, 22, 129-157.*
- Córsico, B., Toledo, J. D., & Garda, H. A. (2001). *Evidence for a central apolipoprotein AI domain loosely bound to lipids in discoidal lipoproteins that is capable of penetrating the bilayer of phospholipid vesicles. **Journal of Biological Chemistry**, 276(20), 16978-16985.*
- Davidson, W. S., Sparks, D. L., Lund-Katz, S., & Phillips, M. C. (1994). *The molecular basis for the difference in charge between pre-beta-and alpha-migrating high density lipoproteins. **Journal of Biological Chemistry**, 269(12), 8959-8965.*
- Davidson, W. S., Gillotte, K. L., Lund-Katz, S., Johnson, W. J., Rothblat, G. H., & Phillips, M. C. (1995a). *The effect of high density lipoprotein phospholipid acyl chain composition on the efflux of cellular free cholesterol. **Journal of Biological Chemistry**, 270(11), 5882-5890.*

- Davidson, W. S., Rodrigueza, W. V., Lund-Katz, S., Johnson, W. J., Rothblat, G. H., & Phillips, M. C. (1995b). *Effects of acceptor particle size on the efflux of cellular free cholesterol*. **Journal of Biological Chemistry**, **270**(29), **17106-17113**.
- Davidson, W. S., & Thompson, T. B. (2007). *The structure of apolipoprotein AI in high density lipoproteins*. **Journal of Biological Chemistry**, **282**(31), **22249-22253**.
- Davis, P. J., Fleming, B. D., Coolbear, K. P., & Keough, K. M. W. (1981). *Gel to liquid-crystalline transition temperatures of water dispersions of two pairs of positional isomers of unsaturated mixed-acid phosphatidylcholines*. **Biochemistry**, **20**(12), **3633-3636**.
- Davis, P. J., & Keough, K. M. W. (1985). *Chain arrangements in the gel state and the transition temperatures of phosphatidylcholines*. **Biophysical journal**, **48**(6), **915-918**.
- Denis, M., Landry, Y. D., & Zha, X. (2008). *ATP-binding cassette A1-mediated lipidation of apolipoprotein AI occurs at the plasma membrane and not in the endocytic compartments*. **Journal of Biological Chemistry**, **283**(23), **16178-16186**.
- Fu, Y. (2010). *Rate-limiting factors of cholesterol efflux in reverse cholesterol transport: Acceptors and donors*. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, **37**(7), **703-709**.
- Fukuda, M., Nakano, M., Sriwongsitanont, S., Ueno, M., Kuroda, Y., & Handa, T. (2007). *Spontaneous reconstitution of discoidal HDL from sphingomyelin-containing model membranes by apolipoprotein AI*. **Journal of lipid research**, **48**(4), **882-889**.
- Fukuda, M., Nakano, M., Miyazaki, M., Tanaka, M., Saito, H., Kobayashi, S., ... & Handa, T. (2008). *Conformational change of apolipoprotein AI and HDL formation from model membranes under intracellular acidic conditions*. **Journal of lipid research**, **49**(11), **2419-2426**.
- Garda, H. A. (2007). *Structure–function relationships in human apolipoprotein AI: role of a central helix pair*. **Future Lipidology**, **2**(1), **95-104**.
- Guha, M., Gantz, D. L., & Gursky, O. (2008). *Effects of acyl chain length, unsaturation, and pH on thermal stability of model discoidal HDLs*. **Journal of lipid research**, **49**(8), **1752-1761**.
- Heuck, C. C., Daerr, W., Haberbosch, W., Horn, D., & Lüddecke, E. (1983). *The surface charge of apolipoproteins, phospholipid liposomes, and human very low density lipoproteins*. **Journal of Biological Chemistry**, **258**(13), **8317-8322**.
- Ichimori, H., Hata, T., Matsuki, H., & Kaneshina, S. (1999). *Effect of unsaturated acyl chains on the thermotropic and barotropic phase transitions of phospholipid bilayer membranes*. **Chemistry and physics of lipids**, **100**(1), **151-164**.
- Ikonen, E. (2008). *Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization*. **Nature reviews Molecular cell biology**, **9**(2), **125**.

- Jacobson, K., & Papahadjopoulos, D. (1975). *Phase transitions and phase separations in phospholipid membranes induced by changes in temperature, pH, and concentration of bivalent cations*. **Biochemistry**, **14**(1), 152-161.
- Jauregui-Adell, J., & Marti, J. (1975). *Acidic cleavage of the aspartyl-proline bond and the limitations of the reaction*. **Analytical biochemistry**, **69**(2), 468-473.
- Jayaraman, S., Benjwal, S., Gantz, D. L., & Gursky, O. (2010). *Effects of cholesterol on thermal stability of discoidal high density lipoproteins*. **Journal of lipid research**, **51**(2), 324-333.
- Jonas, A., Kezdy, K. E., & Wald, J. H. (1989). *Defined apolipoprotein AI conformations in reconstituted high density lipoprotein discs*. **Journal of Biological Chemistry**, **264**(9), 4818-4824.
- Kanehisa, M. I., & Tsong, T. Y. (1978). *Cluster model of lipid phase transitions with application to passive permeation of molecules and structure relaxations in lipid bilayers*. **Journal of the American Chemical Society**, **100**(2), 424-432.
- Klon, A. E., Segrest, J. P., & Harvey, S. C. (2002a). *Comparative models for human apolipoprotein AI bound to lipid in discoidal high-density lipoprotein particles*. **Biochemistry**, **41**(36), 10895-10905.
- Klon, A. E., Segrest, J. P., & Harvey, S. C. (2002b). *Molecular dynamics simulations on discoidal HDL particles suggest a mechanism for rotation in the apo AI belt model*. **Journal of molecular biology**, **324**(4), 703-721.
- Koynova, R., & Caffrey, M. (1998). *Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes**, **1376**(1), 91-145.
- Kučerka, N., Nieh, M. P., & Katsaras, J. (2011). *Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, **1808**(11), 2761-2771.
- Landon, M. (1977). *[15] Cleavage at aspartylprolyl bonds*. In **Methods in enzymology (Vol. 47, pp. 145-149)**. Academic Press.
- Lee, A. G. (2004). *How lipids affect the activities of integral membrane proteins*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, **1666**(1), 62-87.
- Leekumjorn, S., & Sum, A. K. (2007). *Molecular characterization of gel and liquid-crystalline structures of fully hydrated POPC and POPE bilayers*. **The Journal of Physical Chemistry B**, **111**(21), 6026-6033.
- Leng, J., Egelhaaf, S. U., & Cates, M. E. (2003). *Kinetics of the micelle-to-vesicle transition: aqueous lecithin-bile salt mixtures*. **Biophysical journal**, **85**(3), 1624-1646.
- Li H.H., Lyles D.S., Pan W., Alexander E., Thomas M.J., Sorci-Thomas M.G., 2002. *ApoA-I structure on discs and spheres variable helix registry and conformational states*. **Journal of Biological Chemistry**, **277**(42), 39093-39101.
- Li, S., Lin, H. N., Wang, Z. Q., & Huang, C. (1994). *Identification and characterization of kink motifs in 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholines: a molecular mechanics study*. **Biophysical journal**, **66**(6), 2005-2018.

- Lichtenberg, D., Robson, R. J., & Dennis, E. A. (1983). *Solubilization of phospholipids by detergents structural and kinetic aspects*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes**, **737(2)**, 285-304.
- Long, M. A., Kaler, E. W., & Lee, S. P. (1994). *Structural characterization of the micelle-vesicle transition in lecithin-bile salt solutions*. **Biophysical journal**, **67(4)**, 1733-1742.
- M'Baye, G., Mély, Y., Duportail, G., & Klymchenko, A. S. (2008). *Liquid ordered and gel phases of lipid bilayers: fluorescent probes reveal close fluidity but different hydration*. **Biophysical journal**, **95(3)**, 1217-1225.
- Maiorano, J. N., & Davidson, W. S. (2000). *The orientation of helix 4 in apolipoprotein AI-containing reconstituted high density lipoproteins*. **Journal of Biological Chemistry**, **275(23)**, 17374-17380.
- Maric, J., Kiss, R. S., Franklin, V., & Marcel, Y. L. (2005). *Intracellular lipidation of newly synthesized apolipoprotein AI in primary murine hepatocytes*. **Journal of Biological Chemistry**, **280(48)**, 39942-39949.
- Marsh, D. (1991). *General features of phospholipid phase transitions*. **Chemistry and physics of lipids**, **57(2-3)**, 109-120.
- Matz, C. E., & Jonas, A. (1982). *Micellar complexes of human apolipoprotein AI with phosphatidylcholines and cholesterol prepared from cholate-lipid dispersions*. **Journal of Biological Chemistry**, **257(8)**, 4535-4540.
- Maxfield, F.R., & Tabas, I. (2005). *Role of cholesterol and lipid organization in disease*. **Nature**, **438**, 612-621.
- Mazer, N. A., Benedek, G. B., & Carey, M. C. (1980). *Quasielastic light-scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Mixed micelle formation in bile salt-lecithin solutions*. **Biochemistry**, **19(4)**, 601-615.
- Mendis, S., Puska, P., & Norrving, B. (2011). *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*. World Health Organization.
- Mei, X., & Atkinson, D. (2011). *Crystal structure of C-terminal truncated apolipoprotein AI reveals the assembly of HDL by dimerization*. **Journal of Biological Chemistry**, **286(44)**, 38570-38582.
- Miyazaki, M., Tajima, Y., Ishihama, Y., Handa, T., & Nakano, M. (2013). *Effect of phospholipid composition on discoidal HDL formation*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, **1828(5)**, 1340-1346.
- Moore, K. J., & Tabas, I. (2011). *Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis*. **Cell**, **145(3)**, 341-355.
- Mouritsen, O. G. (2011). *Lipids, curvature, and nano-medicine*. **European journal of lipid science and technology**, **113(10)**, 1174-1187.
- Mueller, K. (1981). *Structural dimorphism of bile salt/lecithin mixed micelles. A possible regulatory mechanism for cholesterol solubility in bile? X-ray structural analysis*. **Biochemistry**, **20(2)**, 404-414.
- Neiderhiser, D. H., & Roth, H. P. (1968). *Cholesterol solubilization by solutions of bile salts and bile salts plus lecithin*. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, **128(1)**, 221-225.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M. (2013). *Lehninger Principles of Biochemistry*, 6th edition. W.H. Freeman. New York.

- Papahadjopoulos, D., Moscarello, M., Eylar, E. H., & Isac, T. (1975). *Effects of proteins on the thermotropic phase transitions of phospholipid membranes*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, **401(3)**, 317-335.
- Pasenkiewicz-Gierula, M., Subczynski, W. K., & Kusumi, A. (1990). *Rotational diffusion of a steroid molecule in phosphatidylcholine-cholesterol membranes: fluid-phase microimmiscibility in unsaturated phosphatidylcholine-cholesterol membranes*. **Biochemistry**, **29(17)**, 4059-4069.
- Pennings, M., Meurs, I., Ye, D., Out, R., Hoekstra, M., Van Berkel, T. J., & Van Eck, M. (2006). *Regulation of cholesterol homeostasis in macrophages and consequences for atherosclerotic lesion development*. **FEBS letters**, **580(23)**, 5588-5596.
- Petrache, H. I., Dodd, S. W., & Brown, M. F. (2000). *Area per lipid and acyl length distributions in fluid phosphatidylcholines determined by 2H NMR spectroscopy*. **Biophysical journal**, **79(6)**, 3172-3192.
- Piszkiwicz, D., Landon, M., & Smith, E. L. (1970). *Anomalous cleavage of aspartyl-proline peptide bonds during amino acid sequence determinations*. **Biochemical and biophysical research communications**, **40(5)**, 1173-1178.
- Pownall, H. J., Hsu, F. J., Rosseneu, M., Peeters, H., Gotto, A. M., & Jackson, R. L. (1977). *Thermodynamics of lipid protein associations thermodynamics of helix formation in the association of high density apolipoprotein AI (ApoA-I) to dimyristoyl phosphatidylcholine*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, **488(2)**, 190-197.
- Prieto, E. D., & Garda, H. A. (2011). *Membrane insertion topology of the central apolipoprotein AI region. Fluorescence studies using single tryptophan mutants*. **Biochemistry**, **50(4)**, 466-479.
- Prieto, E. D., Ramella, N., Cuellar, L. A., Tricerri, M. A., & Garda, H. A. (2012). *Characterization of a human apolipoprotein AI construct expressed in a bacterial system*. **The protein journal**, **31(8)**, 681-688.
- Rader, D. J., Alexander, E. T., Weibel, G. L., Billheimer, J., & Rothblat, G. H. (2009). *The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis*. **Journal of lipid research**, **50(Supplement)**, S189-S194.
- Róg, T., Murzyn, K., Gurbiel, R., Takaoka, Y., Kusumi, A., & Pasenkiewicz-Gierula, M. (2004). *Effects of phospholipid unsaturation on the bilayer nonpolar region a molecular simulation study*. **Journal of lipid research**, **45(2)**, 326-336.
- Róg, T., & Pasenkiewicz-Gierula, M. (2006). *Cholesterol effects on a mixed-chain phosphatidylcholine bilayer: a molecular dynamics simulation study*. **Biochimie**, **88(5)**, 449-460.
- Sánchez, S. A., Tricerri, M. A., Ossato, G., & Gratton, E. (2010). *Lipid packing determines protein-membrane interactions: challenges for apolipoprotein AI and high density lipoproteins*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, **1798(7)**, 1399-1408.
- Schmitz, G., & Grandl, M. (2009). *The molecular mechanisms of HDL and associated vesicular trafficking mechanisms to mediate cellular lipid homeostasis*. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, **29(11)**, 1718-1722.

- Schurtenberger, P., Mazer, N., & Känzig, W. (1985). *Micelle to vesicle transition in aqueous solutions of bile salt and lecithin*. **The Journal of Physical Chemistry**, **89(6)**, 1042-1049.
- Seelig, J. (2004). *Thermodynamics of lipid-peptide interactions*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, **1666(1)**, 40-50.
- Seelig, J., & Waespe-Sarcevic, N. (1978). *Molecular order in cis and trans unsaturated phospholipid bilayers*. **Biochemistry**, **17(16)**, 3310-3315.
- Segrest, J. P., Jones, M. K., Klon, A. E., Sheldahl, C. J., Hellinger, M., De Loof, H., & Harvey, S. C. (1999). *A detailed molecular belt model for apolipoprotein AI in discoidal high density lipoprotein*. **Journal of Biological Chemistry**, **274(45)**, 31755-31758.
- Shankland, W. (1970). *The equilibrium and structure of lecithin-cholesterol mixed micelles*. **Chemistry and physics of lipids**, **4(2)**, 109-130.
- Shih, A. Y., Freddolino, P. L., Sligar, S. G., & Schulten, K. (2007). *Disassembly of nanodiscs with cholesterol*. **Nano letters**, **7(6)**, 1692-1696.
- Silva, R. G. D., Hilliard, G. M., Li, L., Segrest, J. P., & Davidson, W. S. (2005). *A mass spectrometric determination of the conformation of dimeric apolipoprotein AI in discoidal high density lipoproteins*. **Biochemistry**, **44(24)**, 8600-8607.
- Shinkai, H. (2012). *Cholesteryl ester transfer-protein modulator and inhibitors and their potential for the treatment of cardiovascular diseases*. **Vascular health and risk management**, **8**, 323-331.
- Somjen, G.J., & Gilat, T. (1983). *A non-micellar mode of cholesterol transport in human bile*. **FEBS Letters**, **156(2)**, 265-268.
- Strandberg, E., Tiltak, D., Ehni, S., Wadhvani, P., & Ulrich, A. S. (2012). *Lipid shape is a key factor for membrane interactions of amphipathic helical peptides*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, **1818(7)**, 1764-1776.
- Suresh, S., & Edwardson, J. M. (2010). *Phase separation in lipid bilayers triggered by low pH*. **Biochemical and biophysical research communications**, **399(4)**, 571-574.
- Surovtsev, N. V., Ivanisenko, N. V., Kirillov, K. Y., & Dzuba, S. A. (2012). *Low-temperature dynamical and structural properties of saturated and monounsaturated phospholipid bilayers revealed by Raman and spin-label EPR spectroscopy*. **The Journal of Physical Chemistry B**, **116(28)**, 8139-8144.
- Swaney, J. B. (1980). *Mechanisms of protein-lipid interaction. Association of apolipoproteins AI and A-II with binary phospholipid mixtures*. **Journal of Biological Chemistry**, **255(18)**, 8791-8797.
- Tabas, I. (2002). *Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications*. **The Journal of clinical investigation**, **110(7)**, 905-911.
- Tabas I. (2004). *Apoptosis and plaque destabilization in atherosclerosis: the role of macrophage apoptosis induced by cholesterol*. **Cell Death and Differentiation**, **11**: S12-S16.

- Tall, A. R., Yvan-Charvet, L., Terasaka, N., Pagler, T., & Wang, N. (2008). *HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis*. **Cell metabolism**, **7(5)**, 365-375.
- Temel, R. E., & Brown, J. M. (2012). *Biliary and non-biliary contributions to reverse cholesterol transport*. **Current opinion in lipidology**, **23(2)**, 85.
- Tricerri, A., Córscico, B., Toledo, J. D., Garda, H. A., & Brenner, R. R. (1998). *Conformation of apolipoprotein AI in reconstituted lipoprotein particles and particle-membrane interaction: effect of cholesterol*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, **1391(1)**, 67-78.
- Tricerri, M. A., Toledo, J. D., Sanchez, S. A., Hazlett, T. L., Gratton, E., Jonas, A., & Garda, H. A. (2005). *Visualization and analysis of apolipoprotein AI interaction with binary phospholipid bilayers*. **Journal of lipid research**, **46(4)**, 669-678.
- Tristram-Nagle, S., Liu, Y., Legleiter, J., & Nagle, J. F. (2002). *Structure of gel phase DMPC determined by X-ray diffraction*. **Biophysical journal**, **83(6)**, 3324-3335.
- Toledo, J. D., Prieto, E. D., Gonzalez, M. C., Soulages, J. L., & Garda, H. A. (2004). *Functional independence of a peptide with the sequence of human apolipoprotein AI central region*. **Archives of biochemistry and biophysics**, **428(2)**, 188-197.
- Vedhachalam, C., Ghering, A. B., Davidson, W. S., Lund-Katz, S., Rothblat, G. H., & Phillips, M. C. (2007a). *ABCA1-induced cell surface binding sites for ApoA-I*. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, **27(7)**, 1603-1609.
- Vedhachalam, C., Duong, P. T., Nickel, M., Nguyen, D., Dhanasekaran, P., Saito, H., ... & Phillips, M. C. (2007b). *Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein AI and formation of high density lipoprotein particles*. **Journal of Biological Chemistry**, **282(34)**, 25123-25130.
- Voet D., Voet J.G. (2010). *Biochemistry*, 4th edition. John Wiley & Sons Ltd. Chichester.
- Walter, A., Vinson, P. K., Kaplun, A., & Talmon, Y. (1991). *Intermediate structures in the cholate-phosphatidylcholine vesicle-micelle transition*. **Biophysical journal**, **60(6)**, 1315-1325.
- Wang, Z. Q., Lin, H. N., Li, S., & Huang, C. H. (1995). *Phase Transition Behavior and Molecular Structures of Monounsaturated Phosphatidylcholines*. **CALORIMETRIC STUDIES AND MOLECULAR MECHANICS SIMULATIONS**. **Journal of Biological Chemistry**, **270(5)**, 2014-2023.
- Wróblewska, M. (2011). *The origin and metabolism of a nascent pre- β high density lipoprotein involved in cellular cholesterol efflux*. **Acta Biochimica Polonica**, **58(3)**.
- Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2003). *Unfolding the toxicity of cholesterol*. **Nature cell biology**, **5(9)**, 769.
- Zhou, Y., & Raphael, R. M. (2007). *Solution pH alters mechanical and electrical properties of phosphatidylcholine membranes: relation between interfacial electrostatics, intramembrane potential, and bending elasticity*. **Biophysical journal**, **92(7)**, 2451-2462.