



Cinvestav-Monterrey

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD MONTERREY

*Efecto de la acumulación intracelular de lípidos en la síntesis
de agonistas vasodilatadores en células endoteliales*

Tesis que presenta

Ricardo Antonio Corro Hernández

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

Especialidad en Ingeniería y Física Biomédicas

DIRECTO DE LA TESIS

Dr. Bruno Alfonso Escalante Acosta

Apodaca, Nuevo León, mayo 2023

Agradecimientos

A mi madre, mi hermano y mis abuelos que a la distancia han sabido siempre permanecer a mi lado, brindándome su amor, su apoyo y su cariño.

A mi director de tesis el Dr. Bruno A. Escalante Acosta y a Amelia P. Ríos Rodríguez, quienes fueron quienes me guiaron en el laboratorio y me brindaron las herramientas para crecer en el mismo y adquirir los aprendizajes necesarios para poder salir adelante en el desarrollo de mi proyecto.

A mis sinodales los doctores Daniel Paulo Sanchez Herrera, Jesús Santana Solano y Moisés Santillán Zerón que fueron guías y amigos durante el desarrollo de este proyecto. Así mismo a la Dra. Ana María Gámez Méndez que además de sinodal externo, fue una persona fundamental para poder llevar a buen término este proyecto.

A mis profesores del CINVESTAV unidad Monterrey que siempre estuvieron para apoyarme en clase, pero especialmente fuera de las mismas.

A Elisa Villa Martínez y Eduardo Jiménez Cruz, quienes son los más grandes regalos que me dio mi estancia en el CINVESTAV, fueron mis amigos, compañeros, colegas y más que nada fueron el soporte que, me permitió seguir adelante pese a las adversidades que se fueron presentando

A la comunidad del CINVESTAV unidad Monterrey que en su gran mayoría siempre me brindaron un gesto amable y su incondicional ayuda. En particular a Karen Garza Cuéllar, Melissa Sofía Sevilla Zambrano, Jahaira Abigail Córdova Romero, Aidee Mayabel Magdaleno Silva, Cassandra Lisseth Escareño Cardenas, Anna Belén Cervantes, Don Raúl, Don Nabor, Doña Tony y Doña Berta, que además de siempre ayudarme, me brindaron cariño y su amistad.

A mis amigos Karina del Rosario Juárez Navarro, Amaury Pérez Tirado, Gustavo Armando Hernández, Erika Hernández Morales, Maria del Carmen Trejo, Anaí Paola González Ramírez, Verónica Ajelet Vargaz Guadarrama, José Alonso Romero, Brenda Herrada, Jorge Arias del Angel, Oscar A. Aguila Torres, Jorge A. Armenta Valenzuela, Alejandra Nicolás Cruz, Mary Trini García, Mireya Estefany Márquez, Berenice Yolotl Pérez, Alberto Luis Ramirez, Angela Maria Jaramillo, Víctor Manuel Pérez, Osmart Ochoa, Daniel Ortega, C. Fernanda Ramos, Luis Martinez, Danna Oasis López Pérez, Erika Gonzales Arrieta, Cinthia Escobar Jarquín, Teresa J. Hernández Abad, M. Inés Isidro Coxca, Viridiana Juárez Quintero y a la comunidad biomédica. Todos ellos que, a pesar del tiempo, la distancia y un sin número de eventualidades me siguen brindándome su amistad y animándome a seguir adelante.

Al CONACYT por brindarme una beca que me permitió solventar mis gastos durante todo el desarrollo de este proyecto.

Índice

Abstract	5
Resumen	6
Introducción	7
OBESIDAD	7
ÁCIDOS GRASOS	8
GOTAS LIPÍDICAS	10
ENDOTELIO.....	12
ÓXIDO NÍTRICO	14
CALCIO.....	16
Justificación	18
Hipótesis	19
Objetivo General	19
Objetivos particulares	19
Metodología	20
CULTIVO CELULAR.....	20
TRATAMIENTO CON LÍPIDOS	20
TINCIÓN DE LÍPIDOS.....	21
MEDICION DE CALCIO INTRACELULAR.....	22
BLOQUEADORES DE LA SEÑAL DE CALCIO	23
MEDICIÓN DE OXIDO NITRICO.....	25
Resultados	27
LÍPIDOS INTRACELULARES	27
CALCIO INTRACELULAR	28
BLOQUEO DE LA FOSFOLIPASA C.....	29
BLOQUEO DEL RECEPTOR IP ₃	29
BLOQUEO DEL RECEPTOR DE RYANODINA	30
RECUPERACIÓN DE LA SEÑAL DE CALCIO	30
BLOQUEO DEL INTERCAMBIADO Na ⁺ /Ca ²⁺	31
BLOQUEO DE LA SERCA.....	31
PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO	32
Discusión	33
AMPLITUD DE LA SEÑAL DE CALCIO	33

RECUPERACIÓN DE LA SEÑAL DE CALCIO	34
POSIBLES MECANISMOS IMPLICADOS	34
PRODUCCIÓN DE NO.....	35
Conclusión	35
Perspectivas	36
Bibliografía	37

Abstract

People with obesity have high levels of fatty acids in blood, this leads to a greater intracellular accumulation of lipids in structures known as lipid droplets (LDs), which are intracellular organelles whose main function is fat storage. In addition, they have been associated with multiple functions, such as participating in cell signaling, regulating cell metabolism, and even immune functions. However, there are several studies that report its increase in various pathologies, prevailing doubt about the role that LDs play in cells. Because endothelial cells are the first barrier that fatty acids must cross to get from the blood to the rest of the body's tissues, it makes them particularly more vulnerable to experiencing the effects of fat accumulation inside them. One way to assess whether these cells have been damaged is to analyze the mechanisms that regulate cytosolic calcium (Ca^{2+}), since one of its most important functions is the production of nitric oxide (NO) and it is calcium that is responsible for regulating its production.

In this work we explored the effect of exposing endothelial cells to high levels of oleic acid (OA) and analyzed how the Ca^{2+} signal induced by acetylcholine (ACh) was modified in these cells. As well as the effect of this treatment on the production of NO in these cells. Finding that by subjecting these cells to treatment with OA, the accumulation of intracellular lipids increased, we also observed a lower amplitude in the calcium response and by blocking different participants in the pathway, we noticed changes in their respective responses, in the same way we analyzed the production no. However, in this case we did not find significant differences.

Resumen

Las personas con obesidad presentan niveles elevados de ácidos grasos en sangre, esto conduce a una mayor acumulación intracelular de lípidos en estructuras conocidas como gotitas lipídicas (LDs), las cuales son organelos intracelulares cuya principal función es el almacenamiento de grasas. Además, se les ha asociado a múltiples funciones, como participar en la señalización celular, regular el metabolismo celular e incluso se le ha asociado con funciones inmunitarias. Sin embargo, hay varios estudios que reportan su aumento en varias patologías, prevaleciendo la duda sobre el papel que juegan las LDs en las células. Debido a que las células endoteliales son la primera barrera que deben atravesar los ácidos grasos para llegar de la sangre al resto de tejidos del cuerpo, las vuelve particularmente más vulnerables a experimentar los efectos de la acumulación de grasas en su interior. Una manera de evaluar si estas células se han dañado es analizar los mecanismos que regulan el calcio citosólico (Ca^{2+}) ya que una de sus funciones más importantes es la producción de óxido nítrico (NO) y es el calcio quien se encarga de regular su producción.

En este trabajo exploramos el efecto de exponer células endoteliales a niveles elevados de ácido oleico (OA) y analizamos como se modificaba la señal de Ca^{2+} inducida por acetilcolina (ACh) en estas células. Así como el efecto de este tratamiento en la producción de NO en estas células. Encontrando que al someter estas células al tratamiento con OA, aumentaba la acumulación de lípidos intracelulares, También observamos una menor amplitud en la repuesta de calcio y al bloquear diferentes participantes de la vía, notamos cambios en sus respectivas respuestas, de igual forma analizamos la producción de NO. Sin embargo, en este caso no encontramos diferencias significativas.

Introducción

OBESIDAD

La obesidad es un serio problema de salud pública que se extiende por todo el mundo. En la actualidad es considerada una pandemia que afecta a por lo menos 502 millones de personas, y este número va en aumento^{1,2}. En México, de acuerdo a los resultados de la encuesta nacional de salud y nutrición realizada en 2018, el 75.2 % de los mexicanos adultos de 20 años en adelante, presentan sobrepeso y obesidad.³ Dado este panorama, resulta de sumo interés entender las afectaciones que se pueden suscitar alrededor de esta enfermedad.

La organización mundial de salud (OMS) define la obesidad como una acumulación excesiva de grasa corporal, que pone en riesgo la salud de las personas que la padecen⁴. Esto incluye tanto la salud física como la psicosocial de los individuos¹. El índice de masa corporal (IMC) es una razón matemática que asocia la masa y la talla de un individuo y sirve como herramienta para determinar si un individuo presenta sobrepeso u obesidad¹. El IMC se calcula dividiendo el peso corporal del paciente entre el valor de su altura elevado al cuadrado. En promedio, se considera que personas con valores de IMC por arriba de 25, tienen sobrepeso y los que alcanzan valores por arriba de 30, se dice que tienen obesidad. Sin embargo, el médico es quien realizando una exploración más detallada del paciente para diagnosticar obesidad. Otros factores que se consideran en el diagnóstico de obesidad son que el paciente presenten una altura elevada o mucha masa muscular^{1,2,5}.

Una de las grandes preocupaciones de la obesidad, es ser un factor de riesgo para el desarrollo de diferentes patologías como la diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias, asma, apnea del sueño, diferentes tipos de cáncer y además, está fuertemente asociada con las enfermedades del sistema cardiovascular^{2,6}, siendo estas últimas la principal causa de mortalidad en nuestro país⁷.

A partir de las investigaciones realizadas para elucidar los mecanismos por los cuales la obesidad es capaz de producir estas afectaciones patológicas, uno de los principales agentes causales que se destacan son los ácidos grasos⁸. Se ha observado que las personas con obesidad suelen presentar niveles elevados de ácidos grasos en sangre, esto a su vez trae como consecuencia el desarrollo de resistencia a la insulina, hiperglucemia, alto estrés oxidativo y problemas inflamatorios^{6,8}.

ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos son biomoléculas de naturaleza lipídica, por lo cual presentan características propias de los lípidos, como su composición orgánica y su hidrofobicidad. De manera general los diferentes tipos de lípidos desarrollan diversas funciones en nuestro organismo, siendo componentes estructurales de las membranas biológicas, mensajeros químicos, sirven como mecanismo de transporte y almacenamiento de energía en las células, también tienen funciones mecánicas como cubierta de diversos órganos, e incluso participan del reconocimiento en la superficie de las células, así como en la especificidad e inmunidad de los tejidos^{8,9}.

En particular los ácidos grasos son ácidos carboxílicos con una cadena hidrocarbonada alifática y se caracterizan por poseer un grupo carboxilo terminal en su estructura. Estos pueden presentar uno o más dobles enlaces en su cadena hidrocarbonada, y en escasas ocasiones enlaces triples, a cada doble enlace en su estructura se les llama insaturaciones, en caso de no presentarse ningún doble enlace, se dice que el ácido graso se encuentra saturado. Los ácidos grasos difieren entre sí, por la longitud de su cadena y por la cantidad de dobles enlaces que posea^{8,9}.

Los ácidos grasos pueden ser producidos por nuestro organismo, pero en su mayoría son obtenidos a través de la alimentación. Su proceso de absorción

se inicia en el intestino delgado, donde las lipasas intestinales hidrolizan los triglicéridos, que son un tipo de lípido constituido por tres ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol. La hidrólisis de los triglicéridos conduce a la liberación de ácidos grasos y monoacilglicerol, estas moléculas lipídicas son emulsificadas por los ácidos biliares, colesterol, esteroides de plantas, y vitaminas solubles en grasas, formando micelas que son transportadas al interior de las células intestinales (enterocitos). Los ácidos grasos pueden atravesar la membrana celular de los enterocitos a través de transporte pasivo, pero también se conocen transportadores específicos como el Clúster de diferenciación 36 (CD36) y la Proteína de transporte de ácidos grasos 4 (FATP4). Una vez que se encuentra dentro de los enterocitos, las enzimas Acil-CoA diacilglicerol aciltransferasa 1 y 2 (DGAT1, DGAT2), y Monoacilglicerol aciltransferasa (MGAT) se encargan de sintetizar triglicéridos a partir de los ácidos grasos absorbidos. En el retículo endoplásmico de los enterocitos, los triglicéridos y el colesterol son empaquetados en quilomicrones, que son grandes estructuras que en su superficie presentan diferentes apolipoproteínas (B-48, C-II, C-III), las cuales son proteínas de unión a lípidos que son responsables del transporte de los lípidos en la sangre. Los quilomicrones son secretados al sistema linfático y transportados al sistema circulatorio a través del conducto torácico. Una vez en el torrente sanguíneo, los quilomicrones son expuestos a la acción de las lipasas en los tejidos. Esto permite que se liberen ácidos grasos, los que, por ejemplo, pueden ser utilizados por las células musculares y los adipocitos para almacenar y producir energía, en este proceso también se producen remanentes de quilomicrones que son transportados al hígado para ser metabolizados. Una porción de los ácidos grasos liberados se unen a albumina y pueden ser transportados a otros tejidos^{9,10}.

En el interior de las células, los ácidos grasos son transportados a las mitocondrias para poder ser metabolizados a través de un proceso llamado beta oxidación, con la cual, las células pueden obtener energía en forma de adenosín trifosfato (ATP). Los ácidos grasos también se pueden almacenar en

grandes cantidades en las células en forma de triglicéridos, dentro de estructuras llamadas gotas lipídicas^{9,11}.

GOTAS LIPÍDICAS

Las gotas lipídicas (LDs) son organelos citoplasmáticos con forma esférica, cuya principal función es almacenar lípidos (**Figura 1**)¹². Están constituidas por una monocapa anfipática de fosfolípidos que recubre su superficie; los principales fosfolípidos que la componen son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol, su interior es un compartimento hidrofóbico en el que se almacenan grasas neutras, mayormente triglicéridos y ésteres de colesterol^{13,14,15}. Estos organelos se han identificado en la mayoría de las células, pero la cantidad y tamaño cambian de un tipo de célula a otro. Con respecto al tamaño, se pueden encontrar LDs pequeñas de diámetros de entre 100 a 200 nm, o grandes con diámetros superiores de hasta 100 μm , como las que presentan los adipocitos que incluso llenan su citoplasma^{15,16}.

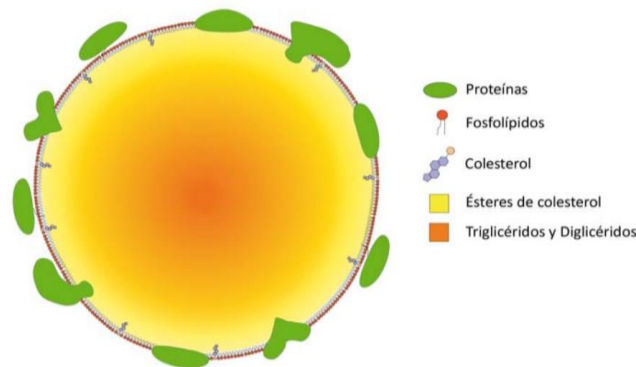


Figura 1. Gota lipídica. En el siguiente esquema se muestra una representación de una gota lipídica y sus componentes principales. La figura fue tomada y modificada de Fiol y col. (2014).

Las LDs se forman a partir de la membrana del retículo endoplasmático (RE)^{17,18}, en un proceso que se encuentra regulado por el reclutamiento de moléculas que promueven el metabolismo de ácidos grasos como Acil-CoA diacilglicerol aciltransferasa 1 y 2 (DGAT1, DGAT2), acil-CoA:colesterol aciltransferasa 1 y 2 (ACAT1, ACAT2)^{15,16}. Si bien, la principal función de las LDs es la de almacén para acumular lípidos, también se les ha ligado a otros procesos celulares muy diversos, como la unión e inactivación de proteínas, transporte intracelular de lípidos, síntesis de membranas, generación de energía, degradación de proteínas y señalización intracelular^{14,15}.

La presencia de LDs forma parte de un buen funcionamiento en el organismo, ya que esta acumulación de lípidos en el interior celular previenen el daño por lipotoxicidad^{13,17,19}. Sin embargo, también se les ha implicado en procesos patológicos, incluyendo la inflamación y el cáncer²⁰. Así mismo se ha visto que son de relevancia en la replicación viral y en algunas infecciones paracitarias¹⁴.

Por otro lado, se ha reportado que los pacientes con enfermedades metabólicas como la obesidad tienen altos niveles plasmáticos de ácidos grasos, así como mayor presencia de LDs intracelulares^{21,15,22,23}, lo cual también representan un riesgo para su salud, ya que existe evidencia que la acumulación intracelular de lípidos en exceso, puede modificar el correcto funcionamiento de las células del organismo^{23,24}.

Entre las células que se encuentran más expuestas a sufrir afectaciones como resultado a la exposición a elevadas concentraciones de ácidos grasos son las células endoteliales (EC), ya que estas forman el endotelio, que es una monocapa de células que recubre la pared del lumen de los vasos sanguíneos y que es la primera barrera que tienen que atravesar los ácidos grasos que viajan en la sangre para llegar al resto de tejidos de nuestro organismo, y se ha visto que los niveles elevados de ácidos grasos plasmáticos alteran el funcionamiento adecuado de estas células²¹.

ENDOTELIO

El endotelio es una monocapa de EC con un grosor menor a $1\ \mu\text{m}$ que recubren la superficie del sistema cardiovascular, el cual está constituido por el corazón y los vasos sanguíneos^{8,25}. El corazón es un órgano muscular autónomo formado por cuatro cámaras que, cumple la función de doble bomba y que se encarga de propulsar la sangre por la red de vasos. De manera muy simplificada, se puede considerar a los vasos sanguíneos como una tubería que conecta a todo nuestro cuerpo. Los vasos de mayor diámetro que conectan al corazón con los diversos órganos del cuerpo son conocidos como arterias, en las cuales su pared está formada por tres capas de tejidos, con diferentes características. La capa más interna es el endotelio, seguida por la capa media, que está formada por músculo liso vascular, y finalmente la capa más externa es la adventicia; que es una capa de tejido conjuntivo que recubre el exterior de los vasos (**Figura 2**). Al salir del corazón y proseguir su camino por el organismo, las arterias van disminuyendo su calibre, cuando alcanzan un grosor menor a $100\ \mu\text{m}$ se les conoce como arteriolas. Además de disminuir su calibre, los vasos también van disminuyendo el grosor de la capa media, y cuando su grosor llega a aproximadamente los $10\ \mu\text{m}$, los vasos ya no presentan músculo liso ni adventicia, quedando únicamente la monocapa del endotelio, a estos vasos se les llama capilares, en los capilares se da el intercambio de gases y nutrientes que son transportados por la sangre hacia los tejidos. Una vez que los capilares dejan los diferentes tejidos y emprenden el camino de regreso al corazón, en ese trayecto van aumentando su calibre y las capas de músculo que la constituyen, se convierten en vénulas y posteriormente forman las venas, llevando la sangre de regreso de los órganos al corazón. Este circuito es conocido como la circulación mayor, que se encarga de transportar sangre oxigenada a los tejidos y llevarla de regreso al corazón para su re-oxigenación. La circulación menor comprende un circuito que viaja del corazón a los pulmones, donde ocurre el intercambio gaseoso que permite la oxigenación de la sangre. Esta sangre rica en oxígeno es regresada al corazón, para incorporarse a la circulación mayor^{26,27}.

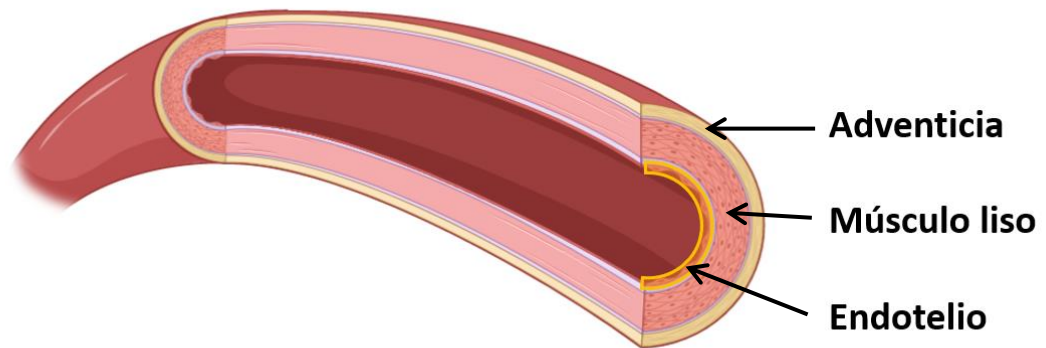


Figura 2. Vaso sanguíneo. En el siguiente esquema se ilustra las tres capas que componen los vasos sanguíneos, que son la adventicia, el músculo liso y el endotelio. Este último se encuentra resaltado en anaranjado. La imagen fue tomada y modificada de BioRender (<https://biorender.com>).

Los vasos sanguíneos se pueden clasificar según su tamaño en dos categorías, macrovasculatura y microvasculatura. La macrovasculatura está constituida por las arterias y las venas; su papel principal es transportar la sangre a los diferentes órganos del cuerpo. La microvasculatura en cambio, engloba arteriolas, venas y capilares; se encarga de regular la perfusión local de los tejidos, la resistencia vascular periférica y el flujo sanguíneo²⁵.

Dentro del sistema vascular, el endotelio tiene un papel clave, ya que es quien se encarga de regular la hemostasia, la respuesta a la inflamación, el tono vascular, el flujo sanguíneo, la permeabilidad vascular y es donde se lleva a cabo el intercambio de oxígeno y nutrientes con los tejidos^{8,14,28}.

El endotelio regula el tono vascular a través de un fino balance de secreción de moléculas con actividad vasoconstrictora, por ejemplo, angiotensina II, endotelina-1 y tromboxano A₂, o con actividad vasodilatadora, por ejemplo, óxido nítrico (NO), prostaglandina I₂, bradicinina y el factor hiperpolarizante dependiente del endotelio (EDHF). Este balance es crítico para un correcto funcionamiento del sistema cardiovascular, ya que la presión sanguínea está dada por la relación que existe entre el gasto cardíaco y la resistencia vascular periférica que a su vez está determinada por el tono vascular^{8,26,29}.

Sin embargo, se ha observado que la exposición a niveles elevados de ácidos grasos pueden romper este equilibrio, ya que se ha reportado que afectan la producción de NO de las células endoteliales^{30,31}, así también, la mayoría de los trabajos reportan que los individuos con obesidad presentan una disminución en la producción de este importante vasodilatador, teniendo como consecuencia el aumento en la presión sanguínea e incrementando el riesgo de padecer hipertensión^{32,33,34}.

ÓXIDO NÍTRICO

Los primeros en reportar la relevancia del endotelio en la regulación de la respuesta vascular fueron Furchgott y Zawadzki³⁵, quienes descubrieron que, al remover el endotelio de anillos de aorta torácica de conejo y montarlos en un set de contracción vascular, la respuesta vasodilatadora mediada por acetilcolina (ACh) se perdía. De esta manera ellos señalaron que el endotelio debía estar secretando una sustancia que era necesaria para inducir la vasodilación en respuesta a la aplicación de ACh, esta sustancia sería conocida años más tarde como óxido nítrico (NO).³¹

La producción de NO se lleva a cabo por una enzima intracelular llamada óxido nítrico sintasa (NOS). Existen tres isoformas de esta enzima (NOS1, NOS2, NOS3), de éstas NOS1 y NOS3 se consideran de expresión constitutiva, en cambio NOS2 se expresa muy poco en las células y en general es necesario que se estimule su transcripción, es por ello que se le conoce como la NOS inducible (iNOS)^{36,37}. Las tres funcionan transformando L-arginina en L-citrulina, en presencia de oxígeno y cofactores, liberando de esta reacción NO^{31,36}.

La NOS responsable de la producción de NO en las células endoteliales es la NOS3, por lo que también es llamada NOS endotelial (eNOS)^{36,38}. Los mecanismos para inducir la producción de NO en el endotelio se pueden agrupar en dos vías, una dependiente de calcio (Ca^{2+}) y otra independiente^{31,39}.

Una vez que el NO es producido, este puede difundir por la membrana celular y actuar sobre la enzima guanilato ciclasa soluble (SGC), la cual se activa y produce guanosín monofosfato cíclico (GMP_c) a partir de guanosina trifosfato (GTP), el aumento en la concentración intracelular de GMP_c, activa la proteína quinasa G (PKG), la cual fosforila varias proteínas, desencadenando la relajación del músculo liso vascular^{31,38,40}.

Sin embargo, los niveles elevados de NO pueden llegar a ser tóxicos para las células, debido a que el NO da lugar a varias especies reactivas de oxígeno (ROS)⁴¹, esto a través de la acción de enzimas oxidativas, entre las que se encuentra el complejo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, xantina oxidasa (XO), ciclooxigenasa (COX), lipoxigenasas (LOX), mieloperoxidasas (MPO), citocromo P450 monooxigenasa, NOS desacopladas y peroxidasas, estas transforman el NO y producen elevadas concentraciones de aniones superóxido⁸. En condiciones fisiológicas esto se evita gracias a la acción de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa, que se encargan de catalizar la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno³¹. Sin embargo, se ha observado que, en personas con obesidad, la función de la NADPH oxidasa se ve dañada, dando lugar a un aumento de NADPH y por consiguiente de los niveles de ROS³¹. Este aumento en ROS da lugar a un incremento en el estrés oxidativo en las células endoteliales y en conjunto a la inflamación, que son los principales mecanismo de patogenicidad asociados a la afección conocida como disfunción endotelial^{8,42}.

La disfunción endotelial es una condición en la que se rompe el balance entre sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras que secreta el endotelio. Se define como una reducción en la producción y/o viabilidad del NO, elevada producción de endotelina-1 y un aumento en las moléculas de adhesión celular^{8,33}. Se ha descrito que esta alteración precede al desarrollo de aterosclerosis y aunque sus orígenes no han sido completamente elucidados, se considera que es una respuesta a factores de riesgo cardiovascular, como

pueden ser el aumento en ROS y/o los cambios en la homeostasis del calcio, ente otros^{33,42,43}.

CALCIO

En el endotelio, la producción de NO que depende de Ca^{2+} , pero se puede activar en respuesta al esfuerzo cortante de la sangre que fluye sobre la superficie celular o al estímulo con alguna molécula vasoactiva, por ejemplo ACh (**Figura 3**), bradicinina, histamina, etc^{44,38}. Estos estímulos activan receptores de membrana acoplados a proteínas G, los cuales a su vez inducen la activación de la fosfolipasa C (PLC). La PLC produce inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3) y diacilglicerol, el aumento en la concentración de IP_3 activa los receptores a IP_3 (IP_3R) presentes en el retículo endoplásmico (RE), estos provocan la liberación de Ca^{2+} del mismo, incrementa la concentración citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)^{31,45}. El RE contiene alrededor del 75% de las reservas de Ca^{2+} intracelular en estas células^{31,45}. El incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ provoca la activación de proteínas sensibles a Ca^{2+} como los receptores rianodínicos (RyR) que se encuentran en el RE y al ser activados liberan más Ca^{2+} del RE, del mismo modo, la elevada $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promueve la unión del Ca^{2+} con calmodulina, esto genera un complejo conocido como Ca^{2+} -calmodulina (CaM), el cual se une a NOS y esto promueve la producción de NO^{38,45}.

Las células no toleran mantener niveles elevados de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por mucho tiempo, ya que esto les resulta tóxico. Por lo que su concentración en el citosol se encuentra fuertemente regulada. Los principales mecanismos encargados de mantener reducida la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ son la bomba de Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA), el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NXC) y la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA), cuando los valores de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumentan a valores por encima del 1 $\mu\text{mol/L}$, estos mecanismos se activan para regresar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a sus valores basales (100 nmol/L)⁴⁶.

Por otra parte, la producción de NO se puede inducir por una vía independiente de calcio, cuyos estímulos pueden ser la aplicación de un esfuerzo cortante, insulina o adipoquinas. Estos estímulos inducen la fosforilación de eNOS a través de la enzima fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y posteriormente de la proteína serina/treonina quinasa B (Akt) lo cual aumenta la producción de NO^{31,39}.

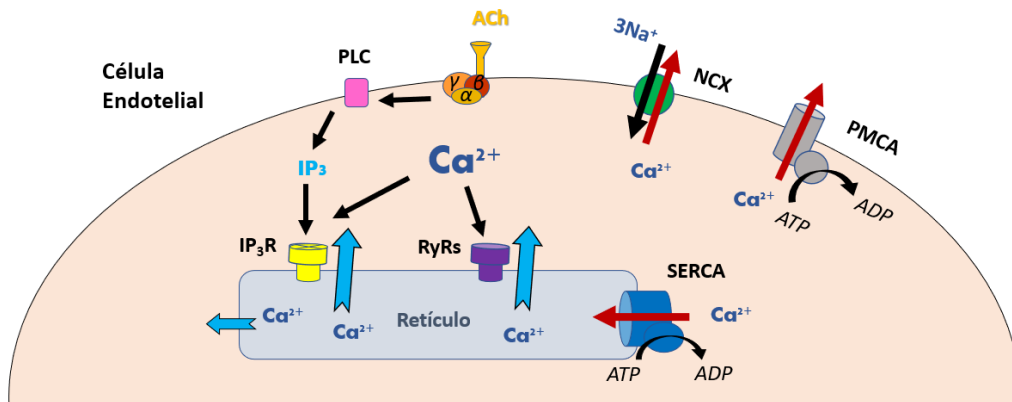


Figura 3. Vía de señalización del Ca^{2+} . En este esquema se ilustra los principales mecanismos que regulan la concentración de calcio intracelular en las células endoteliales al estimular por ACh.

Justificación

Debido a que el endotelio vascular se encuentra anatómicamente interpuesto entre el espacio vascular y los tejidos, cualquier molécula que quiera pasar de la sangre hacia algún órgano, primero deben atravesar el endotelio²⁵. Esto incluye por supuesto a los ácidos grasos, los cuales al ser interiorizados inducen la formación de LDs, las cuales se han visto asociadas a diversas patologías. Sin embargo aún existe discrepancia acerca de su papel en dichas patologías, pues se ha visto que la acumulación intracelular afecta al buen funcionamiento de las células²⁴. Pero también hay trabajos que sugieren que estas estructuras cumplen un papel protector¹³. Dado esto, resulta de gran interés entender de qué manera estas estructuras afectan el funcionamiento adecuado de las células endoteliales. Y ya que el principal indicador de la disfunción endotelial es la disminución en la producción de NO⁴³, y que a su vez este mecanismo depende fuertemente de la regulación de las concentraciones de $[Ca^{2+}]_i$, consideramos que una manera de evaluar si estas estructuras están resultando dañinas, es evaluar si modifican la regulación de este segundo mensajero, así como la producción de NO.

Hipótesis

La acumulación intracelular de lípidos en forma de gotas altera los mecanismos de regulación del calcio en células endoteliales, modificando la síntesis de agonistas vasodilatadores.

Objetivo General

Demostrar que la acumulación intracelular de lípidos altera los mecanismos de regulación del calcio y esto repercute en la síntesis de agonistas vasodilatadores de las células endoteliales.

Objetivos particulares

1. Demostrar que el exceso de ácidos grasos induce la acumulación intracelular de lípidos en células endoteliales.
2. Evaluar el efecto de la acumulación de lípidos sobre la respuesta de calcio en células endoteliales inducida por un agonista fisiológico.
3. Identificar los mecanismos de regulación del calcio que se ven alterados como resultado de la acumulación intracelular de lípidos en células endoteliales.
4. Evaluar la producción de agonistas vasodilatadores en células endoteliales tratadas con OA.

Metodología

CULTIVO CELULAR

Se trabajó con la línea celular bEnd.3 que, son células endoteliales de la microvasculatura de cerebro de ratón. Estas células fueron cultivadas en frascos de cultivo celular de 25 cm² (CORNING) con medio DMEM (gibco) al 10% de suero fetal bovino (marca gibco) y al 1% de Penicilina-Estreptomicina (gibco) como antibiótico. Las células se mantuvieron a 37°C con CO₂ al 5% en una incubadora (Thermo electron) y fueron manipuladas dentro de una campana de flujo laminar vertical (Lumistell). Los materiales usados fueron esterilizados usando calor húmedo en autoclave (Wisd laboratory instruments).

TRATAMIENTO CON LÍPIDOS

Para inducir la formación de LDs en las células endoteliales, se aplicó un tratamiento con lípidos, que consistió en exponer los cultivos a medio adicionado con ácido oleico (OA) a 0.5 mM, por 24 hrs. El OA fue previamente preparado diluyendo ácido oleico a 1.77 M en etanol (CAYMAN CHEMICAL COMPANY) en solución Tris (SIGMA-ALDRICH) 10 mM con albumina de suero bovino (marca SIGMA-ALDRICH) al 10%, con un pH de 8, a una concentración de 12 mM, se prepararon varias alícuotas y se almacenaron a 4°C.

El primer paso del tratamiento consistió en resembrar las células endoteliales, provenientes de frascos de cultivo, estas fueron despegadas usando Tripsina-EDTA (gibco) al 0.25%, después fueron contadas utilizando una cámara de Neubauer (marca MARIENFELD) para poder sembrar un inóculo de 30 mil células en cubreobjetos redondos (Fisher Scientific) de 12 mm de diámetro, los cuales fueron previamente incubados por 40 min con gelatina (J.T.Baker) al 0.1% y se colocaron en placas para cultivo celular (marca CORNING) de 24 pozos. Dichas células se dejaron crecer hasta alcanzar una confluencia del 90% (3 días), una vez alcanzada la confluencia se procedió a cambiar el

medio, a un grupo se le sustituyó por medio con OA y a otro con medio con albumina (sin OA).

TINCIÓN DE LÍPIDOS

Habiendo pasados las 24 horas del tratamiento con OA, se retiró el medio de ambos grupos y se realizaron dos lavados con buffer de fosfatos (PBS): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄ a un pH de 7.4 ajustado con HCl. Los lavados consistieron en aplicar y retirar PBS en los pozos donde se encuentran los vidrios con las células endoteliales. Posterior a los lavados, se retiró el PBS y se sustituyó por 300 µL de Formalina al 10% (SIGMA-ALDRICH) dejando que incuben por 15 min. Concluido este tiempo, se realizaron dos lavados con PBS. Después de lavar, se aplicaron 490 µL de PBS y se agregaron 10 µL de BODIPY (Invitrogen) preparado en PBS a una concentración de 200 µg/mL, para obtener una concentración final de 4 µg/mL. Los pozos con BODIPY se dejaron incubar por 15 min. Una vez finalizados los 15 min, se realizaron 4 lavados para quitar los residuos de BODIPY. Finalmente, los vidrios fueron extraídos de la placa y se colocaron en un portaobjetos en el que previamente se había colocado una gota (≈10 µL) de Vectashield (Vector Laboratories); los vidrios se colocaron de tal manera que las células queden en contacto con el Vectashield.

Para proteger la preparación de quedarse sin líquido, los vidrios en el cubreobjetos fueron sellados usando esmalte de uñas (IM Natural). Una vez que la preparación fue sellada, se colocó en un microscopio invertido (Nikon, modelo ECLIPSE TE200-U) y fue observada a través de un objetivo de 20x (marca Nikon, modelo ELWD) con una apertura numérica de 0.45. Después de haber enfocado la muestra, se le hizo incidir una longitud de onda de 480 nm proveniente de una lámpara de mercurio (EXCELITAS, modelo X-Cite 120) con un filtro de excitación azul (CHROMA, 480 ± 20 nm) y se capturó la imagen usando una cámara monocromática (WATEC, modelo WAT-902H) a una resolución de 640x480 pixeles con un tiempo de exposición de 80 ms. Con

ayuda de un algoritmo desarrollado en Matlab, se sumó la intensidad luminosa de las imágenes tomadas.

MEDICION DE CALCIO INTRACELULAR

Para medir los cambios en la respuesta de calcio, se sembraron 30 mil células en cubreobjetos circulares, y al alcanzar una confluencia del 90% se procedió a aplicar el tratamiento con lípidos. Después de las 24 hr de la exposición a OA, los vidrios se colocaron en una cámara especial, diseñada para fijar los vidrios y mantenerlos sumergidos en solución fisiológica. Además, la cámara permite observar las células en un microscopio invertido (**Figura 4**). Inmediatamente después de haber colocado los vidrios en la cámara, se realizaron dos lavados con solución fisiológica SE: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 5 mM Glucosa, 1 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂ con un pH de 7.4 ajustado con NaOH. Posterior a esto, las células se dejaron incubar por una hora en solución de carga, que es SE con Fluo-4 AM (Invitrogen) al 0.005% y plurónico al 0.06%. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se realizaron cinco lavados con SE libre de calcio (Ca Ø): 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 5 mM Glucosa, 1 mM MgCl₂, 2 mM EGTA con un pH de 7.4 ajustado con NaOH. Las células se mantuvieron en Ca Ø por el resto del experimento. Después del lavado, las células se colocaron en el microscopio invertido previamente descrito y se observaron con un objetivo de 20x, usando como fuente de luz una lámpara de mercurio, incidiendo con una longitud de onda de 480 ± 20 nm, que es a la que absorbe el Fluo-4 unido a calcio. Habiendo enfocado se procedió a grabar video a una velocidad de captura de 10 Hz. La resolución usada fue de 640x480 pixeles y se utilizó un tiempo de exposición de un segundo. Después de 30 segundos de grabación, que sirvieron como basal, se procedió a aplicar Acetilcolina (ACh) preparada en Ca Ø, la concentración final de ACh en el baño fue de 100 µM, y se continuó grabando video hasta conseguir 6 minutos de video.

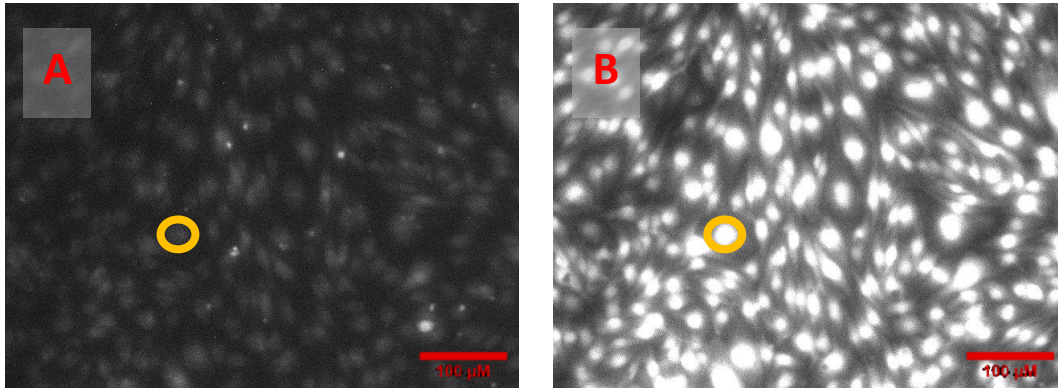


Figura 4. Señal de Ca^{2+} en respuesta a ACh. En esta figura se muestran las células endoteliales antes (A) y después de ser estimuladas con ACh (100 μM). En un círculo amarillo se señala una célula, que permite observar cómo aumenta su fluorescencia con la aplicación.

BLOQUEADORES DE LA SEÑAL DE CALCIO

Para evaluar el papel de algunos de los componentes de la vía de señalización de calcio, la maniobra farmacológica que se utilizó fue bloquearlos. Los elementos de la vía de calcio que se bloquearon fueron la PLC, los IP_3R , los RyR, el NXC y la SERCA. Estas mediciones se relazaron en el grupo tratado con OA y con su respectivo control.

Fosfolipasa C (PLC)

El procedimiento para bloquear la PLC consistió en que, una vez que las células se incubaron con la solución de carga y se lavaran con $\text{Ca } \emptyset$, se dejaron incubar por 10 min con U73122 (SIGMA-ALDRICH), un inhibidor selectivo de la PLC, preparado a una concentración de 2 μm en $\text{Ca } \emptyset$. Después de haber incubado las células, se montaron en el microscopio y se procedió a tomar video. Inicialmente se tomaron 30 segundos de grabación de basal, se procedió a aplicar ACh preparada en $\text{Ca } \emptyset + \text{U73122}$, la concentración final de ACh en el baño fue de 100 μM , y se continuó grabando video por 6 minutos.

Receptor IP₃ (IP₃R)

Para bloquear los IP₃R las células, después de ser incubadas con la solución de carga y lavadas con Ca Ø, se incubaron por 10 min con 2-APB (marca SIGMA-ALDRICH) a una concentración de 20 µM, preparado en Ca Ø. Después de haber transcurrido el tiempo de incubación, las células se montaron en el microscopio y se procedió a tomar video. Se grabaron 30 segundos de basal y después se procedió a aplicar ACh preparada en Ca Ø + 2-APB, la concentración final de ACh en el baño fue de 100 µM. Se continuó grabando video por 6 minutos.

Receptor rianodina (RyR)

En el caso de los RyR, las células, después de ser incubadas con la solución de carga y lavadas con Ca Ø, se incubaron por 10 min con rianodina (marca SIGMA-ALDRICH) a una concentración de 100 µM, preparado en Ca Ø. Después de haber transcurrido el tiempo de incubación, las células se montaron en el microscopio y se procedió a tomar video. Se grabaron 30 segundos de basal y después se procedió a aplicar ACh preparada en Ca Ø + 2-APB, la concentración final de ACh en el baño fue de 100 µM. Se continuó grabando por 6 minutos.

Intercambiador sodio / calcio (NXC)

El bloqueo del NXC requirió que después de incubar las células con la solución de carga, fueran sometidas a cinco lavados con solución libre de sodio (Na Ø). Para ello se preparó Ca Ø sustituyendo el sodio con N-Metil-D-glucamina (NMDG) a 145 mM (marca SIGMA-ALDRICH), para mantener las condiciones osmóticas. Se dejaron incubar por 10 min en Na Ø. Después de haber incubado las células, se montaron en el microscopio y se procedió a tomar video. Inicialmente se tomaron 30 segundos de grabación de basal, se procedió a aplicar ACh preparada en Na Ø, la concentración final de ACh en

el baño fue de 100 μM , y se continuó grabando video hasta conseguir 6 minutos de video.

Bomba de Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA)

Finalmente, el bloqueo de SERCA se logró utilizando Tapsigargina (marca SIGMA-ALDRICH), preparada en $\text{Ca } \emptyset$. El procedimiento consistió en que, una vez que las células se incubaron con la solución de carga y se lavaran con $\text{Ca } \emptyset$, se montaron en el microscopio y se procedió a tomar video. Inicialmente se tomaron 30 segundos de grabación de basal, cumplido este lapso, se retiró el medio y se reemplazó por $\text{Ca } \emptyset$ con tapsigargina a 1 μM , se dejó actuar por 10 segundos e inmediatamente se aplicó ACh preparada en $\text{Ca } \emptyset$ + tapsigargina. La concentración final de ACh en el baño fue de 100 μM , y se continuó grabando video por 6 minutos.

Análisis de la señal de calcio

Una vez obtenidos los registros de calcio, se normalizaron en función de la línea basal. Los datos analizados fueron la amplitud observada en la espiga del incremento de calcio y el tiempo que tarda en llegar al 50% de la reducción de la señal. Para ello se desarrolló un algoritmo en Matlab, que permitió realizar estas mediciones de manera automatizada a partir de los videos registrados.

MEDICIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

Para medir la producción de NO, se sembraron células en vidrios y una vez alcanzado el 90% de confluencia se aplicó el tratamiento con lípidos antes descrito. Después de las 24 horas, se retiró el medio y se reemplazó con DAF-2 al 5 μM disuelto en SE, se dejaron incubar por 30 min a 37°C. Concluido el tiempo, se aplicó ACh para obtener una concentración final de 100 μM ,

nuevamente se dejó incubar, por 15 min. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS y se incubaron con 300 μ L de formalina al 10% por 15 min. Enseguida se realizaron dos lavados con PBS y se aplicaron 500 μ L de SE con 0.5 μ L de Hoechst diluidos en este. Se incubaron por 30 min y posteriormente se realizaron 4 lavados con PBS.

Después de estos pasos los vidrios fueron extraídos de la placa y se colocaron en un portaobjetos con una gota de Vectashield, los vidrios se colocaron de tal manera que las células quedaron en contacto con el Vectashield. Para proteger la preparación de quedarse sin líquido, los vidrios en el cubreobjetos fueron sellados usando esmalte de uñas. Una vez que la preparación fue sellada, se colocó en un microscopio confocal (marca Leica TCS SP5, Mannheim, Germany) y fue observada a través de un objetivo de 60x con una apertura numérica de 0.45. Se usó 490 nm como longitud de onda para excitar las muestras y 515 nm como longitud de onda de emisión. Se adquirió a una resolución de 1024x1024. Para cuantificar la fluorescencia observada en cada grupo, se desarrolló un algoritmo en Matlab, se sumó la intensidad luminosa de las imágenes tomadas.

Resultados

LÍPIDOS INTRACELULARES

Al comparar las imágenes obtenidas entre las células control y las células tratadas con OA, podemos observar que existe mayor acumulación de lípidos en las células tratadas, pudiéndose observar puntos blancos en el grupo tratado, que corresponden a las LDs y, por el contrario, el grupo control no los presenta (**Figura 5**). Al cuantificar la fluorescencia observada en las imágenes, notamos que las células tratadas con OA presentan un aumento en la presencia de lípidos intracelulares con respecto al grupo control. Con esto pudimos dar paso a analizar como la presencia de estas, pudiera estar afectando la señal de calcio.

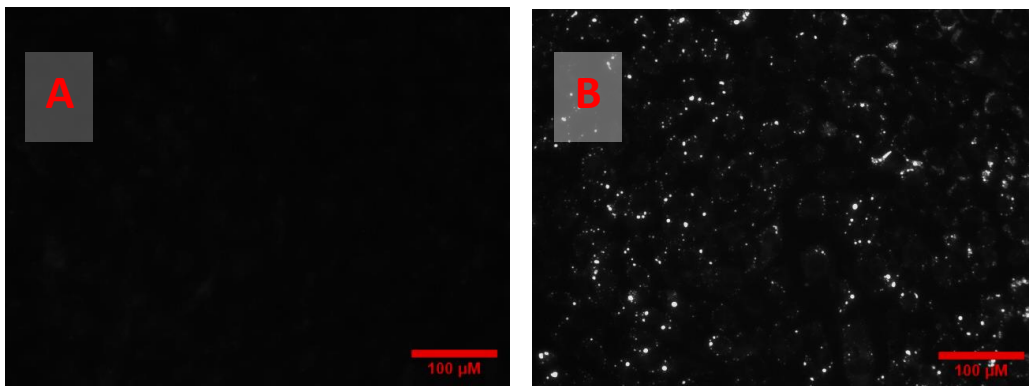


Figura 5. Tinción de Lípidos. En la figura A se muestra una fotografía tomada en fluorescencia del grupo control, y en la figura B se muestra el grupo tratado con OA.

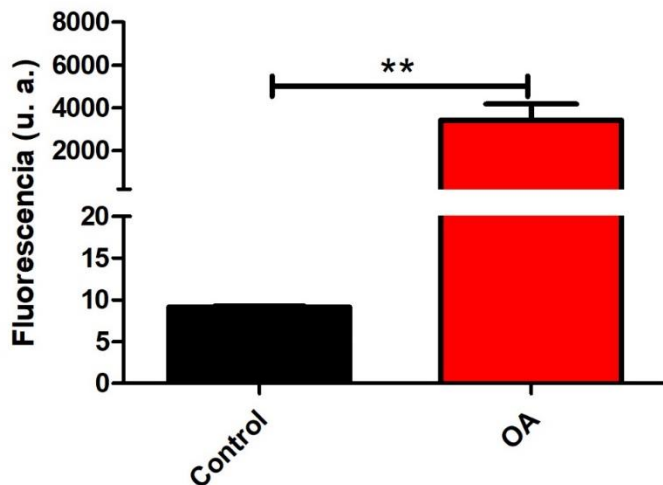


Figura 6. Medición de lípidos. En esta figura se muestra la cuantificación de la fluorescencia en las fotos de la tinción de lípidos en el grupo control (negro) y el grupo tratado con OA (rojo). ** $p < 0.01 \pm SEM$.

CALCIO INTRACELULAR

Al comparar la respuesta de Ca^{2+} inducida por ACh ($100 \mu\text{M}$), pudimos observar que las células tratadas con OA, presentan un trazo más pequeño que el grupo control (**Figura 7**). Encontramos que la amplitud del grupo control fue de 2.6 ± 0.17 u. a. y la del grupo tratado fue de 1.6 ± 0.06 u. a. (**Figura 8**).

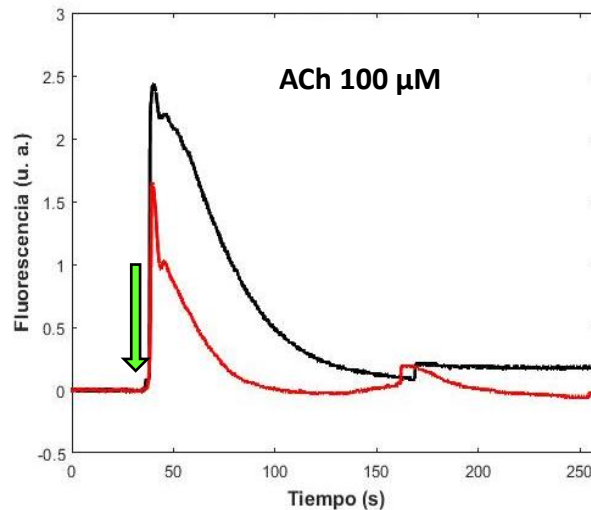


Figura 7. Respuesta de Ca^{2+} inducida por ACh. En esta figura se muestran los registros típicos de la respuesta a ACh $100 \mu\text{M}$ del grupo control (línea negra) y el grupo tratado con OA (línea roja). Con una flecha se ilustra el momento de la aplicación de ACh.

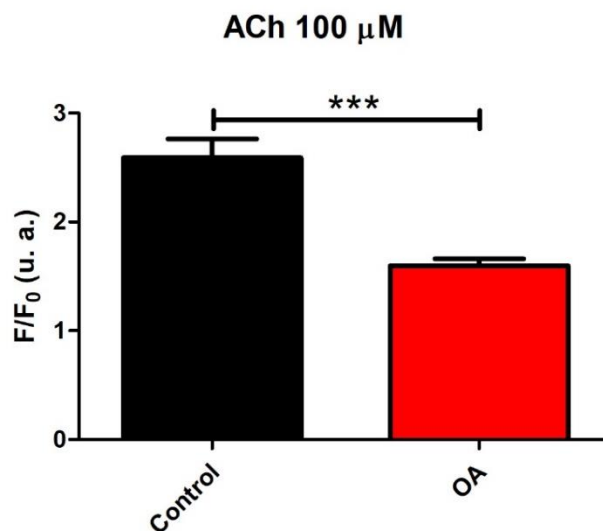


Figura 8. Medición de respuesta de Ca^{2+} . En esta figura se muestra la amplitud de la respuesta inducida con $100 \mu\text{M}$ de ACh en el grupo control (negro) y el grupo tratado con OA (rojo). *** $p < 0.001$, $n = 5$. \pm SEM.

BLOQUEO DE LA FOSFOLIPASA C

Cuando bloqueemos parcialmente la PLC con U73122, observamos que la amplitud en ambos grupos disminuyó a 0.82 ± 0.02 u. a. el grupo con solo el bloqueador y el grupo tratado con OA y el bloqueador a 0.86 ± 0.12 u. a. Al comparar con una prueba t-student, no observamos diferencias (**Figura 9**).

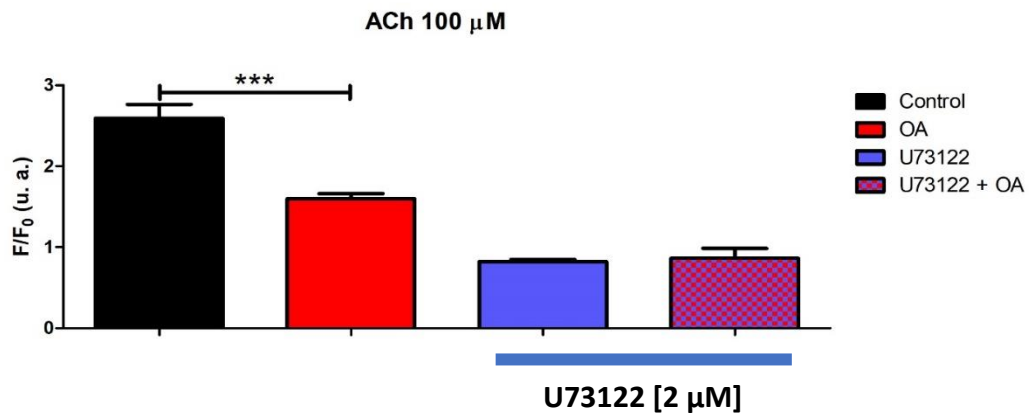


Figura 5. Efecto de bloquear la PLC. En esta figura se muestra la amplitud de la respuesta inducida con ACh 100 μ M en el grupo control (negro), el grupo tratado con OA (rojo), el grupo con U73233 2 μ M (azul) y el grupo con OA y U73122 (cuadros azules y rojos). *** $p < 0.001$, $n = 5$. \pm SEM.

BLOQUEO DEL RECEPTOR IP₃

Los IP₃R se bloquearon parcialmente. En este caso la amplitud disminuyó a 1.36 ± 0.09 u. a. en el grupo con 2-APB y el grupo tratado con OA y 2-APB a 1.34 ± 0.03 u. a. Al comparar ambos grupos con una prueba t-student, no observamos diferencias significativas (**Figura 10**).

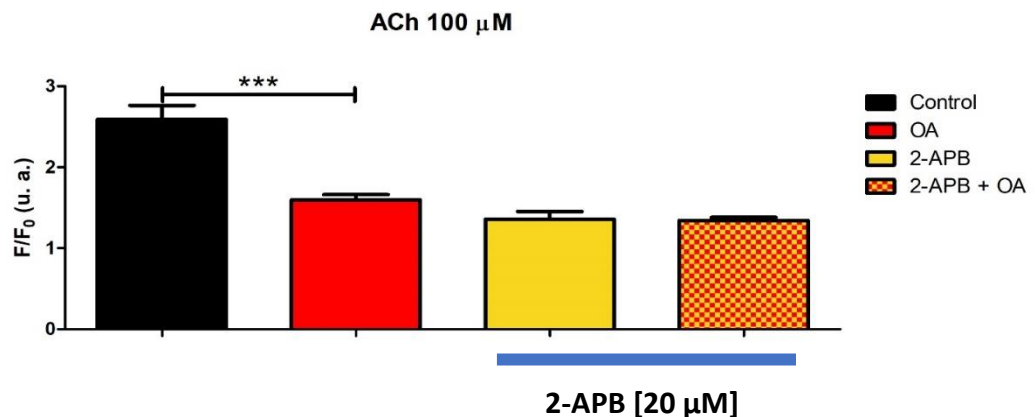


Figura 6. Efecto de bloquear los IP₃R. En esta figura se muestra la amplitud de la respuesta inducida con ACh 100 μ M en el grupo control (negro), el grupo tratado con OA (rojo), el grupo con 2-APB 20 μ M (amarillo) y el grupo con OA y 2-APB (cuadros amarillos y rojos). *** $p < 0.001$, $n = 5$. \pm SEM.

BLOQUEO DEL RECEPTOR DE RYANODINA

En el caso de los RyR, observamos que, al bloquear este receptor, la amplitud de la señal de Ca^{2+} en respuesta a ACh ($100 \mu\text{M}$) de ambos grupos disminuye, pasando a 1.4 ± 0.21 u. a. con solo rianodina y a 1.57 ± 0.25 u. a. el grupo tratado con OA y rianodina. Al comparar ambos grupos utilizando una prueba t-student, no observamos diferencias (**Figura 11**).

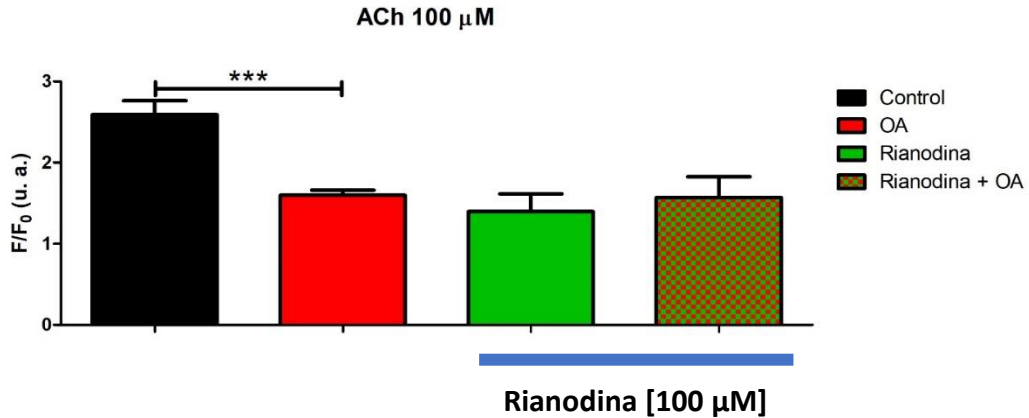


Figura 7. Efecto de bloquear los RyR. En esta figura se muestra la amplitud de la respuesta inducida con ACh $100 \mu\text{M}$ en el grupo control (negro), el grupo tratado con OA (rojo), el grupo con rianodina $100 \mu\text{M}$ (verde) y el grupo con OA y rianodina (cuadros verdes y rojos). *** $p < 0.001$, $n = 5$. \pm SEM.

RECUPERACIÓN DE LA SEÑAL DE CALCIO

Para evaluar los cambios en la recuperación de los niveles basales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, después de la estimulación con ACh ($100 \mu\text{M}$), analizamos el tiempo que le regresan al 50% (T50) del valor de la amplitud. Observamos que el tiempo que

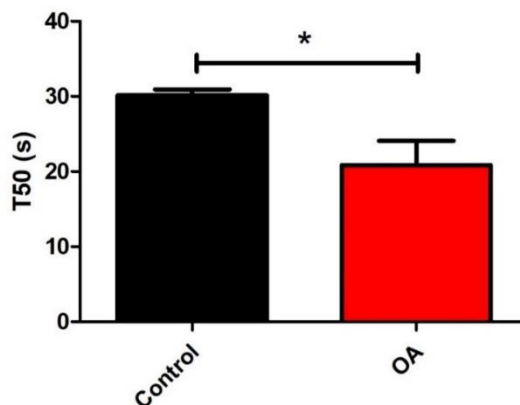


Figura 8. Recuperación de la señal de Ca^{2+} . En esta figura se muestra el T50 del grupo control (negro) y del grupo tratado con OA (rojo). * $p < 0.05$, $n = 5$. \pm SEM.

le toma al grupo control es 30.14 ± 0.76 s y 20.86 ± 3.23 s al grupo tratado con OA (**Figura 12**).

BLOQUEO DEL INTERCAMBIADO $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

Al bloquear la participación del NXC, aumentó el tiempo que le toma a ambos grupos alcanzar el T50. El grupo con $\text{Na } \emptyset$ y el grupo con $\text{Na } \emptyset$ y OA a 0.86 ± 0.12 u. a. Comparando la T50, las diferencias se conservan (**Figura 13**).

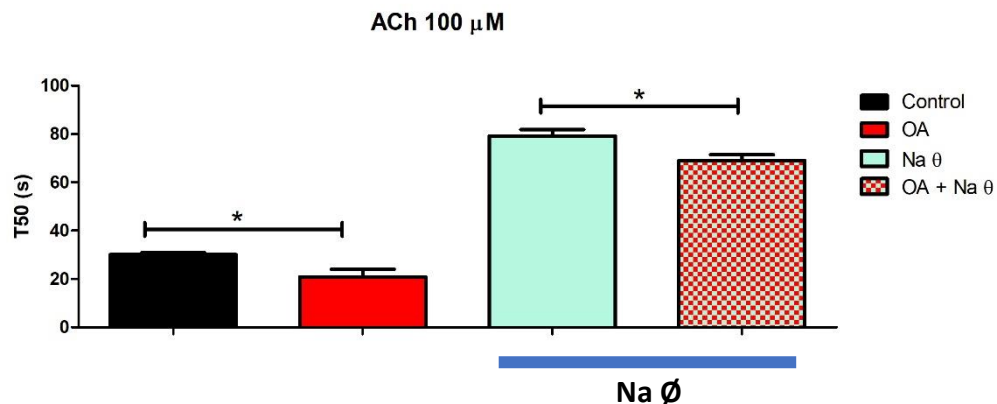


Figura 9. Efecto de bloquear el NXC. En esta figura se muestra el T50 después de la aplicación de ACh $100 \mu\text{M}$ del grupo control (negro), el grupo tratado con OA (rojo), el grupo con rianodina $100 \mu\text{M}$ (cian) y el grupo con OA y rianodina (cuadros cian y rojos). * $p < 0.05$, $n = 5$. $\pm\text{SEM}$.

BLOQUEO DE LA SERCA

Para observar la participación de SERCA en la recuperación, la bloqueamos con tapsigargina ($1 \mu\text{M}$). Se observó que ambos grupos tardan más en alcanzar la T50, el grupo solo con tapsigargina tardó 55.21 ± 8.35 u. a., mientras que el tratado con OA 52.96 ± 9.94 u. a. Al compararlos utilizando una prueba t-student, no observamos diferencias significativas (**Figura 14**).

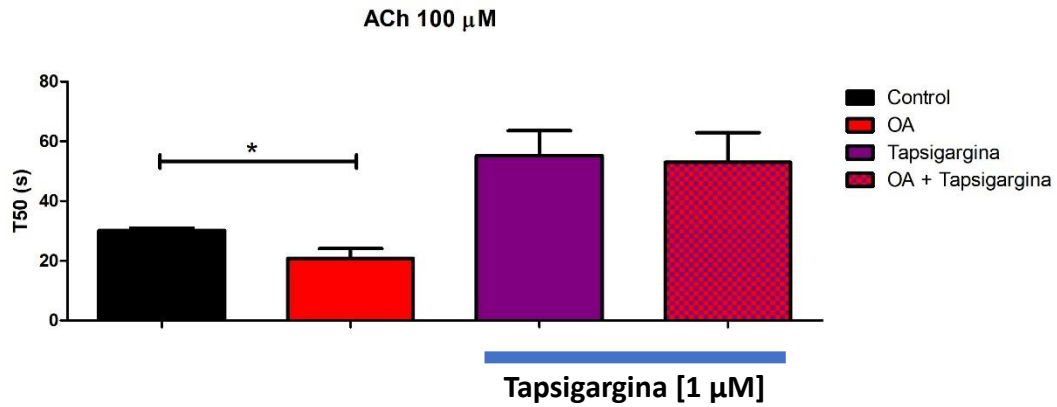


Figura 10. Efecto de bloquear la SERCA. En esta figura se muestra el T50 después de la aplicación de 100 μ M de ACh del grupo control (negro), el grupo tratado con OA (rojo), el grupo con tapsigargina 100 μ M (morado) y el grupo con OA y tapsigargina (cuadros morados y rojos). * $p < 0.05$, $n = 5$. \pm SEM.

PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

Al comparar las imágenes de fluorescencia obtenidas con el marcado de NO, DAF-2, se observa un aumento en la producción de NO en las células con LDs al compararlas con el grupo control (**Figura 15**). Sin embargo, al cuantificar la fluorescencia de cada grupo, no se encuentran diferencias significativas (**Figura 16**).

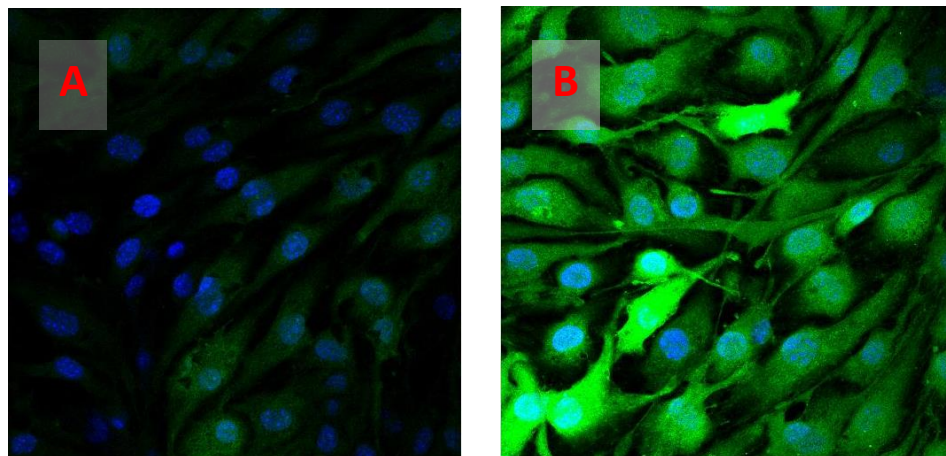


Figura 11. Tinción con DAF-2. En la figura A se muestra una fotografía tomada en fluorescencia del grupo control, y en la figura B se muestra el grupo tratado con OA, en ambos casos las células fueron estimuladas con ACh (100 μ M).

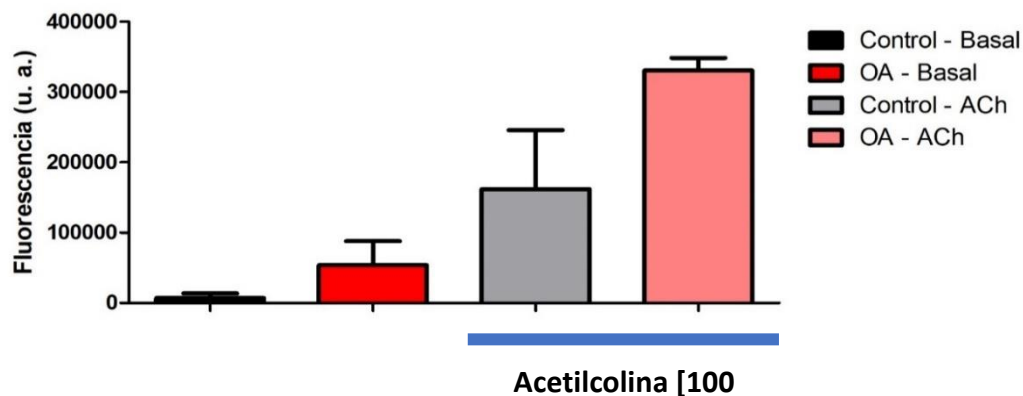


Figura 12. Medición del NO. En esta figura se muestra la fluorescencia en la basal del grupo control (negro), en la basal del grupo tratado con OA (rojo), en el grupo con ACh (100 μ M) en gris y en el grupo con OA y ACh (100 μ M) en rosado, $n = 3$. \pm SEM.

Discusión

AMPLITUD DE LA SEÑAL DE CALCIO

Los cambios en la amplitud nos sugieren que la incubación con ácido oleico y la formación de las LDs están modificando los mecanismos que regulan los niveles de calcio intracelular. Por lo que, al bloquear la vía del IP₃ inducida por la estimulación con ACh, podemos notar que las amplitudes se igualan. Esto sugiere que, tanto los IP₃R, los RyR y/o la PLC se ven afectadas por la presencia de LDs. Esta disminución en la amplitud de la señal inducida con ACh pudiera considerarse una afectación ya que el calcio es responsable de regular varias funciones vitales en las células, como la producción de NO, la reproducción celular, la apoptosis, etc. Sin embargo, hay reportes que indican que el aumento de [Ca²⁺]_i podría causar alteraciones como disminución en la autofagia en las células, alteración presente en personas con obesidad⁴⁷. Desde esta perspectiva, la disminución en la señal de calcio, pudiera ser un mecanismo para prevenir el aumento en la autofagia, que podría conducir a un mal funcionamiento de las células, sumado a los reportes que sugieren un papel protector por parte de las LDs¹³. Lo cual contrasta con los trabajos que

han reportado la relación entre la acumulación de LDs y alteraciones en el Ca^{+2} en las células endoteliales ³⁰.

RECUPERACIÓN DE LA SEÑAL DE CALCIO

El hecho de que se mantuvieran las diferencias observadas en la T50 al bloquear al NXC nos hace pensar que este mecanismo no fue afectado por la presencia de las LDs, por ello bloqueamos la SERCA y al observar que se perdían las diferencias entre ambos grupos, suponemos que su participación resultaba importante en el aumento en la reducción de la T50 en el grupo tratado. El aumento en la actividad en esta bomba podría explicar los cambios en el tiempo de la caída.

POSIBLES MECANISMOS IMPLICADOS

Elucidar el o los mecanismos implicados en estos cambios en la regulación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, aun requerirá la exploración de otros mecanismos y vías que escapan a los alcances de este trabajo. Uno de estos mecanismos puede ser la inflamación.

La inflamación es una respuesta a diferentes estímulos lesivos para el sistema, entre estos se encuentran los niveles elevados de ácidos grasos en sangre¹⁶, los cuales se ha visto que pueden inducir una respuesta inflamatoria en el endotelio. Hay trabajos que sugieren que las LDs son parte de la respuesta inflamatoria de las células endoteliales^{14,48}. Por otro lado, se ha reportado que en células endoteliales se encuentra presente un receptor acoplado a proteínas G que responde a ácidos grasos (GPR40 o FFR1). El cual induce un aumento en $[\text{Ca}^{2+}]_i$, a través de la activación de la vía del IP3, y se ha visto que OA es capaz de activarlo⁴⁹, este tratamiento podría estar induciendo una sobre estimulación de esta vía y provocar por ende una desensibilización.

PRODUCCIÓN DE NO

Se ha demostrado que la exposición de células endoteliales a concentraciones elevadas de ácidos grasos disminuye su producción de NO^{8,30,33}. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que no hay cambios en la producción de este vasodilatador. Esto pudiera deberse a las diferencias propias de cada trabajo, por ejemplo, los tiempos de incubación, las concentraciones de OA o los métodos de detección de NO. Por otro lado, hay que señalar que el número de experimentos realizados en este trabajo es menor en comparación a otros trabajos, hecho que nos hace cuestionar si los resultados observados en la producción de NO pudieran conducir a un resultado diferente al aumentar el número de experimentos. También hay que tener en cuenta que este tejido presenta una gran heterogeneidad, ya que va cambiando dependiendo de la vasculatura de la cual provenga este endotelio²⁵, es por ellos que habría que tomar con mucha cautela los resultados alusivos a la medición de NO. Obviando esto último, en individuos con obesidad se ha visto que puede presentarse una afectación en los mecanismo que regulan el calcio, sin que esto se vea reflejado en cambios en la producción de la eNOS, pero en estos trabajos reportan que la expresión de iNOS aumenta, incrementando la producción de NO hasta alcanzar a producirlo en niveles tóxicos⁴¹. Sin embargo, los resultados en la producción de NO presentado en este trabajo resultan polémico ya que los cambios en los niveles de Ca²⁺ se han asociación con la inflamación que se ha reportado disminuye la producción de NO^{8,33}.

Conclusión

La acumulación intracelular de lípidos en forma de gotas altera los mecanismos de regulación del calcio, sin modificar la producción del NO en células endoteliales.

Perspectivas

EXPLORAR LA RELACIÓN QUE EXISTE ENTRE LA EXPOSICIÓN A OA Y LA FUNCIÓN DE LA SERCA.

Ya que los resultados sugieren que dicha bomba se encuentra aumentada, La SERCA es uno de los principales mecanismos encargados de mantener bajos los niveles Ca^{2+} en el citosol, una alteración como la que sugieren los resultados de este trabajo indicaría una notable modificación en el manejo del Ca^{2+} por parte de las células endoteliales con el tratamiento con OA. Una posibilidad es que el OA se encuentre activando una vía que conduce a la síntesis de la SERCA y esta sea la causa por la que vemos aumentada su acción, por ende, sería de gran interés indagar en la síntesis de esta proteína.

AUMENTAR EL NÚMERO DE MEDICIÓN DE NO.

Debido a los controversiales resultados presentado en este trabajo acerca de la producción de NO, aumentar el número de experimentos resultaría de sumo interés ya que nos daría mayor certeza acerca de estos, así mismo sería importante poder contrastarlos con otros métodos de detección de NO para corroborar que lo que detectamos es real y no algún tipo de problema propio de la técnica.

EVALUAR LA RESPUESTA DE Ca^{2+} IN SITU

Una interrogante que surge al analizar un trabajo en células como el aquí presentado es si los resultados observados en células en cultivo son similares a los que presentaría un órgano in vivo, una manera de abordar esa cuestión es utilizando un modelo de endotelio *in situ*. Con ello, es posible valorar si respuesta de Ca^{2+} se preserva, respecto a lo observado en este trabajo o todo se ve modifica debido a las diferencias entre el tejido *in situ* y en vivo.

Bibliografía

1. James, P. T. Obesity: The worldwide epidemic. *Clin. Dermatol.* **22**, 276–280 (2004).
2. Swinburn, B. A. *et al.* The global obesity pandemic: Shaped by global drivers and local environments. *Lancet* **378**, 804–814 (2011).
3. González Block, M. A. *et al.* Resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018. *Salud Publica Mex.* **59**, 126–127 (2018).
4. World Health Organization. Obesidad. <https://www.who.int/topics/obesity/es/> (2019).
5. Caballero, B. The global epidemic of obesity: An overview. *Epidemiol. Rev.* **29**, 1–5 (2007).
6. Luma, A. and ahmad anwar. Relationships between Obesity and Cardiovascular Diseases in Four Southern States and Colorado. *Natl. Intitutes Heal.* **34**, 1–15 (2011).
7. INEGI. Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. *INEGI*
<https://www.inegi.org.mx/sistemas/olap/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp> (2020).
8. Ghosh, A., Gao, L., Thakur, A., Siu, P. M. & Lai, C. W. K. Role of free fatty acids in endothelial dysfunction. *J. Biomed. Sci.* **24**, 1–15 (2017).
9. Lehninger, A. L. *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular.* (Ediciones Omega, 2003).
10. Feingold, K. R. Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **51**, 437–458 (2022).
11. Mallick, R. & Duttaroy, A. K. Modulation of endothelium function by fatty acids. *Mol. Cell. Biochem.* **477**, 15–38 (2022).
12. Fiol, A. H. *Biología celular de los cuerpos lipídicos. Biogénesis, acumulación y metabolismo.* (Universidad de Barcelona, 2014).
13. Kuo, A., Lee, M. Y. & Sessa, W. C. Lipid Droplet Biogenesis and Function in the Endothelium. *Circ. Res.* **120**, 1289–1297 (2017).
14. Czamara, K. *et al.* Lipid droplets formation represents an integral component of endothelial inflammation induced by lps. *Cells* **10**, 1–15 (2021).
15. Walther, T. C. & Farese, R. V. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 687–714 (2012).
16. Kuo, A., Lee, M. Y., Yang, K., Gross, R. W. & Sessa, W. C. Caveolin-1 regulates lipid droplet metabolism in endothelial cells via autocrine prostacyclin–stimulated, cAMP-mediated lipolysis. *J. Biol. Chem.* **293**, 973–983 (2018).
17. Rutkowski, J. M., Stern, J. H. & Scherer, P. E. The cell biology of fat expansion. *J. Cell Biol.* **208**, 501–512 (2015).
18. Ariotti, N. *et al.* Postlipolytic insulin-dependent remodeling of micro lipid droplets in adipocytes. *Mol. Biol. Cell* **23**, 1826–1837 (2012).

19. Listenberger, L. L. *et al.* Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3077–3082 (2003).
20. Cruz, A. L. S., Barreto, E. de A., Fazolini, N. P. B., Viola, J. P. B. & Bozza, P. T. Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks. *Cell Death Dis.* **11**, (2020).
21. Boden, G. Obesity and Free Fatty Acids. *Endocrinol. Metab. Clin. north Am.* **37**, 635–646 (2008).
22. Greenberg, A. S. *et al.* The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. *J. Clin. Invest.* **121**, 2102–2110 (2011).
23. Getiye, Y., Rice, T. A., Phillips, B. D., Carrillo, D. F. & He, G. Dysregulated lipolysis and lipophagy in lipid droplets of macrophages from high fat diet-fed obese mice. *J. Cell. Mol. Med.* **26**, 4825–4836 (2022).
24. Boden, G., Lebed, B., Schatz, M., Homko, C. & Lemieux, S. Effects of Acute Changes of Plasma Free Fatty Acids on Intramyocellular Fat Content and Insulin Resistance in Healthy Subjects. *Diabetes* **50**, 1612–1617 (2001).
25. Pi, X., Xie, L. & Patterson, C. Emerging roles of vascular endothelium in metabolic homeostasis. *Circ. Res.* **123**, 477–494 (2018).
26. Guyton, H. *Tratado de fisiología médica.* (2006).
27. Crystal, G. J. & Pagel, P. S. The Physiology of Oxygen Transport by the Cardiovascular System: Evolution of Knowledge. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* **34**, 1142–1151 (2020).
28. Harvey, K. A., Xu, Z., Pavlina, T. M., Zaloga, G. P. & Siddiqui, R. A. Modulation of endothelial cell integrity and inflammatory activation by commercial lipid emulsions. *Lipids Health Dis.* **14**, 1–16 (2015).
29. Godo, S., Takahashi, J., Yasuda, S. & Shimokawa, H. Endothelium in Coronary Macrovascular and Microvascular Diseases. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **78**, S19–S29 (2021).
30. Kuroda, R., Hirata, K. I., Kawashima, S. & Yokoyama, M. Unsaturated free fatty acids inhibit Ca²⁺ mobilization and NO release in endothelial cells. *Kobe J. Med. Sci.* **47**, 211–219 (2001).
31. Toda, N. & Okamura, T. Obesity impairs vasodilatation and blood flow increase mediated by endothelial nitric oxide: An overview. *J. Clin. Pharmacol.* **53**, 1228–1239 (2013).
32. Kim, F. *et al.* Free fatty acid impairment of nitric oxide production in endothelial cells is mediated by IKK β . *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 989–994 (2005).
33. Luk, C., Haywood, N. J., Bridge, K. I. & Kearney, M. T. Paracrine Role of the Endothelium in Metabolic Homeostasis in Health and Nutrient Excess. *Front. Cardiovasc. Med.* **9**, (2022).
34. Gamez-Mendez, A. M., Vargas-Robles, H., Ríos, A. & Escalante, B. Oxidative stress-dependent coronary endothelial dysfunction in obese mice. *PLoS One* **10**, 1–17 (2015).

35. Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373–376 (1980).
36. Mattila, J. T. & Thomas, A. C. Nitric oxide synthase: Non-canonical expression patterns. *Front. Immunol.* **5**, 1–5 (2014).
37. Król, M. & Kepinska, M. Human nitric oxide synthase—its functions, polymorphisms, and inhibitors in the context of inflammation, diabetes and cardiovascular diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–18 (2021).
38. Garcia, V. & Sessa, W. C. Endothelial NOS: perspective and recent developments. *Br. J. Pharmacol.* **176**, 189–196 (2019).
39. Dimmeler, S. *et al.* Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399**, 601–605 (1999).
40. Moccia, F., Negri, S., Faris, P. & Berra-Romani, R. Targeting the Endothelial Ca²⁺ Toolkit to Rescue Endothelial Dysfunction in Obesity Associated-Hypertension. *Curr. Med. Chem.* **27**, 240–257 (2019).
41. Atawia, R. T., Bunch, K. L., Toque, H. A., Caldwell, R. B. & Caldwell, R. W. Mechanisms of obesity-induced metabolic and vascular dysfunctions. *Front. Biosci.* 890–934 (2019).
42. Wang, Y. *et al.* Oxidative stress induced by palmitic acid modulates KCa_{2.3} channels in vascular endothelium. *Exp. Cell Res.* **383**, 111552 (2019).
43. Steinberg, H. O. *et al.* Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation. *J. Clin. Invest.* **100**, 1230–1239 (1997).
44. Zaragoza, C., Márquez, S. & Saura, M. Endothelial mechanosensors of shear stress as regulators of atherogenesis. *Curr. Opin. Lipidol.* **23**, 446–452 (2012).
45. Tran, Q. K., Ohashi, K. & Watanabe, H. Calcium signalling in endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* **48**, 13–22 (2000).
46. Moccia, F. Update on vascular endothelial Ca²⁺ signalling: A tale of ion channels, pumps and transporters. *World J. Biol. Chem.* **3**, 127 (2012).
47. Park, H. W. *et al.* Pharmacological correction of obesity-induced autophagy arrest using calcium channel blockers. *Nat. Commun.* **5**, 1–12 (2014).
48. Pacia, M. Z. *et al.* Heterogeneity of chemical composition of lipid droplets in endothelial inflammation and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1867**, 118681 (2020).
49. Loaiza, A. *et al.* Differential intracellular calcium influx, nitric oxide production, ICAM-1 and IL8 expression in primary bovine endothelial cells exposed to nonesterified fatty acids. *BMC Vet. Res.* **12**, 1–11 (2016).