

00524
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN
DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA DE TRANSFERENCIA
DE ESTERES DE COLESTEROL (CETP): SU INFLUENCIA
EN EL DESARROLLO DE CARDIOPATÍA
ISQUÉMICA CORONARIA (CIC)**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A :
JUANA ELIZABETH CARREÓN TORRES



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F.

2003

1



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JUARADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:
VOCAL:
SECRETARIO:
1ER. SUPLENTE:
2DO. SUPLENTE:

ANGELINA QUINTERO RUIZ
ELPIDIO GARCÍA RAMÍREZ
OSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ
MA. DEL SOCORRO CECI REYNA RODRÍGUEZ
ENEIDA BAILÓN VÉLEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA :
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA ÁREA DE INVESTIGACIÓN
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Juana Elizabeth
Carreón Torres
FECHA: 27 - JUNIO - 2003
FIRMA: [Firma]


OSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ
DIRECTOR DE TESIS :


JUANA ELIZABETH CARREÓN TORRES
SUSTENTANTE

AGRADECIMIENTOS

A *Dios* doy gracias, por haberme acompañado y darme fortaleza durante este tiempo para lograr esta meta en mi vida.

A *mi Madre*, a la que le dedico este trabajo y le debo la vida. Le agradezco, porque todas las noches ha velado mis sueños y por el día ha vigilado mis pasos y ahora ve consolidado cada uno de esos esfuerzo en este proyecto.

A *mi Abuela*, a la que agradezco su ejemplo, sus cuidados, dedicación y amor que me ha dado desde pequeña. Sobre todo por que siempre estuvo al pendiente de mi formación escolar.

A *mi madrina Malena*, a *mis compadres Claudia y Fernando*, a *mi tía María*, a *mi tío Gregorio*, a *mi tía Martha* y a cada miembro de mi Familia que ha estado a mi lado y nunca perdió la fe en mí.

A los dos grandes amores de mi vida, a *ti mi Fer* y a *ti Nahum* por su amor incondicional.

A *mis amigos y compañeros, Blanca, Marisela, Guillermo, Vladimiro, Claudia, Serafin, Beto, al gran Che* y a todos lo que en alguna etapa de mi vida estuvieron a mi lado, por sus críticas y valiosos consejos, y sobre todo por soportar mi locura.

A *mi Escuela y Maestros*, por la importancia que ha tenido su presencia en mi formación.

Agradezco al *Dr. Guillermo Cardoso* por sus aportaciones e interés a este trabajo, por su paciencia y valioso tiempo que me dedico.

Muy en especial agradezco al *Dr. Oscar Pérez Méndez*, director de esta tesis, guía y ejemplo de mi vida profesional; que en cada momento y a pesar de todo me brindo su confianza, sabiduría y experiencia, por la gran paciencia que me tuvo. Gracias a todo ello este proyecto pudo llegar a su fin.

INDICE

RESUMEN.....	5
ANTECEDENTES.....	7
I. LIPOPROTEÍNAS.....	7
I.1 COMPONENTES DE LAS LIPOPROTEÍNAS.....	7
A. LÍPIDOS.....	7
B. APOLIPOPROTEÍNAS.....	9
I.2 CLASIFICACIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS.....	10
I.3 METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS.....	13
II. CETP.....	17
II.1 MECANISMO DE TRANSFERENCIA DE LA CETP.....	18
II.2 REGULACIÓN DE LA CETP.....	19
II.3 ALTERACIONES GENÉTICAS DE LA CETP.....	20
II.4 CETP E HIPOALFALIPOPROTEINEMIA.....	20
II.5 RELACIÓN CETP Y ENFERMEDAD ATROSCLEROSA CORONARIA (EAC).....	21
A. ATROSCLEROSIS.....	22
III. JUSTIFICACION.....	24
IV. HIPÓTESIS.....	25
V. OBJETIVOS.....	25
METODOLOGÍA.....	27
VI. MATERIAL.....	27
A. GRUPOS DE ESTUDIO.....	28
B. RECOLECCION DE MUESTRAS.....	28
C. ANÁLISIS DE LABORATORIO.....	28
D. SUBPOBLACIONES DE HDL.....	28
E. AISLAMIENTO DE APO A-I.....	29
F. TIPIFICACION DEL POLIMORFISMO Taq 1B.....	29
VII. METODOS.....	30
A. METODO FLUORESCENTE.....	30
B. METODO RADIATIVO.....	31
RESULTADOS.....	34
VIII. METODO FLUORESCENTE.....	34
IX. METODO RADIATIVO.....	38
DISCUSIÓN.....	53
CONCLUSIÓN.....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	62
APÉNDICE.....	69

ABREVIATURAS

Apo:	Apolipoproteínas
CETP:	Proteína de Transporte de Esteres de Colesterol
C-HDL:	Colesterol de HDL
C-LDL:	Colesterol de LDL
CT:	Colesterol Total
EAC:	Enfermedad Aterosclerosa Coronaria
Ex:	Eximero
HDL:	Lipoproteínas de Alta Densidad
IDL:	Lipoproteínas de Densidad Intermedia
LCAT:	Lecitina Colesterol Acilo Transferasa
LDL:	Lipoproteínas de Baja Densidad
LH:	Lipasa Hepática
LPL:	Lipoproteína lipasa
Mon:	Monómero
PLTP:	Proteína de transporte de fosfolípidos
PON:	Paraoxonasa
SR-B1:	Receptor Scavenger clase B1
SDE:	Sujetos sin Diagnóstico de la Enfermedad
Tg:	Triacilglicerolos
TRC:	Transporte Reverso del Colesterol
VLDL:	Proteínas de muy baja densidad

RESUMEN

Existen evidencias muy sugestivas de que en México se ha incrementado la incidencia de cardiopatía coronaria. En las últimas décadas, la mortalidad por esta enfermedad ha aumentado progresivamente, hasta alcanzar el primer lugar en varias zonas del país. En más de 90% de los casos de cardiopatía isquémica es secundaria la aterosclerosis coronaria.

Así también es bien conocida la correlación negativa entre las concentraciones de C-HDL y la incidencia de desarrollar enfermedad arterial coronaria (EAC). Este papel protector que presentan las HDL se le ha atribuido al papel que juega en el transporte reverso del colesterol (TRC), por su heterogeneidad en su población y por su características antiaterogénicas intrínsecas.

Por lo que el objetivo de este estudio fue implementar un método para determinar la actividad de la Proteína Transportadora de Esteres de Colesterol (CETP), la cual se encarga, como su nombre lo dice, de transportar esterios de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) a las lipoproteínas de baja (LDL), intermedia (IDL) y muy baja densidad (VLDL). Esta proteína juega un papel importante en el TRC y en la remodelación de las lipoproteínas.

Se implementaron dos métodos para la determinación de esta proteína; el método fluorescente y el método radiactivo, este último resulta mucho más práctico que el método fluorescente.

Después de haber establecido el método más eficaz para determinar la actividad CETP, decidimos determinar si existen diferencias en actividad entre dos grupos de sujetos; uno con cardiopatía (EAC) y otro sin diagnóstico de la enfermedad (SDE). Se incluyó también un tercer grupo para determinar la influencia que tienen las alteraciones genéticas como el polimorfismo Taq 1B sobre la actividad CETP. Además se determinó el perfil de lípidos de estos tres grupos, y si estos confieren un mayor riesgo de presentar la enfermedad.

Se analizaron los datos de 52 sujetos SDE, 30 sujetos con cardiopatía previamente diagnosticada y con por lo menos un infarto al miocardio y 68 sujetos previamente genotipados para el polimorfismo Taq1B. No se observó una diferencia significativa en la actividad CETP, como indicativo de alteración en esta proteína debida a la enfermedad. Sin embargo se observó que existe una diferencia significativa en las subpoblaciones de las HDL en ambos grupos (aumento de 52% de partículas

HDL_{3c} en los sujetos SDE comparado con los sujetos EAC). Esto sugiere que la remodelación de las lipoproteínas pudiera tener un papel crítico en la protección del desarrollo de la enfermedad. Aun cuando, no se observó una alteración sobre la actividad CETP en la enfermedad aterosclerosa coronaria, demostramos que existe una remodelación diferente de dichas lipoproteínas en estos sujetos, que se relaciona con la CETP.

En el estudio con sujetos que presentan polimorfismo Taq 1B efectivamente existe una influencia sobre la actividad CETP según muestran nuestros resultados. El alelo B1 se asocia con una mayor actividad CETP en plasma y un ligero aumento en los niveles de C-HDL sobre el genotipo B2.

Concluimos que la actividad CETP en plasma no se ve afectada por el proceso ateroscleroso pero en asociación con la Lecitina-colesterol acilo transferasa (LCAT), la CETP contribuye a determinar la distribución de subclases de HDL de manera diferente en los sujetos sanos que en los sujetos con EAC. El significado de tal distribución y su asociación con la CETP en sujetos sanos es motivo de investigaciones futuras.

ANTECEDENTES

I. LIPOPROTEINAS

Los lípidos son moléculas relativamente insolubles en la sangre, debido a la naturaleza acuosa del plasma. En consecuencia, estas moléculas para ser transportadas desde su lugar de síntesis hasta su destino final, en los sistemas biológicos, se asocian a proteínas solubles formando complejos denominados Lipoproteínas que son: complejos macromoleculares y pseudomicelares.

Las lipoproteínas (Fig.1) básicamente consisten de un núcleo de lípidos hidrofóbicos (no polar), como triacilglicerolos y ésteres de colesterol rodeado de una mezcla de lípidos anfipáticos, principalmente fosfolípidos y colesterol no esterificado. El complejo macromolecular se estabiliza en términos fisicoquímicos por unas estructuras proteicas que son llamadas apolipoproteínas, que se unen por medio de interacciones hidrofóbicas a los lípidos más externos y por atracciones electrostáticas a los fosfolípidos.

En esta sección se describen los elementos constitutivos de las lipoproteínas, sus características estructurales, clasificación y metabolismo.



Fig. 1 Esquema general de la composición de las lipoproteínas. Las lipoproteínas están compuestas en su superficie por lípidos anfipáticos como colesterol libre y fosfolípidos; en su fase proteica dándole estabilidad las diferentes apolipoproteínas dependiendo del tipo de lipoproteína y en su interior lípidos hidrofóbicos como colesterol esterificado y triacilglicerolos.

I.1 COMPONENTES DE LAS LIPOPROTEÍNAS

A. LIPIDOS

Los lípidos (del griego *lipus*, grasa) son un grupo de compuestos muy heterogéneo, de sustancias relacionadas con los ácidos grasos y se encuentran en la mayoría de los seres vivos. Se pueden definir como compuestos orgánicos, en su mayoría ésteres, insolubles en agua (o ligeramente solubles) y solubles en solventes orgánicos como: éter, cloroformo y benceno.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los lípidos presentan una gran diversidad de estructuras y funciones, forman parte de las lipoproteínas plasmáticas y de las membranas, estabilizando sus proteínas. Estos pueden participar como cofactores enzimáticos, transportadores electrónicos, agentes emulsionantes, como fuente de energía y forman parte de la estructura de hormonas y de mensajeros intracelulares

De acuerdo a su estructura podemos clasificar a los lípidos en diferentes grupos, pero solo algunos de ellos se encuentran asociados con las lipoproteínas. Entre ellos tenemos primeramente:

ACIDOS GRASOS: Dentro de los lípidos, los ácidos grasos son los más sencillos en términos de estructura. Son ácidos orgánicos compuestos por una cadena hidrocarbonada (R) y un grupo carboxilo terminal (R-COOH) con un número par de carbonos cuyas cadenas alifáticas pueden contener una o más insaturaciones. La combinación de un grupo ionizable y una cadena alifática le confieren a los ácidos grasos un carácter anfipático (Fig.2) Existen varios tipos de lípidos que contienen o que son derivados de los ácidos grasos. Entre los más importantes destacan los triglicéridos, fosfolípidos y los cerebrosídeos.

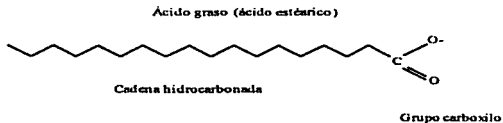
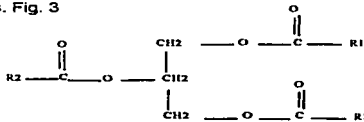


Fig.2. Ácidos grasos. Estructura química de un ácido graso como el Ácido esteárico, el cual esta compuesto de una cadena hidrocarbonada de 18 carbonos y su grupo carboxilo.

TRIACILGLICEROLES: Están compuestos de tres ácidos grasos unidos con un enlace éster a un glicerol. Los que contienen el mismo tipo de ácido graso en las tres posiciones se denominan triacilglicerol simples y los que contienen dos o más ácidos grasos diferentes se les conoce como triacilglicerol mixtos. Fig. 3



R1, R2, R3=residuos de Ácidos grasos

Fig.3 Triacilglicerol. Estructura química general de un triacilglicerol con ácidos grasos idénticos en la posición 1 y 3:

FOSFOLÍPIDOS: Contiene dos ácidos grasos unidos a los dos grupos hidroxilo del glicerol por un enlace éster y el tercer grupo hidroxilo del glicerol forma un enlace fosfodiéster con un grupo fosfato. Los fosfolípidos se clasifican en función del grupo sustituyente en el fosfato. Fig. .4

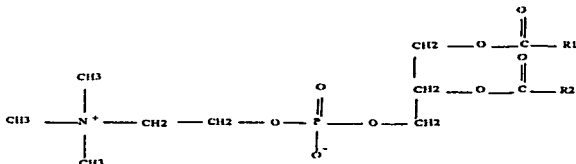


Fig. 4. Fosfolípidos. Estructura química de un fosfolípido como la fosfatidilcolina.

ESTEROIDES: Otros compuestos que están considerados como lípidos y forman parte de las lipoproteínas. Los esteroides a menudo se encuentran asociados a las grasas, están compuestos por un núcleo cíclico semejante al del fenantreno al cual se une un anillo de ciclo pentano. Dentro de este grupo podemos encontrar al Colesterol, un alcohol esteroideo insaturado, se encuentra ampliamente distribuido en todas las células del organismo como componente estructural de membranas y precursor de las sales biliares, de algunas hormonas como; las sexuales y adrenales y algunas vitaminas.^{1,2} Fig. 5



Fig.5 Esteroides. Estructura química del Colesterol libre y colesterol esterificado.

B. APOLIPOPROTEINAS

Otro componente de las lipoproteínas son las Apolipoproteínas. Las unidades proteicas aisladas de las lipoproteínas y que aun no se incorporan a ellas, se denominan apoproteínas, cuando forman complejos no covalentes con las lipoproteínas se les denomina apolipoproteínas (Apo). Estos

polipéptidos son de peso molecular variable y sus funciones son estructurales; como ligandos de receptores y como cofactores de enzimas del metabolismo de los lípidos. Las diferentes apolipoproteínas y sus principales características se resumen en la Tabla 1.

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS DE LAS APOLIPOPROTEÍNAS ³

Apolipoproteína	Masa molecular	Punto iso-eléctrico	Sitio de síntesis	Concentración plasmática (mg/dL)	Función
A-I	29,016	5.9-5.4	Intestino/Hígado	100-150	Principal proteína componente de las HDL, activador de LCAT, estimulación del flujo del colesterol, ligando de HDL para unión de SR-B1 y ABC1.
A-II	14,414	5.0	Intestino/Hígado	30-50	Principal proteína componente de HDL, inhibidor de LH y de la LCAT.
A-IV	44,465	5.5	Intestino	15	Activador de LCAT, modulador de LPL y estimulador de flujo de colesterol.
B-100	512,723	-	Hígado	80-100	Ligando para receptor de LDL
B-48	240,800	6.8	Intestino	-	Proteína estructural de los quilomicrones. Contiene el 48% de los aminoácidos de la apo B-100.
C-I	6,630	7.5	Hígado	4-6	Activador de LCAT, inhibición de la captación hepática de triacilglicerol.
C-II	8,900	4.9	Hígado	3-5	Activador LPL, inhibición de la captación hepática de lipoproteínas ricas en triacilglicerol
C-III _{0,1,2}	8,800	4.5-5.0	Hígado	12-14	Inhibidor de la LPL
E _{2,3,4}	34,145	6.0-5.7	Hígado	3-5	Ligando de receptor de LDL y de residuos de quilomicrones, movilización de colesterol celular en macrófagos y flujo de colesterol.

Tabla 1. Características de las apolipoproteínas que forman parte de las lipoproteínas. Lipoproteínas de alta densidad (HDL: High Density Lipoproteins), LCAT: Lecitina: colesterol acilo transferasa, SR-B1: Receptor scavenger clase B1 (Scavenger Receptor Class B1), ABC1: transportador dependiente de ATP (ATP-binding cassette transporter), LPL: Lipoproteína lipasa, LH: Lipasa hepática. Lipoproteínas de baja densidad (LDL: Low Density Lipoprotein) y Lipoproteína (a) (Lp(a)).

I.2. CLASIFICACION DE LAS LIPOPROTEÍNAS

Las lipoproteínas se clasifican de acuerdo a su densidad de flotación y sus propiedades funcionales en seis categorías: Quilomicrones (Qm), Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL: Very Low Density Lipoproteins), Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL: Intermediate Density Lipoprotein), Lipoproteínas de baja densidad (LDL: Low Density Lipoprotein), Lipoproteínas de alta densidad (HDL: High Density Lipoprotein), sus características se presentan en la Tabla 2.

A continuación se describen las características de las lipoproteínas separadas en función de su densidad de flotación.

- **QUILOMICRONES (Qm)**

Estos se sintetizan en el intestino y su principal función es transportar los triacilglicérolos provenientes de la dieta a los diversos tejidos. Son las fracciones de mayor tamaño, tienen un gran contenido de triacilglicérolos y bajo contenido de proteínas, son de menor densidad, contienen además apo B-48, A-I, A-II y Apo IV. Por interacción con moléculas HDL recogen moléculas de Apo C y esta activa a la lipoproteína lipasa, que tiene como función catalizar la hidrólisis de triacilglicérolos. Al perder gran cantidad de triacilglicérolos, vuelven a interactuar con las HDL, esta vez cede su Apo A-I, Apo A-II, Apo C y parte de su contenido de lípidos para transformarse en un remanente de quilomicrón, este contiene principalmente colesterol, Apo B-48 y Apo E. Los receptores Apo B/E en el hígado reconocen el remanente de quilomicrón; facilitan la endocitosis y la posterior degradación hepática del remanente de quilomicrón produciendo lipoproteínas de muy baja densidad.

- **LIPOPROTEINAS DE MUY BAJA DENSIDAD (VLDL)**

Son sintetizadas en el hígado a partir de remanentes de quilomicrón, contienen principalmente triacilglicérolos, Apo B-100, Apo B-48 y Apo E. El catabolismo mediado por la Apo C-II como colector de la LPL da lugar a que se produzcan IDL, esta también interactúa con HDL al cual se transfiere parte de Apo C y colesterol libre.

- **LIPOPROTEINAS DE DENSIDAD INTERMEDIA (IDL)**

Las VLDL se transforman en partículas de IDL, estas contienen cantidades casi iguales de colesterol y triacilglicérolos y contienen principalmente Apo B y Apo E, Esta última apolipoproteína es necesaria para el consumo hepático y degradación posterior de IDL a LDL por acción de la lipasa hepática.

- **LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD (LDL)**

A medida que las partículas de IDL donan sus lípidos y adquieren el tamaño del LDL. Las moléculas de Apo B-100 empacadas en las VLDL originales son reconocidas por sus receptores específicos, que se encuentran en las células hepáticas y extrahepáticas.

• LIPOPROTEINAS DE ALTA DENSIDAD (HDL)

La principal función de las HDL es captar el colesterol libre circulante derivado del catabolismo de otras lipoproteínas o de la superficie de las células periféricas. Están formadas básicamente por proteínas, fosfolípidos y colesterol esterificado. Las principales apoproteínas son: apo A-I, apo A-II y apo C-III. Las HDL pueden proceder de la síntesis hepática, donde se producen en forma de partículas pre- β_1 las cuales están compuestas esencialmente de fosfolípidos y apo A-I, con una masa molecular de 60 kDa y con una densidad igual a las HDL₂, las cuales desempeñan un papel importante en la captación de colesterol en las células periféricas, funcionando como primeros aceptores de colesterol, iniciando así el transporte reverso del colesterol (TRC). Así también proceden de los componentes de superficie de otras lipoproteínas durante el proceso de lipólisis.

Estas lipoproteínas también se pueden subdividir de acuerdo a su densidad (ρ) en HDL₂ ($1.063 < \rho < 1.12 \text{ g/mL}$) y HDL₃ ($1.12 < \rho < 1.21 \text{ g/mL}$). Las HDL₂ son ricas en lípidos hidrofóbicos, mientras las HDL₃ están formadas por fosfolípidos y proteínas principalmente.

Otros métodos de separación como la electroforesis en gel de agarosa, en gradientes de poliacrilamida o filtración en gel, se han utilizado para caracterizar la clasificación de las lipoproteínas. Por ejemplo, Krauss⁴ et. al. 1982 describió de 4 a 5 subclases de LDL debido a su tamaño. Por otra parte, Skinner en 1994, describió 5 tipos de HDL (HDL_{2a}, HDL_{2b}, HDL_{3a}, HDL_{3b}, HDL_{3c}) haciendo una combinación entre ultracentrifugación y electroforesis⁵. También por su movilidad electroforética y tamaño, se han descrito otras subfracciones de HDL entre las que destacan las partículas pre- β_1 .⁶

TABLA 2. PROPIEDADES DE LAS LIPOPROTEÍNAS⁷

Tipo de Lipoproteína	Mov. Electroforética	Tamaño (nm)	Contenido de proteínas (%)	Contenido de fosfolípidos (%)	Contenido de triglicéridos (%)	Contenido de colesterol (%) Libre Esterificado	
Qm	No tiene	750-12,000	1-2	3-6	90-95	1-3	
VLDL	Pre-beta	30-70	6-10	15-20	45-65	4-8	
IDL	Pre-beta, beta	25	20	30	35	35	
LDL	Beta	18-30	18-22	18-24	4-8	6-8	45-50
HDL	Alfa	5-12	45-55	26-32	2-7	3-5	15-20

Tabla 2. Características de las lipoproteínas y su composición de lípidos específica. Quilomicrones (Qm), Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL: Very Low Density Lipoproteins), Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL: Intermediate Density Lipoprotein), Lipoproteínas de baja densidad (LDL: Low Density Lipoprotein), Lipoproteínas de alta densidad (HDL: High Density Lipoprotein)

1.3. METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS

La composición de las lipoproteínas plasmáticas se ve continuamente modificada, como resultado del intercambio dinámico y la transferencia de lípidos que existen entre ellas durante su metabolismo intravascular. Una gran variedad de enzimas, proteínas y algunos receptores membranales como el SR-B1 y el ABC1 están involucrados en este metabolismo; todos ellos influyen en la concentración de los lípidos favoreciendo el transporte (proteínas de transferencia) o la hidrólisis de los mismos (enzimas hidrolíticas). En la Tabla 3 se presentan algunas características destacables de las enzimas y proteínas de transporte que intervienen en el metabolismo de las lipoproteínas.

Una de las proteínas que juega un papel importante en el transporte e intercambio de ésteres de colesterol y la cual es motivo de estudio en esta tesis, es la Proteína Transportadora de Esteres de Colesterol (CETP). Ésta facilita el intercambio de ésteres de colesterol y triacilglicérolos entre las HDL y las lipoproteínas ricas en apo B, conservación de HDL y generación de apo A-I libre de lípidos. En la sección II se detallan las características de esta proteína.

TABLA 3 ENZIMAS Y PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS^{3,8}

NOMBRE	Función	ORIGEN
LCAT	Cataliza la transferencia de un ácido graso de un fosfolípido al colesterol libre que se encuentra presente en las HDL y en las LDL. Contribuye a la maduración de HDL.	Hepático
LH	Hidroliza los triacilglicérolos y fosfolípidos de HDL, IDL y LDL. Es cofactor de SR-B1 para una captación selectiva, así como la generación de Apo A1 libre de lípidos.	Hepático
LPL	Hidroliza los triacilglicérolos de VLDL y Qm utilizando C-II como cofactor. Favorece la generación de precursores de HDL.	Tejido adiposo Pared endotelial Pulmón
CETP	Intercambia ésteres de colesterol por triacilglicérolos entre las HDL ₂ y las lipoproteínas que contienen apo B	Tejido adiposo Hepático Intestino delgado
RECEPTORES Y PROTEÍNAS MEMBRANALES		
SR-B1	Receptor para las HDL para intercambiar colesterol entre los hepatocitos y las células	Hepatocito, macrófagos
ABC1	Modulación del flujo de colesterol y fosfolípidos. Favorece a la maduración de HDL.	Hígado, macrófagos intestino

Tabla 3. Enzimas y proteínas involucradas en el metabolismo de las lipoproteínas. LCAT= Lectina: colesterol acil-transferasa; LH= Lipasa hepática; LPL= Lipasa lipoprotéica; CETP= Proteína transportadora de ésteres de colesterol; PLTP= Proteína transportadora de fosfolípidos; SR-B1= Receptor scavenger clase B1 (Scavenger Receptor Class B1); ABC1: transportador dependiente de ATP (ATP-binding cassette transporter), Quilomicrones (Qm), Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL: Very Low Density Lipoproteins), Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL: Intermediate Density Lipoprotein), Lipoproteínas de baja densidad (LDL: Low Density Lipoprotein), Lipoproteínas de alta densidad (HDL: High Density Lipoprotein).

Los principales lípidos que favorecen la remodelación de las lipoproteínas son el colesterol, triacilglicerolos y fosfolípidos. Ahora bien, las concentraciones intracelulares de colesterol libre y esterificado están altamente controladas. Las proteínas celulares que controlan la adquisición de colesterol son el receptor de LDL, que regula la captación de colesterol exógeno y la enzima hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa), que regula la síntesis endógena de colesterol. La acumulación de un exceso de colesterol en forma de colesterol esterificado está controlada por la enzima lecitina-colesterol acilo transferasa (LCAT). Cuando el contenido de colesterol libre aumenta por encima de un umbral, se inhibe la actividad del receptor de LDL y de la enzima HMG-CoA reductasa y se activa la enzima LCAT.⁸

Existen al menos tres mecanismos por los que se modula el tráfico intracelular de colesterol. Uno para el movimiento del colesterol sintetizado en el retículo endoplásmico (fuente endógena de colesterol) hasta la membrana plasmática. Otro para el movimiento del colesterol exógeno que entra en la célula vía receptor de LDL hasta la membrana plasmática y otro mecanismo que es el transporte reverso del colesterol.^{9, 10}

• **VIA EXOGENA.**

La incorporación de los lípidos exógenos se efectúa en tres fases: Digestión, Absorción y Transporte. Las grasas contenidas en los alimentos no pueden ser absorbidas por el intestino por lo que al llegar al duodeno son catabolizadas. La vesícula biliar libera ácidos biliares conjugados, lecitina y colesterol al intestino formando así micelas más pequeñas. El páncreas produce tres enzimas hidrolíticas que son: la enzima colesterol esterasa, la lipasa pancreática y fosfolipasa A. La lipasa actúa sobre los triacilglicerolos para liberar ácidos grasos libres monoglicéridos, diglicéridos y glicerol. La colesterol esterasa hidroliza enlaces éster y genera ácidos grasos libres y colesterol libre; la fosfolipasa A hidroliza los fosfolípidos exógenos. En la etapa de absorción el mecanismo de transporte de lípidos depende del tipo de molécula que se transporta. Por ejemplo, los ácidos grasos pasan a los enterocitos del intestino delgado donde son reesterificados con glicerol formando triacilglicerolos, los cuales se ensamblan con pequeñas cantidades de colesterol junto con apo B-48 y apo A-I y fosfolípidos para formar los quilomicrones que son liberados a la linfa mesentérica y finalmente a la circulación. En el plasma los quilomicrones intercambian componentes de superficie como fosfolípidos

y apo A-I por apo C-II, apo-E y esteres de colesterol con las lipoproteínas de alta densidad (HDL). La lipoproteína-lipasa hidroliza los triacilglicérol de los quilomicrones dando lugar a remanentes de estos. Estas partículas en las que la apo C ha sido remplazada por la apo E son rápidamente capturadas por el hígado a través del receptor apo B/E. El remanente de quilomicrones es enriquecido, por la acción de la CETP, con esteres de colesterol que provienen de las HDL, estos remanentes de quilomicrón son captados por los receptores hepáticos y convertidos dentro del hígado en ácidos biliares.^{8, 10, 11} Fig. 6

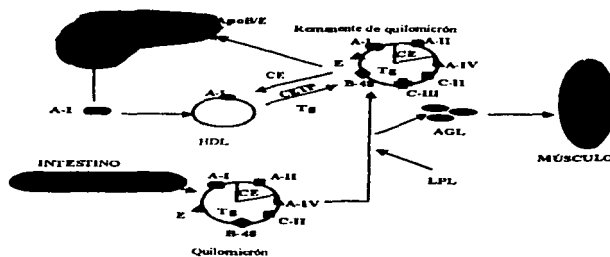


Fig. 6 Metabolismo de lipoproteínas. Vía Exógena: vía por la cual el colesterol de la dieta es llevado al hígado. AGL: Ácidos Grasos Libres. CE: Colesterol estenificado, Tg: Triacilglicérols, LPL: Lipoproteína lipasa.

• VIA ENDOGENA.

Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) son sintetizadas en el aparato de Golgi de los hepatocitos a partir del ensamblaje de ácidos grasos libres, glicerol, y una baja cantidad de colesterol, proveniente de la lipólisis del tejido adiposo. Las VLDL son liberadas hacia la circulación, donde maduran al captar ésteres de colesterol, apo B-100 y apolipoproteínas CII, CIII y E cedidas éstas últimas por las HDL. Las partículas VLDL posteriormente interactúan con la lipoproteína-lipasa (LPL) del endotelio, que utiliza apo CII como cofactor para hidrolizar estas lipoproteínas, liberando así ácidos grasos a partir de sus triacilglicérols y a su vez transfiere apo C y apo E a las HDL, para transformarse en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL). Estas lipoproteínas pueden seguir tres caminos: a) ser captadas por el hígado a través del receptor apoB/E; b) seguir disminuyendo su

tamaño, ya que sufren hidrólisis de sus triacilgliceroles restantes hasta convertirse en LDL pequeñas y densas o c) ser fagocitadas por macrófagos y monocitos.^{8, 10, 11} Fig. 7

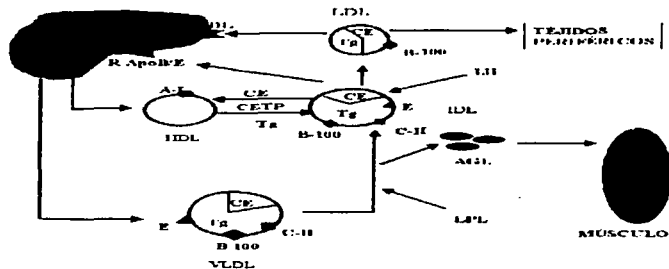


Fig. 7 Metabolismo de lipoproteínas. Vía Endógena: Vía por la cual el colesterol es removido del hígado hacia los tejidos periféricos y regresar al mismo hígado. Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL: Very Low Density Lipoproteins), Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL: Intermediate Density Lipoprotein), Lipoproteínas de baja densidad (LDL: Low Density Lipoprotein), Lipoproteínas de alta densidad (HDL: High Density Lipoprotein), LPL: Lipoproteína lipasa, LH: Lipasa Hepática, CE: Colesterol Esterificado, CL: Colesterol Libre, Tg: Triacilglicerol, CETP: Proteína transportadora de ésteres de colesterol, AGL: Ácidos Grasos Libres.

• METABOLISMO DE LAS HDL: TRANSPORTE REVERSO DEL COLESTEROL

Las HDL han sido catalogadas como partículas anti-aterogénicas, ya que evitan la formación de placa aterosclerótica, a través de varios mecanismos entre los que se encuentra el llamado Transporte Reverso del Colesterol (TRC), que es el flujo del colesterol de las células periféricas hacia el hígado. La formación de estas lipoproteínas se realiza por síntesis y secreción hepática e incorporación de fosfolípidos, colesterol, apo A y C que provienen de las VLDL.

La primera etapa del TRC es el flujo de colesterol de las células. En el intestino delgado este colesterol es captado por las partículas pre- β que posteriormente es esterificado por la acción de la LCAT. Esta esterificación hace que el colesterol pierda su carácter anfipático transformándose en una partícula hidrófoba, dando como resultado que los ésteres de colesterol pasen al interior de la lipoproteína, aumentando así el tamaño de la misma, generando partículas HDL₂.

El colesterol ya esterificado puede tomar dos caminos: 1) ser eliminado directamente de la lipoproteína por un mecanismo en el cual interviene el receptor hepático SR-B1, generando así HDL

TEJIDOS
FALLA DE ORIGEN

de menor tamaño capaces de reiniciar el ciclo o 2) por medio de diversas reacciones de transferencia, en las que intervienen la CETP el colesterol de las HDL₂ es intercambiado por los triglicéridos con lipoproteínas ricas en apo B como VLDL e IDL, por una parte y por la otra, las apolipoproteínas C y E pasan a los quilomicrones y VLDL. La lipasa hepática (LH) hidroliza los triglicéridos de las HDL₂ y en asociación con la actividad PLTP regenera los aceptores primarios de colesterol (partículas pre-β) Es así como el colesterol de los tejidos periféricos llega al hígado para ser reciclado y excretado a través de las vías biliares.^{12,13}

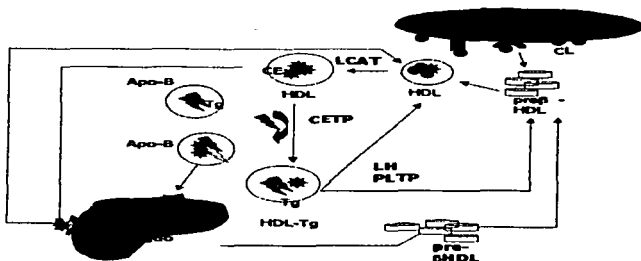


Fig. 8. Metabolismo de las lipoproteínas. Transporte Reverso del Colesterol: mecanismo por el cual el Colesterol es llevado al hígado a través de las HDL (High Density Lipoproteins). Apo B = Lipoproteínas ricas en apo B (VLDL (Very Low Density Lipoproteins), LDL (Low Density Lipoprotein) y Quilomicrones (Qm) LCAT: Lectina colesterol acil transferasa; LH: Lipasa hepática; CETP: Proteína transportadora de ésteres de colesterol. PLTP: Proteína Transportadora de fosfolípidos, SR-B1: Receptor scavenger clase B 1 (Scavenger Receptor Class B), ABC1: transportador dependiente de ATP (ATP-binding cassette transporter),

II. CETP

El gen de la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP) se encuentra situado sobre el brazo largo del cromosoma 16, en la región 12-21, consta de 16 exones, con 25 kpb de DNA genómico, muy cercano al locus de LCAT. Este gen produce una proteína de 476 aminoácidos con un peso molecular aparente de 66 a 74 kDa, consta de cuatro sitios N-glicosilados y numerosas regiones hidrofóbicas (cerca de 44%). También cuenta con un dominio C-terminal hidrofóbico que se ha postulado como el sitio de interacción con las lipoproteínas.^{14,15}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Existe una diferencia entre el peso molecular del péptido del cDNA de CETP (53,000 Da) y la CETP purificada del plasma (74,000 Da) lo que demuestra que existen modificaciones post-transcripcionales antes de dar origen a la proteína madura.

En los seres humanos el suministro más abundante de RNAm de la CETP es el hígado, bazo y tejido adiposo y con niveles más bajos de expresión en el intestino delgado, glándula adrenal, riñón y corazón. El tejido que tiene una mayor concentración de RNAm de la CETP es el tejido adiposo.¹⁶

II.1 MECANISMO DE TRASFERENCIA DE LA CETP

En el plasma, la CETP circula principalmente unida a HDL y tiene la capacidad de intercambiar ésteres de colesterol, triacilglicerol y fosfolípidos entre lipoproteínas.

Aun se desconoce con certeza cómo se une la CETP a las lipoproteínas, sin embargo, se tienen datos que sugieren la existencia de distintos sitios de unión para triacilglicerol, ésteres de colesterol (lípidos neutros) y fosfolípidos. Lo anterior se ha demostrado por medio de experimentos en los cuales se efectúa la deletión de los residuos 470-475 de la proteína, disminuyendo así la transferencia de ésteres de colesterol y triacilglicerol, pero no la de fosfolípidos. En consecuencia la CETP presenta dominios diferentes para unir a estos lípidos, aun cuando comparten el mismo mecanismo de transferencia.¹⁷

Se ha propuesto que la unión de la CETP con las lipoproteínas es por medio de interacciones iónicas, entre una posible carga positiva entre los residuos de la proteína y una carga negativa en los grupos fosfatos de las lipoproteínas, la alta estabilidad del complejo CETP-fosfatidicolina en la superficie de las lipoproteínas, el cual depende de un balance hidrófobo y electrostático¹⁸

Se han propuesto dos mecanismos diferentes por los cuales se lleva a cabo la transferencia de ésteres de colesterol, triacilglicerol (lípidos neutros) y fosfolípidos. El primer mecanismo propone que la CETP puede actuar como acarreador de lípidos neutros, entre el donador y aceptor, es decir la CETP se une al donador y éste le cede los lípidos (CE, Tg, y PC), al aceptor.

El siguiente mecanismo involucra un complejo ternario entre el donador, la CETP y el aceptor. En este mecanismo la CETP desempeña un papel de puente hidrofóbico por el cual se lleva a cabo la transferencia de lípidos. En la Fig. 9 se presentan los dos mecanismos.¹⁵

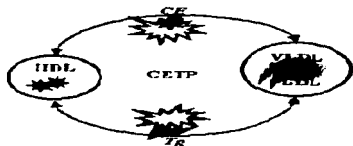


Fig. 9a. Mecanismo I. La CETP acarrea una molécula de Tg o CE desde una proteína donadora hacia una aceptora.



Fig. 9b. Mecanismo II. La CETP forma un complejo ternario, que involucra a la CETP y ambas lipoproteínas dándose el intercambio.

II.2 REGULACION DE LA CETP

Se ha demostrado en experimentos con animales que existe un aumento en la concentración del RNAm, actividad y masa de CETP en el hígado, tejido adiposo, corazón y músculo esquelético, en respuesta a una dieta rica en colesterol y grasas saturadas. Este efecto también se ha observado en los humanos.^{14,15,19}

Se propone experimentos anteriores que al aumentar tanto la actividad como la concentración de la CETP plasmática podría reciclar una mayor cantidad de colesterol, resultado de la lipólisis de los quilomicrones depositado en la célula al dar una dieta rica en colesterol.

La CETP es también alterada por algunas hormonas y drogas. La actividad de la CETP se ve aumentada en mujeres en el primer trimestre del embarazo, esto sugiere que la CETP se ve modificada por hormonas sexuales. La terapia con corticosteroides está asociada con una reducción de CETP tanto en sujetos normales como en pacientes con síndrome nefrótico. En estudios con ratones transgénicos para CETP se ha demostrado que la terapia con corticosteroides decrece los niveles plasmáticos de la CETP y una reducción del RNAm de la CETP en el hígado. El Probuocol (farmaco hipolipemiante) está asociado con un incremento en plasma de CETP. Estudios en hámster sugieren que el probuocol incrementa la cantidad de RNAm de la CETP en tejido adiposo, siempre y cuando exista una dieta rica en colesterol. Lo contrario sucede en el ser humano, baja los niveles de RNAm de la CETP en el tejido adiposo.^{14,15}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II.3 ALTERACIONES GENÉTICAS DE LA CETP EN HUMANOS

Se han reportado varias mutaciones presentes en el gen de la CETP causantes de deficiencias de su actividad y masa reflejándose en un incremento o decremento en los niveles de C-HDL.²⁰ Una de las mutaciones más conocida y estudiada, que se presenta como polimorfismo, es la variante identificable por la enzima de restricción Taq 1B. Es el cambio de una Guanina por una Adenina (G-A) del nucleótido 277 en el intrón 1. Al alelo transportador del sitio de corte para la enzima Taq 1B se le denominó B1, mientras que cuando no existe el sitio de corte para la enzima se le denominó B2. A los sujetos homocigotos para el alelo B1 (B1B1 G/G) se les ha atribuido altos niveles de actividad CETP y bajos niveles de C-HDL en comparación con los sujetos heterocigotos B1B2 (G/A) o sujetos homocigotos para B2B2 (A/A). Estos últimos tienen una actividad baja de CETP y niveles altos de C-HDL.²¹

Existen además otros polimorfismos y alteraciones genéticas asociadas a incrementos o decrementos de la actividad CETP aunados a modificaciones en la concentración de C-HDL y su efecto de desarrollar enfermedad arterial coronaria.

Existen también evidencias de que la deficiencia genética de la CETP esta relacionada con una deficiencia de LH.²² Se han realizado estudios en los que se encontró que individuos con deficiencia de CETP y LH tienen un alto riesgo de desarrollar aterosclerosis, mientras que solo la deficiencia de la CETP no aumenta el riesgo²²

II.4 CETP E HIPOALFALIPOPROTEINEMIA

El término hipoalfalipoproteinemia se define como concentraciones plasmáticas de C-HDL por debajo de la décima percentila ajustada por la edad y sexo del sujeto. Son varios los factores que determinan las concentraciones bajas de C-HDL, entre las que destacan las proteínas y enzimas que intervienen en el transporte reverso del colesterol (TRC) entre las que podemos incluir a la CETP.²⁴

Como ya se mencionó anteriormente la CETP promueve la redistribución de ésteres de colesterol, triacilgliceroles y en menor proporción los fosfolípidos entre lipoproteínas. La habilidad de esta proteína facilita la remodelación en la composición de las lipoproteínas, principalmente en las HDL, por lo que representa un paso importante en el metabolismo intravascular.

En la remodelación de esta proteína se destaca el movimiento de apo A-I de moléculas de HDL con migración α a moléculas HDL con migración pre- β , como consecuencia una disminución en el tamaño de partículas y una reducción en la cantidad de ésteres de colesterol en las partículas HDL favoreciendo así el transporte reverso. Esta proteína también afecta los niveles de LDL y su interacción con su receptor LDL, facilitando la conversión de VLDL a LDL.²⁵

Estos efectos provocan una disminución de C-HDL, es decir una hipoalfalipoproteinemia, pero esto no implica que un aumento en los niveles de la CETP en plasma y niveles bajos de C-HDL sean un riesgo de presentar cardiopatía o por el contrario una deficiencia de CETP con un aumento de C-HDL sea un factor protector para el desarrollo de la enfermedad.²⁶

Sin embargo, existe controversia en el papel que juega la CETP en el transporte reverso del colesterol, ya que existen evidencias de que la CETP puede favorecer o no favorecer la aterogénesis. Se han hecho estudios en conejos (especies con actividad CETP normal por naturaleza) en la cual se presenta un efecto de la CETP potencialmente anti-aterogénico, mientras que en los ratones (especies deficientes de CETP por naturaleza) se han reportado ambos efectos pro y anti-aterogénico, dependiendo de la vía metabólica. Ambos casos se presentan igualmente en los humanos. Individuos en que la deficiencia de la CETP coincide con una concentración de C-HDL de 41-60 mg/dL tienen un 50% de incremento de cardiopatía isquémica coronaria. Sin embargo cuando la deficiencia de la CETP esta asociada con niveles de C-HDL mayor a 60mg/dL, la incidencia de presentar aterosclerosis es baja, comparada con la de los individuos en que los niveles de C-HDL están elevados, no estando asociados a una deficiencia de la CETP.²⁷

II.5 RELACION ENTRE LA CETP Y LA ENFERMEDAD ATEROSCLEROSA CORONARIA (EAC)

La enfermedad aterosclerótica coronaria es una de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad en adultos mexicanos según la Secretaría de Salud²⁸, así también en países desarrollados. En México se ha demostrado que la población tiene una predisposición genética de presentar varias formas de dislipidemias, entre ellas Colesterol-HDL bajo (hipoalfalipoproteinemia). Aunado a ello, varios reportes describen que aproximadamente el 85% de pacientes que presentan enfermedad aterosclerótica coronaria (EAC) están asociados a uno o más factores de riesgo como son: edad

avanzada, diabetes tipo 2, hipertensión, tabaquismo, antecedentes hereditarios de cardiopatía o algún tipo de dislipidemia.^{23,29}

En consecuencia todos estos factores de riesgo podrían tener relación o incluso tener su origen en alteraciones de la actividad de la CETP. La relación que existe entre la CETP, sus alteraciones genéticas y la susceptibilidad prematura a la aterosclerosis son muy complejas, ya que existen evidencias de ambos efectos, pro- y anti-aterogénico.

Como se mencionó anteriormente, aún es controversia si la CETP puede jugar un papel activo en el desarrollo de la aterosclerosis. Por una parte algunos indicios como la relación inversa entre CETP y los niveles de C-HDL, o la ausencia de CETP en ratones que son modelos muy malos de aterosclerosis, se orientan a postular a la CETP como aterogénica. Sin embargo, otro tipo de evidencias como la generación de partículas pre- β por acción de la CETP o la presencia de aterosclerosis temprana en la deficiencia homocigótica de CETP, señalan a la CETP como una proteína antiaterogénica²⁹.

A. ATEROSCLEROSIS

La aterosclerosis cuyo nombre proviene de los términos griegos *athéra* (papilla) y *sklérosis* (endurecimiento), es una enfermedad de la capa íntima de las arterias de mediano y gran calibre caracterizada por proliferación de células musculares lisas (CMLV) y depósito de lípidos que conforman placas visibles.³⁰

La pared arterial consta de tres capas o tunicas: una capa exterior de tejido conjuntivo, una capa media de fibras elásticas transversales y fibras musculares lisas y una capa interior o íntima formada por células endoteliales que están en contacto con el flujo sanguíneo (endotelio vascular). Las regiones arteriales más susceptibles de sufrir aterosclerosis son aquellas que presentan una retención incrementada de lipoproteínas aterogénicas como LDL, que es la fuente principal de colesterol, Lp(a) y lipoproteínas ricas en triglicéridos. Las LDL retenidas sufren modificaciones químicas y estructurales dando lugar a partículas de LDL agregadas, oxidada y liposomas ricos en colesterol no esterificado.^{31,32,33}

Se ha observado que la evolución de las placas hacia procesos trombóticos depende más de la composición de la placa (tipo de placa) que del grado de estenosis (tamaño de la placa) Además

contienen un núcleo lipídico que se compone de lipido extracelular, que deriva de la retención de LDL, y lipido situado intracelularmente en macrófagos y CMLV. Así como también contienen una elevada cantidad de células inflamatorias que liberan citosina activando las CMLV. Las CMLV activadas y las células inflamatorias, dando lugar a la rotura de la placa. Los linfocitos T estimulan este proceso al secretar interferón que inhibe la producción de colágeno por CMLV y conduce a la apoptosis de estas células. Algunos de los factores responsables del incremento de potencial aterogénico de la placa después de su rotura son el contenido de factor tisular (FT) en la placa expuesta y el número de células espumosas derivadas de macrófagos que producen FT. También el alto contenido de colesterol de LDL y colesterol total puede incrementar la activación y la agregación plaquetarias, facilitando la unión de fibrinógeno.³⁴

III. JUSTIFICACION

Se a puesto de manifiesto en México que la población tiene una predisposición genética de presentar varias formas de dislipidemias, en particular bajos niveles de C-HDL, así como de desarrollar enfermedades cardiovasculares; esto se ha atribuido a hábitos y estilos de vida como son: un consumo alto de calorías, tabaquismo, consumo de alcohol y sedentarismo.^{23,29}

Como se ha mencionado previamente, la CETP juega un papel importante en la modulación cualitativa y cuantitativa de los niveles de C-HDL vía el transporte reverso del colesterol. Se ha descrito que un incremento en la actividad de la CETP puede disminuir los niveles de C-HDL, esto se puede deber a la capacidad que tiene la CETP de transferir ésteres de colesterol de las HDL a las lipoproteínas ricas en triacilglicérolas. En consecuencia, la CETP tiene influencia sobre el metabolismo de otras lipoproteínas. También es conocida la relación inversa que existe entre los niveles de C-HDL y el riesgo de presentar cardiopatía. En este sentido, es importante enfatizar que la población mexicana presenta niveles de C-HDL notablemente más bajos que otros grupos étnicos lo que representa un riesgo de desarrollar EAC.²³

Al existir una influencia de la CETP sobre el metabolismo de las HDL y que éstas a su vez tienen una relación con el riesgo de desarrollar enfermedad aterosclerosa coronaria, es importante implementar un método para la determinación de la actividad en plasma de esta proteína de transporte, investigar la posible relación existente entre la actividad de la CETP, sus alteraciones genéticas y el desarrollo de presentar cardiopatía en mexicanos, ya que en nuestro país no existe ningún reporte al respecto.

IV. HIPOTESIS

- La determinación de la actividad de la Proteína de transferencia de ésteres de Colesterol (CETP) puede realizarse por métodos fluorescentes y radiactivos.

Asumiendo que la enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC) está asociada a alteraciones del metabolismo de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), y como la CETP juega un papel activo en ese metabolismo, esperamos que:

- En los pacientes que presentan cardiopatía isquémica coronaria existan alteraciones de la actividad de la Proteína de transferencia de ésteres de Colesterol (CETP) al compararlos con sujetos sanos.
- Si la proteína de transferencia de ésteres de Colesterol (CETP) tiene influencia sobre el metabolismo de las HDL, al existir una alteración sobre dicha proteína también se verán afectados los niveles de C-HDL.
- Si existe una relación entre el polimorfismo Taq1B y la actividad de la Proteína de transferencia de ésteres de Colesterol (CETP), los niveles de C-HDL plasmáticos tendrán una dependencia del genotipo.

V. OBJETIVOS

A. OBJETIVOS PRINCIPALES

- Comparar y establecer si existen diferencias de actividad de la Proteína de transferencia de ésteres de Colesterol (CETP), perfil de lípidos y el desarrollo de la enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC) en sujetos con y sin diagnóstico de la enfermedad.
- Implementar un método de Laboratorio para la determinación de la actividad de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP).

B. OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Caracterizar las diferencias que existen entre el tamaño y composición de la lipoproteínas de alta densidad (HDL) y la actividad de la Proteína de transferencia de ésteres de Colesterol (CETP).
- Determinar los niveles de actividad de la Proteína de transferencia de ésteres de Colesterol (CETP) para pacientes con cardiopatía así como para sujetos normales.

- **Caracterizar el efecto que tiene el polimorfismo Taq 1B sobre la actividad de la Proteína de transferencia de ésteres de Colesterol (CETP) y el perfil de lípidos.**

VI. MATERIAL

A. GRUPOS DE ESTUDIO

Se estudiaron a 151 sujetos, agrupados en tres categorías; sujetos con enfermedad aterosclerosa coronaria, sujetos sin diagnóstico de la enfermedad y sujetos cuyo polimorfismo Taq1B es conocido. Estos sujetos acudieron a distintos departamentos del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

En el momento de admisión se les realizó una historia clínica en la cual se incluyen las características antropométricas. Los criterios de selección que deben de reunir los sujetos para cada uno de los grupos en estudio, que se mencionan a continuación.

1. *Sujetos sin diagnóstico de cardiopatía*

Se seleccionaron 60 sujetos donadores del Banco de Sangre de este Hospital, proporcionados por la Dra. Mejía, clínicamente sanos con edades comprendidas entre 18 y 60 años, sin padecimientos crónicos, sin antecedentes clínicos, ni familiares con enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC), ni de diabetes, normotensos, sin enfermedades hepáticas previas, sin haber recibido algún tipo de vacuna en los últimos seis meses y sin estar en tratamiento médico de ningún tipo.

2. *Sujetos con cardiopatía*

Se seleccionaron 31 sujetos aleatoriamente, que participaron en el programa de educación preventiva que realizó el departamento de Endocrinología y estos fueron proporcionados por el Dr. Carlos Posadas. Los sujetos que se han integraron a este programa han sufrido al menos un infarto agudo de miocardio por isquemia aterosclerosa coronaria.

3. *Sujetos con fenotipo Taq1B conocido*

Se seleccionaron 68 sujetos con caracterización previa de su polimorfismo Taq1B, bajo el trabajo de tesis de Galicia M, 2002; 22 sujetos con genotipo B1B1, 24 sujetos con genotipo B1B2, 22 sujetos con genotipo B2B2. Los sujetos que integran este estudio son clínicamente sanos, de población abierta, sin padecimientos crónicos, sin antecedentes familiares de EAC, no hipertensos, no diabéticos, sin tratamiento medico de ningún tipo.

B. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de sangre de todos los sujetos en estudio, se colectaron en tubos de vidrio con Na₂ EDTA (1.5 mg/mL), después de que los sujetos cumplieran un ayuno no menor de 12 h.

Para separar el plasma del paquete celular, se centrifugó la muestra 15 min. a 3500 rpm. Posteriormente se hicieron alícuotas del plasma y se refrigeraron a - 70°C, estas se utilizaron para la determinación de actividad CETP, perfil de lípidos, subpoblación de HDL y lipoproteínas plasmáticas.

C. ANÁLISIS DE LABORATORIO

Se llevó a cabo la determinación de Colesterol total, Colesterol-HDL , triglicéridos y fosfolípidos mediante métodos enzimáticos y colorimétricos, el C-HDL fue determinado en el sobrenadante después de precipitar las apo B con una solución precipitante de sulfato de dextrana/magnésio (Ciba-Coming). El colesterol LDL fue calculado mediante la ecuación de Friedewalds ($C\text{-LDL} = C\text{-Total} - C\text{-HDL} - (Tg/5)$) La determinación de apo B se realizó por métodos de nefelometría.

D. SUBPOBLACIONES DE HDL

El plasma obtenido se ajusta a una densidad =1.063 g/mL con KBr sólido y se somete a una ultra centrifugación secuencial a 110,000 rpm durante 2 h 16 min. En esta parte primeramente se aislaron las lipoproteínas que contienen apo B (VLDL, IDL, LDL). El remanente de plasma se ajustó a una densidad =1.210 g/mL con KBr sólido y se somete a ultra centrifugación a 110,000 rpm por 2 h 35 min. En esta etapa se separan las HDL, sin contaminación de Apo B, bajo estas condiciones, del 80% a 85% de la Apo A1 del total del plasma se recupero de las fracciones de HDL, según se verificó por electroforesis con SDS.

Después de llevar a cabo la separación de las HDL por ultra centrifugación, se realizó una diálisis con una solución amortiguadora de TBE (Tris-Borato-EDTA pH=8.4), posteriormente se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante con un gradiente del 4% al 30%, usando como marcadores de peso molecular, proteínas globulares (Farmacia, Uppsala, Suecia). Previamente se cuantificó la cantidad de proteína (Método de Lowry) para establecer la cantidad de muestra equivalente a 20 µg de proteína con solución de muestra (sacarosa-azul de bromofenol en solución amortiguadora de TBE, 1µL de solución/10µg de proteína) que se depositan en cada pozo del gel. Se realizó una precorrida del gel a 20 volts por 15 min para equilibrar el gel en la solución amortiguadora de TBE, después se depositó la muestra en cada pozo y se corrió a 70 volts por 15

min. para concentrar la muestra y por último se corrió 20 h a 165 volts, después de este tiempo se detuvo la electroforesis, para visualizar las bandas de proteína de HDL y marcadores se realizó una tinción con azul Coomassie (Bio-Rad R-250) y finalmente se analizó por densitometría (Molecular Analyst Software Versión 1.1, 1994 Bio-Rad), para determinar los diámetros de las HDL.

E. AISLAMIENTO DE APO AI

Se obtuvieron HDL por ultra centrifugación secuencial, posteriormente se liofilizaron y se deslipidaron con una mezcla de solventes orgánicos (etanol: éter, 2:1). La parte proteica se disolvió en solución Tris-HCl 30mM (Boehringer Mannheim) y solución amortiguadora de Urea 6M pH =8.0, esta mezcla se separó por cromatografía de intercambio iónico, para obtener Apo AI, usando una columna Uno™-Q1 (Bio Rad Serie Q1-2291) acoplada a un sistema de cromatografía Bio Rad Dou Flow. La elusión de proteínas se realizó con un gradiente lineal en la misma solución amortiguadora conteniendo NaCl 0.1 M. Se colectaron fracciones de 250µL y se seleccionaron solo las fracciones que contenían apo AI, esto se verificó con una electroforesis con SDS en un gradiente de 4% a 21%, haciendo visibles las bandas con una tinción de azul de Coomassie, obteniéndose una pureza del 98%. La concentración de Apo AI fue estimada por espectrofotometría, asumiendo un coeficiente de extinción molar =1.13 mL/mg*cm. Las fracciones que contenían apo AI se dializaron con Bicarbonato de amonio 5mM, posteriormente se liofilizaron y se almacenaron a -20°C.

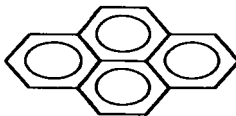
F. TIPIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO Taq 1B

La tipificación de este polimorfismo se realizó en el Departamento de Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología, de acuerdo al método descrito en el Apéndice 2.⁷¹ Las muestras de plasma de los sujetos fenotipados nos las otorgó amablemente el Dr. Cardoso dentro del marco de un programa de cooperación científica.

VII. MÉTODOS

A. MÉTODO FLUORESCENTE

Este primer método que probamos para determinar la actividad de la CETP, fue descrito previamente por Ohnishi *et. al.* 1994, se basa en la transferencia de fosfatidilcolina desde un liposoma donador hacia otro aceptor. La transferencia se puede cuantificar utilizando fosfatidilcolina marcada con pireno (Pyr) en las partículas donadoras, aprovechando la característica del pireno de formar exímeros. En efecto, el pireno es un compuesto cíclico fluorescente que tiene la característica de formar exímeros cuando se encuentra en altas concentraciones locales. Cuando el pireno se excita con una longitud de onda de 340 nm, los exímeros emiten a una longitud de onda de 475 nm, mientras el monómero emite a una longitud de onda de 398 nm. De esta manera, la transferencia de fosfolípidos de un liposoma marcado a uno no marcado, facilitada por la CETP, disminuye las concentraciones locales de pireno y por tanto, de exímeros. Lo anterior se traduce en una disminución en la emisión de la fluorescencia a 475 nm acompañada de un ligero aumento en la emisión a 398 nm. Aprovechando esta característica medimos la transferencia de partículas entre los liposomas donadores y aceptores.



Pireno

Fig. 10 Estructura química del pireno

s PREPARACION DE LIPOSOMAS

- *Liposomas donadores*

Los liposomas fueron preparados mezclando 2 mg fosfatidilcolina- CHCl_3 , 2 mg Triacilglicerol y 0.1 mg Pyr-Colesterol esterificado-hexano, en un tubo de vidrio, se evaporó el disolvente bajo una corriente de N_2 y agitación y finalmente la mezcla se secó al vacío durante tres horas. Enseguida se agregó bajo agitación enérgica una solución amortiguadora Tris (Tris10mM, NaCl 140mM, EDTANa₂ 1nM, NaNa₃ 0.01%, pH 7.4) para formar una suspensión de lípidos. La suspensión se sometió a 3 ciclos de

sonicación de 10 minutos continuos cada uno, por medio de una sonda de titanio acoplada a un disruptor celular por ultrasonido para formar los liposomas. Los liposomas se separaron de los restos de titanio de la sonda, así como de los lípidos que no se integraron a estructuras estables bien definidas, por una ultracentrifugación de 30 min. a 90000 rpm, seguida de una separación en una columna de 1 X10 cm de gel de sefarosa 4B (Farmacia, Uppsala Suecia), acoplada a un sistema de cromatografía líquida DuoFlow (Bio Rad). De esta manera obtuvimos partículas homogéneas, de las mismas características en tamaño y composición, evitando así la trasferencia de fosfolípidos promovida por colisiones entre partículas de diferentes tensiones de superficie. Se colectó el pico principal del perfil de elusión en fracciones de 1 mL. Para establecer cuáles de las fracciones contenían partículas con proporciones similares de exímeros y monómeros, determinamos el cociente de las emisiones de exímero/ monómero (E/M). Las fracciones con los cocientes E/M mayores e iguales, se mezclaron y se utilizó como el sustrato donador. El sustrato así preparado es estable durante al menos 4 semanas si se mantienen al abrigo de la luz y en refrigeración. Para terminar se determina el contenido de fosfolípidos en el sustrato.

- *Liposomas aceptores*

Los liposomas fueron preparados mezclando 2 mg fosfatidicolina-CHCl₃ y 2 mg Triacilglicerol, en un tubo de vidrio y se realiza el mismo procedimiento que para las partículas marcadas. Para seleccionar las fracciones útiles, se tomó como modelo el cromatógrama de las partículas fluorescentes. A la mezcla de las fracciones se les determinan los fosfolípidos.

- *Transferencia CETP*

Para llevar a cabo la reacción se colocaron 0.8 µg de fosfolípidos de partículas donadoras (marcadas con Pr_y) y 7.2 µg de fosfolípidos de partículas aceptoras (no marcadas). La mezcla se lleva a un volumen de 1 ml con solución amortiguadora Tris (CETP), y se coloca en el fluorómetro para realizar un barrido de fluorescencia y una lectura inicial de la emisión de exímeros (475nm) y monómeros (398nm) de pireno. Posteriormente se agregan 10 µL de plasma, y se realizan lecturas a longitudes de onda de emisión de 475nm para el exímero y 398 nm para el monómero, con una longitud de onda de excitación de 340 nm, cada minuto durante 10 minutos y después de este tiempo se toman lecturas cada hora durante 24h manteniendo la reacción a 37 °C.

Posteriormente se realizan los cálculos necesarios para obtener la transferencia entre las partículas en base a una fórmula empírica descrita por Ohnishi *et. al.*³⁵

B. METODO RADIOACTIVO

La actividad CETP se determinó de acuerdo al método descrito por Tollefson JH *et al* en 1986, con modificaciones realizadas en nuestro laboratorio.³⁶

a) Preparación de sustrato aceptor (VLDL, IDL, LDL)

Se extrae sangre total de sujetos sanos en tubos con EDTA-Na₂ (1,5 mg/ml), para separar el paquete celular del plasma se centrifuga a 3500 rpm por 10 min., se extrae el plasma y se agrega apotininina (10µl/ml plasma) y PMSF (1µl/ml plasma) como inhibidores de proteasas. Posteriormente se ajusta el plasma a densidad =1.060 g/ml con KBr sólido y esta fracción se separa por ultracentrifugación secuencial. El sobrenadante obtenido se dializa en una solución amortiguadora 0.14 M NaCl /10mm Tris /mM EDTA/0.01% azida de sodio a un pH 7.4. Finalmente se realizan alícuotas de 1 ml y se guardan a -20 °C. Para verificar la calidad del sustrato (VLDL, IDL), se cuantifican proteínas y se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida con un gradiente de 3% a 19% en presencia de SDS.

b) Preparación de ³H-Colesterol Esterificado HDL₂:

Con el remanente de la anterior centrifugación se realiza un pool y se ajusta a una densidad = 1.11 g/ml con KBr sólido y se centrifuga a 110,000 rpm durante 2 h 35 min. a 10° C (Beckman Optima TLX), la densidad es ajustada por la adicción de KBr sólido (Laitz), el sobrenadante se desecha (LDL + HDL₂) y el remanente (HDL₃ + plasma), se dializa contra amortiguador Tris. Después de la diálisis se recupera la muestra, se coloca en un tubo de vidrio y se le agregan 100 µl de ³H-Colesterol en etanol (equivalente a 50 µCi [1α,2α(n)-³H] Colesterol, amersham farmacia biotech), gota a gota y con una suave agitación. Se deja incubar por 18h a 37°C, se ajusta a una densidad =1.25 g/ml con KBr sólido y se realiza una ultracentrifugación a 110,000 rpm durante 2 h 35 min. para obtener HDL₃. El KBr se elimina por medio de una nueva diálisis contra una amortiguador Tris por dos días. Al término de la diálisis se recupera la muestra y se realizan alícuotas de 200 µL y se guardan a -20 °C. Para determinar el porcentaje de esterificación se realiza una extracción de los lípidos con cloroformo-metanol 2:1 y se separan el colesterol libre del esterificado por cromatografía en capa fina utilizando placas de poliéster cubiertas de gel de sílice (Aldrich, Milwaukee, WI) y como eluyente éter de petróleo,

éter etílico y ácido acético (90:10:5, v/v). La placa se revela con yodo sublimado (I_2), y se identifican las posiciones del colesterol libre y esterificado por medio de los estándares correspondientes. Las zonas que corresponden a cada uno de ellos se recorta y se determina la radiactividad en un contador de radiación beta (Liquid Scintillation Analyzer TRI-CARB 2200CA, Packard) utilizando 4 ml líquido de centelleo por muestra (CytoScint, ICN Costa Mesa, CA). El porcentaje de esterificación se calcula con base en la cantidad de radiactividad de los ésteres de colesterol respecto a la radiactividad total recuperada en la placa. Para controlar la calidad de nuestras HDL₃, se realiza una electroforesis adicionando SDS, en gel de poliacrilamida con un gradiente 4% a 21% y otra en gel de poliacrilamida en condiciones nativas con un gradiente 4% a 30%

c) Transferencia CETP

En un tubo de plástico desechable de fondo cónico se colocan 3 μ L de donador (HDL₃-³H) equivalente a 10,000 dpm (equivalente a 120 μ g de proteína), se agregan 100 μ L de aceptor (VLDL, LDL), equivalente a 240 μ g proteína. La mezcla debe tener una proporción 1:2, donador: aceptor. Se agregan 10 μ L del plasma problema, 500 μ L de solución amortiguadora Tris y se mezcla suavemente. Para el blanco se agrega lo mismo excepto el plasma y todas las muestras se realizan por duplicado. Se incuba a 37°C por 16 h. Después de la incubación se toman 100 μ L de la mezcla, al restante se agrega 50 μ L de reactivo precipitante. Las lipoproteínas LDL y VLDL son precipitadas con sulfato de dextrana y sulfato de magnesio, permaneciendo en el sobrenadante las HDL, posteriormente se centrifuga después de 5 min a 2500 rpm 10 min. Del sobrenadante se toma una alícuota de 100 μ L, ambas alícuotas se colocan en frasco de vidrio por separado, se les agrega 4 ml de líquido de centelleo, para su posterior lectura en el contador de radiación beta. Los resultados se expresan como el porcentaje de radiactividad transferida a la fracción precipitada.

RESULTADOS

VIII. METODO FLUORESCENTE

En una primera etapa se prepararon los liposomas que se utilizaron como sustrato según se describe en el capítulo de metodología. La Fig.11 corresponde al perfil de elución de la columna de cromatografía en gel de sefarosa 4B del sustrato preparado. Se muestra igualmente el cociente E/M de las fracciones recuperadas. Cuando los cocientes E/M son semejantes entre las fracciones, nos indica que contienen liposomas con proporciones similares de CE-Pyr respecto a los fosfolípidos totales. En consecuencia se seleccionaron las fracciones colectadas de la 6 a la 11 para ser utilizadas como sustrato donador de la marca de pireno. Para las vesículas receptoras se procedió de la misma manera y se seleccionaron las mismas fracciones 6 a la 11 como sustrato aceptor.

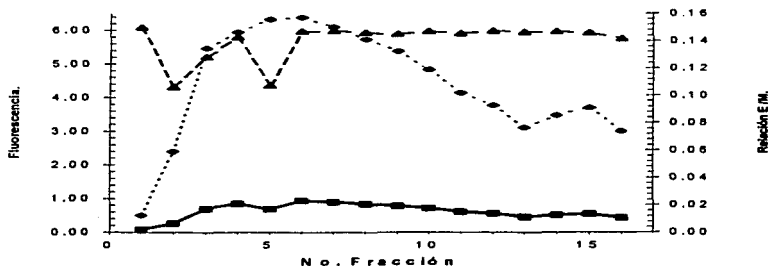


Fig 11. Perfil de elución de los liposomas marcados con PhCol-Pyr (2 mg fosfatidilcolina, 2 mg triglicérido y 0.1 mg Pyr-CE) en una columna de Sepharosa 4B. Determinación de fluorescencia para cada una de las fracciones obtenidas. Determinando al exímero a 475 nm (Exímero) y para el monómero a 398 nm (Mon) con una longitud de onda de excitación de 340 nm para ambos. Cuando la relación se vuelve constante y hay una mayor proporción tanto de exímero como de monómero, (E/M) con relación a la fluorescencia, tenemos partículas homogéneas. Las fracciones 6 a la 11, cumplen con estas características por lo que se separan y se hace una mezcla entre ellas. Esta mezcla se utiliza para la reacción de transferencia con la CETP.

La presencia de exímeros en los liposomas marcados se verificó por medio de un espectro de emisión entre 355 y 500 nm (Fig 12). Se observan los dos picos característicos de fluorescencia de los

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

monómeros del pireno a 378 y 398 nm, mientras que los exímeros se manifiestan por un máximo de emisión a 475 nm³⁷

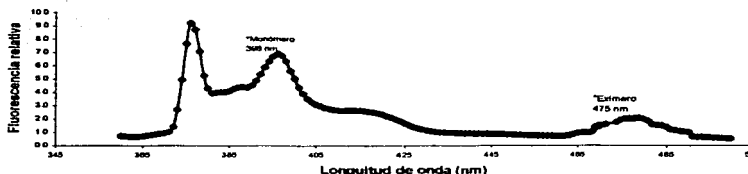


Fig. 12. Espectro de emisión de fluorescencia para los liposomas marcados con PhCol-Pyr (2 mg fosfatidilcolina, 2 mg triacilglicerol y 0.1 mg Pyr-CE) que se realiza de 355 a 500 nm para observar el comportamiento del monómero a 375 y 398 nm y del exímero a 475 nm.

Con los liposomas marcados y no marcados así preparados, procedimos a determinar la actividad CETP de un muestra de plasma control recién obtenido. Se pusieron en contacto el donador y el aceptor en una relación (1:9) respectivamente y se determinaron de manera continua y simultanea las emisiones del monómero a 398 y del exímero 475nm. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 24 h para determinar si existían intercambios inespecíficos de la marca fluorescente. Observamos que después del tiempo de incubación, la proporción E/M se mantenía sin cambio respecto al tiempo inicial, indicando que no existen intercambios inespecíficos entre los liposomas. Considerando al valor inicial de E/M como un 100%, al añadir el plasma de ensayo, observamos un incremento inmediato en el cociente E/M del 15% aproximadamente. Observamos un aumento similar en el porcentaje de E/M inicial cuando añadimos un plasma inactivado a 60°C, indicando que tal incremento inicial es inespecífico y se debe muy probablemente a sustancias plasmáticas que emiten en las longitudes de onda utilizadas o a la presencia de partículas que generan dispersión de luz. Para estimar el máximo decremento del porcentaje E/M inicial debido a la transferencia facilitada por la CETP, en los resultados obtenidos más adelante se consideró el incremento debido a la adición de la muestra, realizando una corrección.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Bajo las condiciones descritas arriba, no observamos más del 5% de decremento en el porcentaje de E/M inicial después de incubar 24 h a 37°C (resultados no mostrados). Por lo anterior, se agregaron 20 µg de apolipoproteína AI por ensayo con el fin de reestructurar a los liposomas y favorecer la transferencia mediada por CETP³⁸. La cinética de transferencia bajo estas condiciones se presenta en la Fig. 13. La transferencia de ésteres de colesterol marcado desde la partícula donadora hacia el aceptor resulta en una dilución local de pireno y como consecuencia una disminución de la cantidad de exímeros existentes. Desde el tiempo 0 hasta las 5 h la fluorescencia del exímero disminuye y la del monómero aumenta, indicando que se está llevando a cabo la transferencia de ésteres de colesterol. A las 12h de incubación se alcanzó la transferencia máxima, que equivale para este pool de plasma control a 23.5% de reducción del porcentaje del cociente E/M inicial, corregido por el incremento inespecífico producido por la adición del plasma a la mezcla de transferencia (10.1%). La ausencia de transferencia cuando se adiciona un suero inactivado a 60°C, 30 min, indica la especificidad de la prueba. En resumen, las condiciones adecuadas para estimar la actividad CETP utilizando esta sonda fluorescente son: 12h de incubación a 37°C. Bajo estas condiciones se alcanza una transferencia máxima equivalente al 23.5% de reducción en el E/M inicial. No obstante, la transferencia medida como punto final, posee poco significado para evaluar la actividad CETP por este método fluorescente. En su lugar, es preferible expresar el porcentaje de transferencia como una tasa de transferencia fraccional un mejor indicador de la actividad CETP que la medición a punto final. Para estimar la tasa de transferencia k, los datos experimentales de E/M expresados como fracción de 1, se adecuaron a la ecuación empírica siguiente:³⁵

$$\ln [(Ex/Mon)-b] = -2(k/L_1)t + cte$$

en donde L_1 representa la cantidad de fosfolípidos presentes en las partículas donadoras, b es el valor del intercepto en la regresión lineal de la calibración de la relación E/M para el contenido de Pyr en los liposomas y la C es el valor del intercepto de la regresión lineal de la cinética de la reacción. Para el ensayo presentado en la Fig.14, la tasa de transferencia es de 0.2754 (1/h)

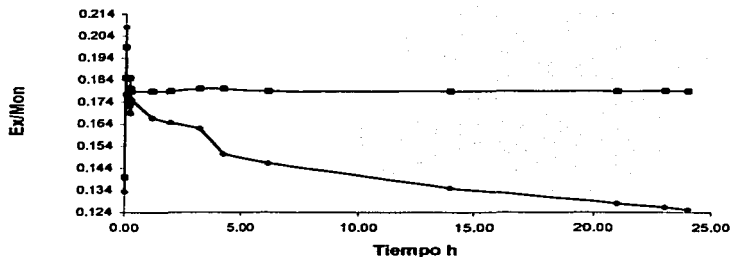


Fig. 13 Reacción de transferencia de ésteres de colesterol, debida a la CETP. La reacción se llevó a cabo entre liposomas donadores (0.8 μ g de fosfolípidos) incubados con liposomas aceptores (7.2 μ g de fosfolípidos-no marcados), en presencia de 10 μ L de plasma (con CETP ● o inactivado a 60°C sin CETP ■) y la reacción EM fue monitoreada por medición de la fluorescencia durante 24h.

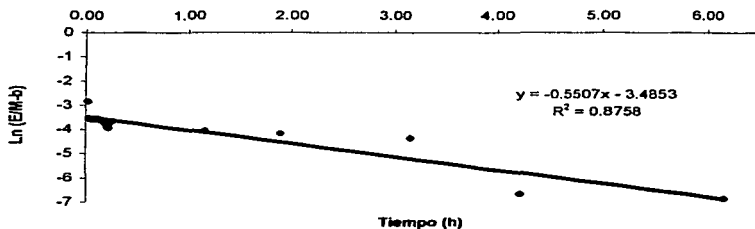


Fig. 14 Taza de transferencia fraccional para la CETP. Representación gráfica para el cálculo de la tasa de transferencia entre liposomas donadores (0.8 μ g de fosfolípidos) incubados con liposomas aceptores (7.2 μ g de fosfolípidos-no marcados), en presencia de 10 μ L de plasma (con CETP). De donde la Taza de transferencia corresponde al cálculo de la pendiente de la gráfica ($m = -0.5507 = -2(k_{12})$), por lo tanto $k_{12} = 0.2754$

Para evaluar de manera más objetiva las posibles bondades de la determinación de la actividad CETP por el método fluorescente, implementamos el método utilizando colesterol tritiado descrito previamente por Tollefson H. *et al.* (1986)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B. METODO RADIOACTIVO

Abordamos la adecuación a nuestro laboratorio de un segundo método, en este caso radiactivo, para la determinación de la actividad CETP según se ha descrito previamente Tollefson *et al.* 1986³⁶. El procedimiento general consiste en dos etapas; la primera consiste en la preparación del sustrato radiactivo y la segunda es el ensayo para determinar la actividad.

1. Preparación del sustrato.

El infranadante de densidad 1.12 g/mL marcado con colesterol tritiado se incubó según se describe en el capítulo de métodos. Bajo estas condiciones, el colesterol se incorpora a la única población de lipoproteínas existentes, las HDL₃. La incubación resulta en la esterificación del colesterol radiactivo recién incorporado por medio de la lecitina colesterol acilo transferasa que se encuentra en ese infranadante. Para establecer la proporción de colesterol esterificado presente en nuestro sustrato, realizamos la separación del colesterol libre del esterificado por medio de una cromatografía en capa fina según se describe en el capítulo de métodos. De esta manera determinamos que por este método el rendimiento de esterificación fue del 96.3% en el sustrato preparado, con una radiactividad de 3354.7 ± 50.9 dpm/ μ L. Se podría argumentar que el procedimiento de preparación de los sustratos altere la estructura de las lipoproteínas donadoras y receptoras. Por lo anterior y para determinar la integridad de los diferentes sustratos, se analizaron por medio de una electroforesis en gradiente de poliacrilamida (Fig 15). Observamos que no existen alteraciones apreciables de la estructura de las HDL por el procedimiento al que fueron expuestas.

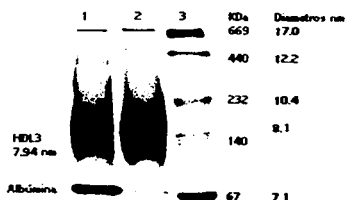


Fig. 15 Electroforesis de poliacrilamida en condiciones nativas (4-30%). Análisis de la estructura de HDL₃ antes (carril No. 1) y después de introducir la sonda radiactiva 3H-Colesterol (carril No. 2), en el carril No 3 se encuentra el marcador

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Enseguida, se implementaron las condiciones adecuadas para llevar a cabo la reacción determinando la cantidad de aceptor, de donador, temperatura y tiempo de incubación. De acuerdo a lo reportado previamente por otros autores, el tiempo y la temperatura de incubación son de 20 h y 37°C, respectivamente para un volumen de plasma de 20 µl. Nuestros primeros ensayos se llevaron a cabo bajo estas condiciones.

2. Cantidad de donador y aceptor

Se llevaron a cabo pruebas de actividad CETP utilizando un pool de muestra de plasma y con diferentes concentraciones de partículas aceptoras y donadoras. Cuando se utilizaron partículas donadoras conteniendo 3000 dpm de partículas donadoras en presencia de un exceso de partículas aceptoras (120 µg de proteína) no observamos transferencia. Ahora cuando se utilizaron partículas donadoras conteniendo 10000, 15000 y 18000 dpm las lecturas fueron muy similares a las tasas de transferencia obtenidas. Por lo anterior y por principio de economía, partimos de partículas donadoras que contienen 10000 dpm, correspondiente a 124.43 µg de proteína, para nuestros ensayos ulteriores. El siguiente parámetro a optimizar fue la cantidad de aceptor. Los resultados de las transferencias obtenidas con las diferentes cantidades de aceptor y partículas donadoras que contienen 10000 dpm se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Efecto de la cantidad de aceptor para la validación del método radiactivo

Cantidad de aceptor (volumen/ proteína)	10 µL/25 µg.	50µL/120 µg	100 µL/240 µg	200 µL/480 µg
% transferencia CETP (n = 10)	1.85	14.59	23.10	15.54
Actividad CETP (mgCE/mL*h)	0.022	0.175	0.277	0.186
SD	0.07	0.57	1.13	0.64
CV	3.82	3.88	4.9	4.10

SD: desviación estándar. CV: coeficiente de variación.

Según lo descrito anteriormente, con partículas que contienen 10000 dpm (124.3µg de proteína) de las partículas donadoras y 100µL (240 µg de proteína) de partículas aceptoras, se registro la mayor transferencia, por lo que se consideró para los ensayos posteriores

3. Temperatura óptima

Después de haber determinado la cantidad de donador y aceptor más favorable para llevar a cabo la reacción consideramos la temperatura. Originalmente el método se realiza a 37°C. Sin embargo, algunos autores³⁹ a 40°C se obtienen tasas de transferencia más elevadas en menor tiempo. Por lo tanto decidimos realizar ensayos de transferencia a estas dos temperaturas. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Efecto de la temperatura para la validación del método radiactivo.

Temperatura	37°C	40°C
% Transferencia CETP n = 10	25.3	8.25
Actividad CETP (mgCE/mL*h)	0.304	0.099
SD	0.64	0.35
CV	4.8	4.29

SD: desviación estándar. CV: coeficiente de variación.

Como podemos observar donde hubo una mayor transferencia fue a 37°C, probablemente a temperaturas más elevadas la CETP se inactiva. Posteriormente se determinó el tiempo óptimo de transferencia.

4. Tiempo óptimo de incubación

Para estimar el tiempo óptimo de transferencia, se realizó una cinética monitoreando durante 24 h la cantidad de radiactividad transferida, tomando como referencia al aceptor (Fig.16). A las 18 h de incubación se presentó un máximo de transferencia que posteriormente disminuye con la incubación. Por lo tanto, el intervalo óptimo fué de 16 a 18 h dando una transferencia de 26.0% para el pool de plasma utilizado.

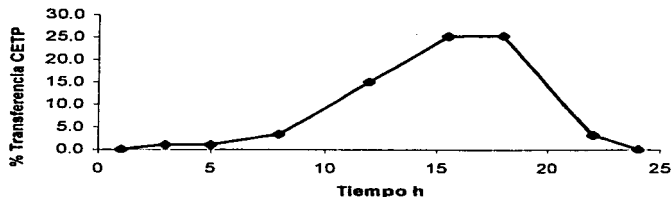


Fig. 16 Cinética de reacción de transferencia de la CETP. La reacción se llevó a cabo incubando a 37°C 3 μ L de 3 H-HDL₂ (equivalente a 10000 dpm y 120 μ g de proteína), como partículas donadoras y 100 μ L de aceptor (VLDL/LDL, equivalente a 240 μ g proteína) en presencia de 10 μ L de plasma que contiene a la CETP. La cantidad de radiactividad transferida fue monitoreada durante 24h, encontrándose un máximo entre las 15-18h.

4. Reproducibilidad

Una vez establecidas las condiciones óptimas para el método se procedió a verificar su reproducibilidad. Para ello, se realizaron determinaciones de la actividad CETP de un plasma control 10 veces por triplicado cada una, el mismo día (intra ensayo) y 1 vez por duplicado en 10 días diferentes (inter ensayo). Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Variabilidad inter e intra ensayo para la validación del método radiactivo.

	Intra ensayo	Inter ensayo
% Transferencia de CETP n=10	28.3	29.1
Actividad CETP (mgCE/mL ² h)	0.340	0.350
SD	1.2	0.9
CV	3.94	3.09

SD: desviación estándar. CV: coeficiente de variación.

5. Elección del método

La cinética de transferencia de ésteres de colesterol mediada por la CETP alcanza el máximo de actividad alrededor de 20 horas. En consecuencia, un método que solo permite trabajar una muestra a la vez, resulta poco práctico, como es el caso del método fluorescente que exploramos. En efecto, para obtener resultados cuantificables, se requiere monitorear la cinética de desaparición de exímero y aumento de la fluorescencia del monómero durante 16 horas. En las condiciones actuales de nuestro laboratorio, solo se puede realizar una muestra por ensayo. Por lo anterior, y pese haber

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

obtenido resultados alentadores con el marcador fluorescente, evitamos continuar sobre esa línea por la infactibilidad práctica del método, ya que el objetivo de la prueba es poder evaluar la actividad CETP en diferentes muestras de sujetos como se detalla a continuación. En conclusión, para continuar con la segunda etapa del presente trabajo, optamos por el método radiactivo que resultó ser más práctico que el método fluorescente.

ACTIVIDAD CETP Y ENFERMEDAD ATEROSCLEROSA CORONARIA

Después de haber validado el método descrito, la segunda etapa del presente trabajo, consistió en determinar el impacto que tiene la actividad CETP en dos grupos de sujetos, uno con diagnóstico de EAC (EAC, n=31) y el segundo sin sintomatología ni historia familiar de EAC (denominado SDE, n=52). En la tabla 7 se presentan las características antropométricas y perfil de lípidos de ambos grupos.

Tabla 7. Características antropométricas y perfil de lípidos de los grupos EAC Y SDE.

	SDE Media(DS)	EAC Media (DS)	P
No. Sujetos	52	30	
Hombres	44	25	
Mujeres	8	5	
Edad (años)	29.9(±8.9) ^a	56.4(±9.8)	0.000
IMC (Kg/m ²)	26.6(±3.7)	28.0(±3.4)	0.076
Coolesterol (mg/dL)			
Total	165.8(±41.0) ^a	188.2(±34.5)	0.010
HDL	45.1(±11.2) ^a	35.4(±8.9)	0.000
LDL	86.8 (±39.9) ^a	118.4(±31.5)	0.000
Triglicéridos (mg/dL)	142.2(±64.3) ^a	209.5(±70.4)	0.000
Índice aterogénico	2.8(±1.2) ^a	4.5(±1.3)	0.000

Los valores expresan la media(± DS).

IMC: Índice de masa corporal (peso/altura²). EAC: sujetos con enfermedad aterosclerosa coronaria. SDE sujetos sin diagnóstico de la enfermedad. DS: desviación estándar.

^aExpresa diferencias estadísticamente significativa entre los grupos EAC y SDE. El análisis estadístico de los resultados se realizó por una prueba t student.

Se observa que los factores lipídicos de riesgo coronario, a saber, CT, C-LDL y Tg se encuentran elevados en el grupo EAC respecto a los sujetos del grupo SDE. Y por el contrario, los niveles plasmáticos de C-HDL son significativamente menores en los sujetos del grupo EAC con respecto a los del SDE. Como consecuencia, el índice aterogénico, calculado como el cociente del C-Total-C-HDL/ C-HDL, es casi del doble en los sujetos con diagnóstico de enfermedad aterosclerosa.

Como se sabe el nivel plasmático de lípidos esta relacionado con la edad, sexo, IMC, y considerando que nuestra población no es homogénea en estos factores, se realizó un análisis estadístico utilizando una prueba de ANCOVA controlando las variables antes mencionadas, para evitar que actuaran como variables confusoras. Este análisis nos mostró que sólo el C-LDL mantiene una diferencia significativa ($p < 0.016$), así como los triacilgliceroles ($p < 0.017$).

Partiendo de que algunas alteraciones en el perfil de lípidos podrían tener su origen, al menos parcialmente, en modificaciones de la actividad de la CETP, determinamos la actividad de la proteína en el plasma de cada uno de los sujetos de ambos grupos. La actividad promedio de los 52 sujetos del grupo SDE fue de $30.3 \pm 0.9\%$ de ésteres de colesterol transferido por $10 \mu\text{L}$ de plasma, por 18 horas, muy próxima a la actividad promedio de los 31 sujetos del grupo EAC que fue de $28.8 \pm 1.4\%$, siendo diferentes no alcanzan significado estadístico. El análisis estadístico se realizó utilizando una prueba de ANCOVA controlando las variables confusoras (edad, sexo, IMC).

Al no observar diferencia significativa entre ambos grupos decidimos agrupar a nuestros sujetos por terciles de actividad CETP (Tabla 8 y 9). Donde observamos que el colesterol total y el C-LDL en el grupo de sujetos EAC, tienden a disminuir conforme se incrementa la actividad CETP (Grafica 1,2,3) Sin embargo, dichas tendencias no alcanzaron significado estadístico.

Tabla 8. Resultados analizados por terciles de actividad CETP en sujetos EAC.

EAC-TERCIL	1	2	3
% Transferencia CET P	21.3(± 3.7)	31.3(± 2.6)	38.2(± 2.7)
Actividad CETP (mgCE/mL*h)	0.256(± 0.04)	0.376(± 0.03)	0.458(± 0.03)
C-Total mg/mL	204.6(± 31.9)	181.4(± 38.6)	178.6(± 30.1)
C-HDL mg/mL	32.5(± 4.17)	38.3(± 11.7)	35.3(± 9.7)
C-LDL mg/mL	127.9(± 45.1)	114.9(± 34.3)	112.4(± 40.1)
Triacilgliceroles mg/mL	275.4(± 20.8) ^a	180.8(± 20.3) ^b	172.2(± 19.6)

Los valores expresan la media(\pm DS). El análisis estadístico se realizo utilizando una prueba de ANCOVA ajustando por edad, IMC y sexo.

IMC: Índice de masa corporal (peso/altura²). EAC: sujetos con enfermedad aterosclerosis coronaria. DS: desviación estándar.

EAC-TERCIL 1: Expresa al grupo de sujetos que presentan una menor actividad CETP.

EAC-TERCIL 2: Expresa al grupo de sujetos que presentan una actividad intermedia CETP

EAC-TERCIL 3: Expresa al grupo de sujetos que presenta una mayor actividad CETP.

^a Expresa diferencia estadísticamente significativa entre el tercil 1 y el tercil 3 $p < 0.002$

^b Expresa diferencia estadísticamente significativa entre el tercil 1 y el tercil 2 $p < 0.006$

Tabla 9. Resultados analizados por terciles de actividad CETP en sujetos SDE.

SDE-TERCIL	1	2	3
	Media (DS)	Media (DS)	Media (DS)
% Transferencia CETP	24.5(±1.2)	28.9(±1.2)	33.7(±2.5)
Actividad CETP (mgCE/mL·h)	0.294(±0.01)	0.347(±0.01)	0.404(±0.03)
C-Total mg/mL	166.4(±49.3)	162.9(±37.9)	168.2(±37.9)
C-HDL mg/mL	45.6(±13.0)	49.3(±9.4) ^a	40.2(±9.7)
C-LDL mg/mL	95.7(±45.1)	70.5(±34.3)	95.1(±40.1)
Tnaciilgliceróles mg/mL	136.5(±15.5)	152.5(±15.4)	136.8(±16.0)

Los valores expresan la media(± DS). El análisis estadístico se realizó utilizando una prueba de ANCOVA ajustando por edad, IMC y edad

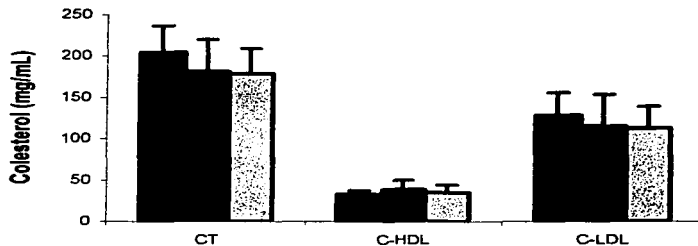
IMC: Índice de masa corporal (peso/altura²). SDE sujetos sin diagnóstico de la enfermedad. DS: desviación estándar.

SDE-TERCIL 1: Expresa al grupo de sujetos que presentan una menor actividad CETP.

SDE-TERCIL 2: Expresa al grupo de sujetos que presentan una actividad intermedia CETP

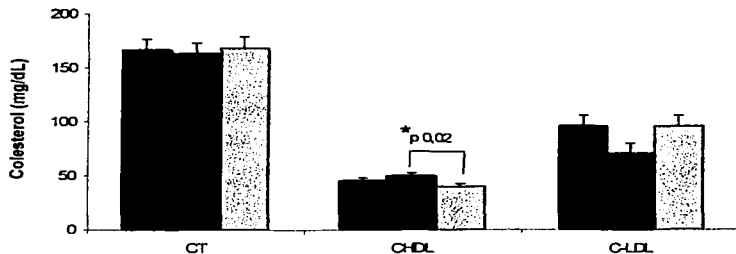
SDE-TERCIL 3: Expresa al grupo de sujetos que presenta una mayor actividad CETP.

^a Expresa diferencia estadísticamente significativa entre el tercil 2 y el tercil 3 p<0.002

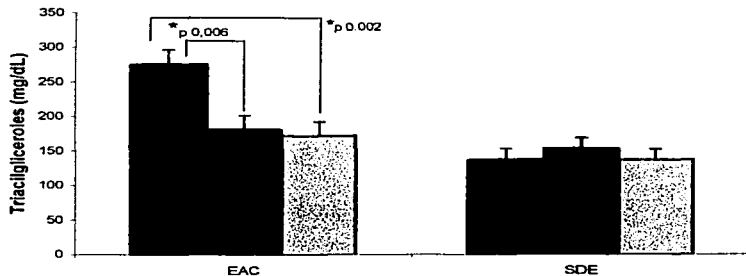


GRAFICA 1. Efecto de la Actividad CETP sobre las concentraciones plasmáticas de lípidos de sujetos EAC. A los sujetos EAC que se les determinó % Act. CETP por el método radiactivo, se dividió por terciles de actividad. El tercil 1 ■ corresponde al grupo de sujetos que tienen una actividad más baja (21.3±3.7). El tercil 2 ■ corresponde al grupo de sujetos que tienen una actividad intermedia (31.3 ±2.6). El tercil 3 ■ corresponde al grupo que tienen la actividad más alta (39.2±2.7). CT: Colesterol Total. C-HDL: Colesterol HDL. C-LDL: Colesterol-LDL.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



GRAFICA 2. Efecto de la Actividad CETP sobre las concentraciones plasmáticas de lípidos de sujetos SDE. A los sujetos SDE que se les determino % Act. CETP por el método radiactivo, se divido por terciles de actividad. El tercil 1 ■ corresponde al grupo de sujetos que tienen una actividad más baja (24.5 ± 1.2). El tercil 2 ■ corresponde al grupo de sujetos que tiene una actividad intermedia (28.9 ± 1.2). El tercil 3 □ corresponde al grupo que tienen la actividad más alta (33.7 ± 2.5). CT: Colesterol Total. C-HDL: Colesterol HDL. C-LDL: Colesterol-LDL.



GRAFICA 3. Efecto de la % Actividad CETP sobre las concentraciones plasmáticas de triacilglicérols de ambos sujetos EAC (sujetos con EAC) y SDE (sujetos sin enfermedad). Donde el tercil 1 ■ corresponde a la actividad más baja el tercil 2 ■ corresponde a la actividad intermedia y el tercil 3 □ a la actividad más alta, las medias de cada tercil se describieron en la grafica 1 y 2 de cada grupo.

La tendencia inversa observada entre la actividad CETP y los niveles de C-HDL no se manifiestan en el grupo de sujetos SDE. En efecto, no hay una tendencia definida del colesterol total ni del C-LDL por

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

terciles de CETP en los sujetos SDE (Gráfica 2). En contraste con los sujetos EAC (Gráfica 1), observamos que en el tercil 1 (menor actividad) existen niveles altos de C-total y de C-LDL tendiendo a disminuir conforme aumenta la actividad, sin que existan modificaciones en el C-HDL en el grupo EAC.

Respecto a la influencia de la actividad CETP sobre el nivel plasmático de triglicéridos, nuevamente observamos un efecto dicotómico entre el grupo de sujetos con cardiopatía y los sujetos sin diagnóstico de la enfermedad. Mientras que en el tercil bajo de actividad CETP del grupo EAC, el promedio de triacilglicerol plasmáticos es significativamente más elevado que en los otros dos (Gráfica 3). En el grupo de sujetos SDE no se observó la segregación de mayores niveles de triglicéridos en el tercil bajo de actividad CETP.

Independientemente de no tener un efecto directo sobre los niveles de C-HDL, la CETP en conjunción con la LCAT, puede tener un impacto en la remodelación de estas lipoproteínas. Para explorar cuál es el impacto CETP en la interconversión de las diferentes subclases de las HDL, determinamos la distribución de tamaños de las HDL por ultracentrifugación secuencial y electroforesis en condiciones nativas de muestra de plasma de un subgrupo de sujetos con EAC y otro de sujetos SDE. Sabiendo que la LCAT es un paso previo de remodelación de las lipoproteínas a la CETP, determinamos también en estas muestras la actividad de esta enzima. De esta manera, pudimos establecer un esquema metabólico de las HDL más completo. Los resultados se presentan en la tabla 10.

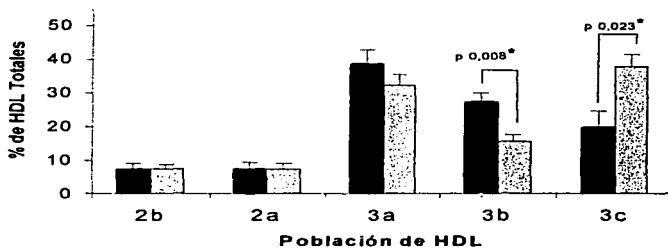
Tabla 10. Actividad LCAT y distribución de tamaños de las HDLs en sujetos EAC y SDE

	SDE Media(DS)	EAC Media (DS)	P
LCAT (nmol/L/h)	114.3(±47.6)	105.9(±62.9)	0.237
% Transferencia CETP	33.1(±4.5)	29.2(±6.5)	0.258
Actividad CETP (mgCE/mL*h)	0.397(±0.05)	0.350(±0.08)	0.325
Tamaños de partículas	%HDL		
HDL2b	7.4(±3.2)	7.3 (±4.3)	0.967
HDL2a	7.3(±4.7)	7.3(±3.9)	0.989
HDL3a	32.2(±11.4)	38.6(±3.2)	0.331
HDL3b	15.5(±5.3)*	27.2(±6.4)	0.008
HDL3c	37.7(±12.0)*	19.6(±6.7)	0.023

Los valores expresan media(± DS). El análisis estadístico se realizó utilizando una prueba de ANCOVA ajustando por IMC, edad, sexo y para el caso de tamaños de HDL se ajustó además por Triacilglicerolios. Para este subgrupo de tamaños HDL se tomaron 10 muestras de sujetos EAC y 21 muestras de sujetos SDE.

* Expresa diferencias estadísticamente significativa entre los grupos SDE y EAC.

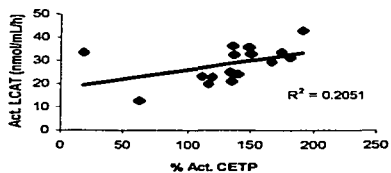
Según la tabla anterior podemos observar la marcada diferencia en la proporción de partículas HDL de tamaño pequeño. En efecto, la proporción de partículas HDL_{3c} en el grupo EAC es de solo el 52% en promedio respecto al grupo SDE. La baja proporción de partículas HDL_{3c} en el grupo EAC se asocia con un incremento en las partículas inmediatamente mayores en esta clasificación, las HDL_{3b}, que resultó ser aproximadamente 75% más abundante respecto al grupo SDE. Este resultado sugiere que las HDL ó no alcanzan a remodelarse de manera normal hasta HDL_{3c}, acumulándose de esta manera en HDL_{3b}, o bien, existe una reconversión más rápida hacia HDL_{3b} en los sujetos con EAC. La segunda posibilidad podría estar relacionada con un aumento en la actividad LCAT, debido a que esta enzima favorece el incremento de tamaño de las HDL al esterificar el colesterol. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que no existe diferencia en la actividad LCAT ni de CETP de ambos grupos. Sin embargo observamos cierta tendencia negativa entre la actividad CETP y la actividad LCAT, apoyando así la hipótesis de que existe un déficit en las vías de interconversión de HDL grandes hacia HDL de menor tamaño en los sujetos con EAC. Fig. 10



GRAFICA 4. Distribución de los diferentes tamaños de las HDL en sujetos EAC y SDE. Se determinaron las diferentes poblaciones de las HDL en un subgrupo de los sujetos EAC (n=16) y SDE (n=21). Las cuales se aislaron de plasma fresco de los pacientes, a través de una electroforesis en un gel de poliacrilamida (4-30%) en condiciones nativas y se revelaron con colorante azul brillante de Coomassie. Se realizó un análisis de densitometría para determinar las proporciones de cada subtipo de población de las HDL.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A)



B)

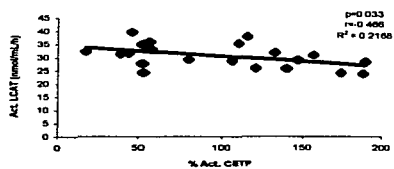


Fig. 17 Comparaciones entre la actividad CETP, la actividad LCAT A) Correlación de Actividad CETP (% transferencia) y Act. LCAT (nmol/mL/h) en sujetos EAC. B) Correlación de Actividad CETP y Act. LCAT (nmol/mL/h) en sujetos SDE

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

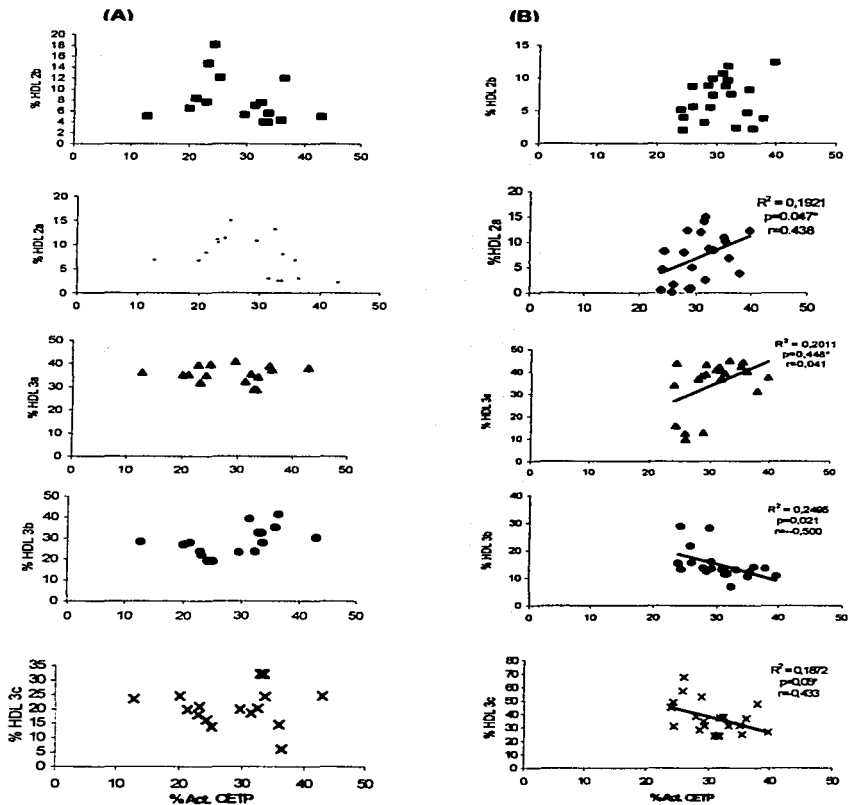


Fig. 18 Comparación entre la actividad CETP (% de transferencia) y la distribución de los diferentes tamaños de las HDL. La columna (A) corresponde a las Correlaciones de % Actividad CETP y % de tamaños de HDL en sujetos EAC. La columna (B) corresponde a las correlaciones de Actividad CETP y % de tamaños de HDL en sujetos SDE

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Podemos observar que en los sujetos SDE la CETP tiene una fuerte influencia en la distribución de las diferentes subpoblaciones de HDL. Para determinar en que proporción la CETP contribuye a modificar a las HDL realizamos un análisis de regresión, el cual nos mostró que la CETP contribuye en un 20% promedio en la variación de las subpoblaciones HDL_{2a}, HDL_{3a}, HDL_{3b} y HDL_{3c} (Fig. 10). En las distribuciones de tamaños de HDL en sujetos con EAC no observamos estas mismas correlaciones. Por lo que podría ser una explicación al desequilibrio metabólico que existe en estos sujetos. Como se mencionó en los antecedentes, otro factor que puede contribuir a establecer las concentraciones plasmáticas de C-HDL, es el polimorfismo Taq 1B en el intrón 1 del gen de la CETP. Tal efecto puede estar mediado por un decremento en la expresión de la proteína asociado al genotipo B2.⁴⁰ Sin embargo, este hallazgo no ha sido constante en todos los estudios. En consecuencia, y considerando que los mexicanos tienen niveles de C-HDL muy inferiores a las medias poblacionales de otras etnias, decidimos estudiar el impacto que tiene el polimorfismo Taq 1B sobre la actividad CETP en sujetos mexicanos. Para ello incluimos 22 sujetos con genotipo B1B1, 24 sujetos con B1B2 y 22 sujetos con B2B2, genotipados previamente por Galicia *et al.* (2002). En la tabla 11 se presentan las características antropométricas y el perfil de lípidos de este grupo de sujetos.

Tabla 11. Características antropométricas y perfil de lípidos de sujetos con el polimorfismo Taq-1B.

	B1B1	B1B2	B2B2	P
	Media(DS)	Media(DS)	Media(DS)	
No. de sujetos	22	24	22	
EDAD (años)	42.3(±9.8)	41.5(±10.9)	40.5(±9.3)	ns
IMC(Kg/m ²)	27.8(±4.3)	26.9(±3.6)	27.2(±4.1)	ns
Colesterol (mg/dL)				
C-Total	172.7(±31.5) ^a	173.1(±33.6) ^b	203.8(±38.8)	0.002
C-HDL	39.1(±10.1)	39.9(±12.1)	43.6(±9.6)	ns
C-LDL	113.2(±27.4) ^a	112.3(±29.9) ^b	140.2(±35.9)	0.024
Triacilglicerolios (mg/dL)	128.2(±68.9)	130.4(±71.3)	125.9(±55.0)	ns
% transferencia CETP	23.2(±6.09) ^a	18.8(±7.5)	17.8(±6.9) ^b	0.032
Actividad CETP (mgCE/mL·h)	0.278(±0.07) ^a	0.226(±0.09)	0.214(±0.08) ^c	0.030
LCAT(nmol/h/mL)	139.1(±42.2) ^a	127.7(±50.1) ^b	101.1(±40.4) ^c	0.006

Los valores están expresados media(± DS) El análisis estadístico se realizó utilizando una prueba de ANOVA ajustado por edad, IMC, y sexo.

IMC: Índice de masa corporal (peso/talla²), EAC: sujetos con enfermedad aterosclerosa coronaria. SDE sujetos sin diagnóstico de la enfermedad. DS: desviación estándar.

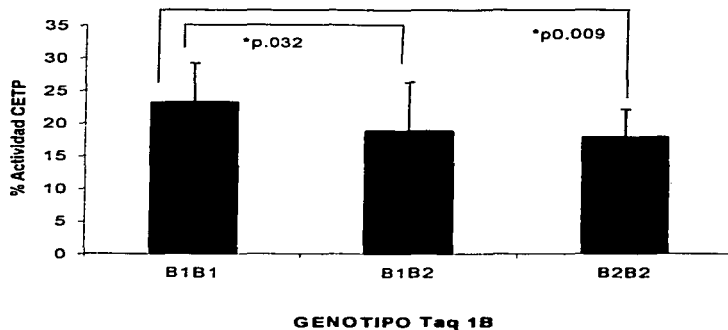
^a Expresa diferencias estadísticamente significativa entre 1-2.

^b Expresa diferencias estadísticamente significativa entre 1-3.

^c Expresa diferencias estadísticamente significativa entre 2-3.

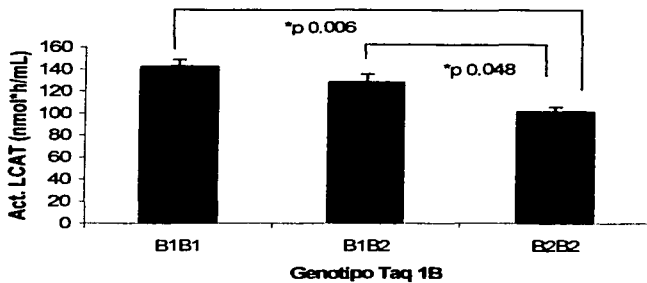
La tabla anterior nos muestra que efectivamente la actividad CETP se ve influenciada por alteraciones genéticas como Taq-1B observándose diferencias estadísticamente significativas entre los tres genotipos. En donde el genotipo B1 se asocia a actividades mayores de la CETP respecto al genotipo B2. De esta manera la actividad CETP es significativamente mayor en los sujetos homocigotos para el alelo B1 respecto los heterocigotos y los homocigotos B2. No encontramos diferencia estadísticamente significativa entre los homocigotos B2 con el grupo de heterocigotos, no obstante la actividad media de este último grupo es mayor en comparación con el primero (Grafica 5). Pese a las diferencias estadísticas en actividad CETP entre los grupos de sujetos B1B1 y B2B2, los valores de C-HDL no son diferentes entre estos grupos.

Por otra parte, nuestros resultados demuestran que, en la población estudiada, el genotipo B2 de la CETP se asocia con concentraciones elevadas de colesterol total y el C-LDL, mientras que no existe ninguna influencia del genotipo Taq-1B del gen de la CETP sobre el nivel de triglicéidos (Tabla 11).



GRAFICA 5. Efecto del genotipo Taq 1B sobre el % Actividad CETP. De un grupo de sujetos que se tipificaron previamente, se seleccionaron 22 sujetos homocigotos B1B1, 24 sujetos heterocigotos B1B2 y 22 sujetos homocigotos B2B2. Por medio del método radiactivo, se determino el % de actividad CETP en estos sujetos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



GRAFICA 6. Efecto del genotipo Taq 1B sobre la actividad LCAT. De un grupo de sujetos que se tipificaron previamente, se seleccionaron 22 sujetos homocigotos B1B1, 24 sujetos heterocigotos B1B2 y 22 sujetos homocigotos B2B2. Por medio del método radiactivo, se determino la actividad LCAT en estos sujetos.

Lo que quedaría abierto para estudiar el tamaño de las HDL que tenemos y determinar si esta disminución en concentración de HDL no se asocia con la enfermedad aterosclerosa. Realizando un posterior estudio con sujetos control.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSION

En México, se han hecho estudios epidemiológicos donde se ha puesto de manifiesto que la dislipidemia más frecuente es la hipoalfalipoproteinemia (niveles bajos de C-HDL <36 mg/dL).²³ Así mismo está perfectamente establecida la correlación negativa que existe entre los niveles bajos de C-HDL o hipoalfalipoproteinemia y el riesgo de desarrollar enfermedad aterosclerosa coronaria.¹² En consecuencia, la hipoalfalipoproteinemia es el factor de riesgo de EAC más frecuente en nuestra población.

Sin embargo, las causas primarias de esta dislipidemia aun no se conocen en su totalidad, por lo que se vuelve objetivo de estudio para desarrollar terapias preventivas para combatir este factor de riesgo. Se conocen varios factores metabólicos que pueden alterar los valores de colesterol HDL. Entre ellos se encuentran las enzimas y proteínas que se ven involucradas en el TRC, en particular la CETP. Esta es una proteína cuya función es transferir ésteres de colesterol de las HDL a las lipoproteínas que contienen apo B, como se mencionó anteriormente. En el humano, existen evidencias de que esta proteína es capaz de modificar los niveles plasmáticos de C-HDL.^{17,19}

Uno de los objetivos de este trabajo fue implementar un método para determinar la actividad de la CETP ajustando las condiciones necesarias para trabajar en nuestro laboratorio. En la literatura se presentan dos métodos para determinar dicha actividad, el primero es un método Fluorescente y el segundo es un método radiactivo,^{35,36} ambos métodos se pusieron en práctica

En una primera etapa nos inclinamos por el método fluorescente para evitar el manejo de isótopos radiactivos, por la complejidad de su manejo en el laboratorio, de los desechos que se generan y por los riesgos biológicos inherentes a la radiactividad. El método de ésteres de colesterol marcados con pireno como sonda fluorescente incorporada a un liposoma sintético hecho a base de fosfatidicolina y triacilglicerol, que funciona como partícula donadora, fue descrito originalmente por Onishi y colaboradores.^{35,36,42} En sus trabajos, Onishi *et al*, emplean fundamentalmente CETP purificada para determinar de manera semicuantitativa la transferencia de ésteres de colesterol, facilitada por la proteína, hacia una partícula aceptora, en diferentes circunstancias. Bajo esas condiciones, las cinéticas de transferencia son relativamente rápidas y se completan en el orden de minutos. Nuestra intención fue de adaptar ese método para la determinación de la actividad CETP en plasma. Al tener

una cantidad de CETP aproximadamente 20, 000 veces menor con respecto al grupo de Onishi *et al*, (equivalente a 1.4 mg/ μ L de la proteína pura) la cinética de transferencia que observamos en nuestros ensayos fue del orden de horas. Además, la adición de plasma a la mezcla de liposomas, alteraba de manera importante la fluorescencia de la sonda, en particular el que fue parámetro de medición, cociente E/M. Por esta razón, la cantidad de plasma que se puede añadir es muy limitada, evitando así que se pudieran mejorar los tiempos para las cinéticas de transferencia. Otro parámetro factible de ser modificado para incrementar las tasas de transferencia era la cantidad de partículas donadoras yceptoras. Sin embargo, estos liposomas tienen un diámetro considerable (26 nm),^{35,38} y en consecuencia, si se incrementa su concentración, produciría dispersión de la luz, provocando de esta manera que se sobrestimara la emisión de la sonda fluorescente. A pesar de todas estas limitantes, logramos algunos resultados preliminares cuantificables, que presentamos en la sección de resultados. Como se indica en la sección de elección del método, la utilización de sondas fluorescentes no resulta práctica para determinar la actividad CETP bajo las condiciones y equipo con que contamos en nuestro laboratorio.

En consecuencia, nos dimos a la tarea de adaptar el siguiente método radiactivo para la cuantificación de la actividad CETP en plasma. Este método descrito por Tollefson *et al*,³⁶ ha servido como base para una serie de variantes metodológicas descritas por diversos autores.^{39,43} El principal inconveniente del método es la imposibilidad de estandarizar los reactivos utilizados como partículas donadoras yceptoras de la marca radiactiva. A este respecto, cada laboratorio tiene sus parámetros, forma de preparar y en consecuencia, condiciones de incubación.^{39,43} Por esta razón, dentro del marco del presente trabajo, adaptamos los procedimientos de este método a las condiciones de nuestro laboratorio. El método radiactivo para la determinación de la actividad CETP arrojó resultados satisfactorios bajo las condiciones descritas en el capítulo de resultados. A pesar de los inconvenientes en el manejo de isótopos radiactivos, frente a la infactibilidad del método fluorescente, elegimos el método con ésteres de colesterol marcados con Tritio (³H-CE) como sonda radiactiva incorporada a un pool de HDL₂ humanas, para cuantificar el porcentaje de intercambio de colesterol esterificado.

Una segunda etapa del presente trabajo, fue la aplicación del método implementado, donde realizamos un estudio piloto sobre el impacto de la actividad CETP en el metabolismo de las HDL en

la enfermedad aterosclerosa coronaria. Este primer estudio lo consideramos piloto por el tipo de sujetos incluidos como control. La selección de estos sujetos fue muy estricta y podría considerarse a *priori* un buen grupo control. Los resultados de este estudio demuestran que efectivamente los factores lipídicos de riesgo como son Colesterol Total, C-LDL y Triacilglicérols, comúnmente reportados en estudios previos, se encuentran elevados en los sujetos que presentan cardiopatía a diferencia de los sujetos que no presentan antecedentes de EAC. Así también existe un déficit en las concentraciones plasmáticas de C-HDL (hipoalfalipoproteinemia) en los sujetos EAC, otro factor de riesgo importante. Todas estas diferencias son estadísticamente significativas. Por lo que nuestra población de sujetos EAC es representativa de su condición. Sin embargo a *posteriori*, observamos que no alcanzamos a tener una población pareada por edad con el grupo de sujetos con enfermedad coronaria. Este es un punto débil del estudio, porque la edad es un factor determinante del nivel de lípidos plasmáticos.^{44,45} Para paliar la diferencia de edades entre ambos grupos, realizamos un análisis estadístico ajustando por este parámetro. Los resultados de estos análisis indican que solo existe diferencia estadísticamente significativa en los niveles de C-LDL y triacilglicérols, dos de los factores de riesgo lipídicos más comunes para desarrollar enfermedad aterosclerosa coronaria.

El eje central de este trabajo es de establecer la posible participación de la CETP en el desarrollo de la enfermedad aterosclerosa coronaria. El papel de la CETP en la aterogénesis continua siendo hasta ahora motivo de debate.^{29,46,47} La CETP puede participar como una proteína proaterogénica, desde el punto de vista de que facilita la redistribución de colesterol proveniente de lipoproteínas protectoras contra la aterosclerosis (HDL), hacia las lipoproteínas ricas en apo B que son proaterogénicas. Este concepto encuentra sustento en el hecho de que las especies animales que son resistentes a la aterosclerosis inducida por dieta, presentan niveles de actividad CETP muy bajos o nulos.^{48,49} Sin embargo, la CETP promueve uno de los pasos centrales en el transporte reverso de colesterol, proceso considerado como antiaterogénico. El elevado riesgo de aterosclerosis que presentan cierto tipo de sujetos con deficiencia genética de CETP y la disminución de lesiones aterosclerosas en cierto tipo de ratones por transgénesis de la CETP humana, apoyan el papel antiaterogénico de esta proteína.^{50,51} La respuesta al controversial papel de la CETP en la aterosclerosis, puede estar en estudios epidemiológicos que incluyan la actividad plasmática de esta proteína. Sin embargo, a nuestro conocimiento, no existen este tipo estudios en sujetos con EAC. En este sentido, este trabajo

contribuye a llenar este vacío de información. Nuestros resultados muestran que la enfermedad aterosclerosa coronaria no se relaciona con cambios en la actividad CETP en plasma ni existe una correlación entre la actividad CETP y los niveles de C-HDL en los grupos de estudio. No obstante, las HDL son una categoría de lipoproteínas integrada por una amplia gama de partículas con diversas estructuras y funciones pleiotrópicas,⁵² a saber, su actividad antioxidante a través de la enzima paraoxonasa que se une físicamente a las HDL pequeñas,^{52,53} las HDL inhiben el proceso inflamatorio que da origen al ateroma a través de la regulación de la expresión de las moléculas de adhesión en el endotelio vascular,⁵⁴ las HDL evitan complicaciones de la placa preformada por medio de sus efectos antitrombóticos y profibrinolíticos^{54,55}. Todas estos efectos antiaterosclerosos son dependientes de la estructura de las HDL, y la CETP desempeña un papel central en la remodelación de estas lipoproteínas.^{56,57} Sujetos con deficiencia genética de CETP tienen elevación muy importante de HDL con mayor tamaño enriquecidas en apo E y en ésteres de colesterol, acompañadas de una deficiencia relativa de partículas de menor tamaño tipo HDL₃^{56,59}

Con base en lo anterior, planteamos la posibilidad de que la actividad CETP estuviera relacionada con el proceso pro o antiateroscleroso, no por influir en los niveles plasmáticos de C-HDL, sino por inducir cambios estructurales de las HDL que afecten su funcionalidad. Para verificar esta hipótesis, determinamos la distribución de subclases HDL por medio de ultracentrifugación secuencial seguida de una separación de las partículas por tamaño en gradiente de poliacrilamida. Este método previamente estandarizado en nuestro laboratorio permite subclasificar a las HDL en cinco categorías como se describe en la sección de métodos.

Nuestros resultados demuestran que existe una disminución muy importante en las proporciones de las partículas más pequeñas que se pueden aislar por este método en los sujetos del grupo EAC. Tal disminución está asociada a una acumulación importante de la proporción de partículas HDL_{3b}. El significado fisiológico de tal desproporción en los sujetos se desconoce, pero se puede especular ciertas interpretaciones a partir de las funciones y del metabolismo de las HDL. Por una parte, considerando que las HDL_{3b} pueden ser un intermediario metabólico entre partículas pequeñas (HDL_{3c}) hacia partículas de mayor tamaño (HDL₂)⁵. Esta vía sería mediada por acción de la LCAT (la esterificación del colesterol resulta en su internalización al núcleo de la lipoproteína provocando aumento en su tamaño y disminución de la densidad). Por esta razón, determinamos la actividad de

esta enzima en nuestros subgrupos de estudio, a los cuales ya se les había caracterizado tamaños de HDL y pudimos comprobar que no hay diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos. En consecuencia, descartamos la hipótesis de que la baja proporción de partículas HDL_{3c} en los sujetos con EAC tiene su origen en una conversión acelerada de estas partículas mediada por la LCAT. Una segunda explicación para la desproporción en las partículas HDL_{3c} y HDL_{3b}, a la luz de los conocimientos actuales, se puede fundamentar en una reconversión ineficiente de partículas HDL grandes (p.e. las HDL_{3b} que se acumulan en el plasma de los sujetos con EAC) hacia partículas pequeñas más pequeñas (HDL_{3c}).

Estudios *in vitro* han demostrado que la CETP puede generar HDL de tamaños pequeños a partir de HDL de mayor diámetro⁵ y se han observado partículas HDL de gran tamaño en sujetos con deficiencia genética de CETP⁸¹ y en animales de experimentación en los cuales se ha bloqueado la CETP por medio de anticuerpos.^{82,83} Podría argumentarse que la desproporción en los tamaños de las HDL en los sujetos con EAC no tiene su origen en la CETP, puesto que no encontramos diferencias en la actividad de la proteína con respecto a los sujetos sanos. Este argumento puede ser descartado, debido a que existe una clara influencia de la proteína sobre la distribución de las subpoblaciones de HDL en los sujetos sanos, según se puede inferir de los análisis de correlación. No existe la misma interrelación CETP-distribución de tamaños de HDL en los sujetos con cardiopatía. Esta observación implica que: 1) El metabolismo HDL no es el mismo en los sujetos EAC, y 2) La distribución al equilibrio de las HDL no dependen de la CETP en la cardiopatía isquémica y puede deberse a diversos aspectos ambientales y farmacológicos que pueden contribuir a explicar dichas implicaciones.

El grupo EAC está integrado por sujetos que han sufrido al menos un infarto. Estos individuos cursan una etapa de sensibilización hacia su salud, su persona y su familia y se someten a nuevas actitudes higiénicas (ejercicio programado, hábitos alimenticios, abandono del tabaco), además de tener intervención farmacológica con fibratos, estatinas o calcio antagonistas. Todos estos factores contribuyen a modificar el perfil de lípidos, en este sentido, se sabe que por cada 3 Kg de reducción en el peso corporal, el C-HDL puede aumentar hasta 1 mg/dL,⁸⁴ los fumadores pueden tener niveles entre el 15 y 20% menos de C-HDL que los sujetos no fumadores que tardan hasta 60 días después de dejar el hábito del cigarro para recuperar sus niveles plasmáticos originales⁸⁵ y también existe un

efecto dosis-respuesta entre el C-HDL y la cantidad de ejercicio aeróbico realizado. Tales modificaciones en perfil lipídico a través de medidas higiénicas podrían involucrar modificaciones en la actividad CETP o afectar otras enzimas, disminuyendo así el impacto de la CETP sobre la distribución de tamaños HDL en los pacientes con EAC. Sin embargo, a nuestro conocimiento, no existen estudios al respecto y representan un campo a explorar en investigaciones futuras.

Estudios recientes en nuestro laboratorio con ratas tiroidectomizadas, han demostrado que acumulan HDL grandes en plasma por una deficiencia de actividad LH^{66,67}. Así mismo, los conejos, deficientes naturalmente de LH, presentan HDL de gran tamaño en plasma.⁶⁸ Por otra parte se ha demostrado en animales transgénicos que sobre expresan PLTP, que incrementan su concentración plasmática de partículas HDL pequeñas^{68,69}. Con base en estas premisas, otra explicación plausible a la desproporción de las subclases de HDL observada en los sujetos con enfermedad aterosclerosa, es la presencia de alteraciones en la reestructuración mediada por la LH y/o la PLTP. Estas proteínas podrían estar reguladas por factores ambientales que ocurren en el paciente con EAC y/o por factores farmacológicos, como se describe más adelante. Esta hipótesis tendrá que ser explorada en investigaciones futuras.

Cualquiera que sea el origen de las desproporción en las subclases de HDL en sujetos con EAC, el resultado mismo puede tener un impacto muy importante en el diagnóstico precoz de la aterosclerosis. Estos datos sugieren que un incremento en las HDL_{2b} asociado a una disminución de las HDL_{2a} puede ser un factor de riesgo. Sin embargo, la veracidad de esta observación deberá sustentarse con un estudio de mayor amplitud.

Por otra parte, como ya se mencionó anteriormente estos sujetos se encuentran bajo tratamiento farmacológico, las cuales reciben estatinas para disminuir sus niveles de colesterol plasmático. En un estudio reciente se demostró que las estatinas pueden afectar a la actividad CETP y a través de ese mecanismo contribuyen a aumentar los niveles de C-HDL.⁷⁰ Nosotros no observamos diferencias significativas en actividad CETP. Así también, no existen diferencias en los niveles de C-HDL después de controlar las variables de edad, entre los sujetos sanos y los sujetos con EAC. No obstante, existen diferencias importantes en la distribución de tamaños de las HDL. Cabe entonces la posibilidad de que estas diferencias tengan su origen, al menos en parte, en el efecto de las estatinas sobre la CETP. Esto representa otro horizonte a explorar más adelante.

En el estudio previamente citado de Kotake *et al*,⁷⁰ la respuesta a las estatinas depende del genotipo Taq 1B del gen de la CETP, sugiriendo que la variación genética puede ser un factor importante en los diseños de mejores tratamientos contra la aterosclerosis⁷⁰. En nuestro país existe muy poca información acerca de la incidencia de los diferentes genotipos Taq 1B del gen CETP y la influencia del mismo sobre el metabolismo de las lipoproteínas. Por esta razón y aprovechando la plataforma previamente establecida por Galicia y Cardoso⁷¹, se estudio la influencia del genotipo CETP en la actividad de la proteína y el perfil de lípidos. Nuestros resultados apoyan observaciones previas^{21,72} en el sentido de que el genotipo B1 se asocia a actividades CETP superiores, comparada con la actividad del genotipo B2.

Sin embargo, el mecanismo por el cual se asocia el polimorfismo Taq 1B con la actividad CETP y los niveles de C-HDL no son bien conocidos. Ya que es poco probable que este polimorfismo localizado en el Intron 1 represente una mutación funcional. Pero a pesar de ello existe una asociación entre un incremento de la actividad CETP y el genotipo B2. Una explicación viable para ello es que este polimorfismo este ligado con una mutación funcional en la región de regulación del gen de la CETP.⁷² Es decir, el alelo B1 siempre va estar presente solo si existe otro elemento regulador aún desconocido, que este promoviendo la síntesis de CETP, por lo que el polimorfismo se encuentra en un intron 1, pudiera ser un reflejo de lo que esta pasando en otro lugar adyacente a este gen. A hora bien una explicación a la asociación de este polimorfismo con lo niveles de C-HDL, se puede deber al papel que juega la CETP en el transporte reverso de colesterol y la remodelación de las lipoproteínas principalmente las HDL. A pesar de que entre los tres genotipos no existen diferencias significativas en los niveles plasmáticos de C-HDL podemos observar que existe una tendencia entre estos ha aumentar en el grupo con genotipo B2. Aunado a ello, existe un aumento en el C-LDL y C-Total, alcanzando diferencia estadísticamente significativa.

Como se puede ver el incremento de C-HDL no implica un papel protector necesariamente ya que también existe el aumento de otros dos factores de riesgo que pueden contribuir a que se desarrolle la enfermedad.

Para descartar que la actividad de LCAT fuese un factor limitante en la actividad de CETP procedimos a determinarla. Los resultados nos muestran que la actividad LCAT también se ve modificada por el genotipo Taq 1B teniendo el mismo comportamiento que la actividad CETP. Estos resultados podían

tener explicación en el hecho que el gen de la CETP y la LCAT se encuentran muy cercanos y probablemente exista una región de regulación para ambos genes que pudiera afectar la expresión cuando existe el polimorfismo Taq 1B. Este efecto se ha observado en animales transgénicos. El estudio de la distribución de los tamaños de las HDL para determinar en cual de los genotipos las HDL son más funcionales, aun cuando los niveles de C-HDL no necesariamente estén elevados, puede aportar más elementos para comprender el papel de la CETP en el metabolismo de las HDL.

CONCLUSIÓN

La actividad CETP no se observó modificada en sujetos EAC, con respecto a los sujetos SDE. Sin embargo, vale la pena remarcar que la actividad CETP repercute en la distribución de tamaños de HDL, sin alterar necesariamente la C-HDL como se ha reportado en otros estudios.

Nuestros resultados también confirman que el polimorfismo del gen de la CETP Taq 1B tiene influencia sobre la actividad CETP, aun cuando no explican los valores bajos de C-HDL en nuestra población.

Nuestro trabajo deja en claro que la CETP no es principal determinante de la concentración plasmática de las HDL en la población estudiada. Esto es, la determinación de la actividad CETP de manera aislada no resulta de utilidad. Debe considerarse que el metabolismo de las lipoproteínas, y en consecuencia, los niveles plasmáticos de lípidos, es el resultado de un equilibrio de otras proteínas y enzimas que actúan dinámicamente y en sincronía con la CETP. Por lo anterior, el estudio de los equilibrios dinámicos entre todos los factores involucrados en la remodelación de lipoproteínas (PLTP, PON, LH, LPL, LCAT CETP) será sin duda la manera de predecir con más precisión cuando una dislipidemia representa un verdadero riesgo de desarrollar aterosclerosis.

Otro factor importante ha determinar en los sujetos con EAC y SDE podría ser el polimorfismo Taq 1B, para establecer la posible relación entre este polimorfismo y la enfermedad, de manera que pueda mejorar el diagnóstico precoz de la enfermedad.

Otra perspectiva que se desprende de este trabajo, es profundizar en la determinación de tamaños de HDL y su relación con la CETP, por que es en la estructura de las HDL que incide directamente la actividad de la proteína. Este efecto puede impactar directamente sobre la función antiaterosclerosa de las HDL.

BIBLIOGRAFIA

1. Lehniger L.A., Nelson L.D., Cox M.M. Lípidos. En Principios de Bioquímica. 2nda. Edición. Editorial Ediciones Omega; Barcelona,1993. pp: 240-266.
2. Voet D., Voet J.G. Bioquímica; Ed. Omega. Barcelona España 1990. Pp294-300.
3. Von E., Yadong H., Gerd A. Physiological role and clinical relevance of high density lipoprotein subclasses. Curr Opin Lipidol. 1994;5:404-416.
4. Krauss R.M., Burke D.J. Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. J. Lipid. Res. 1982; 23: 97-104.
5. Skinner E.R. High-density lipoprotein subclasses. Current Opinion in lipidology.1994;5:241-247.
6. Castro G.R., Fielding C.J. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre- β -migrating high density lipoprotein pathway. Biochemistry. 1988;27:25-29.
7. Aguilar S.C., Gómez P.F. Lipoproteínas y aterogenesis. 1. Metabolismo normal de las lipoproteínas. Revista del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. 1989;2 :22-28.
8. Rader J.D., Maugeais C. Genes influencing HDL metabolism: new perspectives and implications for atherosclerosis prevention. Molecular Medicine Today. 2000; 6:170-175.
9. Llorente V y Badimon L. Bases celulares y moleculares de la acumulación de colesterol en la pared vascular y su contribución a la progresión de la lesión aterosclerótica. Revista de Cardiología Española. 1998;51:633-641.
10. Kane J.P. Estructura y función de las lipoproteínas plasmáticas y de sus receptores. En Fuster V., Ross R., Topol E.J., Aterosclerosis y enfermedad arterial coronaria, Editorial Springer-Verlag Ibérica, Barcelona 1997. pp. 97-112.
11. Hegele RA. Monogenic Dyslipidemias. Window on Determinants of plasma Lipoprotein Metabolism. Am J. Hum. Genet. 2001; 69: 000-000.
12. Pérez-Méndez O.A., Luc G., Posadas C. Concentraciones bajas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en plasma y enfermedad arterial coronaria. Arch. Inst. Cardiol. Méx. 2000; 70: 312-321.
13. Sviridov D., Nestel P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. Atherosclerosis. 2002; 161, 245-254.
14. Tall A.R. PLASMA LIPID TRANSFER PROTEINS. Annu. Rev. Biochem. 1995;64:235-257.

15. Tall A.R. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J. Lipid. Res.* 1993;34:1255-1274.
16. Gruyard-Dangremont V., Tenekjian V., *et al.* Immunochemical evidence that cholesteryl ester transfer protein and bactericidal/permeability-increasing protein share a similar tertiary structure. *Protein Science.* 1999; 8: 2392-2398.
17. Bruce C., Seand DW., Kussie P., *et al.* Molecular Determinants of Plasma Cholesteryl Ester Transfer Protein Binding to High Density Lipoproteins. *J. Biol Chem.* 1995;270: 11532-11542.
18. Nishida H.I., Arai H., Nishida T. Cholesterol ester transfer mediated by lipid transfer protein as influenced by charge in characteristics of plasma lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 1993; 268:16352-16360.
19. Tall A.R., Jiang X., Luo Y.S.D. 1999 George Lyman Duff Memorial Lecture. Lipid transfer Proteins, HDL Metabolism, and Atherogenesis. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20: 1185-1188.
20. Agerholm-Larsen B., MSc, PhD; Tybjaerg-Hansen A., MD, DMSc; *et al.* Common Cholesteryl Ester Transfer Protein Mutations, Decreased HDL Cholesterol, and Possible Decreased Risk of Ischemic Heart Disease. The Copenhagen City Heart Study. *Circulation.* 2000;102:2197-2203.
21. Corella D., Sáiz C., Guillén M., *et al.* Asociación of Taq 1B polymorphism in the cholesteryl ester transfer protein gene with plasma lipid levels in a healthy Spanish population. *Atherosclerosis.* 2000; 152: 367-376.
22. Hirano K., Yamashita S., Kuga Y., *et al.* Atherosclerotic disease in marked hyperalphalipoproteinemia: combined reduction of cholesteryl ester transfer protein and hepatic triglyceride lipase. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.* 1995;15:1849-1856.
23. Aguilar-Salinas CA., Olais G., Valles V., *et al.* High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *J Lipid Res.* 2001; 42: 1298-1307.
24. Bruce C., Chouinard RA. Jr., Tall A.R. Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and Reverse Cholesterol Transport. *AR. Nutr.* 18: 297-330.
25. Kunitake ST, Mendel CM, Hennessy LK. Interconversion between apolipoprotein A-I containing lipoproteins of pre-beta and alpha electrophoretic mobilities. *J. Lipid Res* ; 33:1807-1816.
26. Hiarano K, Yamashita S and Matsuzawa Y. Pros and cons of inhibiting cholesteryl ester transfer protein. *Curr. Opin. Lipidol.* 2000; 11:589-596.

27. Moriyama Y., Okamura T., Inazu ADM., *et. al.* A low prevalence of coronary heart disease among subjects with increased high-density lipoprotein cholesterol levels, including those with plasma cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Prev. Med.* 1998; 27:659-667.
28. Secretaría de Salud . Información epidemiológica de morbilidad. Dirección general de Epidemiología, México. Secretaría de salud Mortalidad 2000.
29. Aguilar-Salinas CA., Vázquez-Chávez C., Gamboa-Marrufo R., *et. al.* Obesity, Diabetes, Hypertension, and Tobacco Consumption in an Urban Adult Mexican Population. *Archives of Medical Research.*2001;32: 446-453.
30. Lusis J.A. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407: 233-241.
31. Kane J.P. Lipoproteínas plasmáticas de alta densidad y aterogénesis . En Fuster V., Ross R., Topol E.J., *Atherosclerosis y enfermedad arterial coronaria*, Editorial Springer-Verlag Ibérica, Barcelona 1997. pp. 113-138
32. Kane J.P. Lipoproteínas oxidadas y aterosclerosis . En Fuster V., Ross R., Topol E.J., *Atherosclerosis y enfermedad arterial coronaria*, Editorial Springer-Verlag Ibérica, Barcelona 1997. pp. 139-160
33. Adams R.M., Kinlay S., Blake J.G., *et. al.* ATHEROGENIC LIPIDS AND ENDOTHELIAL DYSFUNCTION: Mechanisms in the Genesis of Ischemic Syndromes. *Ann. Rev. Med.* 2000;51:149-167.
34. Ahumada A.M. Patogénia de la aterosclerosis. En Posadas Romero C. *Dislipidemias y Aterosclerosis*. Ed Interamericana. 1995; pp.1-16.
35. Ohnishi T., Tan C., Yokoyama S. Selective Transfer of cholesteryl Ester over Triglyceride by Human Plasma Lipid Transfer Protein between Apolipoprotein- Activated lipid Microemulsions. *Biochemistry.*1994;15: 4533-4542.
36. Tollefson H.J. and Albers J.J. Methods in Enzymology. Isolation, characterization, and Assay of Plasma Lipid Transfer Proteins. 1986;129: 28.
37. Rajaram O.V., Chan R.Y., Sawyer W.H. Effect of unesterified cholesterol on the activity of cholesteryl ester transfer protein. *Biochem. J.* 1994. 1:304; 423-430.
38. Milner G.T., Ko Kerry W.S., Ohnishi T. and Yokoyama S. Enhancement of the human plasma lipid transfer protein reaction by apolipoproteins. *Biochim et Biophys Acta.* 1991; 1082. 71-78.

39. Lagrost L. The Methodos in molecular Biology. Lipoprotein protocols Ed. Determination of the mass concentration and the activity of the plasma.1998;110:231-241.
40. Zhong S., Sharp D.S., Grove J.S. *et. al.* Increased Coronary Haert Disease In Japanese- American Men with Mutation in the Cholesteryl Ester Transfer Protein Gene Despite Increased HDL levels. *J. Clin. Inves.* 1996; 97(12):2917-2923.
41. Nagano M., Yamashita S., Hirano K., *et. al.* Point Mutation (-69 G(A) in the Promoter Region of Cholesteryl Ester Transfer Protein Gene in Japanese Hyperalphalipoproteinemic subjects. *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.* 2001;21:985-990.
42. Ohnishi T., Yokoyama S., Yamamoto A. Rapid purification of human plasma lipid transfer proteins. *J. Lipid Res.* 1990. 31:397-406.
43. Tan K.C., Shiu S.W., Kung A.W. Plasma Cholesteryl Ester Transfer Protein Activity in Hyper-and Hypothyroidism. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 1998; 83: 140-143.
44. Anderson K.M., Castelli W.P., Levy D. Cholesterol and Mortality. 30 Years of Follow-up from of Framinham Study. *JAMA* 1987; 257:2176-2180.
45. Manninen V.L., Tenkanen P., Koskinen J.K., Huttunen J. Effects of serum triglyceride and LDL cholesterol and HDL cholesterol concntracions on coronary heart disease risk in the Helsinki heart study: Implication for treatment. *Circulation.* 1992;85:37-45.
46. Fielding C.G., Havel R.J. Cholesteryl ester transfer protein: friend or foe?. *J. Clin. Invest.* 1996;97:2687-2688.
47. Stevenson C.G. Cholesterol ester transfer protein: a molecule with three faces? *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1998;35:517-546.
48. Inazu A., Kolzumi J., Mabuchi H. Colesteryl ester transfer protein and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 2000;11:389-396.
49. Barter P. CETP and Artherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol.* 2000; 20: 2029-2031.
50. Jiang X.C., Agellon L.B., Walsh A., Breslow J.L., Tall A. Dietary cholesterol increases transcription of the human cholesteryl ester transfer protein gene in transgenic mice: dependence on natural flanking sequences. *J. Clin. Invest.* 1992;90:1290 -1295.
51. Brunzell J.D., Hokanson J.E. Low-density and high-density lipoprotein subspecies and risk for premature coronary artery disease. *Am. J. Med.* 1999;107:16S-18S.

52. Von E.A., Nofer J.R., Assmann G. High Density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2001; 21:13-27.
53. Aviram M., Scott B., Soreson R. *et. al.* Paraoxonase Active Site Required for Protection Against LDL Oxidation Involves Its Free Sulfhydryl Group and Is Different From That Required for Its Arylesterase/Paraoxonase Activities. Selective Action of Human Paraoxonase Allozymes Q and R. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1998;18:1617-1624.
54. Shah K.P., Kaul S., Nilsson J., *et. al.* Exploiting the Vascular Effects of High-Density Lipoprotein and its Apolipoproteins. Part I. Circulation. 2001;104:2376-2383.
55. Nofer J.R., Beate K. HDL and arteriosclerosis:beyond reverse cholesterol transport. Atherosclerosis. 2002;161:1-16.
56. Wu J.H., Lee Y.T., Hsu H.C., Hsieh L.L. Influence of CETP gene variation on plasma lipid levels and coronary heart disease. A survey in Taiwan. Atherosclerosis. 2001;159:451-458.
57. Tato F., Vega L.G., Grundy M.S. Determinants of plasma HDL- Cholesterol in hypertriglyceridemic Patients. Role of Cholesterol-Ester Transfer Protein and Lecithin Cholesteryl Acyl Transferase. Arterioscler. Thromb. Vasc Biol. 1997;17:56-63.
58. Hixson J.E., Vemier D.T. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. J. Lipid. Res. 1990;31:545-548.
59. Talmud J.P., Edwards L.K., Timmer M.C., *et. al.* Linkage of the Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) Gene to LDL particle Size. Use of a Novel Tetranucleotide Repeat Within the CETP Promoter. Circulation. 2000;101:2461-2466.
60. Lee M., Kim Q.J., Kim J., *et. al.* Studies on the plasma lipid profiles, and LCAT and CETP activities according to hyperlipoproteinemia phenotypes (HLP). Atherosclerosis. 2001;159:381-389.
61. Yamashita S., Sprecher D.L., Sakai N., Matsuzawa Y., Tarui S., Hui D.Y. Accumulation of apolipoprotein E-rich high density lipoproteins in hyperalphalipoproteinemic human subjects with plasma cholesteryl ester transfer protein deficiency. J. Clin. Invest. 1990;86:688-695.
62. Evans G.F., Bensch W.R., Apelgren L.D., Bailey D., Kauffman R.F., *et. al.* Inhibition of cholesteryl ester transfer protein in normocholesterolemic and hypercholesterolemic hamsters: effects on HDL subspecies, quantity, and apolipoprotein distribution. J. Lipid. Res. 1994;35:1634-1645.
63. Gaynor B.J., Sand T., Clark R.W., Aiello R.J., Bamberger M.J., Moberly J.B. Inhibition of

- cholesteryl ester transfer protein activity in hamsters alters HDL lipid composition. *Atherosclerosis*. 1994;110:101-109.
64. Dattilo A.M., Kris-Etherton P.M. Effects of weight reduction on blood lipids and lipoproteins: a meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 1992;56:320-328.
65. Moffatt R.J., Biggerstaff K.D., Stamford B.A. Effects of the transdermal nicotine patch on normalization of HDL-C and its subfractions. *Prev. Med.* 2000;31:148-152.
66. Berti J.A., M.E.C. Amaral, A.C. Boschero, *et al.* Thyroid Hormone Increases Plasma Cholesteryl Ester Transfer Protein Activity and Plasma High-Density Lipoprotein Removal Rate in Transgenic Mice. *Metabolism*. 2001; 50: 530-536.
67. Huesca-Gómez C., Franco M., Luc G, *et al.* Chronic hypothyroidism induces abnormal structure of high-density lipoproteins and impaired kinetics of apolipoprotein A-I in the rat. *Metabolism*. 2002;51:443-450.
68. Xian-Cheng J. The effect of phospholipid transfer protein on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Frontiers in Bioscience*. 2002; 7:d1634-1641.
69. Jiang X.C., Francone O.L., Bruce C., Milne R., Mar J., Walsh A., Breslow J.L., Tall A.R. Increased pre beta-high density lipoprotein, apolipoprotein AI, and phospholipid in mice expressing the human phospholipid transfer protein and human apolipoprotein AI transgenes. *J. Clin. Invest.* 1996;98, 2373-2380
70. Kotake H, Sekikawa A, Tokita Y, Ishigaki Y, Oikawa S. Effect of HMG-CoA Reductase Inhibitor on Plasma Cholesteryl Ester Transfer Protein Activity in Primary Hypercholesterolemia: comparison among CETP/Taq 1B genotype subgrupos. *J. Atheroscler. Thromb.* 2002;9:207-12.
71. Galicia-Juarez M., Cardoso-Saldaña G.C., Trabajo de Tesis. Polimorfismo del gen de la Proteína Transportadora de Ésteres de Colesterol (CETP), lípidos y lipoproteínas en población abierta del sur de la ciudad de México. Instituto Nacional De Cardiología "Ignacio Chávez". Dep. Endocrinología. 2002
72. Ordovas J.M., Cupples L., Adrienne, Corella Dolores, *et al.* Association of Cholesteryl Ester Transfer Protein Taq 1B Polymorphism With variations in Lipoprotein Subclasses and Coronary Heart Disease Risk. The Framingham Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol.* 2000;20:1323-1346.

APÉNDICE1 GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES NATIVAS

Tamaños de HDL. Para un Gel de 4-30%

	4%(5mL)	30%(5mL)
TBE (mL)	0.5	0.5
Acrlamida-Bis (mL)	0.4	3
Agua mL	4.1	0.75
Glicerol (mL)	---	0.75

Una vez que ya se tiene esto, adicionar al momento de hacer el gel.

*Persulfato de amonio (μL)	20	20
TEMED (μL)	4	4

- *10 mg en 100 μL de agua destilada.
- El buffer de comida es TBE
- Migrar a 20V por 15 minutos, sin muestra.
- Depositar 10 μg de proteína al gel con 1 μL de buffer de muestra.
- Migrar a 70V por 15 minutos
- Migrar a 165V por 20 h
- Teñir el gel con Azul de Coomassie
- Utilizar el marcador de alto peso molecular

Subclases de HDL	Tamaños (nm)
HDL2a	10.40
HDL2b	11.57
HDL3a	9.29
HDL3b	8.59
HDL3c	7.94

GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS)

Separación de apolipoproteínas

Solución A
36.3 g Tris-HCl c.b.p.. 100 mL pH=8.9

Solución B
48.0 g Acrilamida más 1.28 g Bis-acrilamida c.b.p. 100 mL

Solución C
10 g SDS c.b.p. 90 mL

MARCADORES DE PESO MOLECULAR BAJO PESO MOLECULAR

α Lactoalbúmina	14,400
inhib. Tripsina	20,100
Anhidrasa Carbo.	30,000
Ovoalbúmina	45,000
Albúmina	66,000

Solución E

39.4 g Tris más 2.0 g SDS c.b.p. 1000 mL pH=6.8

Gel para Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) 3-19%

	3%	%19	St
Solución A (mL)	1.0	1.0	---
Solución B (μL)	240	1600	300
H ₂ O (mL)	2.76	0.4	1.5
Glicerol (mL)	---	1.0	---
SDS (μL)	40	40	---
Solución E (mL)	---	---	2.0

Una vez que ya se tiene esto, adicionar al momento de hacer el gel.

*Persulfato de amonio (μL)	25	25	40
TEMED (μL)	5	5	6

Gel para Lipoproteínas de alta densidad (HDL) 3-21%

	4%	%21	St
Solución A (mL)	1.0	1.0	---
Solución B (μL)	320	1770	300
H ₂ O (mL)	2.68	0.23	1.5
Glicerol (mL)	---	1.0	---
SDS (μL)	40	40	---
Solución E (mL)	---	---	2.0

Una vez que ya se tiene esto, adicionar al momento de hacer el gel.

*Persulfato de amonio (μL)	25	25	40
TEMED	5	5	6

- *10 mg en 100 μL de agua destilada
- Colocar 15 μg de proteína y 10 μL de buffer de muestra
- Migrar a 60 mA hasta que entren las muestras en el gel concentrador
- Migrar a 90 V durante 2.30 h (hasta que salga el frente de corrida del gel)
- Teñir el gel con Azul de Coomassie
- Utilizar el marcador de bajo peso molecular.

Fosforilasa	97,000	
ALTO PESO MOLECULAR		
Tiroglobulina	669,000	7.1 nm
Femtina	440,000	8.1 nm
Catalasa	232,000	10.4 nm
Lactato desh.	140,000	12.2 nm
Albúmina	67,000	17.0 nm

METODO DE LOWRY

Determinación de proteínas

Solución de Na_2CO_3

20% en H_2O

Solución de tartrato de Na y K

1g más 0.5g CuSO_4 en 250 mL de H_2O

Solución de NaOH 0.8 N

16 g en 500 mL de H_2O

Solución SDS al 10%

Solución patrón de albúmina

1mg/mL

Al momento de la reacción preparar

Solución A

1 volumen de tartrato de Na y K

1 volumen de Na_2CO_3

2 volúmenes de NaOH

2 volúmenes de SDS

2 volúmenes de H_2O

Reactivo de Folin

Preparar al momento

Una proporción 1:6

TÉCNICA

CURVA PATRÓN

	1	2	3	4	5	6	Muestra
Estándar /muestra(μL)	0	10	20	40	80	100	20
H_2O (μL)	100	90	80	60	20	0	80
Solución A (mL)	1	1	1	1	1	1	1

Incubar 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente

Folin (μL)	500	500	500	500	500	500	500
-------------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Incubar 30 minutos más en oscuridad a temperatura ambiente.

- Leer a una longitud de onda de 750 nm.
- Trazar una gráfica de concentración contra absorbancia y *extrapolar* las muestras.

APÉNDICE 2

Extracción de DNA y Determinación de genotipos

El DNA se obtuvo de leucocitos sanguíneos por el método de Salting-out modificado (Miller). Un fragmento de 535 pares de bases en el intron 1 del gen de la CETP fue amplificado por la reacción de polimerasa en cadena (PCR). Cada amplificación se llevó a cabo usando 200 μ M de dNTPs, 50 pmol de cada indicador con la secuencia: 5- CACTAGCCCAGAGAGAGGAGTGCC-3 y 3- CTGACGCCAGCCGACACTAAC-5, 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.5 U de la enzima Taq-polimerasa (Boehringer Mannheim Lot. 14562154-28) y 800 ng de DNA genómico en un volumen final de 50 μ L. La reacción de PCR se realizó en un termociclador (Techne mod. 62-6027) y consistió de un primer paso de desnaturalización a 94°C, 30 seg de alineamiento a 60°C y 1 min de elongación a 72°C, finalmente se realizó un último paso de elongación de 8 min a 72°C.

Para verificar la amplificación del segmento, se corrió un gel de agarosa 1.5% con solución amortiguadora de TBE 0.5X, las muestras se diluyeron 1:3 con azul de bromofenol y solo 15 μ L de la mezcla fueron depositados en cada pozo, también se deposita un marcador de DNA con fragmentos de 154 a 2150 pares de bases. Para revelar las bandas se coloca el gel en una solución de bromuro de etidio (BE, 0.05 μ g/ml). Las moléculas de bromuro de etidio (BE) se adhieren a los nucleótidos de DNA y producen fluorescencia color naranja al ser iluminadas con luz ultravioleta, haciendo evidentes los fragmentos de DNA.

El producto de la reacción PCR fue sometido a enzimas de restricción. Del DNA amplificado se colocaron 12 μ L, y 0.5 μ L de la enzima Taq 1B (10 U/ μ L, Boehringer Mannheim Lot 84841420-85) y 1.0 μ L de la solución amortiguadora de la enzima. Se homogenizó y se incubó por 3 h a 60°C. Esta enzima de restricción es específica para la secuencia palindrómica T/CGA.

Para verificar los tamaños de los productos de la digestión fue identificado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3% con solución amortiguadora de TBE y BE (0.05 μ g/mL), aplicando una corriente de 80V durante 1h 20min. Si el producto de la amplificación por PRC presentó la secuencia de nucleótidos que la enzima reconoce, corta y genera fragmentos de 350 y 180 pb, a esto se le conoce como genotipo B1 y si la enzima no generó ningún fragmento por que no reconoció la secuencia, se asignó B2. El resultado de la digestión se comparó con estándares de peso molecular de 154 a 2150 pb.

APÉNDICE 3

SOLUCION AMORTIGUADORA TRIS (CETP)

$C_4H_{11}NO_3$ -HCL	10 mM	15.76 g
NaCl	140 mM	81.8 g
EDTANa ₂	1 mM	0.37 g
NaN ₃		0.15 g
BTH	0.01 mM	0.22 g

Para preparar 1L 10X