

¹Instituto Nacional de Medicina Genómica, ²Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” · *Programa de Maestría en Ciencias Biológicas, Facultad de Medicina, UNAM, esme_32_91@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La enfermedad arterial coronaria (EAC), manifestación clínica de la aterosclerosis, es una patología vascular crónica progresiva, consecuencia de la pérdida de la integridad vascular y resultante de una disfunción endotelial. Durante el curso de la aterosclerosis el endotelio secreta moléculas proinflamatorias que agravan la lesión aterogénica así como también se ha estudiado la liberación de micropartículas (MPs) endoteliales.

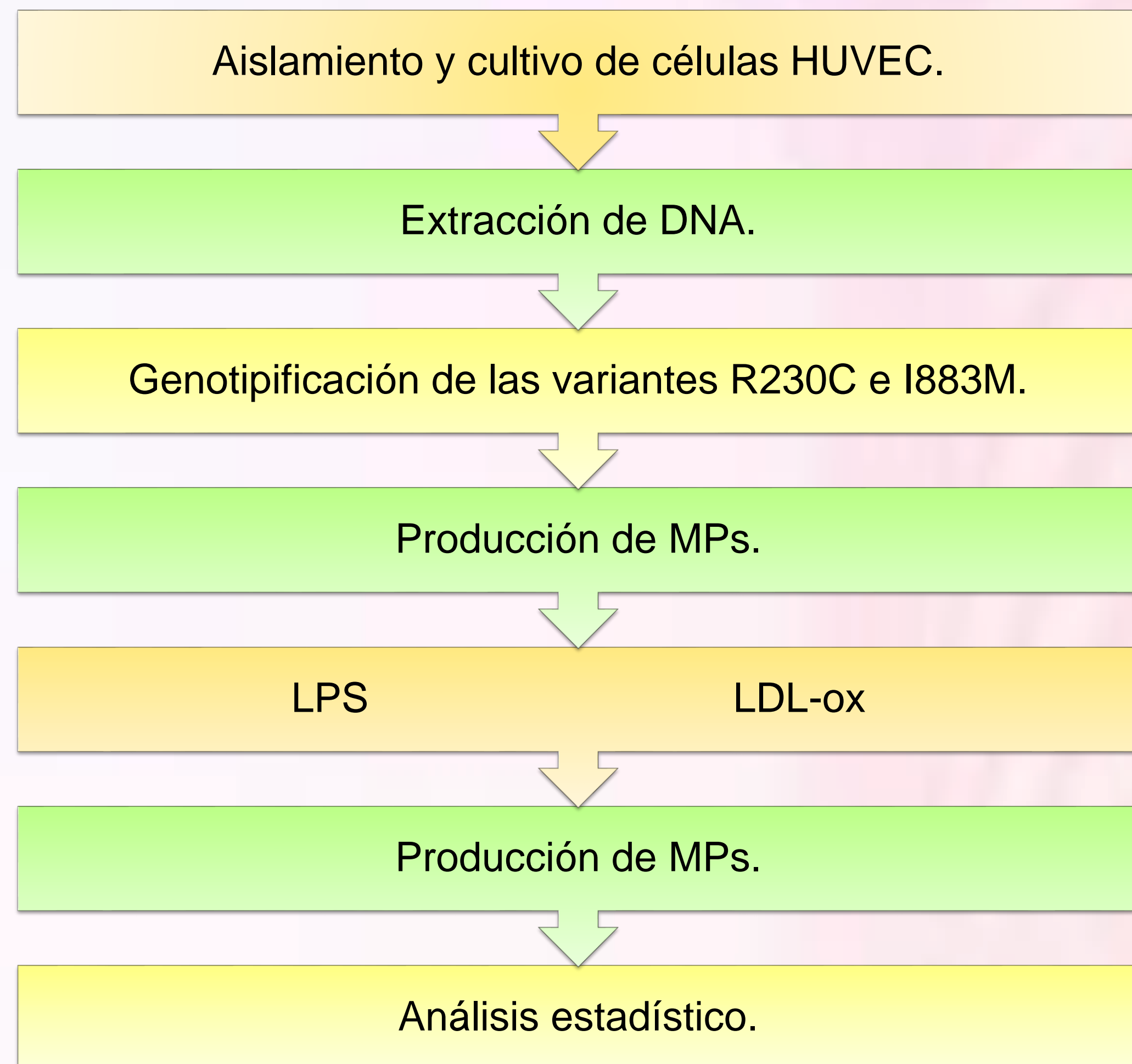
Las MPs son vesículas fosfolipídicas esféricas de 100 a 1000 nm de diámetro, son vectores potentes de información biológica y son protagonistas de una red de comunicación intracelular (1); contienen una amplia variedad de biomoléculas: proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Un evento crucial implicado en la formación de las MPs es la externalización de fosfatidilserina (PS). La distribución asimétrica de la PS es regulada por tres distintos tipos de enzimas; flipasas, flopasas y escramblasas (2). Una proteína que conocemos y que tiene función de flopasa es ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A-1), la cual es un transportador de membrana dependiente de ATP cuya función más estudiada es promover el eflujo de colesterol hacia la apolipoproteína A-I (Apo A-I) para formar lipoproteínas de alta densidad (HDL); su actividad de flopasa la ha implicado en la formación de micropartículas. Se ha reportado que las variantes genéticas de *ABCA1* están asociadas a distintos parámetros metabólicos como los niveles de C-HDL; sin embargo, existe solo un estudio previo que relaciona dos variantes de este gen con los niveles de MPs (3). El estudio del efecto de la variación genética en *ABCA1* sobre la producción de MPs podría ayudar a explicar por qué el efecto de las variantes en *ABCA1* en los niveles séricos de C-HDL y la susceptibilidad a la enfermedad arterial coronaria son independientes (4,5).

OBJETIVO

Analizar el papel de *ABCA1* y su variación genética sobre la formación de micropartículas endoteliales *in vitro* en condiciones basales y en respuesta a estímulos involucrados en la fisiopatología de la aterosclerosis.

METODOLOGÍA

Se colectarán 100 cordones umbilicales del Hospital General de Tláhuac “Dra. Matilde Petra Montoya Lafragua” de bebés cuyas madres hayan cumplido con los criterios de inclusión (mujeres que hayan cursado con un embarazo sano, sin patologías como diabetes gestacional, hipertensión, entre otras) y firmado la carta de consentimiento informado.



RESULTADOS

Se han colectado hasta la fecha 118 cordones, a partir de los cuales se realizó la extracción de HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical humana) y su cultivo; de estos cordones logramos obtener 49 cultivos viables, que alcanzaron el 100% de confluencia (Figura 1).



Figura 1.-Células HUVEC

Se extrajo el DNA de los 47 cultivos de HUVEC mediante el kit Gentra Puregene (QIAGEN). Se evaluó la calidad del DNA obtenido (rendimiento, pureza e integridad). Una vez obtenido el DNA, se procedió a almacenar de 4 a 8 viales con un millón de HUVEC de cada cultivo para la posterior estimulación y medición de la producción de MPs.

Genotipificación de las variantes de *ABCA1*

Se realizó la genotipificación de las variantes R230C e I883M de *ABCA1* mediante PCR en tiempo real, utilizando sondas TaqMan (Applied Biosystems) y un termociclador LightCycler 480 (ROCHE). Para ambos ensayos el valor de calidad mínimo fue de 0.93. Las figuras 2 y 3 muestran las gráficas de discriminación alélica para estas dos variantes.

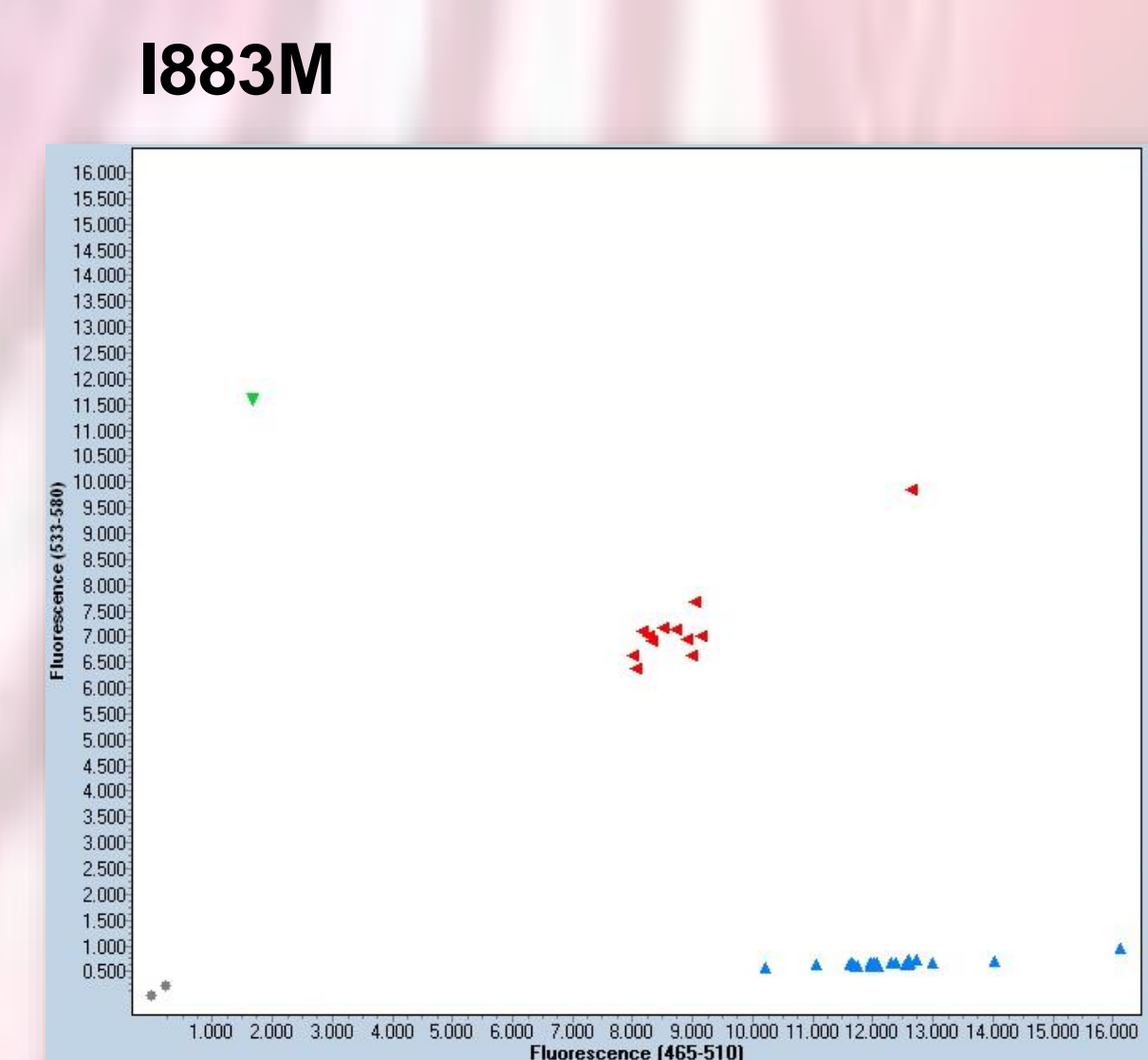


Figura 2.- Gráfica de discriminación alélica de la variante I883M

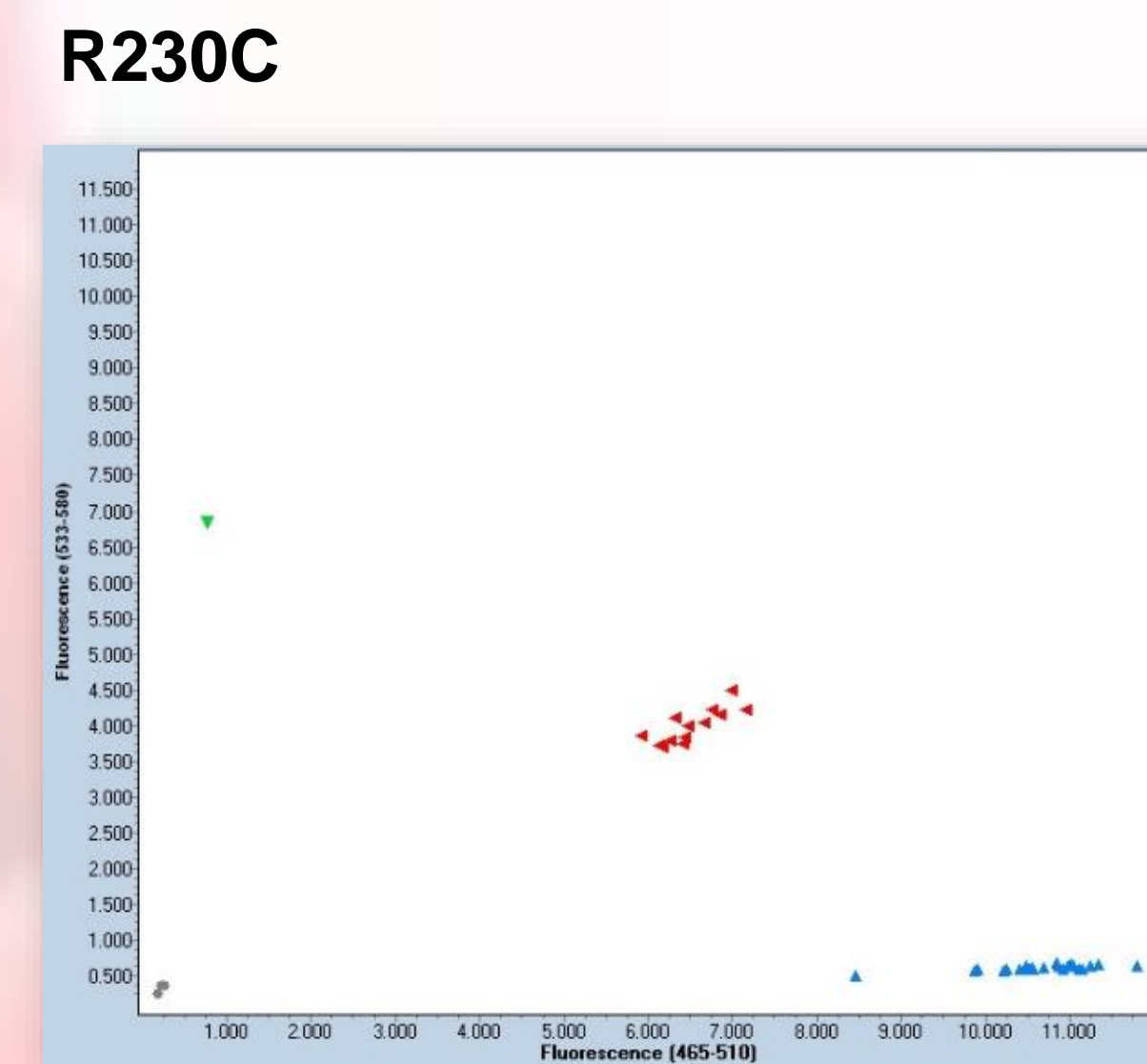


Figura 3.- Gráfica de discriminación alélica de la variante R230C

Estandarización de la cuantificación de MPs mediante citometría de flujo

Se realizó la cartometría de flujo del medio metabolizado (72 hrs) de los cultivos primarios, utilizando medio M-199 suplementado con suero fetal bovino Hyclone (ultracentrifugado), se utilizaron marcadores específicos de MPs endoteliales (Figuras 4-9).

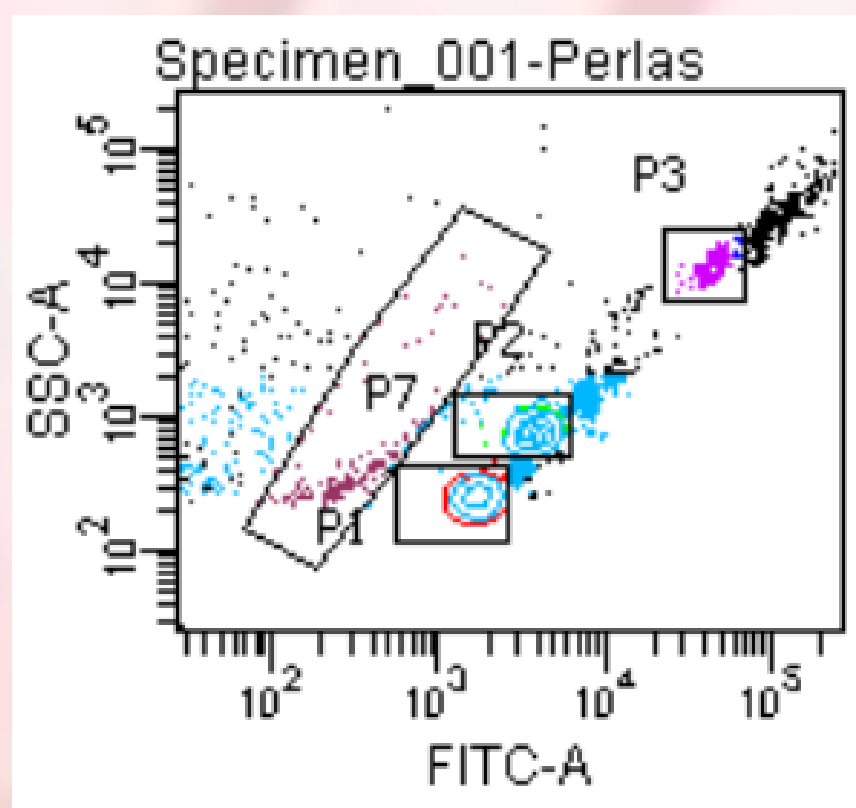


Figura 4.- Dispersión de las Perlas

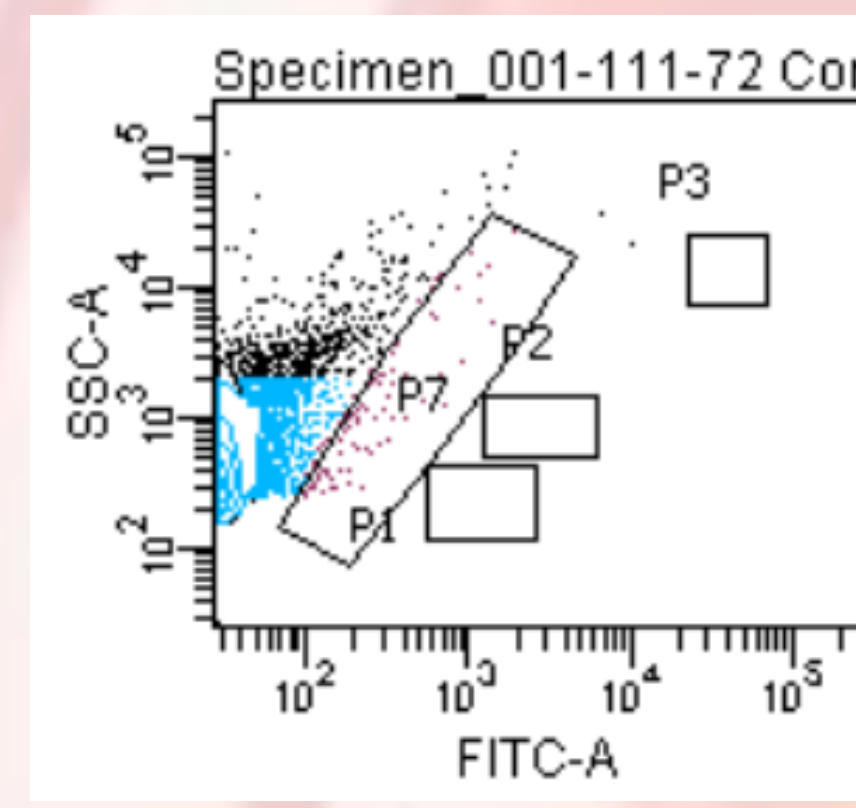


Figura 5.- MPs, Control.

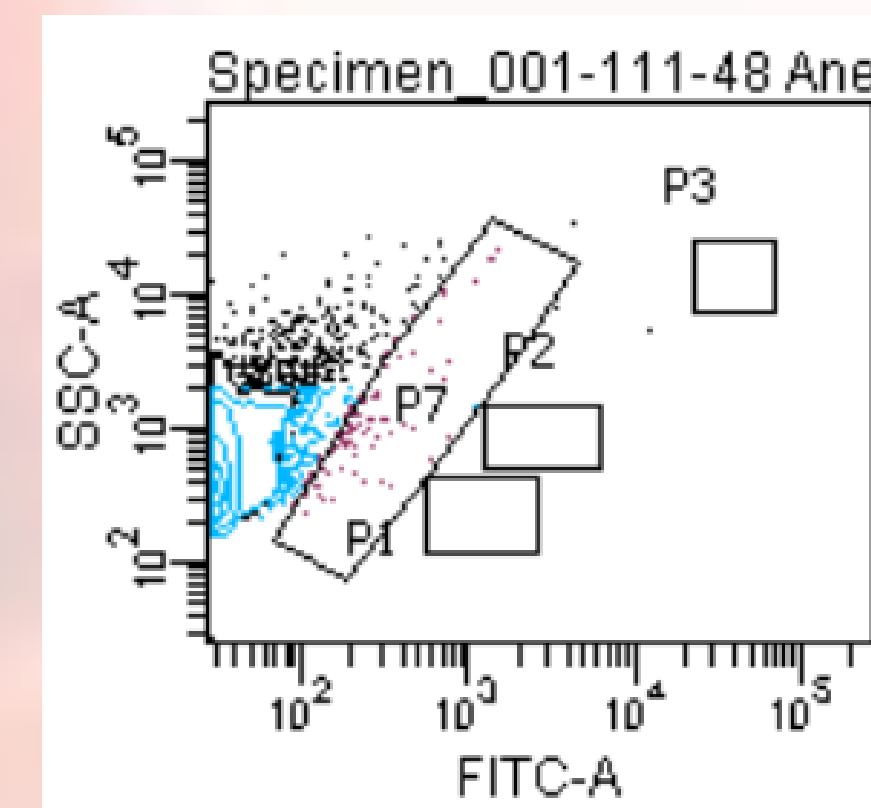


Figura 6.- MPs, Anexina V.

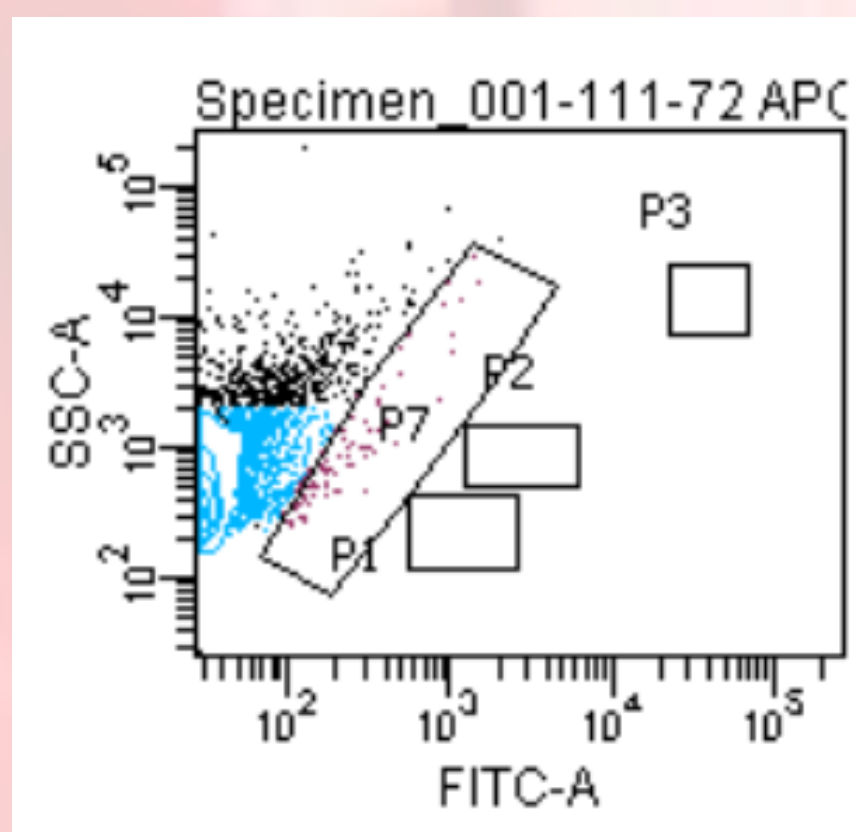


Figura 7.- MPs, APC.

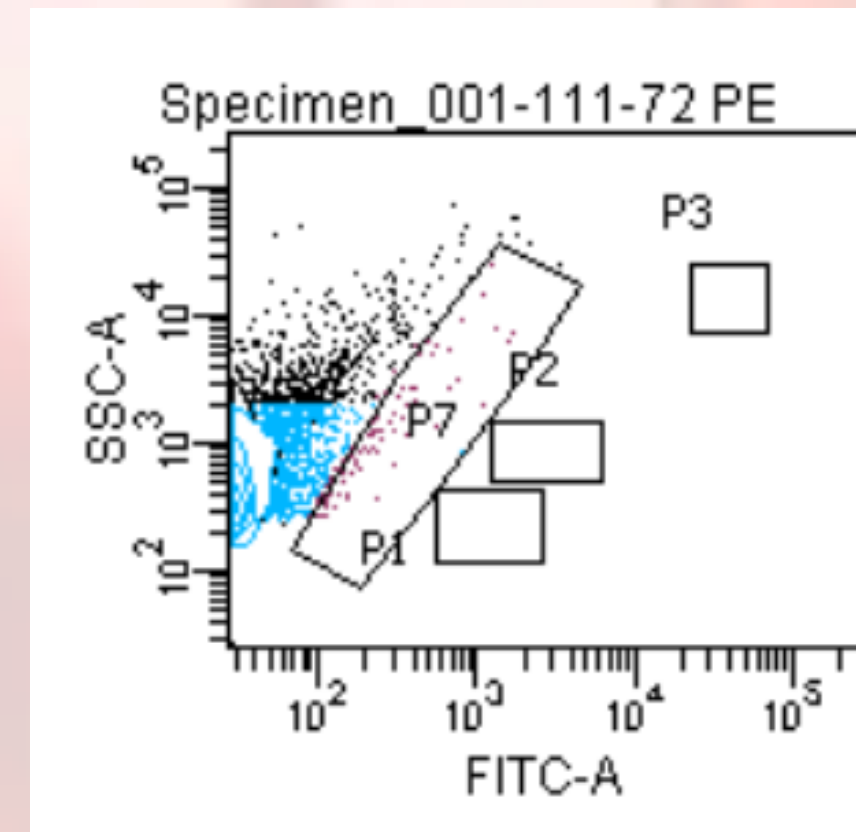


Figura 8.- MPs, PE.

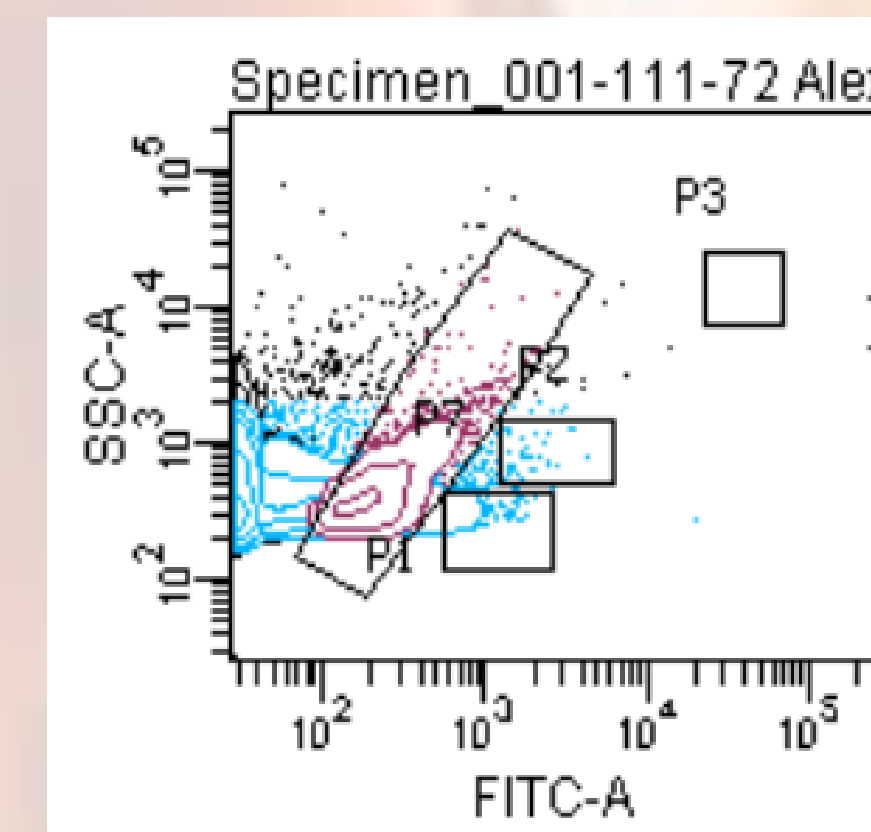


Figura 9.- MPs, Alexa.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos de la genotipificación de los polimorfismos R230C (frecuencia alélica 16%) e I883M (frecuencia alélica 22%) del gen *ABCA1*, concuerdan con los datos ya reportados en población mexicana mestiza. Hemos logrado identificar la presencia de MPs endoteliales mediante citometría de flujo; aún estamos trabajando en la estandarización para mejorar la cuantificación de micropartículas y así continuar con los estímulos aterogénicos (LDL-ox y LPS), así como también a la par continuar recolectando más cordones para aumentar el tamaño de la muestra y llegar al objetivo de 100 cordones.

REFERENCIA

1. Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intracellular information Exchange. Circ Res. 2010;107:1047-57.
2. Burger D, Schock S, Thompson CS, Montezano AC, Hakim AM, et al. Microparticles: biomarkers and beyond. Clin Sci (Lond) 2013;124(7):423-41.
3. Sahu U, Mohapatra BN, Kar SK, Ranjit M. Promoter polymorphisms in the ATP binding cassette transporter gene influence production of cell-derived microparticles and are highly associated with susceptibility to severe malaria in humans. Infect Immun 2013;81:1287-94.
4. Villarreal-Molina T, Posadas-Romero C, Romero-Hidalgo S, Antúnez-Argüelles E, Bautista-Grande A et al. The *ABCA1* Gene R230C Variant Is Associated with Decreased Risk of Premature Coronary Artery Disease: The Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) Study. PLoS One 2012;7(11):e49285.
5. Voight FJ, Peloso GM, Orho-Melander M, Frikke-Schmidt R, Barbalic M, et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomization study. Lancet 2012; 380: 572-80.