

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL METABOLISMO DE
LAS HDL EN DOS CONDICIONES POTENCIALMENTE
ATEROGENICAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A :

CLAUDIA HUESCA GOMEZ

TUTOR PRINCIPAL:
DR. OSCAR ARMANDO PEREZ MENDEZ

MEXICO, D.F.

2004.



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.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	DR. EDMUNDO CHÁVEZ COSSIO
SECRETARIO	DR. OSCAR A PÉREZ MÉNDEZ
VOCAL	DR. MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA
VOCAL	DR. EDGAR ZENTENO GALINDO
VOCAL	DR. GUILLERMO CARDOSO SALDAÑA
SUPLENTE	DR. CARLOS POSADAS ROMERO
SUPLENTE	DRA. SOCORRO DURAN VARGAS

SITIO DONDE SE REALIZÓ LA TESIS:

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA.
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: Claudio Huesca
Gómez

FECHA: 27 Mayo 2004

FIRMA: [Firma]

Agradezco a Dios el haber puesto en mi camino personas que me han apoyado incondicionalmente durante mi formación personal y académica. A ellas les dedico este trabajo.

A mis padres.

Jamás existirá forma de agradecer toda una vida de lucha, sacrificios y esfuerzos.

Por su confianza y amor.

A mis hermanos

Omar y Sócrates por apoyarme en todo momento.

Cari, gracias por estar presente y compartir la vida conmigo, siempre estarás en mi pensamiento y mi corazón.

A mis amigos

Fabis, Mari, Rosy, Lauris, Maye, Richard, Tomas y Jesús por su apoyo, consejos y amistad incondicional.

Al Dr. Oscar A. Pérez Méndez por iniciarme en este camino, su confianza, apoyo, ayuda y orientación. Pero sobre todo por su gran calidad humana y amistad.

Agradezco al consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACYT) la beca otorgada durante el desarrollo del presente trabajo para la obtención del grado de Doctora en Ciencias Biomédicas.

**Este trabajo fue apoyado en su totalidad por el CONACYT.
Número de proyecto J28942.**

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN.....	4
ANTECEDENTES	
I. LIPOPROTEÍNAS Y SU METABOLISMO.....	5
I.1. CLASIFICACIÓN.....	5
I.2. METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS.....	7
I.2.1. Lipoproteínas que contienen apo B (Lp B).....	7
I.2.2. Lipoproteínas de alta densidad (HDL).....	8
II. HDL Y ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA (EAC).....	10
II.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS HDL.....	11
II.2. ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA.....	12
II.3. PREVENCIÓN DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.....	13
III. FIBRATOS Y HDL.....	15
III.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FIBRATOS.....	15
III.2 EFECTO DE LOS FIBRATOS SOBRE LOS GENES QUE REGULAN EL METABOLISMO DE LAS HDL.....	15
IV. METABOLISMO DE LAS HDL EN EL HIPOTIROIDISMO.....	18
V. ESTUDIOS CINÉTICO METABÓLICOS DE LAS LIPOPROTEÍNAS.....	19
V.1. ELECCIÓN DEL TRAZADOR.....	20
V.2. PARÁMETROS METABÓLICOS.....	21
V.3. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS.....	22
JUSTIFICACIÓN.....	24
OBJETIVO GENERAL.....	26
MODELO 1. RATAS HIPOTIROIDEAS	
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
METODOLOGÍA.....	28
RESULTADOS.....	32

DISCUSIÓN.....	38
MODELO 2. ESTUDIO DE PACIENTES TRATADOS CON CIPROFIBRATO	
HIPÓTESIS.....	43
OBJETIVOS PARTICULARES.....	43
METODOLOGÍA.....	44
RESULTADOS.....	49
DISCUSIÓN.....	54
DISCUSION GENERAL.....	58
CONCLUSIÓN.....	60
PERSPECTIVAS.....	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
APÉNDICES.....	78

ABREVIATURAS

ABCA1: Transportador de membrana dependiente de ATP.
Apo: Apolipoproteína.
CE: Colesterol esterificado.
CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol.
DS: Desviación estándar.
EAC: Enfermedad arterial coronaria.
EDTA: Ácido etilendiaminotetracético.
FCR: Tasa de catabolismo fraccional
FSR: Tasa de síntesis fraccional.
HDL: Lipoproteína de alta densidad.
Htx: Hipotiroidismo.
IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia.
kD: Kilo Dalton.
LCAT: Lecitina:Colesterol Aciltransferasa.
LDL: Lipoproteína de baja densidad.
LDL- ox: LDL oxidada.
LH: Lipasa hepática.
Lp: Lipoproteína.
LPL: Lipasa lipoprotéica.
PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida
PLTP: Proteína de transferencia de fosfolípidos.
PON 1: Paraoxonasa 1.
PPAR: Receptor activado por proliferador de peroxisomas.
PPRE: Elemento de respuesta a la proliferación de peroxisomas.
PR: Tasa de producción.
Qm: Quilomicrón.
RT: Tiempo de residencia.
RXR: Receptor 9-cis del ácido retinoico.
SR-BI: Receptor barrendero clase B tipo I.
TNF: Factor de necrosis tumoral
TRC: Transporte reverso de colesterol.
TBE: Tris-ácido bórico.
VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.

RESUMEN

Las concentraciones de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) tienen una correlación inversa con el riesgo de desarrollar enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC). Las HDL son una población heterogénea de partículas que se pueden agrupar en diferentes subclases. En este contexto, estudios recientes han postulado que la función antiaterosclerosa de las HDL depende del tipo de partícula, independientemente de la concentración plasmática de C-HDL. Las subclases de HDL son el resultado de un delicado equilibrio dinámico entre las actividades enzimáticas y de proteínas de transporte intravascular, de receptores celulares, así como de la velocidad con la que sintetizan y se catabolizan estas lipoproteínas. Sin embargo, se conoce poco acerca de los diferentes factores metabólicos que dan origen a las diferentes subpoblaciones HDL. Por lo anterior, postulamos que existe una relación entre metabolismo de las HDL con su potencial antiaterogénico, relación que tendría por intermediario la estructura de las partículas lipoproteicas.

Seleccionamos dos modelos de estudio que se caracterizan por presentar alteraciones estructurales de las HDL, entendiéndose por estructura al tamaño, contenido de lípidos y apoproteínas, con el objetivo de aportar nuevos conocimiento que permitan interpretar la compleja relación en metabolismo, estructura y función de estas lipoproteínas.

En primer lugar, estudiamos el metabolismo de las HDL en un modelo murino de hipotiroidismo (Htx). Este modelo se caracterizó por tener partículas HDL significativamente más grandes, enriquecidas en fosfolípidos y apo E en comparación con los controles. Realizamos estudios cinético-metabólicos de la apo AI marcada de manera exógena con ^{125}I , reincorporándola tanto en HDL aisladas de ratas normales (HDL-n) como de ratas Htx (HDL-Htx). Nuestros resultados demuestran que las HDL-Htx se depuran lentamente en comparación con las HDL-n, sugiriendo que la estructura de la partícula es un factor determinante en la velocidad de eliminación de las HDL. A pesar de los cambios estructurales de las HDL-Htx, su capacidad de captar colesterol de la membrana de las células en cultivo no se vió afectada.

En segundo lugar, analizamos el metabolismo de las HDL en sujetos hipertrigliceridémicos, en condiciones basales y después de disminuir el nivel de triacilgliceroles plasmáticos por medio de ciprofibrato. El tratamiento con el fármaco, produjo una disminución significativa en el contenido de triacilgliceroles de las HDL y desplazó el patrón de distribución de tamaños hacia las partículas más pequeñas, HDL3c. Los estudios cinético-metabólicos en estos pacientes se realizaron por infusión constante [5,5,5-tri- ^2H] leucina que permite el marcaje endógeno de todas las proteínas en curso de síntesis. La cinética de incorporación del marcador isotópico a la apo AI de las HDL se determinó por espectrometría de masas. Nuestros resultados demuestran que el catabolismo de la apo A-I se incrementa un 50% en promedio, asociado a un incremento de la actividad de la proteína de transferencia de fosfolípidos. Las modificaciones en el metabolismo y estructura de las HDL inducidas por el ciprofibrato, resultan en un aumento en la capacidad de captar colesterol de células en cultivo.

Este trabajo de investigación permite postular que existe una relación inversa entre el tamaño de la partícula HDL y su catabolismo. Además, las modificaciones en el metabolismo de las HDL que se manifiestan por una disminución en tamaño de las partículas, favorece su función fundamental de promover el flujo de colesterol. Por lo tanto, intervenciones farmacológicas, o de otra naturaleza, que aumenten el catabolismo de las HDL, pueden contribuir a mejorar su función en el transporte reverso del colesterol. La confirmación de esta propuesta, así como la relación entre la estructura de las HDL con otras funciones antiaterosclerosas de estas lipoproteínas, tendrá que ser evaluado en estudios futuros.

I. LIPOPROTEÍNAS Y SU METABOLISMO

Las lipoproteínas (Lp) son macromoléculas pseudomicelares (Figura 1), constituidas principalmente por lípidos anfipáticos (fosfolípidos y colesterol libre), lípidos no polares (triacilgliceroles y ésteres de colesterol) y por proteínas llamadas apolipoproteínas (apo) (Tabla I). Los lípidos no polares se sitúan en el interior de las lipoproteínas. Los lípidos anfipáticos se organizan en una monocapa en la superficie del complejo, presentando sus grupos polares hacia el medio acuoso. Las apolipoproteínas estabilizan la monocapa de fosfolípidos, modulan la actividad de ciertas enzimas y la relación de estas últimas con sus receptores. De esta manera el transporte de los lípidos en plasma está garantizado.

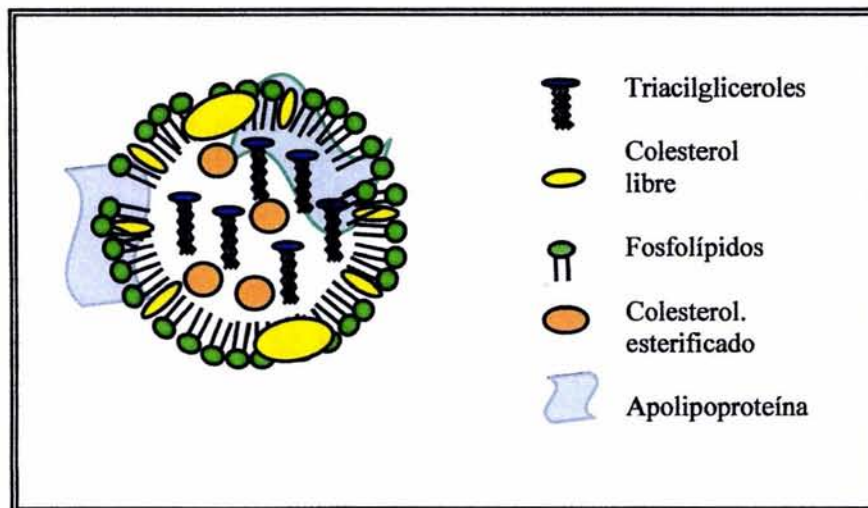


FIGURA 1. Representación esquemática de una lipoproteína.

I.1. CLASIFICACIÓN

Las lipoproteínas se han clasificado de acuerdo a su migración en la electroforesis y también con base a su densidad o contenido de apolipoproteínas (tabla 1)

a) Clasificación según migración electroforética.

Con este método se reconocen las lipoproteínas como α , β y pre- β .

TABLA I. Características de las principales apolipoproteínas ¹.

Apo	PM. (kD)	Localización	Función	Sitio de síntesis	P.I	Conc. plasmática (mg/dL)
A-I	29,016	HDL, Qm	Principal proteína componente de las HDL, cofactor de LCAT	Intestino Hígado	5.9-5.4	121± 24
A-II	14,414	HDL	Inhibidor de LH y de la LCAT	Intestino Hígado	5.0	37± 9
A-IV	44,465	HDL, Qm	Activador de LCAT, modulador de LPL y estimulador de eflujo de colesterol	Intestino	5.5	15
B-100	512,723	VLDL, LDL	Ligando para receptor de LDL	Hígado	-	98± 20
B-48	240,800	Qm	Proteína estructural de QM	Intestino	6.8	*
CI	6,630	HDL, VLDL, Qm	Activador de LCAT, inhibición de la captación hepática de triacilglicerolos	Hígado	7.5	7±2
C-II	8,900	HDL, VLDL, Qm	Cofactor de LPL, inhibición de la captación hepática de lipoproteínas ricas en triacilglicerolos	Hígado	4.9	3.7± 1.8
C-III _{0,1,2}	8,800	HDL, VLDL, Qm	Inhibidor de la LPL	Hígado	4.5-5.0	13± 2
E _{2,3,4}	34,145	VLDL, HDL	Ligando de receptor de LDL	Hígado	6.0-5.7	4±1

Apo: apolipoproteína, PM: Peso molecular, kD: kilodalton, PI: punto isoeléctrico, HDL: lipoproteína de alta densidad, Qm: Quilomicrón, LCAT: Lecitina:Coolesterol Aciltransferasa, LH: Lipasa Hepática, LPL: Lipoproteína Lipasa.

b) Según la densidad, se distinguen cinco clases:

- 1) Quilomicrones (Qm), son las lipoproteínas más grandes y menos densas ($d < 0.94$).
- 2) VLDL (Very Low-Density Lipoproteins), lipoproteínas de muy baja densidad ($0.94 < d < 1.006$).
- 3) IDL (Intermediate-Density Lipoproteins), lipoproteínas de densidad intermedia ($1.006 < d < 1.019$).
- 4) LDL (Low-Density Lipoproteins), lipoproteínas de baja densidad ($1.019 < d < 1.063$).
- 5) HDL (High-Density Lipoproteins), lipoproteínas de alta densidad ($1.063 < d < 1.210$).

Las HDL, a su vez, pueden ser separadas en dos subclases:

- HDL₂: $1.063 < d < 1.120$.
- HDL₃: $1.120 < d < 1.210$.

Tabla II. Características de las lipoproteínas separadas en función de su densidad².

Lipo-proteína	Patrón de distribución electroforético	Diámetro (nm) Ø	Contenido de Proteína (%)	Contenido de Fosfolípidos (%)	Contenido de Triacilglicérols (%)	Contenido de Colesterol (%)
Qm	Origen	>70	1-2	3-6	90-95	1-3
VLDL	Pre-β	30-70	6-10	15-20	45-65	4-8
IDL	β lenta	20-30	20	30	35	38
LDL	β	18-25	18-22	18-24	4-8	50
HDL	α	5-12	45-55	26-32	2-7	22

Qm: Quilimicrón, VLDL: lipoproteína de muy baja densidad, IDL: lipoproteína de densidad intermedia, LDL: lipoproteína de baja densidad, HDL: lipoproteína de alta densidad.

c) Por su contenido de apolipoproteínas, se dividen en dos tipos.

1. Las lipoproteínas que contienen apo A-I: Lp A-I y Lp A-I: A-II. En esta clasificación se incluyen las HDL.
2. Las lipoproteínas que contienen apo B: Lp B; Lp B: E; Lp B: C-III y Lp B: C-III: E. En esta clasificación se incluyen las VLDL, IDL y LDL.

Otras poblaciones pueden ser clasificadas por su contenido de apo A-IV o de apo E.

I.2. METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS

I.2.1. Lipoproteínas que contienen apo B (Lp B).

Dos órganos están implicados en la biosíntesis y secreción de las Lp B: el intestino que sintetiza los Qm y el hígado que sintetiza las VLDL.

Los Qm se sintetizan en el enterocito a partir de los lípidos digeridos y absorbidos provenientes de la dieta. Contienen apo B-48, A-I, A-II y A-IV. Los triacilglicérols contenidos en los Qm pueden seguir dos rutas metabólicas. En la primera, los Qm intercambian triacilglicérols por ésteres de colesterol, con las HDL; este intercambio es facilitado por la Proteína de Transferencia de Ésteres de Colesterol (CETP). En la segunda, la Lipasa Lipoprotéica (LPL) hidroliza los triacilglicérols dando lugar a la formación de remanentes de Qm.

En el plasma, los Qm transfieren a las HDL componentes de superficie que incluyen las apo C-II, C-III y E y reciben de esas lipoproteínas fosfolípidos y apo A-I. De esta manera, los remanentes de Qm se enriquecen proporcionalmente en apo E, hecho que favorece su captación por el hígado a través del receptor apo B/E.

Las VLDL son sintetizadas por el hígado a partir de triacilgliceroles obtenidos de otras lipoproteínas o sintetizados *de novo*. Las VLDL contienen apos B-100, C-II y E. Una vez en el torrente sanguíneo interactúan con la LPL del endotelio, que utiliza la apo C-II como cofactor para hidrolizar los triacilgliceroles contenidos en las VLDL. Además, las VLDL ceden triacilgliceroles, fosfolípidos, y apo C's y E a las HDL, recibiendo de éstas ésteres de colesterol. Se forman entonces partículas IDL, más pequeñas, con un menor contenido de triacilgliceroles y enriquecidas con ésteres de colesterol. Estas lipoproteínas pueden ser captadas en el hepatocito a través del receptor apo B/E, o seguir disminuyendo su tamaño por la hidrólisis de sus triacilgliceroles hasta convertirse en LDL. Las partículas de LDL pueden ser eliminadas de la circulación por el receptor LDL del hígado, o pueden ser usadas por otros tejidos que requieran colesterol para formar membranas celulares durante la proliferación, o ser aprovechadas por tejidos esteroideogénicos para síntesis de hormonas.

El organismo es incapaz de eliminar el colesterol excedente llevado por las LDL y se requiere de su transporte hacia el hígado. Este proceso lo llevan a cabo las HDL, mediante el mecanismo denominado transporte reverso de colesterol (TRC).

1.2.2. Lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Las HDL representan un grupo heterogéneo de partículas, con diámetro que varía entre 7.4-12 nm³. El metabolismo de las HDL es un mecanismo cíclico conocido como TRC y está esquematizado en la figura 2.

Las HDL son sintetizadas por el hígado y el intestino en forma de partículas discoidales pre β -1, con una masa de 67 kD y una densidad $>1.21\text{g/mL}$ ⁴. Las HDL pre β -1 contienen únicamente apo A-I y pequeñas cantidades de fosfolípidos, y son las partículas con la mayor capacidad para aceptar el colesterol proveniente de los tejidos periféricos^{5,6}. La primera etapa del TRC es el eflujo de colesterol de las células. Este paso se realiza a través de un mecanismo regulado por un transportador de membrana dependiente de ATP, llamado ABCA1. El ABCA1 funciona como molécula de translocación, facilitando la exposición de los lípidos en la superficie de la célula. Cuando las HDL se enriquecen con colesterol, las partículas pre β -1 se transforman en partículas más grandes, constituidas de fosfolípidos y una pequeña cantidad de colesterol libre denominadas HDL pre- β -2. Estas partículas son excelente sustrato para la Lecitina:Colesterol Aciltransferasa (LCAT)^{3,7,8}. Por acción de esta enzima se generan ésteres de colesterol y lisofosfatidilcolina; los primeros permanecen asociados a las HDL y migran hacia el núcleo de la partícula. Este proceso convierte a las HDL discoidales de migración pre- β en pequeñas partículas esféricas de migración α con un diámetro aproximado de 7.7 nm⁹.

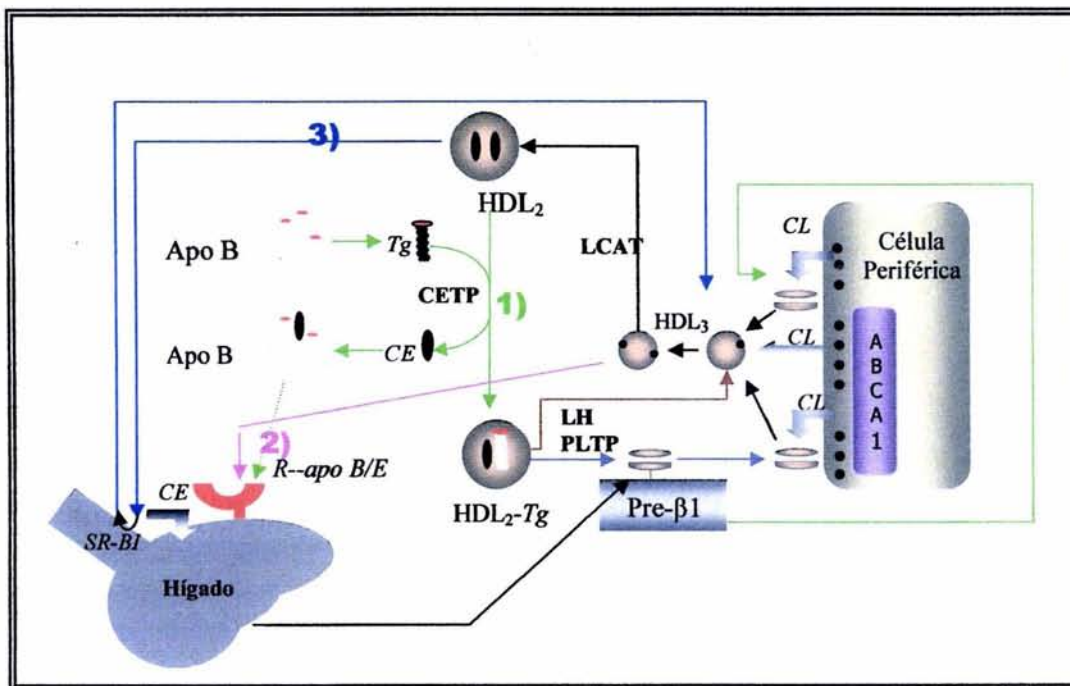


FIGURA 2. Esquema del transporte reverso de colesterol, se identifican las tres diferentes vías utilizadas por las Lipoproteínas de alta densidad (HDL) para transportar el colesterol de los tejidos periféricos hacia el hígado. ABCA1: transportador dependiente de ATP, CL: colesterol libre, CE: colesterol esterificado, Tg: triacilglicerol, apo B: lipoproteínas ricas en apo B, LCAT: Lecitina:colesterol aciltransferasa, LH: Lipasa hepática, CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol, PLTP: Proteína de transferencia de fosfolípidos, SR-B1: Receptor barrendero clase B tipo I.

En la figura 2 se muestra como los ésteres de colesterol de las HDL pueden ser llevados al hígado por tres mecanismos diferentes. *Primero:* intercambio por triacilglicerol provenientes de los Qm o VLDL, facilitado por la CETP. La Lipasa Hepática (LH) hidroliza los triacilglicerol adquiridos y, en asociación con la Proteína de Transferencia de Fosfolípidos (PLTP), se reduce el tamaño de las HDL, dando lugar a partículas densas y pequeñas (HDL₃) capaces de reiniciar el ciclo de captación de colesterol. *Segundo,* si la actividad de la CETP es baja, las HDL que contienen apo E pueden ser depuradas directamente por el receptor hepático apo B/E^{10,11}. *Tercero,* los ésteres de colesterol pueden ser selectivamente removidos de las HDL por el receptor SR-BI¹² localizado en el hepatocito, generando así partículas HDL de menor tamaño que pueden repetir el ciclo. La partícula completa de HDL también puede ser depurada por un mecanismo que involucra a la cubilina. Esta proteína de membrana ha sido identificada como un sitio de unión para la apo A-I de las HDL en células epiteliales del tubo proximal de los riñones. Así, pequeñas partículas HDL con tamaño < 8 nm son filtradas por el glomérulo y alcanzan sus sitios catabólicos en el túbulo renal¹³.

II. HDL Y ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA (EAC).

La enfermedad arterial coronaria (EAC), es la primera causa de mortalidad en los países desarrollados y comienza a serlo en los países emergentes. Datos de la Secretaría de Salud en México señalan que este padecimiento es la segunda causa de morbilidad y mortalidad ¹⁴.

La aterogénesis comienza como una respuesta a un daño, desencadenando una serie de eventos inflamatorios, de proliferación de células y de apoptosis ^{15,16}. La participación activa de las LDL es bien conocida en la génesis de la enfermedad. Por otra parte, el papel protector de las HDL ha sido demostrado consistentemente por los estudios epidemiológicos. De hecho, en los estudios prospectivos, el C-HDL es comúnmente el factor de riesgo lipídico que mejor correlaciona con el riesgo de aterosclerosis coronaria²³.

La hipoalfalipoproteinemia (HA, niveles de C-HDL < 40 mg/dL ¹⁷) es la dislipoproteinemia más frecuente en pacientes con infarto al miocardio prematuro ¹⁸ y es la de mayor incidencia en la población mexicana ¹⁹. Varios estudios han demostrado la transmisión genética de la hipoalfalipoproteinemia, pero no han sido determinadas la o las proteínas directamente involucradas. La hipoalfalipoproteinemia no es una dislipidemia unigénica, ya que varios son los loci que están involucrados en su desarrollo. Algunas deficiencias genéticas y metabólicas de las HDL y su relación con la incidencia de aterosclerosis se describen en la tabla III.

La relación inversa entre los niveles de colesterol HDL y el riesgo de EAC es frecuentemente explicado por el TRC (capítulo I) ²⁰⁻²⁴. El concepto del TRC como mecanismo cardioprotector es apoyado por varios estudios *in vivo* e *in vitro* ^{25,26}. Sin embargo, en los últimos años se han descrito una serie de propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antitrombóticas y profibrinolíticas de las HDL que podrían contribuir a explicar la relación inversa entre la EAC y estas lipoproteínas. La figura 3 resume los diversos mecanismos que sostienen el papel antiaterogénico de las HDL y a continuación se detallan algunos de ellos.

Tabla III , Proteínas involucradas en las concentraciones de HDL ²⁶.

GEN/PROT	CROMO-SOMA	FUNCIÓN EN EL TRC	REGULACIÓN	
			POSITIVA	NEGATIVA
APO A-I	11	Principal proteína componente de HDL, activación de LCAT, estimulación del eflujo de colesterol, ligando de HDL para unión (SR-B1, ABC1)	E2, E3, glucocorticoides, IL-6, retinoides, fibratos	Testosterona, TGF- β , ácido cólico
APO A-II	1	Proteína componente de HDL, ligando de HDL para unión, inhibidor de LH.	Retinoides, fibratos	Hormona tiroidea TNF- α
Apo A-IV	11	Activación de LCAT, modulador de LPL y estimulador de eflujo de colesterol.	Ácidos grasos insaturados, ácidos biliares	Leptina
Apo C-I	19	Activación de LCAT, inhibición de la captación hepática de triacilglicerol	?	?
Apo C-II	19	Activación LPL, inhibición de la captación hepática de lipoproteínas ricas en triacilglicerol	?	?
Apo D	3	Formación de pre- β 3-Lp A-I	Testosterona, glucocorticoide	Estradiol
Apo E	19	Ligando del receptor apo E, movilización de colesterol celular en macrófagos y eflujo de colesterol	Colesterol, E2	Citocinas
Apo F	12	Inhibición de CETP	?	?
LPL	8	Hidrólisis de triacilglicerol, generación de precursores de HDL	Vitamina D3, AMPc, insulina, glucosa, AR- α_1 , AR- β_3 , FFAs, fibratos, tiazolidinedionas	Endotelina-1, IL-1, IL-11, TNF- α , IFN- γ , LPS, PTH, PGE ₂
LH	15	Hidrólisis de triacilglicerol y fosfolípidos en HDL, cofactor de SR-B1 en captación selectiva, generación de apo A-I libre de lípidos	Testosterona	E ₂ , hormona de crecimiento, dexametasona, fibratos
LCAT	16	Esterificación de colesterol, maduración de HDL	IL6, dexametasona, FFAs, corticotropina	TGF- β
CETP	16	Intercambio de ésteres de colesterol y triacilglicerol entre HDL y LpB, conversión de HDL, generación de apo A-I libre de lípidos	Colesterol, oxisterol, retinoides	
PLTP	20	Transferencia de fosfolípidos de lipoproteínas ricas en triacilglicerol a HDL, fusión de HDL pequeñas, generación de apo A-I libre de lípidos	Fibratos, ácidos biliares, hipoxia	

II.1.ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS HDL

Recientemente el papel antiaterogénico de las HDL se ha centrado en su capacidad antioxidante. Varios de sus elementos participan en esta propiedad, entre ellos sus apolipoproteínas y particularmente la paraoxonasa (PON1) ²⁷. Esta enzima se localiza en la

subfracción de las HDL que contiene apo A-I y clusterina (apo J)^{28,29}. La PON1 fue descrita inicialmente como una enzima de desintoxicación que hidroliza el paraoxón, un potente inhibidor de las colinesterasas y de donde deriva su nombre. Se ha demostrado que la PON1, metaboliza lípidos peroxidados y previene su acumulación en las LDL y en las propias HDL³⁰. La oxidación de las HDL reduce sustancialmente su capacidad como aceptor en el eflujo de colesterol del TRC³¹.

RELACIÓN HDL Y PON

La PON1 se sintetiza en los hepatocitos y queda anclada a su membrana. Para que la PON1 abandone la membrana del hepatocito hacia su destino final, el plasma, requiere de un aceptor que posea una tensión superficial adecuada. In vivo, este aceptor son las HDL, particularmente la subfracción HDL₃ (estudios recientes de nuestro laboratorio, no publicados). Como consecuencia la paraoxonasa es transportada en el plasma por las HDL además de ser vectorizada por las mismas a los espacios subendoteliales donde llevará a cabo su función antioxidante.

El papel protector de la PON1 en el desarrollo de aterosclerosis se ha reforzado por estudios en animales, observando que HDLs aisladas de ratones que no expresan el gen PON1, carecen de la capacidad de evitar la oxidación de las LDL³²⁻³⁴. Este efecto biológico se relaciona con la habilidad de la PON1 de hidrolizar los peróxidos asociados a lipoproteínas^{34,35}, dando lugar a derivados inactivos desde el punto de vista de la peroxidación³⁶. Así, la cascada oxidativa de los lípidos de las LDL puede ser interrumpida por la acción de la paraoxonasa³⁷. Otros estudios *in vitro*, han demostrado la disminución de la activación de monocitos por LDL oxidadas en presencia de PON1.

II.2. ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA

Las HDL inhiben la interacción de monocitos con las células endoteliales y con células de músculo liso, además de la adhesión de monocitos a las células endoteliales inducidas por LDL oxidadas (LDL-ox)³⁸. Estudios recientes han mostrado que la expresión de VCAM-1, ICAM 1 y selectina E, son inhibidas por las HDL^{39,40}. La mejor inhibición de la expresión de estas proteínas fue observada a concentraciones fisiológicas de HDL. Además, las HDL previenen la liberación del factor de necrosis tumoral (TNF) inducida por lipopolisacáridos y endotoxinas bacterianas, debido a que se unen a ellos y los neutralizan. Al limitar la liberación de TNF, la activación del complemento se inhibe y se reduce también la inducción de moléculas de adhesión en macrófagos de conejos y ratones^{41,42}.

II.3. PREVENCIÓN DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.

La disfunción endotelial es uno de las primeras manifestaciones en la patogénesis de la aterosclerosis. Estudio *in vitro* e *in vivo* han puesto de manifiesto un efecto de conservación de la función endotelial por parte de las HDL. En este sentido, se ha observado que sujetos con concentraciones abatidas de C-HDL, entre otras anomalías lipídicas, presentan disfunción endotelial. Recientemente se ha reportado que el C-HDL es un factor independiente de predicción de la vasodilatación inducida por flujo, en pacientes con EAC ^{43,44}.

Se ha postulado que los mecanismos responsables de la preservación de la función endotelial mediada por las HDL, están relacionados con la capacidad de ésta últimas de inactivar los efectos nocivos de las LDL-ox a nivel de producción de NO. Las HDL inactivan a las LDL-ox, no solo a través de la paraoxonasa como se ha discutido previamente, sino también por medio de la apo AI, de sus fosfolípidos, y de la captación de lisofosfatidilcolina, uno de los productos derivados del proceso oxidativo de las LDL.

A pesar de las propiedades antiaterosclerosas que poseen las HDL, algunos casos aislados de hipoalfalipoproteinemia severa no se asocian con riesgo elevado de EAC ⁴⁵⁻⁴⁷. En ese tipo de pacientes, se ha determinado que el catabolismo de las HDL es muy elevado, lo que sugiere una función acelerada. En otras palabras, la cantidad de HDL es importante, pero la velocidad con la que realizan sus funciones lo es aún más. Se requieren otros estudios que proporcionen más información para poder discriminar entre una hipoalfalipoproteinemia proaterogénica de una que no lo es.

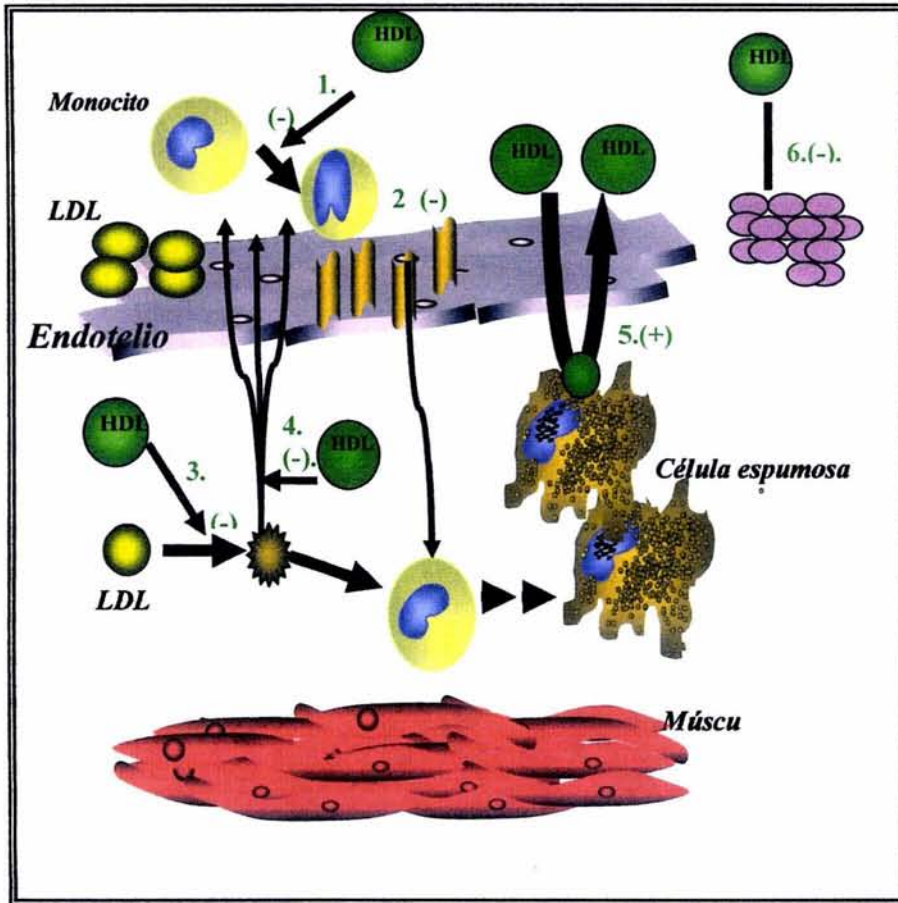


FIGURA 3. Efectos anti-aterogénicos de las HDL. 1) Inhibición de la Quimiotaxis promovida por LDL oxidadas. 2) Regulación de la síntesis de adhesinas en el endotelio vascular. 3) Inhibición de la oxidación de las LDL. 4) Inhibición de la disfunción endotelial inducida por LDL-ox y apoptosis. 5) Estimulación del eflujo de colesterol en el macrófago. 6) Inhibición de la activación de plaquetas.

III. FIBRATOS Y HDL.

Los fibratos son derivados del ácido fólico. Los más utilizados en la clínica son el clofibrato, gemfibrozil, fenofibrato, bezafibrato y ciprofibrato. Estudios de prevención primaria y secundaria han mostrado que los fibratos disminuyen la incidencia de complicaciones de EAC, al regular las concentraciones de lípidos y lipoproteínas ^{48,49}. Los beneficios observados en estos estudios están relacionados con el incremento en el colesterol-HDL. Sin embargo, los conocimientos acerca de las modificaciones en el metabolismo de las HDL por el tratamiento con fibratos son escasos.

III.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FIBRATOS.

Los fibratos son ligandos sintéticos de factores de transcripción llamados receptores activados por proliferador de peroxisomas (PPARs). Los PPARs son miembros de la superfamilia de receptores de hormonas nucleares y han sido identificados tres genes diferentes: α , δ (β) y γ . Los fibratos actúan principalmente por activación de la isoforma α , que tiene como ligandos naturales a los ácidos grasos y sus derivados, leucotrieno B4 y el ácido 8S-hidroxicosateranoico (8S-HETE). Los PPAR α se expresan predominantemente en los tejidos que exhiben una alta tasa metabólica de ácidos grasos, tales como hígado y músculo.

En el núcleo de la célula, los PPARs activados por su ligando, se heterodimerizan con el receptor 9-cis del ácido retinoico (RXR) (Figura 4). El complejo PPAR α /RXR se une a una secuencia específica del DNA, llamado elemento de respuesta a la proliferación de peroxisomas (PPRE). El PPRE está constituido por secuencias hexaméricas AGGTCA, espaciadas por uno o dos nucleótidos ($N_{1,2}$) que actúan como secuencias de regulación de la expresión genética, en particular de proteínas implicadas en el metabolismo de las lipoproteínas.

III.2 EFECTO DE LOS FIBRATOS SOBRE LOS GENES QUE REGULAN EL METABOLISMO DE LAS HDL.

Los PPAR α participan en la regulación de genes que codifican para proteínas estructurales de las HDL, tales como la apo A-I y apo A-II, así como proteínas que participan de manera directa o indirecta en el metabolismo y remodelación de las HDL. El gen de la apo A-I humana presenta una secuencia PPRE en el sitio de activación del promotor ⁵⁰. La unión de este PPRE y de un PPAR α activado por el fibrato aumenta la expresión del gen de la apo A-I y su síntesis proteica ⁵¹.

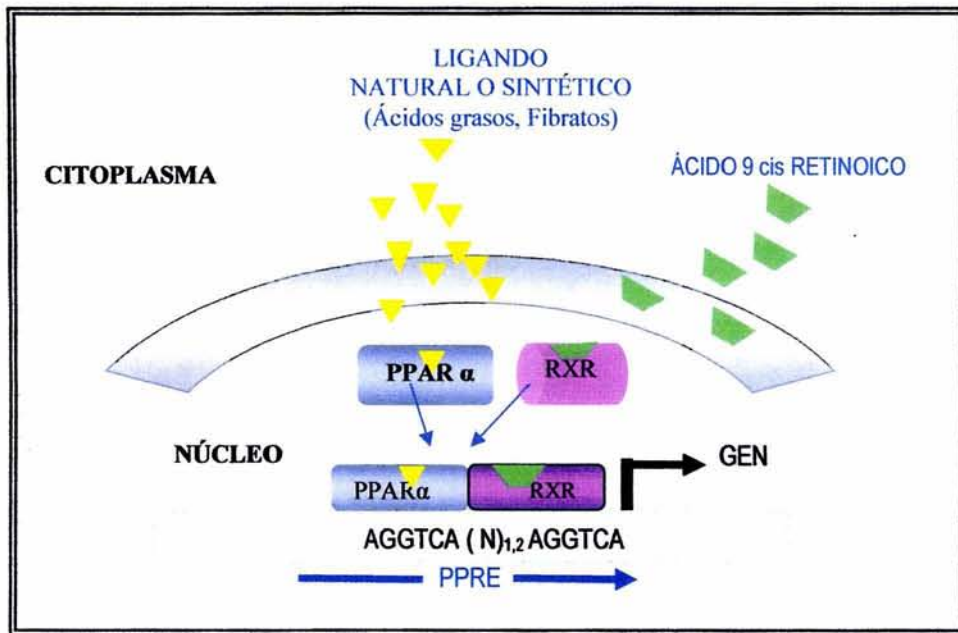


FIGURA 4. Activación y modo de acción de los receptores activados por proliferador de peroxisomas α (PPAR- α) RXR: receptor del ácido retinoico, PPREs elementos de respuesta a la proliferación de peroxisomas.

El gen de la apo All humana presenta un PPRE localizado en su sitio promotor y por lo tanto su transcripción aumenta por efecto de los fibratos, según se ha demostrado con cultivos de hepatocitos humanos y de células HepG2 ⁵². El incremento en la transcripción del gen apo All se manifiesta por aumentos en las concentraciones plasmáticas de la proteína en sujetos con enfermedad coronaria tratados con fibratos ⁵².

Los fibratos regulan la expresión de ciertos receptores de la HDL, en particular el SR-B1 (scavenger receptor B1) y ABCA1 ^{53,54}. Los incrementos en la expresión de estos receptores por el tratamiento con fibratos, puede ser la base de las elevaciones del C-HDL que se observa en los pacientes tratados con fibratos. Sin embargo, se desconoce la contribución real de esas proteínas en la elevación del C-HDL.

En lo que concierne a las proteínas de transporte y enzimas que contribuyen a la remodelación de las HDL, existen algunos indicios acerca de la regulación del gen de la PLTP y la LH por parte de los fibratos. En ratones transgénicos que expresan apo A-I humana, los fibratos incrementan el RNAm de la PLTP manifestándose por un aumento de su actividad en el plasma ⁵⁵. Sin embargo, este efecto no ha sido reportado en humanos que reciben fibratos. Por otro lado, en ratones el tratamiento con fibratos provocó una disminución de la expresión del gen de la LH que fue paralela a la reducción de la actividad de la enzima ⁵⁶.

Los fibratos también regulan la expresión de proteínas que participan de manera indirecta en el metabolismo de las HDL; estimulan la expresión hepática del gen de la LPL y reprimen la del gen de la apo C-III, proteína que inhibe la acción de la LPL. De esta manera, al incrementar la actividad de la LPL y disminuir la concentración plasmática de su inhibidor, se incrementa la lipólisis ⁵⁷. Este efecto contribuye a la disminución de la concentración plasmática de los triacilgliceroles por el tratamiento con fibratos.

Por último, pese a que los fibratos no regulan la expresión del gen de la CETP, se ha reportado que reducen la tasa de intercambio de lípidos neutros (ésteres de colesterol y triacilgliceroles) entre las VLDL y HDL ⁵⁸. Tal reducción es el resultado de la disminución de triacilgliceroles plasmáticos; en consecuencia, los ésteres de colesterol se acumulan en las HDL, lo que contribuye a elevar los niveles de C-HDL en plasma.

IV. METABOLISMO DE LAS HDL EN EL HIPOTIROIDISMO.

El hipotiroidismo se asocia con incremento en riesgo de desarrollar EAC: La asociación entre ambas entidades fisiopatológicas, se ha explicado por la prevalencia de hipercolesterolemia en la disfunción tiroidea. Las hormonas tiroideas regulan los niveles de colesterol-LDL (C-LDL), al estimular la expresión de los receptores hepáticos apo B/E. En consecuencia, en el estado hipotiroideo, estos receptores se encuentran disminuidos, alterando la depuración de las LDL e incrementando así los niveles de colesterol plasmático⁵⁹.

Debido al papel preponderante de las LDL en la formación de la placa ateromatosa, se ha dado poca importancia al estudio del papel antiateroscleroso de las HDL en el estado hipotiroideo. La razón principal de esta omisión, radica en hecho de que durante el hipotiroidismo, el C-HDL se ha encontrado sin cambios⁶⁰ o incluso elevado^{61,62}. Por lo tanto, de manera general se ha asumido que no existen alteraciones en las lipoproteínas de alta densidad asociadas a la deficiencia de hormonas tiroideas. Sin embargo, algunos estudios han mostrado que en pacientes hipotiroideos los triacilgliceroles se acumulan en las HDL por deficiencia de la actividad la LH y de la LPL⁶³. También se ha puesto de manifiesto que la actividad CETP disminuye en el hipotiroidismo^{64,65} y es sabido que actividades bajas de esta proteína resultan en acumulación de ésteres de colesterol en las lipoproteínas de alta densidad^{66,67}. Por lo tanto, una de las manifestaciones bioquímicas de la deficiencia CETP es un aumento en la concentración de C-HDL. Lo anterior explica los hallazgos comúnmente observados en el paciente hipotiroideo en lo que concierne al C-HDL. Por otra parte, las hormonas tiroideas modifican la biosíntesis de la apo A-I, aumentan la expresión de su RNAm en hígado y en intestino de rata, aumentando de esta manera la síntesis de apo A-I *in vivo*⁶⁸.

Este breve resumen de algunas de las anomalías descritas en el metabolismo de las HDL durante el hipotiroidismo, pone de manifiesto la necesidad de profundizar en la posible relación de una deficiencia de HDL y el desarrollo de la EAC en el hipotiroidismo.

V. ESTUDIOS CINÉTICO METABÓLICOS DE LAS LIPOPROTEÍNAS.

Las concentraciones de los lípidos en el plasma dependen de la secreción y del catabolismo de las lipoproteínas. El aumento en la cantidad de lipoproteínas puede ser el resultado de un aumento relativo en su síntesis, de una disminución en su catabolismo o de ambos simultáneamente. Este fenómeno dinámico puede ser medido por los estudios cinéticos de los constituyentes de las lipoproteínas. La evaluación de ciertos parámetros tales como la tasa de síntesis (FSR, fractional synthetic rate) y de catabolismo (FCR, fractional catabolic rate) de las apolipoproteínas, que reflejan el metabolismo de las lipoproteínas completas. Estos estudios son posibles por el marcaje de las apolipoproteínas.

El marcaje de las apolipoproteínas puede efectuarse de manera exógena y endógena. En el primer caso, se utilizan isótopos radiactivos de yodo ($^{131}\text{I}_2$ o $^{125}\text{I}_2$), que se fija a las tirosinas de las proteínas. Una vez marcada, la apolipoproteína se reincorpora a la circulación sanguínea y se cuenta la radiactividad plasmática a diferentes tiempos. Se construye una curva de decaimiento de la radiactividad en plasma que se analiza por medio de un modelo compartimental que permite calcular la FCR de la apolipoproteína en estudio.

Este método con isótopos radioactivos presenta algunos inconvenientes:

- ◆ El uso de radiotrazadores en humanos está estrictamente regulado por consideraciones de seguridad radiactiva y excluye un número de sujetos para estudio, como niños y mujeres embarazadas.
- ◆ El estudio no se puede hacer reiteradamente en el mismo sujeto, por razones de bioseguridad y por el remanente de radiactividad que permanece en el organismo después de cada estudio ⁶⁹.

Estos inconvenientes han limitado el uso de radiotrazadores en modelos animales. Para el estudio de las cinéticas-metabólicas de proteínas en humanos, se han desarrollado métodos que permiten el marcaje endógeno. En este método se utilizan aminoácidos portando un isótopo estable como trazador, que se incorporan a la proteína durante su biosíntesis. Los isótopos estables son detectados utilizando espectrometría de masas (SM), en virtud de su masa diferente.

La administración del trazador, puede ser llevada a cabo como un único bolo intravenoso o como una infusión intravenosa constante en el que se administra un pequeño bolo al inicio. El método de la infusión constante, permite un marcaje estable de la apolipoproteína durante el estudio. La extracción de plasma a diferentes tiempos durante la incorporación continua del trazador, permite determinar el enriquecimiento isotópico *in vivo* de la

apolipoproteína. De esa manera, es posible calcular su síntesis y catabolismo como se describe más adelante.

V.1. ELECCIÓN DEL TRAZADOR

La elección de los aminoácidos marcados depende de sus metabolitos, de su abundancia en la proteína de estudio, de su disponibilidad, de su precio y de la técnica de espectrometría de masas. Varios aminoácidos marcados con isótopos estables son utilizados: [^{15}N] glicina, [5,5,5-tri- ^2H] leucina, [4,4,4,-tri- ^2H] valina o [6,6-di- ^2H -1,2-di- ^{13}C] lisina.

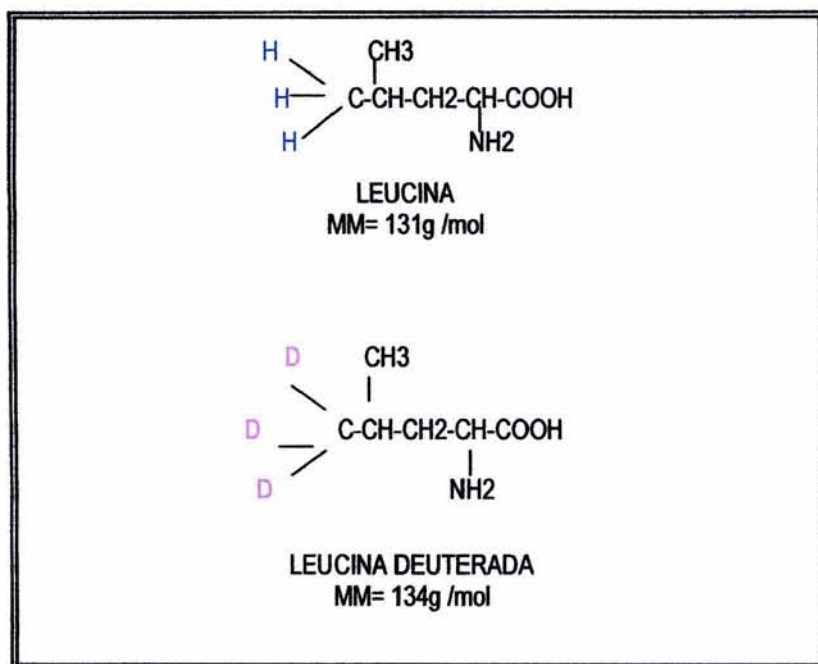


FIGURA 5. Estructura de la leucina natural y la leucina deuterada.

La utilización de la leucina tres veces deuterada en el carbono 5 (leucina deuterada o leucina- D_3 , figura 5) en los estudios cinéticos presenta muchas ventajas:

- Su pureza es superior al 99%.
- Es muy abundante en las proteínas, especialmente en la apo B-100 y la apo A-I, representando en moles de aminoácido 11.6% y 13% respectivamente, de los aminoácidos totales.
- Su triple marcaje y un número relativamente bajo de átomos de carbono minimiza el ruido de fondo de la abundancia natural del isótopo estable (que es de 0.015% + 0.015% + 0.015% = 0.045%)⁶⁹. El marcaje triple de la leucina aumenta la

sensibilidad de su detección. La masa molecular de la leucina deuterada es de 134 contra 131 de la leucina natural.

- Se cataboliza rápidamente por los tejidos extra hepáticos (Figura 6).
- Se transforma rápidamente en ácido ceto-isocaproico (KIC) por el hígado (Figura 6), de tal manera que la determinación del enriquecimiento isotópico de éste representa el de la poza precursora ⁷⁰. Esta determinación es útil en los sujetos hipertrigliceridémicos en los que la meseta del enriquecimiento isotópico de la apo B-100 de las VLDL no se alcanza durante el tiempo de la perfusión.

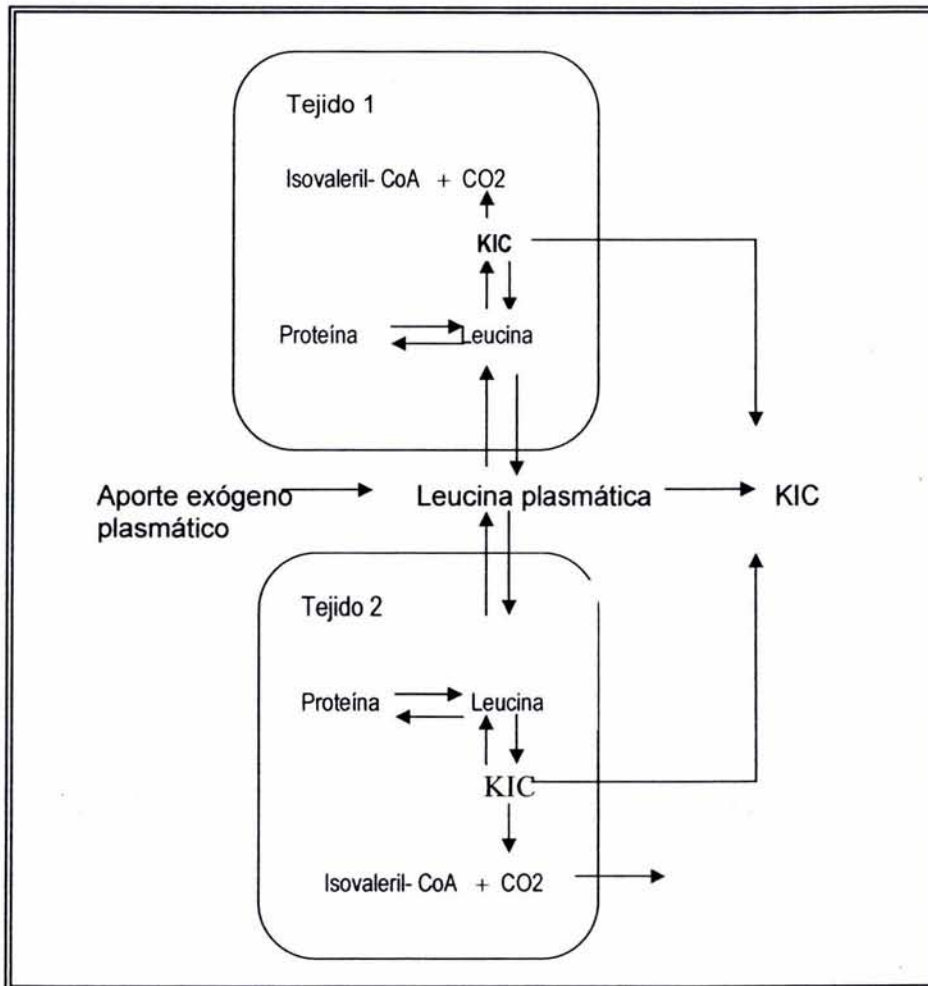


FIGURA 6. Metabolismo de la leucina.

V.2. PARÁMETROS METABÓLICOS.

En el caso de los estudios con marcaje endógeno, la tasa de síntesis fraccional (FSR: Fractional Synthetic Rate) se define como el aumento de la proporción de aminoácido marcado con respecto al total del mismo, contenido a una apolipoproteína, con respecto al

tiempo. Considerando la masa de la apo AI en el total del plasma circulante como una unidad, el FSR se expresa como el número de unidades que se incorporan al plasma de *novo* en un intervalo de tiempo determinado. Sus unidades se representan en h^{-1} o días⁻¹.

La tasa de catabolismo fraccional (FCR: Fractional Catabolic Rate) es un indicativo de la degradación del aminoácido marcado con respecto al tiempo. Refleja la velocidad de desaparición de esta apolipoproteína de la circulación sanguínea. Como el FSR, el FCR es expresado por unidad de tiempo. En condiciones metabólicas estables el FSR es igual al FCR.

La tasa de producción (PR: Production rate) es la cantidad de apolipoproteína producida en miligramos por kilogramo de peso del sujeto, por unidad de tiempo. Se calcula de acuerdo a la siguiente relación:

$$PR = \frac{FSR \times \text{Concentración plasmática de la apo} \times \text{Volumen plasmático total}}{\text{Peso del sujeto}}$$

El volumen de plasma se estima como 0.04 litros por kilogramo de peso del sujeto⁷¹.

El tiempo de residencia (RT: Residence time), es el tiempo que permanece la apolipoproteína en la circulación sanguínea después de su secreción hasta que desaparece y es equivalente a la inversa del FCR.

El tiempo de retardo (τ), es el intervalo de tiempo entre la síntesis de una apolipoproteína y su aparición en el plasma. Este parámetro puede ser determinado por un método matemático o por la cinética con una perfusión constante.

V.3. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS

La meseta isotópica de la apo B-100 de las VLDL es una estimación del enriquecimiento intracelular de las apolipoproteínas producidas por el hígado, tales como apo B-100, apo A-I y apo A-II. En el caso de la apo B-100 de las VLDL, que es una proteína de renovación rápida, el equilibrio isotópico con el precursor es generalmente alcanzado en 5 o 6 horas de la perfusión del trazador.

En estudios metabólicos donde se determinaron simultáneamente el FCR y el FSR de la apo A-I y apo A-II, utilizando marcaje exógeno ($^{131}I_2$, $^{125}I_2$ para la determinación del FCR) y marcaje endógeno (deuterio para la determinación FSR, utilizando la meseta de la apo B-100 como el enriquecimiento inicial del precursor, los resultados mostraron similitud en las diferentes metodologías⁷².

La utilización de la meseta de la apo B-100 de las VLDL presenta ventajas:

- El 98 % de la apo B-100 de las VLDL es de origen hepático.

- Es una proteína de tamaño grande ligada a la lipoproteína que excluye el intercambio extravascular.
- Es una proteína de metabolismo rápido, así el equilibrio isotópico es rápidamente alcanzado en sujetos normolipidemicos.

Las curvas de enriquecimiento isotópico de la apo B-100 de las VLDL, además de la apo A-I y apo A-II de las HDL, son trazadas utilizando el programa SAAM30 (SAAM Institute; University of Washington, Seattle) ⁷³. Las funciones utilizadas son definidas por la ecuación: $z(t) = z_A(1 - e^{-k(t-\tau)})$ (Figura 7).

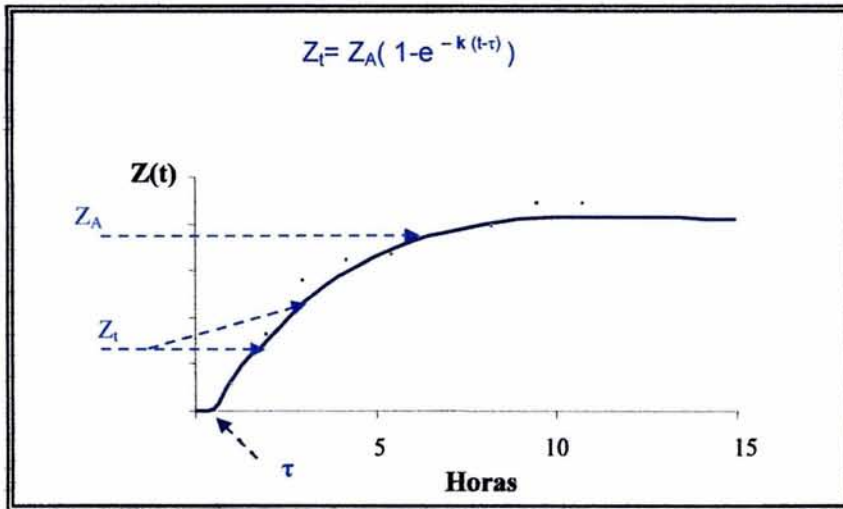


Figura 7. Curva de enriquecimiento isotópico.

Z_t = Enriquecimiento isotópico al tiempo "t" (puntos experimentales)

Z_A = Enriquecimiento isotópico del precursor al tiempo "t" (relación trazador/trazado del pool precursor de la proteína)

τ = tiempo de retardo.

k = tasa de síntesis fraccional (FSR).

JUSTIFICACIÓN.

Los estudios epidemiológicos han demostrado consistentemente que los niveles bajos de C-HDL son un factor de riesgo independiente de enfermedad arterial coronaria (EAC), incluso después de ajustar por otros factores de riesgo. De hecho, en los estudios prospectivos, el C-HDL es el factor de riesgo lipídico que mejor correlaciona con el riesgo de aterosclerosis coronaria. La correlación inversa entre el C-HDL y el riesgo de desarrollar EAC presupone una asociación causal. Las HDL desempeñan, sin duda, un papel directo en la protección contra el proceso ateroscleroso. Sin embargo, su actividad protectora no explica la totalidad del gran poder predictivo que tienen las HDL en los estudios epidemiológicos; los niveles bajos de C-HDL suelen correlacionar con hipertrigliceridemia y se asocian con la presencia de partículas LDL pequeñas y densas que son altamente aterogénicas. Además, la hipoalfalipoproteinemia puede ser consecuencia de resistencia a la insulina y por lo tanto se considera marcador del síndrome metabólico que es proaterogénico *per se*. Otros factores de riesgo de aterosclerosis como el sobrepeso, ingesta elevada de carbohidratos, el tabaquismo y el sedentarismo, también generan hipoalfalipoproteinemia, de tal manera que los bajos niveles de C-HDL son el resultado de varios factores proaterogénicos, que no siempre se han evaluado en los estudios epidemiológicos. Por lo tanto, el C-HDL no es un factor de riesgo tan independiente como los suelen demostrar los análisis estadísticos multivariados. Debido a que bajos niveles de C-HDL pueden ser simultáneamente causa de aterosclerosis y marcador de otros factores de riesgo, existe la posibilidad de que una intervención terapéutica para elevar el C-HDL no contribuya a reducir tanto el riesgo de aterosclerosis coronaria, como podría esperarse con base en los resultados de los estudios epidemiológicos.

Por otra parte, algunos casos aislados de hipoalfalipoproteinemia severa no se asocian a EAC, mientras que algunas hiperalfalipoproteinemias son factor de riesgo. La explicación que se ha dado a esta aparente paradoja, es que las HDL poseen otras características antiaterogénicas, que no dependen exclusivamente de su concentración, sino de su estructura. Sin embargo, se conoce poco acerca de los factores metabólicos que dan origen a las diferentes subpoblaciones de HDL y cuáles de éstas poseen propiedades antiaterogénicas. Existen reportes de alteraciones estructurales de las HDL asociadas a diferentes entidades fisiopatológicas, como la hipertrigliceridemia y el hipotiroidismo. Estos padecimientos se pueden utilizar como modelos para profundizar en el conocimiento de la relación que existe entre metabolismo y estructura de las HDL. Cuando se establezca con precisión dicha relación, se podrá hacer más puntual la evaluación del riesgo coronario

asociado a la hipoalfalipoproteinemia, más allá de la simple determinación del C-HDL. Es en este ámbito que surge y se justifica el presente trabajo de investigación.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo es aportar nuevos conceptos que permitan interpretar la relación que existe entre el metabolismo de las HDL, su estructura y su función.

MODELO 1. RATAS HIPOTIROIDEAS

HIPÓTESIS

- ◆ El estado hipotiroideo podría estar caracterizado por partículas HDL con un contenido de lípidos y proteínas anormal, debido a alteraciones en las actividades de las proteínas involucradas en la remodelación de las HDL.
- ◆ Si existen anomalías en el contenido de lípidos y proteínas de las HDL, entonces se manifestarán en alteraciones en el tamaño de la partícula que tendrán un impacto en la cinética metabólica de la apo A-I y contribuirán a disminuir su capacidad de captación de colesterol *in vitro*.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Establecer un modelo experimental de hipotiroidismo para caracterizar el tamaño y el contenido de lípidos y proteínas de las HDL.
2. Identificar en el modelo de hipotiroidismo los factores plasmáticos relacionados con las modificaciones en el tamaño, contenido de lípidos y proteínas de las HDL.
3. Establecer la relación que existe entre el tamaño de las HDL, su contenido de lípidos y de proteínas, con el metabolismo y la capacidad de captar el colesterol de estas lipoproteínas.

METODOLOGÍA

Animales: El modelo experimental de hipotiroidismo, se realizó con la colaboración de la Dra. Martha Franco Guevara. Se utilizaron ratas macho Wistar con un peso comprendido entre 250 y 300 g. Bajo anestesia general con éter etílico se expuso la tráquea, y con el microscopio estereoscópico las glándulas paratiroides fueron disecadas de la glándula tiroides y reimplantadas en los músculos del cuello ⁷⁴. La glándula tiroides fue disecada cuidadosamente para evitar la lesión de los nervios recurrentes laríngeos y extirpada completamente. A las ratas control se les simuló la misma cirugía.

Muestra de sangre. Se obtuvo sangre arterial de las ratas hipotiroideas (ratas Htx) y controles, después de 12 h de ayuno por punción de la aorta abdominal, y se colectó en tubos con ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (1 mg/mL). Inmediatamente se separó el plasma por centrifugación a 3500 r.p.m durante 15 minutos a 4°C. Las HDL se separaron a partir de 2 mL del plasma fresco dentro de las dos horas siguientes de haber sido separado. Al resto del plasma, se le adicionó benzamidina 2 mM, aprotinina 100 UI y azida de sodio 0.01 %. Cuatro alícuotas de 500 µL se guardaron a -70°C para la determinación del perfil de lípidos, el análisis de apolipoproteínas y el ensayo de eflujo de colesterol.

Para la determinación de las actividades de la LH y la LPL se utilizó plasma postheparinizado; se inyectaron 100 UI/kg de peso de heparina por vía intravenosa. Después de 15 minutos, se tomó una muestra de sangre en tubos con heparina, e inmediatamente se separó el plasma por centrifugación a 3500 r.p.m durante 15 minutos a 4°C y se guardó a -70°C hasta su uso.

Métodos de análisis: El colesterol total, colesterol libre, triacilgliceroles y fosfolípidos se determinaron por métodos enzimáticos colorimétricos comerciales (Boehringer-Mannheim, Alemania; Menary, Italia). La apo A-I y apo A-II se cuantificaron por inmunonefelometría usando anticuerpos monoclonales. Las proteínas totales se determinaron por el método de Lowry ⁷⁵ (Apéndice 1). Los ésteres de colesterol fueron calculados como la diferencia entre el colesterol total y el colesterol libre multiplicado por un factor de 1.68 ⁷⁶.

Cuantificación de la actividad de enzimas. La actividad de la lipasa se determinó *in vitro* por titulación ácido-base en medio no acuoso, cuantificando la formación de ácidos orgánicos producidos por la hidrólisis de una emulsión de triacilgliceroles ⁷⁷. Brevemente, aceite de oliva fue mezclado con fosfatidilcolina y glicerol. La mezcla fue sonicada durante 5 minutos a 20 watts para emulsificar los triacilgliceroles en el glicerol. La actividad de las lipasas totales fue determinada usando 100 µL de plasma postheparina en un amortiguador de Tris 150 mM, NaCl 150 mM, pH 8.5 conteniendo 50 mU de heparina, albúmina humana al

3.75%, suero de rata inactivado por calor al 5% como fuente de apo C-II y la emulsión de triacilglicerol. La mezcla de reacción fue incubada 1h a 37°C. Transcurrido este tiempo, los ácidos grasos producidos fueron extraídos y titulados manualmente con NaOH 1.25 mM en etanol absoluto y azul de timol como indicador de punto final. Para determinar la cantidad de ácidos grasos, se realizó una curva estándar de ácido palmítico entre 2 y 8 mM. La actividad de la lipasa hepática (LH) fue determinada de la misma manera que la actividad de la lipasas totales, pero añadiendo NaCl a una concentración final de 1 M y omitiendo el suero de rata inactivado; de esta manera se inhibió a la lipasa lipoprotéica (LPL). La actividad LPL fue calculada restando la actividad LH de la actividad de las lipasas totales. Las actividades se expresan como Unidades de actividad específica (1 unidad se define como 1 mM de ácido graso producido/minuto/mL de plasma). El coeficiente de variación (CV) intraensayo fue 3.23% e interensayo fue 4.5%.

La actividad LCAT se determinó *in vitro* por el método descrito por Chen y Albers⁷⁸ (Apéndice 4). Brevemente, los proteoliposomas conteniendo apo A-I/fosfatidilcolina/[³H]-Colesterol se incubaron con plasma de ratas control o Htx a 37°C durante 1 h. Los lípidos fueron extraídos con una mezcla cloroformo-metanol (2:1) y separados por cromatografía en capa fina (TLC). La radiactividad de cada banda correspondiente al colesterol libre y al colesterol esterificado fue medida utilizando líquido de centelleo en un contador de radiación beta. La actividad de la LCAT se expresó como los nanomoles de colesterol esterificado por mL de plasma por hora. Todas las muestras se determinaron por duplicado. El CV intraensayo e interensayo fue menor de 7%.

Aislamiento y análisis de las HDL. Las HDL fueron separadas del plasma por ultracentrifugación secuencial, utilizando una ultracentrífuga Beckman optima TLX a 110 000 r.p.m. en tubos de policarbonato de 3.2 mL. Las lipoproteínas que contienen apo B (densidad <1.063 g/mL) se separaron a 110 000 r.p.m durante 2.10 h. Posteriormente las HDL (1.063<densidad<1.21 g/mL) se separaron después de centrifugar a 110 000 r.p.m. durante 2.5 h. Las HDL así aisladas fueron dializadas durante 3-4 días, contra un amortiguador de bicarbonato de amonio 5 mM/L, pH 7.5 o contra una amortiguador de Tris 0.09 M-ácido bórico 0.08M-EDTA 3mM, pH 8.35 (TBE).

La homogeneidad y el diámetro de las HDL se estimó por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en condiciones nativas (no desnaturalizantes), en gradiente del 4-30% (Apéndice 2) utilizando como referencia marcadores de diámetros conocidos (estuche de estándares de proteínas de alto peso molecular, Pharmacia, Uppsala, Suecia, tiroglobulina 17 nm, ferritina 12.2 nm, catalasa 10.4 nm, lactato deshidrogenasa 8.1 nm, albúmina sérica bovina 7.1 nm⁷⁹).

A las HDL liofilizadas se les determinó su composición de apolipoproteínas por medio de PAGE en gradiente 4 –21 con dodecil sulfato de sodio (SDS), (Apéndice 3) utilizando como referencia marcadores de diámetros conocidos (estuche de estándares de proteínas de bajo peso molecular, Pharmacia, Uppsala, Suecia, α -lactoalbúmina 14.4 kD, Inhibidor de tripsina 20.1 kD, anhidrasa carbonica 30 kD, ovoalbúmina 45kD, albúmina 66 kD) Las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie R250. La proporción de apolipoproteína fue determinada cuantificando el colorante fijado a cada proteína por medio de espectrofotometría, después de eluir con piridina ⁸⁰.

Purificación de la apo A-I: Los lípidos de las HDL obtenidas por ultracentrifugación, fueron extraídos con etanol-éter 2:1 (v/v) y la fracción proteica se disolvió en un amortiguador de Tris 30 mM/L y urea 6 mol/L, pH 8.0. La apo A-I fue separada por cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna UNO Q1 (Bio Rad, Hercules CA) acoplada al sistema Bio-Rad Duo Flow. La elución de la proteína fue realizada por un gradiente lineal de la solución amortiguadora conteniendo NaCl 100 mM/L. Se colectaron fracciones de 250 μ L y cada fracción fue analizada mediante SDS-PAGE en gradiente de 4 –30 % (Apéndice 10); las fracciones que contenían únicamente apo A-I fueron reunidas y dializadas durante 3-4 días contra un amortiguador de bicarbonato de amonio 5 mM/L, pH 7.5 Posteriormente, la concentración de apo A-I fue estimada por espectrometría utilizando un coeficiente de extinción molar de 1.13 mL/mg/cm a 270 nm de longitud de onda.

Marcaje de las HDL: La apo A-I se marcó mediante el método de monoclóruo de yodo ⁸¹. Un mg de apo A-I se mezcló con 1 mCi Na¹²⁵I. La apo A-I marcada, fue separada del yodo libre mediante una columna de Sephadex G-25 de 1.0x10 cm. La apo A-I marcada (¹²⁵I-apo A-I, fue reincorporada a las HDL obtenidas de ratas normales (HDL-n) o de ratas hipotiroideas (HDL-Htx) ⁸². Las HDL marcadas con ¹²⁵I fueron dializadas en una solución de NaCl 0.15 M. La solución fue esterilizada usando filtros Millipore de 0.22 μ m y almacenada a 4°C hasta su uso.

Estudios metabólicos de las apo A-I: Los animales se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12h y fueron alimentados con su dieta balanceada habitual. Se incluyeron cuatro grupos de ratas en el estudio, dos grupos de ratas con cirugía simulada (control) y dos grupos de ratas Htx. Un grupo de ratas Htx y un grupo control recibieron HDL provenientes de ratas normales (HDL-n) marcadas con ¹²⁵I-apo A-I mientras las otras dos recibieron HDL provenientes de ratas Htx (HDL-Htx). Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital (15 mg/Kg.) e inyectadas en la vena del pene con un bolo 10 mg de HDL-n o HDL-Htx conteniendo aproximadamente 4×10^7 c.p.m de ¹²⁵I en un volumen total de 0.3 mL.

Se obtuvieron muestras de sangre de 200 μL de la vena de la cola a diferentes tiempos: 5, 15, 30 min. y posteriormente 1, 2, 5, 10, 15, 24, 32, 48 y 72 h. Una alícuota de 20 μL se analizó en un contador gamma durante 1 minuto.

La curva de decaimiento de ^{125}I fue construida considerando como 100% la radiactividad en la muestra sérica correspondiente a los 5 min. Los datos experimentales de la cinética de decaimiento de la radiactividad se ajustaron a una función biexponencial usando el programa SAAM II ⁸³. Esta función permitió calcular el FCR. Asumiendo que los animales estaban en un estado metabólico estable, el FCR es igual a la tasa de síntesis fraccional (FSR). A partir de esta consideración la tasa de producción (PR) por 100 g de peso fue determinada utilizando la fórmula:

$$\text{PR} = (\text{FSR} \times \text{concentración de apo A-I en plasma} \times \text{Vol. de plasma total}) \times 100 / \text{peso}$$

Eflujo de colesterol. Para evaluar la captación de colesterol por las células, se utilizó la línea celular de hepatoma de rata Fu5AH ⁸⁴ (Apéndice 8). Brevemente, las células se marcaron con [^3H]-colesterol y fueron incubadas con suero al 2.5% en medio de cultivo o 50 μg /pozo de proteína HDL, provenientes de ratas control o Htx. Al término de la incubación, el medio se retiró y la monocapa de células se removió con NaOH. La radiactividad se midió tanto en el medio como en las células (radiactividad total por pozo). El porcentaje de radiactividad en el medio respecto a la radiactividad total corresponde al eflujo de colesterol.

RESULTADOS.

El peso, las concentraciones plasmáticas de lípidos y apolipoproteínas en los grupos de ratas hipotiroideas y controles se presentan en la tabla IV. Las ratas Htx tuvieron una reducción en los triacilglicérolos de las VLDL (23.4 ± 7.6 y 37.2 ± 11.3 mg/dL para el grupo de ratas Htx y el grupo de ratas control, respectivamente, $p < 0.05$), que se reflejó en una concentración plasmática de triacilglicérolos menor a la del grupo de ratas control. No se encontraron alteraciones en los triacilglicérolos de otras lipoproteínas. El colesterol LDL (C-LDL) en promedio es tres veces mayor en el grupo de ratas Htx y la concentración de C-HDL se encuentra disminuida en un 25% comparado con el grupo control ($p < 0.05$). Asimismo, los niveles plasmáticos de apo A-I en las ratas Htx se encuentran disminuidos en aproximadamente un 22 % con respecto a las controles.

Tabla IV. Peso, lípidos y apolipoproteínas plasmáticos en los grupos de ratas.

	Grupos de ratas	
	Htx (n=12)	Control (n=12)
Peso (g)	$421 \pm 28.6^*$	508.5 ± 49.9
Triacilglicérolos plasmáticos (mg/dL)	$43.8 \pm 8.2^*$	53.9 ± 12.6
Colesterol plasmático	53.5 ± 14.3	47.9 ± 13.2
Colesterol LDL	$24.8 \pm 8.9^*$	8.3 ± 3.7
Colesterol HDL	$22.9 \pm 6.6^*$	30.9 ± 9.4
Apo A-I	$27.1 \pm 2.6^*$	35.0 ± 6.4
Apo A-II	18.3 ± 3.9	23.0 ± 11.0

Los valores se expresan como media \pm DE.
t de Student no pareada * $p < 0.05$ vs control.

Para determinar los posibles cambios estructurales de las HDL asociadas al estado hipotiroideo, determinamos el diámetro de las HDL en ambos grupos. Encontramos que las HDL de las ratas control (HDL-n) tienen un tamaño promedio de 11.06 ± 0.1 nm, mientras que las HDL de las ratas hipotiroideas (HDL-Htx) presentan un mayor tamaño, con un diámetro promedio de $11.4 \text{ nm} \pm 0.1 \text{ nm}$ ($p < 0.05$) (Figura 8).

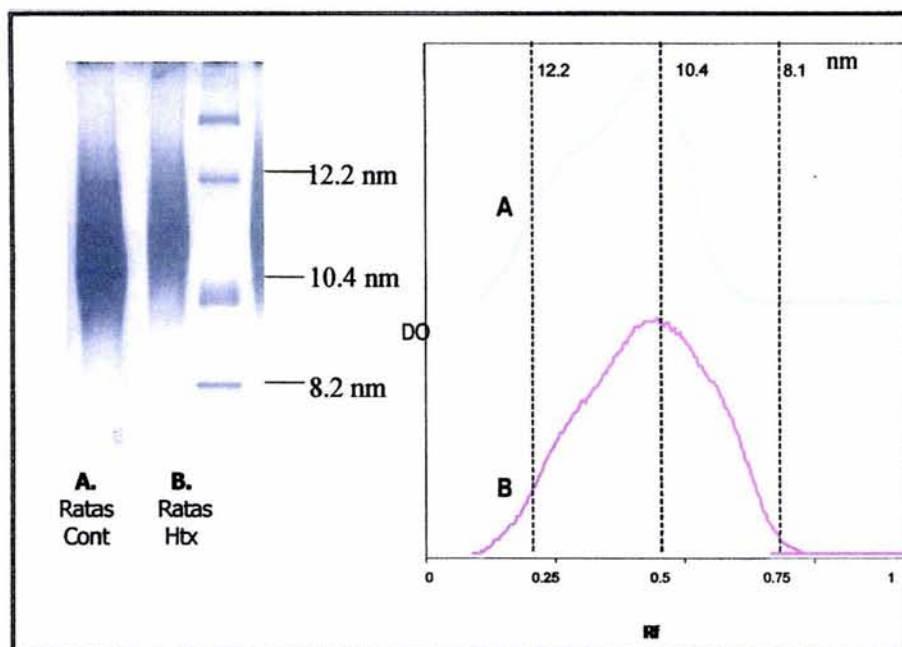


FIGURA 8. Gel de poliacrilamida (PAGE) de las HDL totales del grupo Control (A) y del grupo Htx (B). A la derecha se observa el análisis densitométrico del gel.

El incremento en el diámetro de las HDL se asoció a un aumento significativo en la concentración de fosfolípidos en las HDL-Htx como se muestra en la tabla V.

Tabla V. Composición química de las HDL.

	Grupos de Ratas	
	HDL-Htx	HDL-n
Colesterol libre	3.8 ± 0.6	4.3 ± 1.7
Colesterol esterificado	34.3 ± 3.9	33.8 ± 7.8
Triacilglicerolos	1.5 ± 0.7	2.5 ± 1.2
Fosfolípidos	26.1 ± 1.8*	22.1 ± 1.7
Proteínas	34.3 ± 4.6	33.8 ± 3.4

La composición se expresa como el % de la masa seca de la lipoproteína.

Los valores se expresan como media ± DE.

t de Student no pareada *p<0.05 vs HDL-n.

Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida se caracterizaron las HDL, se determinó su contenido de apolipoproteínas. Los resultados se muestran en la tabla VI.

Tabla VI. Contenido de apolipoproteínas en las HDL totales.

	Grupos de Ratas	
	HDL-Htx	HDL-n
Apo A-I	58.4 ± 3.9	62.6 ± 4.1
Apo A-II	11.5 ± 6.5	7.7 ± 2.9
Apo E	14.1 ± 3.9*	7.5 ± 2.5
Apo A-IV	7.0 ± 0.7*	11.6 ± 4.4
Apo C	6.9 ± 2.9	7.5 ± 2.0

El contenido se expresa como % de la masa proteica

Los valores se expresan como media ± DE.

t de Student no pareada * $p < 0.05$ vs HDL-n.

El contenido de apo A-I de las HDL-Htx tiende a ser menor, pero esta diferencia no alcanzó significancia estadística. La cantidad de apo E en las HDL-Htx fue un 89% mayor que en las HDL-n. También se observó una reducción del 40% en la cantidad de apo A-IV en las HDL de las ratas hipotiroideas ($p < 0.05$).

Para determinar el posible origen de las alteraciones en la composición de las HDL, determinamos la actividad de las enzimas que están involucradas en su remodelación: LCAT, LH y LPL (Tabla VII)

Observamos que la actividad de la LCAT en el grupo de ratas Htx fue 30% menor comparado con la actividad del grupo control. Las ratas no expresan CETP, así que las HDL son parcialmente remodeladas por la LH y llevadas hacia el hígado. Al determinar la actividad de esta enzima encontramos que su actividad en las ratas Htx estaba disminuida en un 30% comparada con la del grupo control (Tabla VII).

Tabla VII. Actividad enzimática de la LCAT, LH y LPL.

Enzimas	Grupos de Ratas	
	Htx (n=8)	Control (n=8)
LCAT (% de esterificación/h/100µL de plasma)	12.2 ± 3.0*	17.3 ± 5.3
LH (mU/mL plasma)	318.5 ± 101.8*	451.1 ± 23.8
LPL (mU/mL plasma)	251.8 ± 155.4	247.5 ± 80.1

Los valores se expresan como media ± DE.

t de Student no pareada * $p < 0.05$ vs control.

El análisis de la correlación de Pearson, entre la actividad LH y las concentraciones de lípidos tanto en plasma como en la partícula HDL, mostró que estos parámetros no se asocian entre sí. Para establecer si las modificaciones observadas en el tamaño, contenido de lípidos y proteínas de las HDL, tienen impacto en la captación de colesterol, se evaluó su capacidad para promover el eflujo de colesterol de la membrana de las células Fu5AH. Nuestros resultados demostraron que el suero de las ratas Htx y controles, promovieron eflujos de colesterol similares ($7.92\% \pm 1.54$ y $8.02\% \pm 1.54$ para las ratas controles e Htx,

respectivamente $p=NS$). Resultados semejantes se obtuvieron al utilizar HDL aisladas por ultracentrifugación de ambos grupos de ratas; el eflujo de colesterol promovido por las HDL-Htx ($9.9 \pm 0.5\%$) fue comparable ($p=NS$) al de las HDL-n ($10.4 \pm 0.4\%$) (Figura 9).

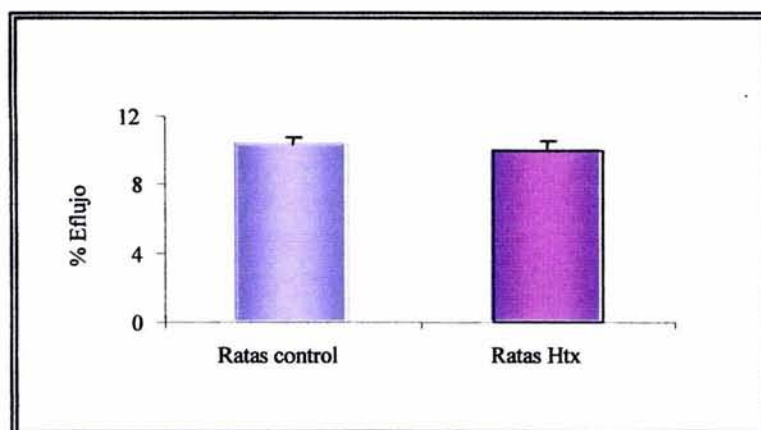


Figura 9. Gráfica del eflujo de colesterol utilizando células Fu5AH, promovido por HDL de ratas control y Htx a una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el medio de cultivo después de 4 h de incubación. Los valores expresan la media del porcentaje del eflujo de colesterol relativo \pm DE.

Para determinar si las alteraciones en el tamaño y contenido de lípidos y proteínas de las HDL influyen en su metabolismo, se realizaron estudios cinético-metabólicos en los que se incorporó ^{125}I -apo A-I a HDL-n. La radiactividad de la apo A-I de las HDL-n incorporada en ratas Htx desaparece más lentamente en comparación con las incorporadas a las ratas control, indicando un retraso en el catabolismo de las apo A-I (Figura 10). Al calcular el FCR de la ^{125}I -apo A-I incorporadas a HDL-n en el grupo Htx, se encontró una disminución promedio del 37% comparada con el grupo control (Tabla XI).

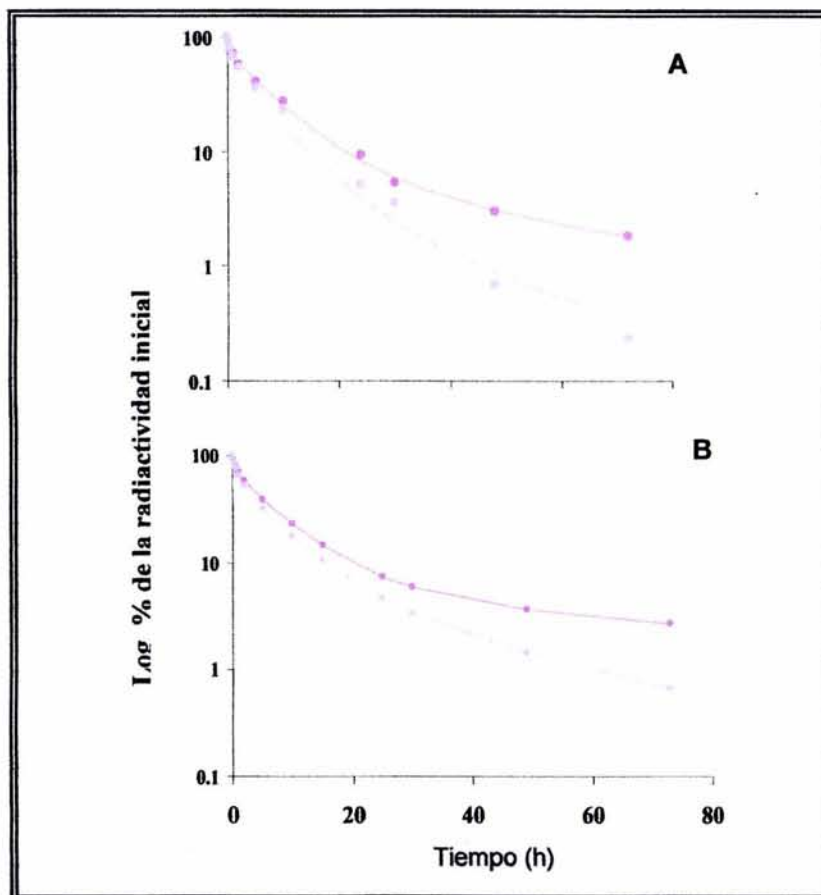


FIGURA 10. Curva de decaimiento de la radiactividad de apo A-I marcada con ^{125}I .. (A) ^{125}I -apo A-I incorporadas en HDL-n, (B) ^{125}I -apo A-I incorporadas en HDL-Htx. Ratas control ● Ratas Htx ●

En una segunda serie de estudios cinéticos, la apo ^{125}I -apo A-I se reincorporó en HDL-Htx y éstas se inyectaron tanto en ratas normales como en hipotiroideas. Se observó que el decaimiento de la radiactividad de ^{125}I -apo A-I incorporada en HDL-Htx- en el grupo de ratas hipotiroideas es menor que en el grupo control (Figura 10B). Al calcular la FCR de la apo A-I en este grupo de ratas observamos que fue más baja que en las controles (Tabla VIII). La apo A-I incorporada en HDL-Htx se cataboliza más lentamente que la incorporada en las HDL-n tanto en el grupo de ratas control como en las hipotiroideas, sugiriendo que el FCR de la apo A-I fue dependiente del origen de las HDL; (Tabla VIII).

La mayor diferencia en la FCR de apo A-I (1.9-veces menor) se observó con HDL homólogas, esto es, HDL-Htx en ratas hipotiroideas y HDL-n en el grupo control. Los resultados sugieren que los cambios en el tamaño y en contenido de lípidos y proteínas, de las HDL contribuyen a un catabolismo disminuido de la apo A-I.

Tabla VIII. Parámetros cinéticos de la ^{125}I -apo A-I incorporada a HDL-Htx o HDL-n.

	^{125}I -apoA-I		
	FCR (d^{-1})		PR ($\text{mg}\cdot(100\text{g})^{-1}\cdot d^{-1}$)
	HDL-n	HDL-Htx	
Hipotiroides (n=8)	0.097±0.009	0.082±0.006 ^a	0.106±0.015
Control (n=8)	0.154±0.026	0.102±0.017 ^b	0.253±0.047
Comparación entre los grupos Htx y control.	p<0.005	p<0.05	p<0.005

Prueba t de Student no pareada ^a $p<0.005$, para la FCR de apo A-I incorporada a HDL-Htx y HDL-n usando ratas Htx como receptoras, ^b $p<0.005$, para el FCR de apo A-I incorporada a HDL-Htx y HDL-n usando ratas normales como receptoras. La tasa de producción (PR) de los datos obtenidos con HDL autólogas.

Al calcular la tasa de producción (PR) con los valores de la FCR de la apo A-I de las HDL homólogas, encontramos que la PR de la apo A-I de las ratas hipotiroideas fue 2.4-veces menor que en el grupo control, lo que da lugar a la hipoalfalipoproteinemia (Tabla VIII).

Pese a que no hubo diferencia en la actividad de la LH en ambos grupos de ratas, se observaron alteraciones importantes en el contenido de lípidos y proteínas de las HDL de las ratas hipotiroideas. Dichos cambios generan alteraciones en el metabolismo de la apo A-I, reflejados en una disminución de la FCR y a un decremento mayor en la producción de las apolipoproteínas.

Los artículos correspondientes a esta parte del trabajo se encuentran en los anexos I y II.

DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo fue establecer un modelo experimental de hipotiroidismo, que nos permitiera caracterizar el tamaño, composición y las propiedades fisicoquímicas de las partículas de HDL, así como estudiar el metabolismo de la apo A-I mediante marcaje exógeno y establecer su funcionalidad en cuanto a la capacidad de captación de colesterol. La efectividad de la tiroidectomía fue evaluada mediante las concentraciones T4, calcio y fósforo en 10 ratas control (C) y 10 ratas tiroidectomizadas. Observamos que después de 16 semanas, los niveles de la hormona T4 disminuyeron en las ratas a las que se les extirpó la glándula tiroides en comparación con las ratas control (Tabla IX), lo que nos indica que las ratas presentan un estado de hipotiroidismo (Htx). Se podría argumentar que la cirugía afecta también la función paratiroidea. Sin embargo, al determinar los niveles de calcio y fósforo no se encontraron diferencias en los niveles plasmáticos (Tabla IX) demostrando que la función de la paratiroides no presentó alteraciones al reimplantarla en los músculos del cuello.

Tabla IX. Niveles de T4, calcio y fósforo, en los grupos de ratas tiroidectomizadas y control.

	Grupos de ratas	
	Tiroidectomizadas (n=10)	Control (n=10)
T4 µg/mL	1.3 ± 0.2*	5.1 ± 0.3
Calcio mg/dL	9.7 ± 0.7	10.1 ± 0.7
Fósforo mg/dL	6.5 ± 1.1	6.9 ± 0.4

Los valores expresan media ± DE
t de student * $p < 0.05$ vs control.

Los resultados de nuestro trabajo ponen de manifiesto que el hipotiroidismo crónico inducido en las ratas provocó cambios importantes en las concentraciones de lípidos y apolipoproteínas. Las ratas Htx tuvieron un aumento importante en las concentraciones del C-LDL plasmático. La hipercolesterolemia es una dislipidemia común en el hipotiroidismo; las hormonas tiroideas regulan la expresión del receptor de las LDL^{85,86}, lo que hace que se acumule el C-LDL. También, hubo una disminución en las concentraciones de triacilgliceroles, debida principalmente a su disminución en las VLDL. Es común que el estado hipotiroideo provoque una reducción en la ingesta de alimento. Por lo tanto, la disminución de la concentración de los triacilgliceroles de VLDL, puede deberse a una reducción en la ingesta de triacilgliceroles o de su síntesis hepática. Para descartar el efecto de la ingesta, las ratas se sacrificaron después de una noche de ayuno; de esta manera, los triacilgliceroles circulantes cuantificados fueron únicamente de origen endógeno. En consecuencia, la concentración encontrada de triacilgliceroles de VLDL fue

el resultado de una síntesis disminuida, como se ha reportado previamente en estudios de hipotiroidismo experimental en rata ^{87,88}.

Las HDL comprenden una clase heterogénea de partículas lipoprotéicas que comprenden diferentes tamaños, con una alta densidad (>1.063g/mL) y un diámetro pequeño (5-12 nm). Los diferentes tamaños de partícula se caracterizan por tener diferente composición de apolipoproteínas y movilidad electroforética. Con base en esto, caracterizamos el tamaño de las partículas de HDL en nuestro modelo de hipotiroidismo crónico. Se observaron cambios significativos en el tamaño y composición de la partícula de HDL de las ratas Htx. Las partículas de HDL de las ratas Htx fueron más grandes, como se ha encontrado en otros trabajos ^{68,89}. El aumento de tamaño de HDL en nuestro modelo se asoció con un incremento en la proporción relativa de apo E y una disminución de la apo A-IV, además de un aumento en el contenido de fosfolípidos. El alto contenido de apo E debería de contribuir a aumentar la depuración de HDL, sin embargo, existe una disminución en la expresión del receptor apo B/E, una vía de depuración de las HDL en las ratas. Esto disminuye el catabolismo de las HDL del grupo de ratas Htx, ocasionando un número mayor de partículas HDL grandes en circulación con acúmulo de apo E, estos resultados se apoyan por estudios previos que demuestran algo similar ^{87,90}. La proporción baja de apo A-IV encontrada, puede explicarse por el hecho de que su síntesis hepática está regulada por las hormonas tiroideas. Trabajos previos han encontrado una disminución del 70-80% en la concentración de apo A-IV en ratas hipotiroideas ⁹¹. Además, se determinó que tanto el RNAm como la proteína se incrementaron de 6 a 8 veces cuando las ratas hipotiroideas se hicieron hipertiroideas ⁹¹.

El tamaño de las HDL determina su capacidad de captar colesterol excedente de las células periféricas. A dicha captación se le denomina eflujo de colesterol de las células periféricas a las partículas HDL y es el primer paso del transporte reverso de colesterol. Se ha observado que las partículas de HDL pequeñas son las más eficientemente en promover el eflujo de colesterol de las células periféricas ⁹². En este estudio, encontramos que las HDL de ratas Htx eran más grandes en comparación a las HDL de ratas control, por lo que esperábamos que fueran menos eficientes en cuanto al eflujo de colesterol. Sin embargo, la capacidad de captar colesterol de la membrana de las células Fu5AH por las HDL-Htx fue similar a las HDL de las ratas control. Estos resultados sugieren que las alteraciones en el tamaño y contenido de lípidos y proteínas de las HDL-Htx en comparación a las HDL de las ratas control, no repercutieron en su capacidad de captar el colesterol vía el receptor SR-B1, presente en la línea celular utilizada para el eflujo de colesterol ⁹³. El eflujo de colesterol vía receptor SR-B1 depende del contenido de fosfolípidos de las HDL ⁹⁴. Las HDL de las ratas Htx presentaron un aumento en el

contenido de fosfolípidos, compensando probablemente de esta manera el eflujo de colesterol.

Las lipoproteínas son remodeladas continuamente durante su tránsito a través del plasma por acción de enzimas lipolíticas y proteínas de transferencia de lípidos, las actividades de estas proteínas son determinantes de la composición y tamaño de las HDL, y en consecuencia pueden estar involucradas de manera indirecta en la funcionalidad de estas lipoproteínas. El colesterol captado por las HDL es esterificado por la LCAT, como segundo paso del TRC. Al evaluar la actividad de esta enzima, nuestros resultados mostraron que la actividad de la LCAT está disminuida en las ratas Htx. Ridgway⁹⁵ demostró que la disminución de la actividad de la LCAT en ratas hipotiroideas, se debe a una disminución de la secreción hepática de la enzima. Por otro lado, en un estudio realizado en sujetos con concentraciones elevadas de colesterol (hipercolesterolemia) se encontró una actividad LCAT baja⁹⁶. Resultados similares observamos en nuestro modelo de hipotiroidismo; hipercolesterolemia asociada a una baja actividad LCAT. Las HDL en la rata son también remodeladas por la PLTP y la LH. Al determinar la actividad de la LH en ambos grupos de ratas, encontramos una disminución en la actividad de la LH en nuestro modelo de hipotiroidismo, como se ha encontrado en reportes previos^{97,98}. En estos informes, la actividad de la LH correlaciona con los niveles de las hormonas tiroideas, sugiriendo que las hormonas tiroideas regulan la expresión y por lo tanto la actividad de esta enzima. Además, se ha observado que la lipasa hepática además de estar relacionada con los niveles plasmáticos de HDL, está involucrada en la remodelación de las partículas de HDL⁹⁹. Así, la lipasa hepática juega un papel importante en la hidrólisis de los fosfolípidos y triacilglicérolos captados por las HDL¹⁰⁰. En este estudio encontramos un aumento en la composición de fosfolípidos en las HDL de ratas Htx en comparación con las ratas control, lo cual se puede explicar por la disminución de la actividad de la LH.

Ya que el estado hipotiroideo indujo cambios en el tamaño, contenido de lípidos y proteínas de las partículas de HDL, nos interesamos en saber si estos cambios influían en la cinética de la apo A-I. Por lo que reincorporamos apo A-I en HDL aisladas de ratas Htx, la FCR fue baja en comparación con la FCR de la apo A-I en ratas normales, poniendo de manifiesto que la apo A-I en las HDL de ratas hipotiroideas se cataboliza más lentamente que en las HDL-n, lo que indica la posibilidad de una alteración de los sitios catabólicos de la apo A-I en las ratas hipotiroideas. En células aisladas de hígado de ratas hipotiroideas, se ha observado una reducción en la unión de las HDL con dichas células⁹⁰, explicando así que el hipotiroidismo crónico afecta los sitios de catabolismo de la apo A-I, contribuyendo a la disminución de depuración de las partículas de HDL. Debido a que los bajos niveles de apo A-I pueden deberse a una tasa de catabolismo aumentada o a una tasa de síntesis

disminuida, o a ambas. Al determinar la tasa de síntesis de la apo A-I, ésta fue menor en el grupo de ratas Htx en comparación al grupo de ratas control. Estos resultados confirman una tasa de síntesis baja y un aumento intracelular de RNAm de apo A-I en ratas hipotiroideas ¹⁰¹. De esta manera, el catabolismo bajo es compatible con los bajos niveles de apo A-I cuando la síntesis de la proteína esta disminuida. Por otro lado, al realizar una segunda serie de estudios metabólicos usando HDL autóloga, encontramos una disminución de 1.9 veces en el catabolismo de las apo A-I en las ratas Htx. Confirmando que los cambios en el tamaño y contenido de lípidos y apolipoproteínas inducidos por el estado hipotiroideo contribuyen a la disminución de la FCR de la apo A-I. Así, los bajos niveles de apo A-I en las ratas Htx en nuestro trabajo, se deben a un desbalance entre la síntesis y el catabolismo, esto es, una tasa de producción baja de la apo A-I que excede la FCR baja. En un estudio realizado en sujetos con hipercolesterolemia familiar heterocigota con concentraciones de C-HDL y apo A-I disminuidos, había una síntesis y catabolismo alto de apo A-I, sugiriendo que el incremento en el catabolismo de la apo A-I sobrepasó el incremento de la producción ¹⁰². Algo similar observamos en nuestro trabajo, en las ratas Htx con hipercolesterolemia se presentó una disminución de las concentraciones de C-HDL y apo A-I, resultado de una tasa de síntesis baja que excede la disminución de la tasa de catabolismo.

La actividad de la CETP tiene una correlación inversa con los niveles plasmáticos de C-HDL ¹⁰³. Por lo anterior, las bajas actividades de la CETP reportada en el hipotiroidismo humano ^{97,104} contribuyen a un incremento en el C-HDL, como lo indican algunos estudios. La ausencia de CETP en la rata nos permitió identificar bajos niveles de C-HDL en el Htx sin la interferencia de esta proteína. Por lo anterior, proponemos que en el hipotiroidismo humano hay un impacto directo de la carencia de las hormonas tiroideas sobre las HDL, que debería manifestarse en una hipoalfalipoproteinemia, pero no hay una manifestación bioquímica porque las bajas concentraciones de la CETP contrarrestan el primer efecto. Así, la falta de explicación bioquímica en el hipotiroidismo humano, como la hipoalfalipoproteinemia, no significaría ausencia de efectos del hipotiroidismo sobre las HDL, sino un enmascaramiento de los efectos de las bajas concentraciones de hormonas tiroideas por la CETP presente.

En resumen, los factores que influyen en el tamaño y contenido de lípidos y proteínas de las HDL y en consecuencia en su tamaño tienen un efecto importante sobre la modulación del metabolismo de las HDL. Las partículas de HDL grandes en las ratas Htx se catabolizan más lentamente en comparación con las HDL de las ratas control que son más pequeñas y tienen un catabolismo acelerado. Además, nuestros resultados ponen de

manifiesto que el hipotiroidismo *per se* favorece un catabolismo más lento, debido a la alteración en el tamaño y contenido de lípidos y proteínas de la partícula de HDL.

HIPÓTESIS.

- ◆ El tratamiento con fibratos modificará las actividades de la LPL, LH, LCAT, CETP o PLTP, lo cual repercutirán en cambios de las concentraciones de C-HDL así como en su contenido de lípidos y proteínas.
- ◆ Si los fibratos inducen modificaciones en el metabolismo de las HDL, éste se reflejará en alteraciones en síntesis, catabolismo o en ambas situaciones metabólicas.
- ◆ Las alteraciones en el metabolismo de las HDL repercutirán en cambios su el tamaño y contenido de lípidos y proteínas.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar las modificaciones del perfil lipídico en pacientes con hipertrigliceridemia, después de un tratamiento con ciprofibrato.
2. Determinar las alteraciones metabólicas relacionadas con las HDL que permitan conocer los mecanismos implicados en su concentración, después del tratamiento con ciprofibrato.
3. Comparar la cinética metabólica de las apolipoproteínas de HDL, en los pacientes antes y después del tratamiento con fibratos, utilizando isótopos estables como marcadores proteicos.

METODOLOGÍA.

Sujetos de estudio: Se reclutaron 8 sujetos que tuvieran una concentración de triacilglicérolos mayor a 220 mg/dL, sin ninguna enfermedad crónica. Hombres de 30-45 años y mujeres posmenopáusicas \leq 60 años. Los sujetos con diabetes mellitus, enfermedad renal hepática u otra enfermedad crónica, o que estuvieran bajo tratamiento hipolipemiante o cualquier otro tratamiento fueron excluidos del estudio.

Un mes antes de los estudios cinéticos se les solicitó a los sujetos un registro alimentario de 3 días para estimar su consumo calórico promedio por día. Del total de calorías ingeridas, 50% debió de provenir de carbohidratos, 35% de lípidos y 15% de proteínas. Si el paciente no se ajustaba a este consumo porcentual, se le dio una dieta isocalórica durante 2 semanas antes del estudio.

Muestras para las actividades enzimáticas. Dos semanas antes del estudio los pacientes asistieron para la toma de dos muestras de sangre. Una muestra fue para la obtención de plasma y suero, guardándose 4 alícuotas de plasma de 1 mL a -70°C para la determinación posterior del perfil de lípidos, de la actividad LCAT, CETP, PLTP y una alícuota de suero de 1 mL para la determinación de la actividad PON.

Otra muestra fue para la determinación de la actividad de lipasas, para la cual se inyectó 100 UI/kg de peso del paciente de heparina por vía intravenosa. Después de 15 minutos, se tomó una muestra de sangre en tubos con heparina, e inmediatamente se separó el plasma por centrifugación a 3500 r.p.m durante 15 minutos a 4°C y se guardó a -70°C hasta su uso.

Protocolo de la cinética metabólica. El estudio metabólico se realizó antes y después del tratamiento con ciprofibrato. La incorporación al organismo del trazador leucina D_3 y la extracción de plasma a diferentes tiempos durante la incorporación continua del trazador, permitió seguir el metabolismo de las apolipoproteínas de interés. En cada una de las extracciones fueron aisladas las apolipoproteínas que se deseaban estudiar, y la proporción de leucina marcada se determinó respecto a la leucina total (enriquecimiento isotópico) por cromatografía de gases, utilizando como detector espectrometría de masas (CG-SM). La determinación del enriquecimiento isotópico *in vivo* de la apolipoproteína permitió calcular su síntesis y catabolismo por medio de una modelización matemática.

Después de 12h de ayuno, los sujetos fueron alimentados cada h por 12h. Tres horas antes de comenzar el estudio se dio un bolo de suplemento dietético (Ensure, Laboratorios Abbot, Ohio) equivalente a 3/15 de su consumo calórico promedio diario del sujeto. A partir

de este momento cada hora ingieren el suplemento dietético, administrado en proporciones idénticas equivalentes a 1/15 de su consumo calórico diario.

A los sujetos se les pusieron 2 líneas intravenosas, una para la perfusión y la segunda para la toma de muestras sanguíneas. Al $t = 0$, se administró al sujeto un bolo inicial intravenoso de leucina-D3 equivalente a $8 \mu\text{mol/kg}$, seguido de una perfusión constante de $10 \mu\text{mol/kg/h}$ del trazador por un periodo de 12 h. Durante el transcurso del estudio el paciente permaneció en reposo, y se le permitió ingerir agua *Ad Libitum*. Se tomaron muestras de sangre de 10 mL a diferentes tiempos: 30 min, 1, 1.30, 2, 3, 4, 6, 8, 10 y 12 h. La sangre fue colectada con EDTA (a una concentración final de 0.1 %). Inmediatamente después de cada toma de sangre se obtuvo el plasma por centrifugación a 3500 r.p.m. durante 15 minutos y se añadieron conservadores PSMF 0.5 mM, aprotinina 100 UI y azida de sodio al 0.01 %. Las lipoproteínas se separaron dentro de las dos horas siguientes de haber sido aislado el plasma.

Aislamiento de las lipoproteínas. Las lipoproteínas fueron separadas por ultracentrifugación secuencial en una ultracentrífuga Beckman optima TLX en tubos de policarbonato de 3.2 mL (Apéndice 9).

Separación de las apolipoproteínas. Después de dializar a las lipoproteínas, las apolipoproteínas correspondientes fueron separadas. La apo B-100 fue aislada de las VLDL, mediante PAGE-SDS en gradiente de 3 –19 % y β -mercaptoetanol al 5%. La apo A-I y apo A-II se aislaron de las HDL por PAGE-SDS en gradiente de 4 –21 %. Las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie R250 y fueron identificadas por comparación con marcadores de diámetros conocidos.

Preparación de los aminoácidos de las apolipoproteínas para la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-SM). Las bandas correspondientes a las apolipoproteínas en estudio se cortaron, liofilizaron e hidrolizaron con HCl 6 N a 110°C durante 24 h. Los hidrolizados proteicos fueron secados con nitrógeno a 60°C , y se recuperaron con la adición de 1 mL de ácido acético 1N Ultrex (J.T. BAKER, Phillipsburg, NJ, USA). Las soluciones ácidas se aplicaron a una resina de intercambio catiónico AG-50W-X8, (BIORAD, Hercules, CA, USA) y eluidas con 3mL de NH_4OH 3M. Los eluidos que contienen los aminoácidos, se colectaron en tubos de 13X100 mm y se secaron en un secador rotativo al vacío.

Los aminoácidos secos se esterificaron (Figura 11) por adición de 0.5 mL de una mezcla de cloruro de acetilo – propanol (1/5 v/v) durante 1 h a 100°C . Las muestras fueron enfriadas y secadas con nitrógeno. Posteriormente se añadió $100\mu\text{L}$ de anhídrido heptafluorobutírico

(SUPELCO Inc, Bellefonte, PA, USA) a cada tubo, para volver a los aminoácidos volátiles, y fueron calentadas a 60°C durante 20 minutos. Los aminoácidos fueron solubilizados con 30µL de acetato de etilo.

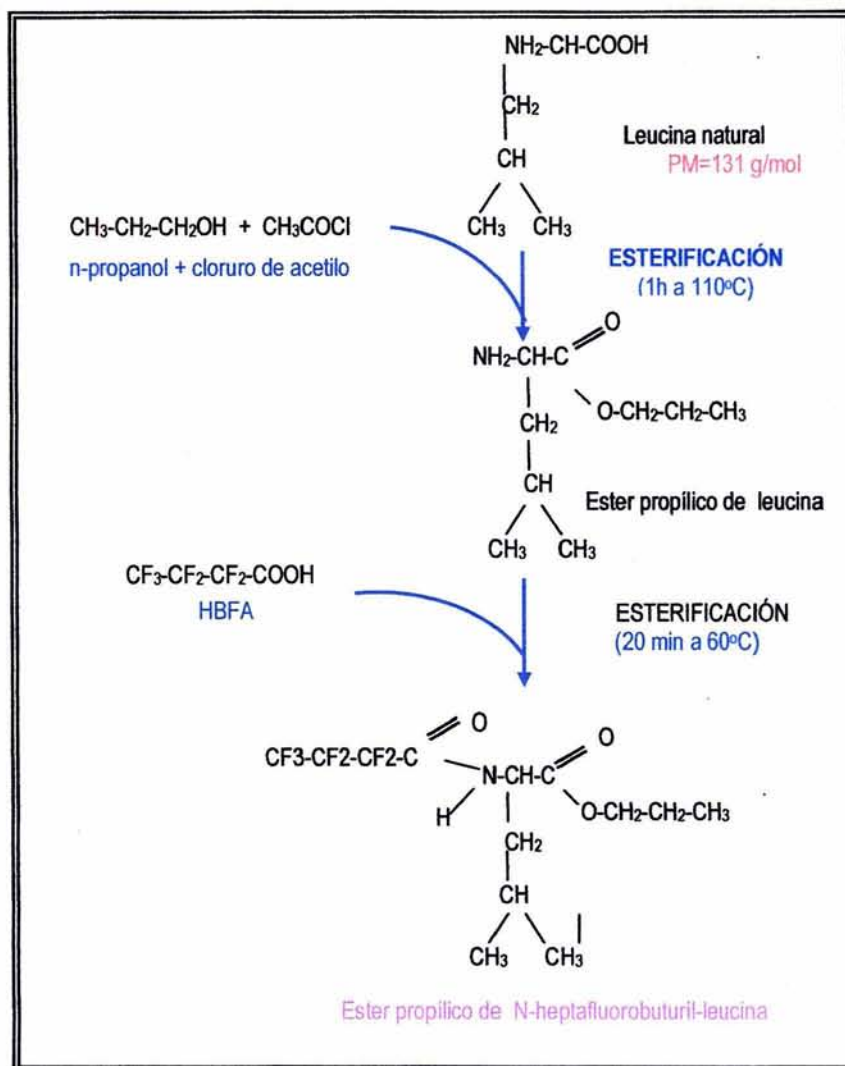


FIGURA 11. Reacciones de la modificación de los aminoácidos para el análisis por CG-SM.

Medición del enriquecimiento isotópico. La separación de los aminoácidos se realizó por cromatografía en fase gaseosa (CG), utilizando una columna capilar DB1 de 30m x 0.25 mm con una película de 0.25 µm de grosor. La fase móvil (helio) es de 1 mL/min y la temperatura aumenta progresivamente de 75°C a 280°C a razón de 10°C por minuto. La detección se realizó mediante un espectrómetro de masas (SM) 710 B (FINNIGAN-MAT, San José, USA) usando ionización química negativa con metano como gas reactivo para

cuantificar los picos correspondientes a los iones leucina-D0 y leucina-D3 (m/z 349 y 352, respectivamente). El integrador del aparato proporciona los valores correspondientes a cada pico.

Determinación de los parámetros cinéticos. Las curvas de enriquecimiento isotópico de la apo A-I y apo A-II de las HDL, fueron trazadas utilizando el programa SAAM II ⁸⁹. Las funciones utilizadas son definidas por la ecuación: $Z_{(t)} = Z_A (1 - e^{-k(t-\tau)})$, donde $Z_{(t)}$ y Z_A son respectivamente, el enriquecimiento isotópico al tiempo "t" y el enriquecimiento isotópico del precursor; "k" es la tasa de síntesis fraccional (FSR) y la τ el tiempo de retardo.

Métodos de análisis. El colesterol total, los triacilgliceroles, fosfolípidos y colesterol libre se determinaron por métodos enzimáticos colorimétricos comerciales (Boehinger-Mannheim, Alemania), utilizando un analizador Hitachi 705 en los primeros dos casos. El C-HDL fue medido en el sobrenadante después de haber precipitado a las lipoproteínas que contenían apo-B, por el método de precipitación con fosfotungstato-magnesio ¹⁰⁵. El colesterol LDL fue calculado con la fórmula de Friedewald. La apo A-I y A-II se cuantificaron por inmunonefelometría referidos en material y métodos del modelo de rata hipotiroidea. Los ésteres de colesterol fueron calculados como la diferencia entre el colesterol total y el colesterol libre multiplicado por un factor de 1.68 ⁷⁶.

Análisis de las HDL. Las subpoblaciones de las HDL se determinaron mediante PAGE en condiciones nativas (no desnaturalizantes) en gradiente del 4-30% (Apéndice 2), utilizando como referencia marcadores de diámetros conocidos (estuche de estándares de proteínas de alto peso molecular, Pharmacia, Uppsala Suecia, tiroglobulina 17 nm, ferritina 12.2 nm, catalasa 10.4 nm, lactato deshidrogenasa 8.2 nm, y albúmina 7.1 nm) apéndice 2. Las proporciones relativas de las subpoblaciones de HDL se determinaron por densitometría óptica del gel teñido con azul de Coomassie R250. Los diámetros que se consideraron para caracterizar las diferentes subpoblaciones fueron: HDL _{3c} 7.9-8.45 nm, HDL _{3b} 8.45-8.98 nm, HDL _{3a} 8.98-9.94 nm, HDL _{2a} 9.94-10.58 nm y HDL _{2b} 10.58-12.36 nm.

En las HDL también se determinó el contenido de apolipoproteínas por medio PAGE-SDS en gradiente 4 –21%, (Apéndice 3). Las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie R250 y La proporción de apolipoproteína fue determinada cuantificando el colorante fijado a cada proteína por medio de espectrofotometría, después de eluir con piridina ⁸⁰.

Cuantificación de la actividad de enzimas. La determinación de la actividad de las lipasas y LCAT se refieren en material y métodos del modelo en rata.

La actividad CETP se determinó *in vitro* por una modificación del método de Tollefson y Albers ¹⁰⁶, (Apéndice 5). Brevemente, HDL₃-³H (lipoproteínas donadoras) más lipoproteínas que contienen apo B (lipoproteínas aceptoras) se incubaron con plasma a 37°C 16 h. Después de la incubación se tomó una alícuota de la mezcla, y al resto se le agregó reactivo de fosfotungstato de magnesio para precipitar las lipoproteína que contienen apo B. La radiactividad se contó en la mezcla antes y después de la precipitación, utilizando líquido de centelleo en un contador de radiaciones β. La actividad de la CETP en este ensayo correlaciona con la masa CETP del plasma ¹⁰⁷. La actividad CETP se expresó como el porcentaje de ésteres de colesterol tritiado transferido a las lipoproteínas aceptoras. Todas las muestras se determinaron por duplicado. El CV intraensayo e interensayo fue <5%.

La actividad PLTP se determinó *in vitro* ¹⁰⁸ (Apéndice 6). Brevemente, liposomas conteniendo fosfatidilcolina-³H se incubaron con el plasma de los sujetos a 37°C durante 1h. Al término de la incubación, los liposomas fueron precipitados con una solución de heparina/MnCl₂. La radiactividad de una alícuota fue medida utilizando líquido de centelleo en un contador de radiación beta. La actividad PLTP se expresó como el porcentaje de fosfatidilcolina-³H transferida de los liposomas a las HDL del plasma. El CV intraensayo e interensayo fue <5%.

La actividad PON1, se determinó utilizando paraoxón como substrato ¹⁰⁹, (Apéndice 7). Brevemente, a un amortiguador de Glicina/NaOH pH 10.5 conteniendo CaCl₂ y 1.0 mM de paraoxón se le adicionó suero de los pacientes. La hidrólisis del paraoxón fue evaluada espectrofotométricamente a 412 nm mediante la cuantificación del p-nitrofenol liberado a 25°C.

Eflujo de colesterol. Para evaluar la captación de colesterol de las células, se utilizó la línea celular de hepatoma de rata Fu5AH ⁸⁴, según se describe en el modelo de las ratas hipotiroideas, (Apéndice 8).

RESULTADOS

Los estudios cinéticos metabólicos en los sujetos se realizaron por medio del marcaje endógeno, utilizando leucina deuterada, según se describe en la sección de métodos. Posteriormente, los datos experimentales se ajustaron a un modelo monocompartimental que permite calcular el FCR y la PR.

Se requería que los sujetos se encontraran en un estado metabólico estable al comenzar y durante el tiempo del estudio. Para verificar esto, a tres voluntarios sanos se les administró el suplemento alimenticio según se describe en la sección de métodos y se determinaron las concentraciones plasmáticas de triacilgliceroles, apo B100, C-total, C-HDL y apo A-I a diferentes tiempos (Figura 12).

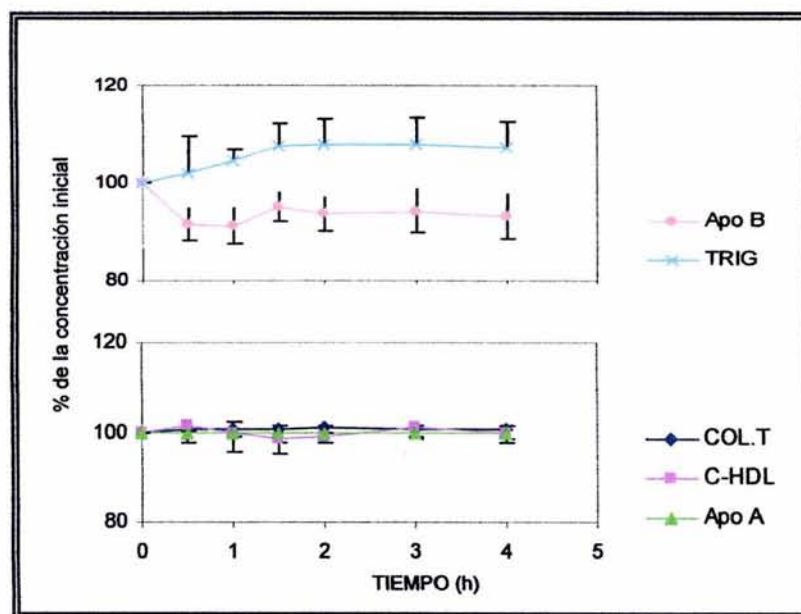


Figura 12. Variación de las lipoproteínas y apolipoproteínas en estado posprandial.

Se puede observar no hubo variaciones en las concentraciones de las lipoproteínas y apolipoproteínas, lo implica que a las tres horas de haber ingerido el suplemento alimenticio, los sujetos se encontraron en un estado metabólico estable, como lo requiere el modelo.

Los resultados de las concentraciones de los lípidos en los sujetos de estudio, antes y después del tratamiento con ciprofibrato se muestran en la tabla X.

Tabla X. Lípidos y lipoproteínas plasmáticos (n=8).

Tratamiento	Col. Total mg/dL	C- HDL mg/dL	Triacilglicerolos mg/dL	C-LDL mg/dL
Antes	256 ± 36	36 ± 9.4	312 ± 133	158 ± 45
Después	197 ± 39***	46 ± 14*	153 ± 69 ^a	120 ± 31**

Los valores se expresan como media ± DE.

t de Student pareada * $p < 0.01$), ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$ vs antes del

tratamiento. ^aValores transformados logarítmicamente para realizar prueba t.

Después del tratamiento se observó un aumento en las concentraciones plasmáticas de C-HDL, una disminución en el C-LDL, colesterol total y triacilglicerolos (27%, 24% y 23%, 50% respectivamente).

Para establecer las bases metabólicas vinculadas a los cambios del perfil de lípidos por efecto del ciprofibrato, se realizó el estudio cinético metabólico de la apo A-I y apo A-II, principales apolipoproteínas de las HDL.

En la tabla XI se muestran los resultados de los parámetros metabólicos obtenidos antes y después del tratamiento con ciprofibrato.

Tabla XI. Parámetros cinéticos de la apo A-I, apo A-II y apo B-100.

	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Incremento porcentual
PR Apo A-I ¹	14.8 ± 8.8	26.7 ± 13.4 *	112
PR Apo A-II ¹	3.7 ± 1.4	6.7 ± 3.1 *	65
FCR Apo A-I ²	0.30 ± 0.11	0.43 ± 0.17 *	51
FCR Apo A-II ²	0.22 ± 0.06	0.24 ± 0.09	18
FCR Apo B-100 ²	4.30 ± 1.62	10.92 ± 5.96	156
Apo A-I ³	109.7 ± 23.8	122.6 ± 25.4*	12
Apo A-II ³	37.3 ± 9.9	60.4 ± 18.8 *	62

¹mg/día/Kg., ² d⁻¹, ³ mg/dL

t de Student pareada * $p < 0.05$ vs antes del tratamiento.

Se observa que tanto la FCR y la PR de la apo A-I, aumentan, 51%. y 112% respectivamente. Un aumento similar se observó con la apo A-II, FCR 18% y PR del 66%. El balance final de este comportamiento metabólico se manifestó por el incremento discreto del 12% en la concentración plasmática de apo A-I y del 62% en apo A-II. Dichos incrementos contribuyen al aumento en la concentración de C-HDL que fue del 28%. También, observamos un aumento de 2.5 veces en la FCR de las apo B-100 de las VLDL,

que se reflejó en la disminución del 50% en la concentración de triacilgliceroles plasmáticos.

Para determinar si la modificación en el metabolismo de las HDL se asocia a alteraciones en el tamaño de estas lipoproteínas, se determinaron las subpoblaciones de las HDL antes y después del tratamiento con el ciprofibrato. En la figura 13 observamos una disminución de 4 veces ($8.5\% \pm 5.02$ vs. $2.02\% \pm 2.11$, antes y después del tratamiento, respectivamente) en la subpoblación de mayor tamaño, HDL_{2b} (diámetro 10.58-12.36 nm), y un incremento de 2.3 veces ($9.25\% \pm 2.9$ vs. $21.2\% \pm 5.7$, antes y después del tratamiento, respectivamente) en la subpoblación de menor tamaño HDL_{3c} (diámetro 7.90-8.45 nm).

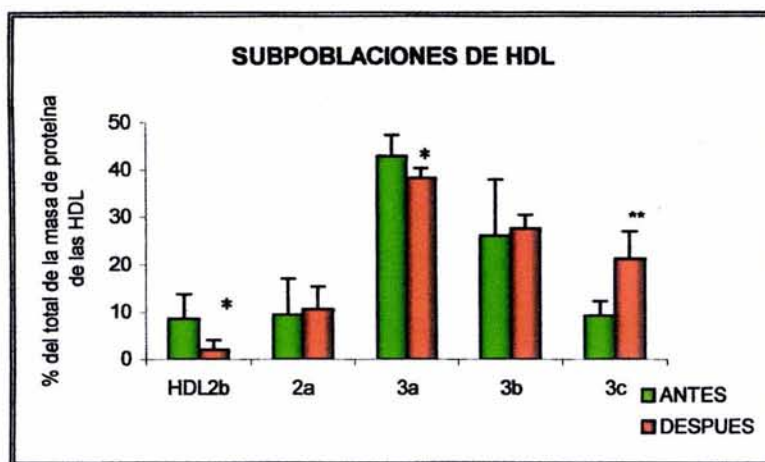


Figura 13. Gráfica de la distribución de las subpoblaciones de HDL. Las barras corresponden a la media \pm DE.

t de Student pareada * $p=0.01$, ** $p=0.001$ vs antes del tratamiento.

Para caracterizar el tamaño de las HDL, se determinó la composición química y de apolipoproteínas. En la tabla XII se presentan los porcentajes de colesterol libre, ésteres de colesterol, triacilgliceroles, fosfolípidos y proteínas de las HDL. Observamos que la composición porcentual no se modifica sustancialmente después del tratamiento con ciprofibrato y sólo se presenta una disminución con significancia estadística en el porcentaje de triacilgliceroles.

Tabla XII. Composición química de las HDL totales.

Tratamiento	Col Libre (%)	Ésteres de Col (%)	Triacilgliceroles (%)	Fosfolípidos (%)	Proteínas (%)
Antes	3.8 ± 0.8	9.7 ± 2.4	3.9 ± 0.9	24.6 ± 3.0	56.7 ± 4.6
Después	2.7 ± 0.8	9.5 ± 2.9	2.8 ± 1.0*	27.4 ± 6.2	59.3 ± 7.8

La composición se expresa como el % del total de la masa seca de la lipoproteína.

Los valores se expresan como media ± DE.

t de Student pareada * $p < 0.05$ vs antes del tratamiento.

En cuanto a la composición de apolipoproteínas, no observamos modificaciones después del tratamiento al que se sometió a los pacientes (Tabla XIII).

Tabla XIII. Contenido de apolipoproteínas en las HDL totales.

Tratamiento	apo A-IV	Apo E	Apo A-I	Apo C + apo A-II
Antes	1.8 ± 0.8	2.5 ± 0.52	73 ± 5.2	23.1 ± 5.4
Después	2.8 ± 1.5b	3.3 ± 1.7	72 ± 4.4	21.4 ± 7.6

El contenido se expresa como % de la masa proteica

Los valores se expresan como media ± DE.

Para poder determinar si las actividades de las enzimas y proteínas de transporte que intervienen en la remodelación de las HDL, dieron origen a las a los cambios en el contenido de lípidos y de proteínas de las HDL determinamos LCAT, CETP, LH y PLTP.

Después del tratamiento no se observó diferencia en la actividad LCAT y CETP. En cuanto a la actividad de las lipasas, después del tratamiento no observamos alteración en la actividad de la LH, mientras que la actividad de la LPL presentó un aumento importante del 72% (Tabla XIV). La PLTP es otra proteína de transferencia que desempeña un papel central en la remodelación de las HDL, modificando su tamaño. Cuando determinamos la actividad PLTP (Tabla XIV) observamos un aumento del 45% en la actividad de la enzima, después del tratamiento con el fármaco.

Tabla XIV. Actividades de las enzimas y proteínas de transporte involucradas en el metabolismo de las HDL.

Tratamiento	LCAT % esterificación	CETP % transferencia	LH µm/min/mL	LPL µm/min/mL	PLTP % transferencia
Antes	28.7 ± 4.7	21.8 ± 6.2	45.4 ± 24.4	66.8 ± 40.7	18.8 ± 6.0
Después	27.6 ± 3.4b	22.1 ± 4.4	46.9 ± 25.3	99.3 ± 46.4*	22.9 ± 5.9*

Los valores se expresan como media ± DE

t de Student pareada * $p = 0.01$ vs antes del tratamiento.

Para establecer si las modificaciones en el tamaño y composición química de las HDL tienen algún impacto en su capacidad para remover colesterol, se evaluó la capacidad de las HDL para captar el colesterol proveniente de la membrana de las células Fu5AH.

Nuestros resultados demuestran que los sueros de los sujetos después del tratamiento, promovieron más el eflujo de colesterol en comparación con el basal (Figura 14).

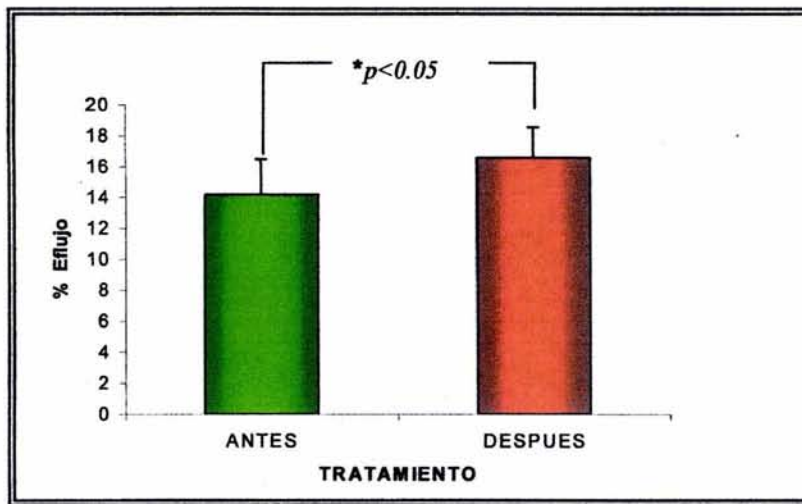


Figura 14. Gráfica del eflujo de colesterol utilizando células Fu5AH. Valores expresados como la media del porcentaje del eflujo de colesterol relativo \pm DS.

Estudios recientes han demostrado que la PON *in vitro*, tiene más afinidad por HDL reconstituidas de mayor tamaño (110). Debido a que el tratamiento con ciprofibrato aumenta la proporción relativa de HDL₃ y disminuye las HDL₂, nos interesamos en estudiar si esta modificación inducida por el ciprofibrato tenía una repercusión negativa en cuanto a la cantidad de paraoxonasa circulante. No hubo diferencias en la actividad de la enzima después del tratamiento (129 ± 36 nmol p-nitrofenol/min/mL suero vs 119 ± 18 nmol p-nitrofenol/min/mL suero, antes y después del tratamiento respectivamente).

DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo fue determinar los efectos del ciprofibrato sobre la cinética metabólica de la apo A-I y apo A-II, así como sobre la distribución de las subclases de HDL y su composición en sujetos con hipertrigliceridemia.

Después del tratamiento por seis semanas, el ciprofibrato indujo una notable mejoría en el perfil lipídico de nuestro grupo de estudio. La modificación más importante se produjo en los triacilgliceroles plasmáticos cuya concentración está determinada en gran medida por su síntesis hepática, que a su vez depende de los ácidos grasos disponibles ¹¹¹. En vista que los fibratos disminuyen la biodisponibilidad de los ácidos grasos por estimular la β -oxidación, la síntesis hepática de triacilgliceroles también se disminuye. De esta manera se puede explicar el efecto observado del ciprofibrato sobre los triacilgliceroles. Además, nuestros resultados demuestran que existe un incremento del catabolismo de la apo B100 de las VLDL, sugiriendo que estas lipoproteínas son remodeladas a IDL y LDL más rápidamente. Esta propuesta se apoya en el incremento observado en la actividad de la LPL, cuyo gen posee un PPRE y en consecuencia aumenta su expresión por efecto del fibrato ¹¹². Por lo tanto, el incremento en el catabolismo de la VLDL por efecto de la LPL, puede estar contribuyendo igualmente al decremento de las concentraciones de triacilgliceroles en plasma.

El segundo efecto del ciprofibrato en el perfil lipídico fue la disminución importante del C-LDL, que es un efecto secundario a la reducción de los triacilgliceroles plasmáticos. La hipertrigliceridemia se acompaña de alteraciones en la estructura de las LDL ¹¹³, haciendo que la interacción de estas lipoproteínas con su receptor celular disminuya. Al disminuir las concentraciones de triacilgliceroles con el ciprofibrato, se restablece la afinidad de las LDL por sus receptores celulares, acelerando así su tasa de captación hepática, que resulta en el decremento de las concentraciones del C-LDL observado.

El tercer efecto del ciprofibrato en el perfil lipídico, y el aumento en el C-HDL. Es ampliamente conocido el efecto de los fibratos sobre el C-HDL. El colesterol de las HDL puede incrementarse en dos situaciones que tienen un significado fisiológico muy diferente: 1) sin modificar el número de partículas, las HDL se enriquecen en colesterol, y 2) un incremento del número de partículas HDL. Con base en la capacidad que tienen los fibratos de estimular la transcripción del gen de la apo A-I ¹¹⁴, se ha aceptado que estos fármacos incrementan los niveles de C-HDL porque, los fibratos aumentan el número de partículas HDL circulantes. Nuestros resultados demuestran que la concentración plasmática de apo A-I aumenta, sugiriendo que efectivamente el número de partículas circulantes también podría incrementarse por el tratamiento con ciprofibrato. No obstante, el aumento promedio

en el C-HDL (28%) es más del doble respecto al de la apo A-I (12%) en nuestro grupo de estudio, indican que las HDL aumentaron en cantidad. Los fibratos producen un aumento en el C-HDL por dos mecanismos; favorece que sea mayor el número de partículas y un enriquecimiento de éstas con colesterol. La propuesta de que las HDL se enriquecen en colesterol, es compatible con la disminución de los niveles de triacilglicérolos plasmáticos inducida por los fibratos. Esto implica una disminución proporcional de intercambio de ésteres de colesterol entre apolipoproteínas ricas en triacilglicérolos y las HDL ¹¹⁵, que tienen como consecuencia una acumulación de los ésteres de colesterol en las HDL.

Si las partículas HDL se enriquecen en colesterol, se esperaría que este efecto se manifestara en la composición química de estas lipoproteínas. Sin embargo, los resultados demuestran que las HDL solo se modifican muy discretamente en el contenido de triacilglicérolos, pero no se observa ningún cambio en la proporción de los otros componentes, en particular de colesterol. Debe considerarse que esta composición química se determinó en HDL totales, y esto corresponde al conjunto de todas las subclases de HDL. Además, el método que utilizamos para determinar la proporción relativa de las subclases de HDL, se basa en la cantidad de proteínas de cada una e ignora su contenido de colesterol. Por lo tanto, esta aparente paradoja tiene una posible respuesta en el tipo de HDL que se beneficia por efecto del fibrato; la fracción más favorecida es HDL_{3c}, que corresponde a una categoría de lipoproteínas pequeñas, densas, pobres en colesterol y que se estructuran con dos unidades de apo A-I ⁷. Mientras que el resto de las subclases HDL (a excepción de las HDL_{2b}), que son ricas en colesterol, requieren de 3 o 4 unidades de apo A-I para estabilizarse ¹¹⁶ y se mantiene prácticamente en la misma proporción después del tratamiento. Esto explicaría, al menos parcialmente, el aumento proporcionalmente diferente en las concentraciones de C-HDL y de apo A-I por el tratamiento con ciprofibrato.

El incremento en la proporción de las partículas HDL_{3c} pequeñas en detrimento de las HDL_{2b} de mayor tamaño implica cambios en los factores metabólicos que intervienen en la remodelación de estas partículas. Por esta razón, determinamos las actividades de las diferentes proteínas de transporte y enzimas plasmáticas que participan en el metabolismo de las HDL. Nuestros resultados demuestran que solo la LPL y la PLTP se incrementan por la acción del ciprofibrato; es conocido que el gen de la LPL tiene en su secuencia el elemento de respuesta para PPAR α ¹¹² y el incremento de su actividad es compatible con la disminución de triacilglicérolos plasmáticos. Sin embargo, la LPL no tiene un efecto directo sobre las HDL y es poco probable que las modificaciones de su estructura estén relacionadas con el incremento de esta enzima.

Por su parte, la PLTP participa directamente en la remodelación de las HDL y el incremento observado de la actividad de esta proteína podría efectivamente participar en los cambios estructurales de las HDL. Los incrementos de la actividad PLTP observados, concuerdan con observaciones hechas previamente en murinos, sugiriendo que el gen de la PLTP también está regulado por PPAR α ¹¹⁷. Evidencias *in vitro* sugieren que la PLTP facilita la transferencia de fosfolípidos entre HDL y lipoproteínas que contienen apo-B^{118,119} y entre partículas HDL^{3,4}. La conversión de las HDL mediada por la PLTP *in vitro*, da lugar a la formación de partículas pequeñas pobres en lípidos y conteniendo apo A-I¹²⁰. De esta manera, la PLTP tiene la capacidad de reducir el tamaño de las partículas de HDL, sugiriendo que la modificación en la distribución de tamaños de las HDL encontrada después del tratamiento farmacológico, está influenciada por el aumento de la actividad de la PLTP.

Otro factor de remodelación de las HDL cuyo gen contiene en la secuencia promotora el PPRE, es el receptor SR-BI. La interacción de las HDL con el SR-BI, resulta en la formación de partículas HDL pequeñas y densas, tipo HDL_{3c}, según se ha demostrado en ratones transgénicos SR-BI que sobre expresan la proteína¹²¹. Además, bajos niveles de expresión hepática del SR-BI también en ratones, correlaciona con partículas HDL de gran tamaño¹²². Asumiendo que el ciprofibrato efectivamente sobrestimula la expresión del gen del SR-BI, éste puede ser entonces otro factor que está involucrado en el incremento de la proporción relativa de las HDL_{3c} y la disminución de las HDL_{2b}.

En este trabajo, por el efecto de la PLTP y del SR-BI, el ciprofibrato da lugar a una mayor proporción de partículas HDL pequeñas que se catabolizan rápidamente. Las HDL pequeñas se asocian frecuentemente con FCR elevados^{47, 123, 124, 125}. Además, como se ha demostrado en este mismo trabajo de tesis, las HDL grandes se catabolizan lentamente¹²⁶. Esto sugiere que las partículas pequeñas tienen mayor afinidad por los sitios catabólicos, situados en el riñón, en particular en las células tubulares^{13, 127}. Para llegar a ellas, la partícula HDL debe ser previamente filtrada en la membrana glomerular, de tal manera que entre más pequeña es la partícula, más probabilidad tendrá de atravesar hacia el espacio de Bowman y en consecuencia a la luz tubular alcanzando así su sitio catabólico. El ciprofibrato, al favorecer la formación de HDL pequeñas (HDL_{3c}), facilita indirectamente que las partículas alcancen su sitio catabólico, explicando así el incremento en el FCR de la apo A-I.

Para determinar la cinética metabólica de la apo A-I utilizamos el enriquecimiento de la apo B-100 de las VLDL como una estimación del enriquecimiento isotópico del pool precursor de leucina de la apo A-I, asumiendo que la apo A-I fue principalmente sintetizada en el hígado⁷¹, al igual que la apo B-100. Así, encontramos que tanto la tasa de catabolismo

fraccional (FCR, fractional catabolic rate) como la tasa de producción (PR) de la apo A-I, aumentan casi al doble. El balance final, es solo un incremento discreto de los niveles plasmáticos de apo A-I, como se ha discutido previamente.

Se ha sugerido que el potencial antiaterogénico de las HDL no está relacionado con los niveles plasmáticos de C-HDL, sino con la cantidad de ciertas subclases de HDL presentes en plasma ^{128,129}. En este sentido, las HDL pequeñas que aumenta con el ciprofibrato, según demuestran nuestros resultados, puede ser un factor de protección adicional contra la formación del ateroma. En efecto, sujetos con hipoalfalipoproteinemia muy importante, que se caracterizan por poseer HDL pequeñas y un catabolismo acelerado de la partícula, no desarrollan EAC ^{47,125}. El poder antiaterogénico de las HDL pequeñas se puede explicar por ser las mejoresceptoras del colesterol excedente de las células periféricas ^{129,130}. Los resultados de este trabajo apoyan esta noción, debido a que demostramos que la capacidad de captar colesterol de la membrana de las células en cultivo por las HDL fue mayor después del tratamiento con el ciprofibrato.

Además, las HDL pequeñas poseen otras características que las colocan como las partículas más antiaterogénicas; estudios recientes ¹²⁹ demuestran que el potencial antioxidante de las HDL está relacionada de manera inversa con el tamaño de la partícula, de tal manera que las HDL_{3c} son las que poseen el mayor potencial antioxidante. El mayor poder antioxidante de las HDL_{3c}, se debe en parte, a que estas partículas son los aceptores primarios de paraoxonasa (PON1), según lo demuestran estudios recientes de nuestro laboratorio (datos no publicados). Esta selectividad se basa en el hecho de que la PON1 se sintetiza en hígado y permanece anclada en la membrana del hepatocito ¹³¹. Para poder ser liberada de ella, se necesita una partícula con una alta tensión superficial (HDL_{3c}) que favorezcan las interacciones con la membrana citoplasmática y con la región hidrofóbica de la enzima ¹³².

No obstante, de acuerdo a los resultados de este trabajo y a estudios previos ¹³³, los niveles plasmáticos de PON1 no aumentan después del tratamiento con ciprofibrato. En trabajos de nuestro laboratorio (datos no publicados), se ha determinado que la actividad paraoxonasa medida en plasma correlaciona pobremente con la actividad paraoxonasa asociada a las HDL, lo que nos sugiere que existe una fracción que se encuentra libre o ligada a otras lipoproteínas. De tal manera, que la determinación de la actividad PON plasmática no refleja la cantidad real de la enzima asociada a las HDL.

DISCUSIÓN GENERAL

Estudios previos han demostrado que sujetos con niveles de apo A-I y de colesterol-HDL inferiores al 50% y 20% de los valores normales respectivamente, no presentan alto riesgo de enfermedad coronaria ^{47, 134, 135}. La etiología de la hipoalfalipoproteinemia en estos sujetos es diversa; sin embargo, la característica común en ellos es que poseen un catabolismo acelerado, asociado a partículas HDL pequeñas ^{47, 125}. Estos resultados permitieron postular que catabolismo acelerado de las HDL es factor protector contra la aterosclerosis, independientemente de las concentraciones de C-HDL y que este catabolismo acelerado genera partículas pequeñas. Sin embargo, esos resultados se podían explicar también desde la perspectiva opuesta: las partículas pequeñas son más antiaterogénicas y se catabolizan más rápidamente. Surge entonces la incógnita de cuál de las dos posibilidades es la explicación correcta. La respuesta a tal incógnita tendrá repercusiones muy importantes a nivel de la evaluación del riesgo coronario. Contribuir a responder esta incógnita fue parte del motivo que dió origen al presente trabajo de investigación.

Con nuestro modelo de hipotiroidismo, demostramos que la diferencia en el tamaño y composición de las partículas HDL con respecto a las HDL-n, son suficientes para retardar la depuración de las partículas HDL. Esto apoya la idea de que la velocidad de depuración de las HDL guarda una relación inversa con el tamaño de la partícula. A pesar de que las partículas grandes se eliminan más lentamente de la circulación, su función en cuanto a la captación de colesterol de las células periféricas no se ve alterada, como lo demuestran nuestros estudios de eflujo de colesterol realizados con células en cultivo.

Por otra parte, estudios de prevención primaria y secundaria han mostrado que los fibratos disminuyen significativamente la incidencia eventos coronarios a través del incremento en el colesterol-HDL plasmático ^{48,49}. Los fibratos regulan una serie de genes que codifican para componentes estructurales (apo A-I y A-II) ^{51,52} y para proteínas que participan en el metabolismo de las HDL, como el SRB1 ⁵³, ABCA1 ⁵⁴ y PLTP ⁵⁵. En consecuencia, postulamos al inicio de este trabajo que los fibratos modifican el metabolismo y la estructura de las HDL y que tales cambios pueden contribuir a explicar papel antiaterogénico de estos fármacos, independientemente del aumento de los niveles plasmáticos del colesterol de las HDL. Para demostrar nuestra hipótesis de trabajo, seleccionamos sujetos hipertriglicéridémicos, candidatos a recibir ciprofibrato para tratar su dislipidemia. Este modelo de estudio nos permitió demostrar que el ciprofibrato disminuye el tamaño de las HDL, además de inducir cambios discretos en su composición y un aumento significativo en su catabolismo. Al analizar los genes involucrados en el

metabolismo de las HDL, cuya expresión se regula a través de los PPAR alfa activados por fibratos, el aumento de catabolismo no parece tener explicación en un efecto directo del ciprofibrato. Por lo tanto, el catabolismo acelerado de la apo A-I en los sujetos tratados con ciprofibrato se explica por la disminución en el tamaño de las partículas HDL que se generó por acción del fármaco. El ciprofibrato, al favorecer la formación de HDL pequeñas (HDL_{3c}), permite que la partícula sea fácilmente filtrada en la membrana glomerular y alcance rápidamente su sitio catabólico en el túbulo renal, explicando así el incremento en el FCR de la apo A-I. Estos resultados apoyan la relación inversa del tamaño de las HDL con su catabolismo.

Se puede argumentar que el tamaño no es el único cambio registrado en los dos modelos de estudio empleados en este trabajo. En efecto, el contenido de lípidos se modifica, pero tal modificación es muy discreta y no existe además un patrón que permita asociar la composición con el catabolismo. Estudios recientes de nuestro laboratorio, demuestran que los PPAR δ activados por pioglitazona generan HDL pequeñas, con importantes modificaciones en el contenido de lípidos (datos no publicados). Sin embargo, se observa un hiperatabolismo de la apo A-I de las HDL que correlaciona con el tamaño y tiene poca relación con la composición de la partícula. Este es un argumento adicional para postular que la composición de las HDL no tiene un impacto importante sobre su catabolismo.

Nuestros resultados permiten afirmar que existe una relación entre estructura y metabolismo de las HDL. La otra parte del objetivo de este estudio, radica en aportar conceptos para establecer la relación entre estructura y función de las HDL. Con base en nuestros resultados podemos postular que, si bien las HDL grandes (modelo Htx) no pierden capacidad de promover el eflujo de colesterol, las HDL pequeñas son más eficientes en esta función (modelo ciprofibrato). A pesar de disminuir el tamaño de las partículas HDL por el tratamiento con ciprofibrato, su capacidad de transportar PON1 no se altera, sugiriendo que la capacidad antioxidante asociada a la actividad de esta enzima no disminuye. Además, estudios recientes apoyan la idea de que las HDL pequeñas son más efectivas en evitar la oxidación de las LDL ¹²⁹. Por lo tanto, postulamos que las modificaciones en el metabolismo de las HDL que originan partículas pequeñas, tienen efecto antiateroscleroso al incrementar su capacidad de promover el eflujo de colesterol y actuar como antioxidantes.

Estudios dirigidos a evaluar la mejoría en otras funciones antiaterosclerosas, como las actividades antiplaquetaria, antiinflamatoria y profibrinolítica, de las HDL, cuando disminuye el tamaño de la partícula, surgen como perspectivas del presente trabajo de investigación.

CONCLUSIÓN

Los resultados de este trabajo demuestran que en condiciones potencialmente aterogénicas (Htx e hipertrigliceridemia), los factores que modifican la composición y el tamaño de las partículas de HDL tienen un efecto importante sobre la modulación de su metabolismo. Es decir, partículas de HDL grandes se asocian a un catabolismo lento en comparación con las partículas de HDL en condiciones no aterogénicas (perfil de lípidos normal) en las que existe una proporción mayor de HDL pequeñas con un catabolismo acelerado.

Esto puede ser de utilidad para poder realizar un diagnóstico más preciso y temprano en aquellos sujetos que por sus condiciones familiares y ambientales, pudieran estar en riesgo de desarrollar EAC. Este diagnóstico se fundamentaría con la determinación del tamaño de las partículas de HDL, sin tener que realizar la cinética metabólica de la partícula, lo cual requiere de un tiempo mayor.

PERSPECTIVAS

Los resultados de este trabajo de investigación han provocado varias interrogantes entre las que destacan:

- ¿Otros fármacos con actividad antiaterogénica comprobada, como estatinas, tiazolidindionas, ácido nicotínico, inducen un patrón metabólico que favorezca la formación de HDL pequeñas y aumenten su catabolismo?. La respuesta afirmativa a esta pregunta permitiría generalizar los conceptos que estamos aportando.
- ¿Las HDL pequeñas son mas eficientes en las otras funciones antiaterogénicas de estas lipoproteínas?
- Con base en nuestros datos hemos propuesto que el contenido de lípidos en las HDL no son un factor importante en su función antiaterosclerosa. Esta propuesta deberá ser confirmada en estudios posteriores.
- Trabajos realizados en nuestro laboratorio, sugieren que existe una fracción de la paraoxonasa que se encuentra libre o ligada a otras lipoproteínas. Debido a esto la determinación de la actividad PON plasmática no refleja la cantidad real de la enzima asociada a las HDL. Por lo tanto, es posible que el potencial antioxidante de las HDL sea mayor por el tratamiento con el fibrato, pero esto no se manifestó por la actividad PON1 en plasma. La veracidad de esta aseveración debe ser investigada con mayor profundidad en estudios ulteriores.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Von E, Yadong H, Berd A. Physiological role and clinical relevant of high density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol* 1994; 5: 404-16.
2. Aguilar-Salinas CA, Gómez PF. Lipoproteínas y aterogenesis. Metabolismo normal de las lipoproteínas. *Revista del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán* 1989; 2: 22-28.
3. Rye K-A, Clay MA, Barter PJ. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis* 1999; 145: 227-38.
4. O'Connor PM, Zysow BR, Schoenhaus SA, Ishida BY, Kunitake ST, Naya-Vigne JM, Duchateau PN, Redberg RF, Spencer SJ, Mark S. Prebeta-1 HDL in plasma of normolipidemic individuals: influence of plasma lipoproteins, age and gender. *J Lipid Res* 1998; 39: 670-78.
5. Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre- β migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry* 1988; 27: 25-29.
6. Sviridov D, Fidge NH. Pathways of cholesterol efflux from human hepatoma cell. *Biochim Biophys Acta* 1995; 125: 210-20.
7. Miida T, Kawano M, Fielding CJ, Fielding PE. Regulation of the concentration of pre high density lipoprotein in normal plasma by cell membranes and lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochemistry* 1992; 31:11112-120.
8. Liang HQ, Rye KA, Barter PJ. Remodeling of reconstituted high density lipoproteins by lecithin:cholesterol acyltransferase. *J Lipid Res* 1996; 37: 1962-70.
9. Nichols AV, Gong EL, Blanche PJ, Forte TM, Shore VG. Molecular pathway in the transformation of model discoidal lipoprotein complex induced by lecithin:cholesterol acyl transferase. *Biochim Biophys Acta* 1985; 834: 285-300.

10. Fielding C, Fielding P. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 1995; 36: 211-28.
11. Tall AR. An overview of reverse cholesterol transport. *Eur Heart J* 1998; 19: A31-A35.
12. Trigatti B, Rigotti A, Krieger M. The role of high-density lipoprotein receptor SR-B1 in cholesterol metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 123-32.
13. Moestrup SK, Kozyraki. Cubilin, a high density lipoprotein receptor. *Curr Opin Lipidol*. 2000; 11: 133-40.
14. INEGI, SSA/DGEI, 2002.
15. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-09
16. Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-26.
17. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002 Dec 17; 106 (25): 3143-421.
18. Genest JJ Jr, Martín-Munleey SS, McNamara JR, Ordovas JM, Jenner J, Myers RH, Silberman SR, Wilson PW, Salem DN, Schaefer EJ. Familial lipoprotein disorders in patients with coronary disease. *Circulation* 1992; 85: 2025-33.
19. Aguilar-Salinas CA, Olaiz G, Valles V, Rios T JM, Gómez P FJ, Rull JA, Rojas R, Franco A, Sepúlveda J. High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *J Lipid Res* 2001; 42: 1298-334.
20. Gordon D, Rifkind BM. Current concepts: High density lipoproteins the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med* 1989; 321: 1311-15.
21. Tall AR, Plasma high-density lipoproteins. Metabolism and relationship to atherogenesis. *J Clin Invest* 1990; 86: 370-84.

22. Genest J, Marcil M, Yu L. High density lipoproteins in health and disease. *J Invest Med* 1999; 47: 31-42
23. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein E, Huang Y. High density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease. The PROCAM experience and pathophysiological implication for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 1996; 124: S11-20
24. Von Eckardstein A, Assmann G. Prevention of coronary heart disease by rising of high density lipoprotein cholesterol. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 627-37.
25. Von Eckardstein A, Nofer J-R, Assmann G. acceleration of reverse cholesterol transport. *Curr Opin Cardiol* 2000; 15: 384-94
26. Von Eckardstein A, Nofer J-R, Assmann G. HDL and atherosclerosis: role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 13-27.
27. Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis*. 1993 Dec; 104(1-2):129-35.
28. Mackness MI, Walker CH. "A"-esterase activity in the lipoprotein fraction of sheep serum. *Biochem Pharmacol* 1981;30:903-6
29. Blatter M-C, James RW, Messmer S, Barja F, Pometta D. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-85: identity of K-85 with paraoxonase. *Eur J Biochem* 1993; 211: 871-79
30. Navab M, Berliner JA, Subbanagounder G, Hama SY, Lusis AJ, Castellani LW, Reddy S, Shi W, Watson AD, Van Lenten BJ, Vora D, Fogelman AM. HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 481-88

31. Nagano Y, Arai H, Kita T. High density lipoprotein loses its effect to stimulate efflux of cholesterol from foam cells after oxidative modification. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6457-61.
32. Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S et al: Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 1998; 394: 284-87.
33. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem* 2000; 275: 1752-57.
34. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du B, Faull KF, Fogelman AM. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 96: 2882- 91.
35. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett* 1998; 423: 57-60.
36. Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation* 2000; 101: 2510- 17.
37. Parthasarathy S, Barnett J, Fong LG. High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1044: 275- 83.
38. Navab M, Imes SS, Hama SY, Hough GP, Ross LA, Bork RW, Valente AJ, Berliner JA, Drinkwater DC, Laks H, Fogelman AM. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in co-cultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest* 1991; 88: 2039- 46.

39. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1987- 94.
40. Calabresi L, Francéschini G, Sirtori CR, De Palma A, Saresella M, Ferrante P, Taramelli D. Inhibition of VCAM-1 expression in endothelial cells by reconstituted high density lipoproteins. *Biochim Biophys Res Commun* 1997; 238: 61- 5.
41. Hamilton KK, Zhao J, Sims PJ. Interaction between apolipoproteins A-I and A-II and the membrane attack complex of complement: affinity of the apoproteins for polymeric C9. *J Biol Chem* 1993; 268: 3632- 38
42. Dimayuga P, Zhu J, Oguchi S et al. Reconstituted HDL containing human apolipoprotein A-I reduces VCAM-1 expression and neointima formation following periadventitial cuff-induced carotid injury in apo E null mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264: 465- 68.
43. Zhang X, Zhao SP, Li XP, Gao M, Zhou QC. Endothelium-dependent and – independent functions are impaired in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2000; 149: 19- 24.
44. Li XP, Zhao SP, Zhang XY, Liu L, Gao M, Zhou QC. Protective effect of high density lipoprotein on endothelium-dependent vasodilation. *Int J Cardiol* 2000; 73: 231- 36.
45. Franceschini G., Sirtori CR., Capurso A., Weisgraber KH., Mahley RW. A-I Milano Apoprotein . Decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. *J Clin Invest* 1980; 66: 892- 900.
46. Genest J. JR, Bard JM., Fruchart JC, Ordovas JM, Schaefer EJ. Familial hypoalphalipoproteinemia in premature coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 1728- 1737.
47. El Khalil L, Majd Z., Bakir R, Perez O, Castro G. Poulain, P, Lacroix, B, Duhal, N, Fruchart, JC, Luc, G. Fish-eye disease: structural and in vivo metabolic abnormalities of high-density lipoproteins. *Metabolism* 1997; 46: 474-83.

48. Frick MH, Elo O, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P, Huttunen JK, Kaitaniemi P, Koskinen P, Manninen V. Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* 1987; 317: 11237-45.
49. Rubins HB, Robins SJ, Collins D. Gemfibrozil for the secondary prevention of CAD in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol: Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N Engl J Med* 1999; 341: 410-18.
50. Vu-Dac N, Schoonjans K, Laine B, Fruchart JC, Auwerx J, Staels B. Negative Regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element. *J Biol Chem* 1994; 269: 3101-8.
51. Staels B., Dallongeville J., Dallongeville. Mechanism of action of Fibrates on Lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation*. 1998; 98: 2088-93.
52. Vu-Dac N, Schoonjans K, Kosykh V, Dallongeville J, Fruchart JC, Staels B, Auwerx J. Fibrates increase human apolipoprotein A-I expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J Clin Invest* 1995; 96: 741-50.
53. Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S, Mallat Z, Antonucci M, Poulain P, Chapman J, Fruchart JC, Tedgui A, Najib-Fruchart J, Staels B. CLA-1/SR-B1 is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation* 2000; 101: 2411-17.
54. Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, Teissier E, Minnich A, Jaye M, Duverger N. PPAR- α and PPAR- γ activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA-1 pathway. *Nat Med* 2001; 7: 53-58.
55. Bouly M, Masson D, Gross B, Jiang X-c, Fievet C, Castro G, Tall AR, Fruchart JC, Stael B, Lagrost L, Luc G. Induction of the phospholipid transfer protein gene accounts for the high density lipoprotein enlargement in mice treated with fenofibrate. *J Biol Chem* 2001; 276: 25841-847.

56. Staels B, Peinado-Onsurbe J, Auwerx J. Down-regulation of hepatic lipase gene expression and activity by fenofibrate. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1123: 227-30.
57. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *Embo J* 1996; 15: 5336- 48.
58. Mann CJ, Yen FT, Grant AM, Bihain BE. Mechanism of plasma cholesteryl ester transfer in hypertriglyceridemia. *J Clin Invest* 1991; 88: 2059- 66.
59. Ness GC, Lopez D, Chambers CM, Newsome WP, Cornelius P, Long CA, Harwood HJJ. Effects of L-triiodothyronine and the thyromimetic L-94901 on serum lipoprotein levels and hepatic low-density lipoprotein receptor, 3- hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and apo A-I gene expression. *Biochem Pharmacol.* 1998; 56:121- 29.
60. Ozata M., Yildirimkaya M., Yilmaz K., Kutluay T., Corakci A., Gundogan MA. The effect of thyroid status on serum apolipoprotein A-I containing lipoprotein particles. *Horm Metab Res* 1998; 30: 217- 21.
61. Muls E, Rosseneu M, Blaton V, Lesaffre E, Lambergts G, de Moor P. Serum lipids and apolipoproteins A-I, A-II and B in primary hypothyroidism before and during treatment. *Eur J Clin Invest* 1984; 14: 12- 15.
62. O'Brien T, Katz K, Hodge D, Nguyen TT, Kotke BA, Hay ID, The effect of treatment of hypothyroidism and hyperthyroidism on plasma lipids and apolipoproteins AI, AII, and E. *Clin Endocrinol* 1997; 4: 17- 20.
63. Valdemarsson SPH, Nilsson- Ehle P. 1982. Reversal of decreased hepatic lipase and lipoprotein lipase activities after treatment hypothyroides. *Eur J Clin Invest* 12: 423- 28.
64. Tan KC, Shiu SW, Kung AW. Effect of thyroid dysfunction on high-density lipoprotein subfraction metabolism: roles of hepatic lipase and cholesteryl ester transfer protein. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2921- 24.

65. Dullaart RP, Hoogenberg K, Groener JE, Dikkeschei LD, Erkelens DW, Doorenbos H. The activity of cholesteryl ester transfer protein is decreased in hypothyroidism: a possible contribution to alterations in high-density lipoproteins. *Eur J Clin Invest.* 1990; 20: 581- 87.
66. Kurasawa, T, Yokoyama, S, Miyake, Y, Yamamura, T, Yamamoto, A. Rate of cholesteryl ester transfer between high and low density lipoproteins in human serum and a case with decreased transfer rate in association with hyperalphalipoproteinemia. *J Biochem* 1985; 98: 1499- 508.
67. Brown, ML, Inazu, A, Hesler, CB, Agellon, LB, Mann, C, Whitlock, ME, Marcel, YL, Milne, RW, Koizumi, J, Mabuchi, H. Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins. *Nature* 1989; 342: 448- 51.
68. Apostolopoulos, JJ, Marshall, JF, Howlett, GJ. Triiodothyronine increases rat apolipoprotein A-I synthesis and alters high-density lipoprotein composition in vivo. *Eur J Biochem* 1990; 194: 147- 54.
69. Schaefer JR, Rader DJ, Brewer HB Jr. Investigation of lipoprotein kinetics using endogenous labeling with stable isotopes. *Curr Opin Lipidol* 1992; 3: 227- 32
70. Thompson GN, Pacy PJ, Ford GC, Merritt H, Halliday D. Relationships between plasma isotope enrichments of leucine and alpha-ketoisocaproic acid during continuous infusion of labelled leucine. *Eur J Clin Invest.* 1988 Dec; 18: 639- 43.
71. Lichtenstein AH, Cohn JS, Haachey DL, Millar JS, Ordovas JM and Schaefer EJ. Comparison of deuterated leucine, valine, and lysine in the measurement of human apolipoproteins A-I and B-100 kinetics. *J Lipid Res* 1990; 31: 1693- 1701.
72. Ikewaki K, Rader DJ, Schaefer JR, Fairwell T, Zech LA, Brewer Jr HB. Evaluation of apo A-I kinetics in humans using simultaneous endogenous stable isotope and exogenous radiotracer methods. *J Lipid Res* 1993; 34; 2207- 15.
73. Berman M, Weiss M. SAAM Manual. 1978: 78-180. DHEW Publ. No. (NIH). National Institutes of Health Bethesda, MD

74. Franco M, Tapia E, Martinez F, Davila ME, Grimaldo JI, Medina K, Herrera-Acosta J. Adenosine regulates renal nitric oxide production in hypothyroid rats. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1681- 88.
75. Lowry OH, Rosebrough HJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
76. Tailleux A, Torpier G, Caron B, Fruchart JC, Fievet C. Immunological properties of apo B- containing lipoprotein particles in human atherosclerotic arteries. *Lipid Res* 1993; 34: 719- 28.
77. Bengtsson-Olivercrona G, Olivecrona T. Assay of lipoprotein lipase and hepatic lipase. In *Lipoprotein Analysis A Practical Approach*. (Ed Converse CA, Skinner ER). Oxford University Press 1992: 168- 85.
78. Chen C, Albers JJ. Characterization of proteoliposome containing apolipoprotein A-I: a new substrate for the measurement of lecithin cholesterol acyltransferase activity. *J Lipid Res*. 1982; 23: 680-91.
79. Kung AW, Pang RW, Janus ED. Elevated serum lipoprotein (a) in subclinical hypothyroidism. *Clin Endocrinol* 1995; 43: 445-49.
80. Tan KC, Shiu SW, Kung AW. Plasma cholesteryl ester transfer protein activity in hyper- and Hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 140- 43.
81. Rader DJ, Castro G, Zech LA, Fruchart JC, Brewer HBJ. In vivo metabolism of apolipoprotein A-I on high density lipoprotein particles Lp A-I and Lp A-I, A-II. *J Lipid Res* 1991; 32: 1849- 59.
82. Braschi S, Neville TA, Vohl MC, Sparks DL. Apolipoprotein A-I charge and conformation regulate the clearance of reconstituted high density lipoprotein in vivo. *J Lipid Res* 1999; 40: 522- 32.
83. Colvin P, Moriguchi E, Barrett H, Parks J, Rudel L. Production rate determines plasma concentration of large high density lipoprotein in non-human primates. *J Lipid Res*. 1998; 39: 2076- 85.

84. Colvin PL, Moriguchi E, Barrett PH, Parks JS, Rudel LL. Small HDL particles containing two apo A-I molecules are precursors in vivo to medium and large HDL particles containing three and four apo A-I molecules in nonhuman primates. *J Lipid Res* 1999; 40: 1782- 92.
85. Ness GC, Lopez D, Chambers CM, Newsome WP, Cornelius P, Long CA, Harwood HJJ. Effects of L-triiodothyronine and the thyromimetic L-94901 on serum lipoprotein levels and hepatic low-density lipoprotein receptor, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and apo A-I gene expression. *Biochem Pharmacol* 1998; 56: 121- 29.
86. Staels B, Van Tol A, Chan L et al: Alterations in thyroid status modulate apolipoprotein, hepatic triglyceride lipase, and low density lipoprotein receptor in rats. *Endocrinology* 1990; 127:1144- 52.
87. Dory D, Roheim PS. Rat plasma lipoproteins and apolipoproteins in experimental hypothyroidism. *J Lipid Res* 1981; 22: 287-96
88. Meyer BJ, Ha YC, Barter PJ. Effect of experimental hypothyroidism on the distribution of lipids and lipoproteins in the plasma of rats. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1004: 73- 79.
89. Lin-Lee YC, Soyak SM, Surguchov A, Sanders S, Strobl W, Patsch W. Thyroid hormone influences conditional transcript elongation of the apolipoprotein A-I gene in rat liver. *J Lipid Res* 1995; 36: 1586- 94.
90. Fong BS, Greco AV, Angel A. Hypothyroidism reduces HDL binding to rat liver cells. *Atherosclerosis* 1989; 79: 1- 8.
91. Davidson NO, Carlos RC, Drewek MJ, Parmer TG. Apolipoprotein gene expression in the rat is regulated in a tissue-specific manner by thyroid hormone. *J Lipid Res* 1988; 29: 1511- 22.
92. Von Eckardstein A. Jauhiainen M, Huang Y, Metso J, Langer C, Pusinen P, Wu S, Ehnholm, Assmann G. Phospholipid transfer for protein mediated conversion of high

- density lipoproteins generates pre- β 1-HDL. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1301: 255-62
93. Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, de la Llera Moya M, Phillips MC, Rothblat GH, Swaney JB, Tall A. Scavenger receptor B1 promotes high density lipoproteins, mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem* 1997; 272: 20982- 85
 94. Fournier N, Paul JL, Atger V, Cogny A, Sony T, de la Llera Moya M, Rothblat G, Moatti N. HDL phospholipid content and composition as a major factor determining cholesterol efflux capacity from Fu5AH cells to human serum. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2685- 91.
 95. Ridgway ND, Dolphin PJ. Serum activity and hepatic secretion of lecithin:cholesterol acyltransferase in experimental hypothyroidism and hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 1985; 26: 1300- 13
 96. Lee M, Kim JQ, Oh H, Park M. Studies on plasma lipid profiles and LCAT and CETP activities according to hyperlipoproteinemia phenotypes (HLP). *Atherosclerosis* 2001; 159: 381-89.
 97. Tan KC, Shiu SW, Kung AW. Plasma Cholesteryl ester transfer Protein Activity in hyper- and Hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 140- 43.
 98. Pazos F, Alvarez JJ, Rubies-Prat J, Varela C, Lasuncion MA. Long-term thyroid replacement therapy and level of lipoprotein (a) and other lipoproteins. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 652-56.
 99. Fan J, Wang J, Bensadoun A et al. Overexpression of hepatic lipase transgenic rabbits leads to a marked reduction of plasma high density lipoproteins and intermediate density lipoproteins. *Proc Natl Sci USA* 1994; 91: 8724- 28
 100. Marques- Vidal P, Azema A, Collet X, Chap H and Perret BP. Hepatic lipase-mediated hydrolysis versus liver uptake of HDL phospholipids and triacylglycerols by perfused rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1082: 185- 94.

101. Strobl W, Gorder NL, Lin-Lee YC, Gotto AMJ, Patsch W. Role of thyroid hormones in apolipoprotein A-I gene expression in rat liver. *J Clin Invest* 1990; 85: 659- 67.
102. Frenais R, Ouguerram K, Maugeais C, Marchini JS, Benlian P, Bard JM. Apolipoprotein A-I kinetics in heterozygous familial hypercholesterolemia: a stable isotope study. *J Lipid Res* 1999; 40: 1506- 11.
103. Brown, ML, Inazu, A, Hesler, CB, Agellon, LB, Mann, C, Whitlock, ME, Marcel, YL, Milne, RW, Koizumi, J, Mabuchi, H. Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins. *Nature* 1989; 342: 448- 51.
104. Dullaart, RP, Hoogenberg, K, Groener, JE, Dikkeschei, LD, Erkelens, DW, Doorenbos, H. The activity of cholesteryl ester transfer protein is decreased in hypothyroidism: a possible contribution to alterations in high-density lipoproteins. *Eur J Clin Invest* 1990; 20: 581- 87.
105. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955; 34: 1345-53.
106. Tollefson JH, Albers JJ. Isolation, characterization and assay of plasma lipid transfer proteins. In. Albers JJ, Segrest JP, eds. *Methods of Enzymology*. New York. NY:Academic Press Inc; 1994: 797- 81.
107. Tato F, Vega GL, Tall A, Grundy SM. Relationship between cholesterol ester transfer protein activities and lipoprotein cholesterol in patients with hypercholesterolemia and combined hiperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 112- 20.
108. Lagrost L, Athias A, Herbeth B, Guyard-Dangremont V, Artur Y, Paille F, Gambert P, Lallemand C. Opposite effects of cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein on the size distribution of plasma high density lipoproteins. *J Biol Chem* 1996; 271: 19058- 65
109. Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Human Genet*. 1983; 35: 1126- 38

110. Pérez-Méndez O, Luc G, Posadas-Romero C. Concentraciones bajas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en plasma y enfermedad arterial coronaria. *Arch Cardiol Mex.* 2000; 70: 312- 21.
111. Lambb RG, Koch JC, Bush SR. An enzymatic explanation of the differential effects of oleate and gembrozil on cultured hepatocyte triacylglycerol and phosphatidylcholine biosynthesis and secretion. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1165: 299- 305.
112. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J. PPAR alpha and PPAR gamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J* 1996; 15: 5336- 48.
113. Galeano NF, Milner R, Marcel YL, Walsh MT, Levy E, Ngu`yen TD. Apolipoprotein B structure and receptor recognition of triglyceride-rich low density lipoprotein (LDL) is modified in samall LDL but not in triglyceride-rich LDL of normal size. *J Biol Chem* 1994; 269: 511- 19
114. Vu-Dac N, Chopin-Delannoy S, Steals B. The nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor alpha and Rev-erbalpha mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates. *J Biol Chem* 1998; 273: 25713- 20.
115. Mann CJ, Yen FT, Grant AM, Bihain BE. Mechanism of plasma cholesteryl ester transfer in hypertriglyceridemia. *J Clin Invest* 1991; 88: 2059- 66.
116. Rye K-A, Clay MA, Barter PJ. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis* 1999; 145: 227- 38.
117. Bouly M, Masson D, Gross B, Jiang X-c, Fievet C, Castro G, Tall AR, Fruchart JC, Stael B, Lagrost L, Luc G. Induction of the phospholipid transfer protein gene accounts for the high density lipoprotein enlargemen in mice treated with fenofibrate. *J Biol Chem* 2001; 276: 25841- 47.
118. Tofellson JH, TRavnik S, Albers JJ. Isolation and charectrization of a phospholipids transfer protein (LTP-II) from human plasma. *J Lip Res* 1988; 29:1593- 602.

119. Cheung MC, Wolfbaeur G, Albers JJ. Plasma phospholipids mass transfer rate: relationship to plasma phospholipids and cholesteryl ester transfer activities and lipid parameters. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1303: 103- 10.
120. Lusa S, Jauhiainen M, Metso J, Somerharju P, Ehnholm C. The mechanism of human plasma phospholipids transfer protein-induced enlargement of high density lipoprotein particles: evidence for particle fusion. *J Biochem* 1996; 313: 275- 78.
121. Webb NR, Cai L, Ziemba KS, Yu J, Kindy MS, van der Westhuyzen DR, de Beer FC. The fate of HDL particles in vivo after SR-BI-mediated selective lipid uptake. *J Lipid Res* 2002; 43:1890- 98.
122. Mardones P, Pilon A, Bouly M, Duran D, Nishimoto T, Arai H, Kozarsky KF, Altayo M, Miquel JF, Luc G, Clavey V, Staels B, Rigotti A. Fibrates down-regulate hepatic scavenger receptor class B type I protein expression in mice. *J Biol Chem* 2003; 278:7884- 90
123. Brinton EA, Eisenberg S, Bresslow JL. Human HDL cholesterol levels are determined by apo A-I fractional catabolic rate, which correlates inversely with estimates of HDL particle size: effects of gender, hepatic and lipoprotein lipases, triglyceride and insulin levels, and body fat distribution. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 707- 20.
124. Velez-Carrasco W, Lichtenstein HA, Li Z, Dolnikowski GG, Lamon-Fava S, Welty KF, Schaefer JE. Apolipoprotein A-I and A-II kinetic Parameters as assessed by endogenous labeling with [²H₃] leucine in middle-aged and elderly men and women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 801- 06.
125. Perez-Mendez O, Castro, G Fruchart, J, Luc, G. Kinetic and Metabolic studies of apo A-I and apo A-II in a hypoalphalipoproteinemic patient. *Eur J Neurology* 1995; 2 (Suppl 2): 77.
126. Huesca-Gómez C, Franco M, Luc G, Montaña LF, Massó F, Posadas-Romero C, Pérez-Méndez O. Chronic hypothyroidism induces abnormal structure of high-density lipoproteins and impaired kinetics of apolipoproteína A-I in the Rat. *Metabolism* 2002; 51: 443- 50.

127. Kozyraki R, Fyfe J, Kristiansen M, Gerdes C, Jacobsen C, Cui SY, Christensen EI, Aminoff M, de la Chapelle A, Krahe R. The intrinsic factor-vitamin B-12 receptor, cubilin, is a high-affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein. *Nat Med* 1999; 5: 656- 61.
128. Nofer JR, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G, von Eckardstein A. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 2002; 161: 1-16.
129. Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1881- 82.
130. Castro G, Nihoul LP, Dengremont C, de Geitere C, Delfly B, Tailleux A, Fievet C, Duverger N, Deneffe P, Fruchart JC, Rubin EM. Cholesterol efflux, lecithin-cholesterol acyltransferase activity, and pre-beta particle formation by serum from human apolipoprotein A-I and apolipoprotein A-I/apolipoprotein A-II transgenic mice consistent with the latter being less effective for reverse cholesterol transport. *Biochemistry* 1997; 36: :2243-49
131. Perez-Mendez O, Huesca- Gomez C. El papel antiaterogénico de la Paraoxonasa 1. *REB* 2002; 21: 245-51.
132. Davidson WS, Rodriguez WW, Lund-Katz S, Johnson WJ, Rothblat GH, Phillips MC. Effects of acceptor particle size on the efflux of cellular free cholesterol. *J Biol Chem*. 1995; 270: 17106- 13.
133. Turay J, Grniakova V, Valka J. Changes in paraoxonase and apolipoproteína A-I, B, C-III and E in subjects with combined familiar hyperlipoproteinemia treated with ciprofibrato. *Drug Exptl Clin Res* 2000; 3: 83- 88.
134. Sparrow JT, Gotto AM. Apolipoprotein/lipid interactions: studies with synthetic polypeptides. *Crit Rev Biochem* 1982; 13: 87-107.

135. Sparrow JT, Gotto AM, Phospholipid studies with synthetic apolipoprotein fragments.
Dans Lipoprotein Structure. (A.M. Scanu et F.R.Landsberger eds)Ann.NY. Acad. Sci.
1980 348: 187-211.

APÉNDICES

APÉNDICE 1

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS MÉTODO DE LOWRY ⁷⁵

SOLUCIONES

- ◆ -Solución de Na_2CO_3 : 20 % en H_2O
- ◆ -Solución de tartrato de Na y K: 1 g + $\text{CuSO}_4 \cdot 0.5\text{g}$
- ◆ -Solución de NaOH 0.8N: 16g en 500 mL H_2O
- ◆ -Solución de SDS al 10%
- ◆ -Solución patrón de albúmina: 1 mg/mL

- ◆ -Solución A. Preparar al momento
 - 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

TECNICA

CURVA PATRÓN

TUBO	1	2	3	4	5	6	muestra
MUESTRA(μL)	0	0	0	0	0	0	20
ST (μL)	0	10	20	40	80	100	0
H_2O (μL)	100	90	80	60	20	0	80
Solución A (mL)	1	1	1	1	1	1	1
		M E Z C L A R					
		I N C U B A R 10 MINUTOS					
		EN OSCURIDAD, A TEMP. AMBIENTE					
React. Folin 1/6(μl)	500	500	500	500	500	500	500
		I N C U B A R 30 MINUTOS					
		EN OSCURIDAD, A TEMP. AMBIENTE					

LECTURA

Leer a una longitud de onda de 750 nm

DETERMINACIÓN DE LOS RESULTADOS

Trazar una gráfica de concentración contra absorbencia con los datos de la curva patrón. Interpolarse la absorbencia de las muestras en la gráfica para determinar la concentración correspondiente.

APÉNDICE 2

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE) EN CONDICIONES NATIVAS

SOLUCIONES

Solución amortiguadora de muestra

Sacarosa 50% + Azul de bromofenol al 0.05% c.b.p. 20 mL

A= Tris 0.09 M + Ac. Borico 0.08M + EDTA 3mM pH 8.35

B= 48 g acrilamida + 1.28g bisacrilamida c.b.p. 100mL

C= persulfato de amonio 10%

	4%	30%
	5 mL	5 MI
Sol A	0.5 mL	0.5 MI
Sol. B	400 µL	3 MI
H ₂ O ₂ d	4.1 mL	750 µL
GLICEROL	---	750 µL
TEMED	4 µL	4 µL
SOL. C	20 µL	20 µL

Depositar 20µg de proteína/ 1µL de buffer de muestra.

- 1) Utilizar estándares de proteínas de alto peso molecular
- 2) Migrar 15 min a 20 V(para concentrar las muestras)
- 3) Migrar 15 min a 70 V (para que entren las muestras al gel)
- 4) Migrar a 18 h a 120 V
- 5) Teñir el gel con azul de Coomasie

APÉNDICE 3

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE-SDS)

SOLUCIONES

- A= 36.3g Tris-HCl c.b.p. 100mL pH 8.9
B= 48 g acrilamida + 1.28g bisacrilamida c.b.p. 100mL
C= SDS 10%
D= persulfato de amonio 10%
E= 39.4g Tris + 2g SDS c.b.p. 100mL pH 6.8

VLDL

	3% 4 mL	19% 4 mL	St 3.5 mL
Sol A	1.0 mL	1.0 mL	---
Sol B	240 µL	1.6 mL	300 µL
H₂O₂ d	2.76 mL	400 µL	1.5mL
GLICEROL	----	1 mL	---
Sol C	40 µL	40 µL	---
Sol. E	---		2 mL
TEMED	5 µL	5 µL	6 µL
Sol D	25 µL	25 µL	40 µL

Depositar 200µg de proteína/ 150µL de buffer de muestra + β-mercaptoetanol 5%

- 1) Utilizar estándares de proteínas de bajo peso molecular
- 2) Migrar 30 min a 40 V (para que entren las muestras al gel concentrador)
- 3) Migrar 2.30h a 90 V (hasta que salga el frente de corrida del gel)
- 4) Teñir el gel con azul de Coomasie

HDL

	4% 4 mL	21% 4 mL	St 3.5 mL
Sol A	1.0 mL	1.0 mL	---
Sol B	320 µL	1.77 mL	300 µL
H₂O₂ d	2.68 mL	230 µL	1.5 mL
GLICEROL	----	1 mL	---
Sol C	40 µL	40 µL	---
Sol E	---		2 mL
TEMED	5 µL	5 µL	6 µL
Sol D	25 µL	25 µL	40 µL

Depositar 200µg de proteína/ 150µL de buffer de muestra + 5% de β-mercaptoetanol.

- 1) Utilizar estándares de proteínas de bajo peso molecular
- 2) Migrar 30 min a 40 V (para que entren las muestras al gel)
- 3) Migrar 2h a 90 V
- 4) Teñir el gel con azul de Coomasie.

APÉNDICE 4

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LCAT ⁷⁸

MUESTRA

Plasma fresco o conservado a -70°C

REACTIVOS

Solución amortiguadora de ensayo	
Tris-HCl	10mM
Na Cl	140mM
EDTA Na ₂	1mM
Lecitina	10 mg/mL en CHCl ₃ – MeOH (9:1 v/v)
Colesterol	1mg/mL en hexano redestilado.
[³ H] Colesterol:	55 μCi/μmol, 100 55 μCi/μmol.
Apo A-I humana	1mg/mL en buffer de ensayo.
Colato de sodio :	0.725M en buffer de ensayo
Albúmina sérica humana	: 2% (w/v) en buffer de ensayo
Mercaptoetanol	0.1M
CHCl ₃ – MeOH	(2:1 v/v).

PREPARACIÓN DEL SUSTRATO DE PROTEOLISOSOMA MARCADO

1. Pipetear en un tubo de ensayo
870μL de lecitina
250μL de colesterol
20 μL de colesterol marcado
Evaporar el disolvente con N₂, manteniendo en agitación en vortex
2. En otro tubo de ensayo pipetear
1.7 mL de buffer de ensayo
1 mL de apo A-I
340 μL de solución de colato.
Mezclar 1 minuto en vortex a temperatura ambiente (verificar que se disuelva la apo A-I)
3. Adicionar el segundo tubo al primer, sin dejar de mezclar por un minuto
4. Dializar, cambiando 4 veces al día (1 litro por cada cambio) de buffer de ensayo, durante 3-4 días a 4 °C , asegurando remover completamente el colato.
5. Ajustar el volumen del dializado a 4.5 mL con buffer de ensayo.
El sustrato puede ser usado inmediatamente o almacenado en alícuotas de 0.1 mL a - 20°C por 3 semanas.*

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LCAT.

- En un tubo con tapón de rosca pipetear
235 μL de buffer de ensayo
125 μL de HSA al 2% en buffer de ensayo
100 μL del proteolisosoma *.
- Preincubar a 37°C, 20 min.
- Añadir 25μL de mercaptoetanol 0.1M
15μL de plasma problema (o buffer de ensayo para blanco)
- Mezclar e incubar a 37°C **exactamente 1 h.**

- Parar la reacción con 3.75 mL de CHCl_3 -MeOH (2/1 v/v),
- Adicionar 15 μL de la mezcla de Estándares (col libre 1mg/mL y esterificado1mg/mL)
- Añadir 1.25 mL de CHCl_3 y 1.25 mL de H_2O .
- Centrifugar los tubos 15 min a 3000 r.p.m
- Separar la fase superior y las proteínas desnaturalizadas desde la interfase por aspiración.
- Transferir la fase de cloroformo (de abajo) a un tubo de vidrio de 50 x 12 mm, que contenga unas gotas de MeOH (asegurando una fase del solvente)
- Evaporar el solvente casi a sequedad bajo N_2 .

SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA (TLC) Y CUANTIFICACIÓN DE COLESTEROL LIBRE Y ESTERIFICADO

1. Preparar la cámara de separación, 1 hr antes de usarlo, forrándolo con papel Whatman 3MM y añadiendo 100 mL del solvente de corrida (éter de petróleo/ éter etílico / ácido acético 90:10:5 por volumen), humedeciendo el papel en el proceso, cerrar el tanque fuertemente poniendo algo pesado en la tapa.
2. Dividir una placa de silica gel
3. Usando una microjeringa tomar cada muestra y aplicarla, aproximadamente 1.5 cm. de ancho y 2 cm. Sobre el botón de cada aplicación. Después de aplicar cada muestra lavar la jeringa varias veces con cloroformo-metanol (2:1 v/v).
4. Colocar una o dos placas en el tanque, cerrar y dejar desarrollar, a 1 cm de la superficie.
5. Remover cada placa, secar por 5 min y colocar en un tanque de vidrio que contenga algunos cristales de I_2 . Los lípidos separados son teñidos de amarillo/café.
6. Marcando la posición de l colesterol (UC) y del colesterol esterificado (CE) por comparación con el ST. (Los R_f son aprox. 0.5 y 0.8 respectivamente) hay que permitir que el I_2 se evapore
7. Cortar cada banda con tijeras, transferir a un vial y añadir 10 mL de un líquido de centelleo basado en tolueno.
8. Mezclar y contar la radiactividad en cada vial, usando un método apropiado usado para isótopos.

DETERMINACIÓN DE LOS RESULTADOS

Después de contar la actividad del UC y del CE, el porcentaje de CE incorporado es calculado.

Y se reportan los resultados como: **nmol de colesterol esterificado/ mL plasma**

APÉNDICE 5

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CETP ¹⁰⁶

MUESTRA

Plasma fresco o conservado a -70°C

REACTIVOS

Solución amortiguadora de ensayo
Tris-HCl 10mM
Na Cl 140mM
EDTA Na₂ 1mM
[³H] Colesterol:
Reactivo precipitante MgCl₂

PREPARACIÓN DEL SUSTRATO

1. El plasma obtenido se ajusta a una $\delta=1.060$ y se centrifuga 2.10h a 110 .000 r.p.m.
2. Separa la fase superior (top) y dializar contra la solución amortiguadora de ensayo
3. Guardar el infranadante (bottom) que se utilizara posteriormente para obtener el donador.
4. Cuantificar proteínas al top dializado

PREPARACIÓN DEL DONADOR ([³H] Colesterol-HDL₃)

1. Ajustar el bottom a $\delta= 1.11$ (HDL₂) y centrifugar 2.35h a 110 .000 r.p.m.
2. Separa el sobrenadante y desecharlo
3. El bottom (HDL₃ y plasma) se dializa contra la solución amortiguadora de ensayo.
4. 50 μCi de [³H] Colesterol se evaporan con N₂ y se redisuelve con 500 μL de etanol.
5. A las HDL₃ obtenidas se les agrega la mezcla etanol- [³H] Colesterol, gota a gota y con una agitación suave.
6. Se incuba 18 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ para la esterificación.
7. Ajustar la mezcla a una $\delta=1.25$ y centrifugar 2.35h a 110 .000 r.p.m.
8. Separa el top, HDL₃ y dializar contra la solución amortiguadora de ensayo.
9. Cuantificar proteínas.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD

1. En un tubo eppendorf pipetear lo equivalente a 120 μg de proteína del donador (³H Colesterol-HDL₃).
2. Agregar 240 μg de proteína del sustrato
3. Agregar 10 μL de plasma
4. Agregar 500 μL de solución amortiguadora.
5. Incubar 16-18h a 37 $^{\circ}\text{C}$
6. Separar 100 μL de la muestra de reacción, transferir a un vial y añadir líquido de centelleo
7. Mezclar y contar la radiactividad en cada vial.
8. Al resto de la mezcla de reacción agregar 50 μL de reactivo precipitante, dejar reposar lo min y centrifugar 10 min a 2500 r.p.m.
9. Separar 100 μL del sobrenadante transferir a un vial y añadir líquido de centelleo
10. Mezclar y contar la radiactividad en cada vial.

DETERMINACIÓN DE LOS RESULTADOS

Ctas pps= Ctas totales – ctas sobrenadante – ctas 100 mL iniciales.

% transferencia= (ctas pps/ctas totales)*100

%transferencia=%trans mtras-%trans bco

APÉNDICE 6

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PLTP ¹⁰⁸

MUESTRA

Plasma fresco o conservado a -70°C

REACTIVOS

- L α -Fosfatidilcolina (Sigma ref; Tipo XVI-E P-3556, 100mg)
- L α -Fosfatidilcolina- marcada
- Acido iodoacetico (Sigma ref: I-4386 10g)
- BHT (Sigma ref: B-1378)
- TRIS
- NaCL
- EDTA
- NaN₃

Solución amortiguadora de ensayo

Tris	10 mM	0.1221g	} pH 7.4
NaCL	150 mM	0.87 g	
EDTA	1 mM	0.03724g	
NaN ₃	0.2g/L	0.02g	

Reactivo precipitante: Heparina de manganeso (445U/mL)

NaCl	1.562g
MnCl ₂ •4H ₂ O (PM 197)	3.592g
Heparina (1000 U/mL)	8.6mL
c.b.p.	50 mL

PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS.

Mezclar	73.5 μ L	Fosfatidilcolina (10 μ mol)
	20 μ L	Fosfatidilcolina marcada (10 nmol-100 mCi/mmol)
	100 μ L	BHT (1 nmol/ μ L)

PONER TUBOS EN HIELO

Evaporar la mezcla con nitrógeno durante 10 minutos

Agregar 0.5 mL de TBS y mezclar en vortex

Agregar 0.5 mL de TBS y mezclar en vortex

Transvasar el contenido a un tubo cónico

Sonicar la mezcla (35 pulsos, 5 minutos)

Esperar 1 minuto

Sonicar la mezcla (35 pulsos, 5 minutos)

Esperar 1 minuto

Sonicar la mezcla (35 pulsos, 5 minutos)

Transvasar el contenido a un tubo eppendorff de 1.5 mL

Centrifugar 10 minutos a 15.000 r.p.m

Separar el sobrenadante (~1 mL) conteniendo los liposomas marcados.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PLTP

Manipular en hielo

TOTAL

Mezclar 10 µL de liposomas marcados
690 µL de TBS

Medir la radiactividad en 500 µL de la mezcla.

MUESTRAS.

Mezclar 10 µL de liposomas marcados
30 µL de muestra (plasma)
40 µL de ácido iodoacético
Agitar e incubar 30 min a 37°C

Para parar la reacción agregar 300 µL de heparina de manganeso (445U/mL)
320 µL de TBS

Agitar en Vortex 10 minutos.

Centrifugar 10 minutos a 13 000 r.p.m.

Meter los tubos en hielo y medir la radiactividad en 500 µL de la mezcla.

BLANCO DE MUESTRA.

Mezclar 10 µL de liposomas marcados
30 µL de muestra (plasma)
40 µL de ácido iodoacético
Agitar e incubar 30 min a 4°C

Para parar la reacción agregar 300 µL de heparina de manganeso (445U/mL)
320 µL de TBS

Agitar en Vortex 10 minutos.

Centrifugar 10 minutos a 13 000 r.p.m.

Meter los tubos en hielo y medir la radiactividad en 500 µL de la mezcla.

DETERMINACIÓN DE LOS RESULTADOS.

A partir de las cuentas efectuadas en 500 µL, determinar el % de transferencia de los liposomas marcados a las HDL.

$$\% \text{ Transferencia} = \frac{\text{D.p.m muestras} - \text{D.p.m blanco}}{\text{D.p.m total}} \times 100$$

EXPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD PLTP

Calcular en % de transferencia / h/ mL de plasma

O en nmol de fosfolípidos transferidos/h/ mL de plasma

$$\frac{100 \text{ nmol} \times (\text{D.p.m muestra} - \text{D.p.m Blanco}) \times 100}{\text{D.p.m Total} \times 30}$$

APÈNDICE 7

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PARAOXONASA ¹⁰⁹

MUESTRA

Suero fresco o conservado a -70°C

SOLUCIONES

Solución amortiguadora.

1. PON

Glicina-NaOH 50 mM
CaCl₂ 1.0 mM
pH = 10

PREPARACIÓN DEL SUSTRATO (Prepararse al momento de realizar la determinación)

- 1) Sustrato basal de paraoxonasa
Agrega 1.0 mM de paraoxón a 10 mL de buffer PON

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD

Actividad de paraoxonasa basal

Diluir a la $\frac{1}{2}$ las muestras en eserina 10-5 M

1. Diluir 20 μL de la muestra en 1 mL de sustrato PON
2. Mezclar y esperar 1 minuto
3. Seguir la cinética c/30 seg. por 3 minutos a 412 nM

DETERMINACIÓN DE LOS RESULTADOS

- 1) Actividad paraoxonasa (nmol p-nitrofenol/min/mL suero)
 ϵ paraoxón = $18\,290\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
Actividad = $(\Delta\ \text{DO} / \epsilon) \times 10^6 \times 50 \times \text{dilución}$

APÉNDICE 8

EFLUJO DE COLESTEROL ⁸⁴

MUESTRAS

Suero o plasma diluido 2.5 %
HDL₃ (100 µg/mL)

REACTIVOS

-
- HEPES o PBS
- Tripsina
- Azul de Tripano
- 1^a,2^a(n)-³H colesterol
- Etanol
- NaOH 0.1 M
- Medio completo
 - MEM 95%
 - Suero bovino fetal 7.5%
 - Glutamina 2 mM
 - Penicilina 100 U/mL
 - Streptomocina 100 µg/mL
 - Bicarbonato 2 g/L
- Línea celular FU5AH

MANTENIMIENTO DE LAS CÉLULAS Fu5AH

A partir de un frasco de mantenimiento a confluencia

Resembrar según la necesidad:

25 000 células /mL con 1mL de medio por pozo para las botellas de 24 pozos de 10mm de diámetro (la confluencia es obtenida 3 días después

-Es necesario saber que en general una botella de mantenimiento tiene 20 000 000 de células.

MARCAJE DE LAS CÉLULAS

Utilizamos (1^a2^a(n)-³H) Colesterol que tenga una actividad específica de 40-60 Ci/mmol en tubos de 1mCi.

½ µCi/pozo para las cajas de 24 pozos

- X µCi de ³H Colesterol son evaporados con N² en tubos de vidrio estériles
- Añadir 1 mL de etanol en la campana y cerrar con tapón estéril
- Poner 45 a 60 min en baño María 60 °C
- Evaporar con N₂
- Añadir 50µL de etanol en la campana
- Poner 15 a 30 min en baño maría a 60 °C
- Preparar el volumen necesario de SVN necesario para una concentración final de 5% en el medio marcado y diluirlo a la mitad con MEM(1 mL caja 24 pozos)
- Añadir el SVN al 50% en el tubo conteniendo los 50 µL de etanol y el ³H colesterol.
- Agitar, y dejar 30 min en baño María a 37°C
- Aforar enseguida con MEM para alcanzar el volumen final deseado
- Distribuir el medio radiactivo sobre las células a razón de 2mL/pozo
- Dejar el medio marcado por 3 días.

PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS PARA EL EFLUJO.

24h antes del eflujo quitar el medio radiactivo y lavar 3 veces las células con 1mL de HEPES, poner MEM+ BSA a 0.5% (1 mL por pozo)

EFLUJO

- Quitar el MEM+ BSA a 0.5%.
 - Para suero o plasma la muestra se diluye a 2.5%
 - Lavar las células con HEPES (1 mL/pozo)
 - Incubar las muestras diluidas a razón de 500 μ L/pozo para las cajas de 24 pozos y 1 mL/pozo para las cajas de 12 pozos.
 - Se trabaja un testigo negativo (MEM)
 - Un testigo positivo (con HDL3 100 μ g de proteína/mL)
 - un testigo interno (un pool de plasma humano normolipidémico)
 - un testigo de carga o tiempo 0.
 - Se incuba 4 horas
 - Se recupera el medio
 - Se lavan 3 veces las células con HEPES (1 mL/pozo)
 - Se recuperan las células con NaOH 0.1M
 - 500 μ L para los frascos de 24 pozos
 - 1mL para los frascos de 6 pozos
- La mitad de los volúmenes (250 μ L) de medio y 250 μ L de células son puestos en frascos y se les pone líquido de centelleo.

DETERMINACIÓN DE LOS RESULTADOS

El % de eflujo de colesterol es calculado.

$\frac{\text{D.p.m en el medio} \times 100}{\text{D.p.m (medio + células)}}$

APÉNDICE 9

SEPARACIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS DEL PLASMA.

MUESTRA

Plasma fresco.

REACTIVOS

KBr sólido

Soluciones $\delta = 1.006$, $\delta = 1.063$, $\delta = 1.21$

Amortiguador de bicarbonato de amonio 5 mM/L, pH 7.5

a. VLDL

Las VLDL se aislaron a partir de 3 mL de plasma ajustada con 0.8 mL de solución de densidad (δ) 1.006. Se centrifugó a 110 000 r.p.m. a 10°C durante 1.45h. Las VLDL que flotan en la superficie (aprox. 0.7 mL) se recuperaron por aspiración.

Se transfirieron a un tubo nuevo, se añadieron 2 mL de la solución $\delta = 1.006$, y se centrifugaron en las condiciones descritas anteriormente (lavado). Las VLDL se recuperaron por aspiración y se dializaron contra un amortiguador de bicarbonato de amonio 5 mM/L, pH 7.5 durante 2-3 días, cambiando la solución 3-4 veces al día.

b. IDL y LDL

El infranadante del paso a, densidad 1.006, se transfirió a un tubo nuevo y se ajustó la densidad a 1.063 con KBr y se añadió una solución de la misma densidad, $\delta = 1.063$, hasta completar 3.2 mL. Se centrifugó a 110 000 r.p.m. a 10°C durante 2.15h. Se recuperó por aspiración el sobrenadante (IDL con LDL) y se desecho.

d. HDL

La solución restante de densidad 1.063, se transfirió a un tubo nuevo y se ajustó a la densidad de 1.21 con KBr y se añadió una solución de la misma densidad, $\delta = 1.21$, a completar 3.2 mL. Se ultracentrifugó a 110 000 r.p.m. a 10°C durante 2.45h. Se recuperaron por aspiración las HDL, se lavaron y se dializaron contra un amortiguador de bicarbonato de amonio 5 mM/L, pH 7.5 durante 2-3 días, cambiando la solución 3-4 veces al día.

APÉNDICE 10

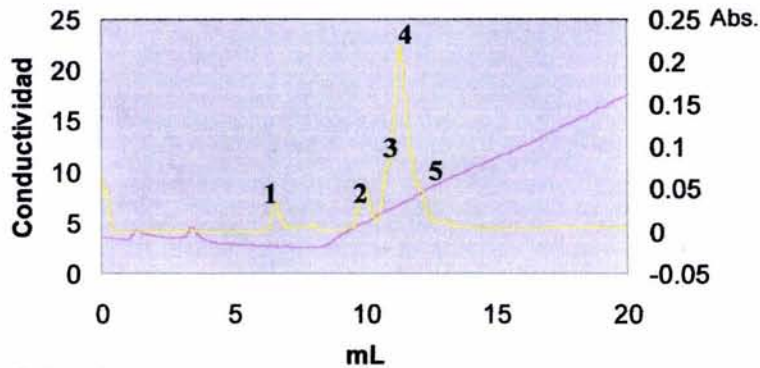
PURIFICACIÓN DE LA APO A-I POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

MUESTRA

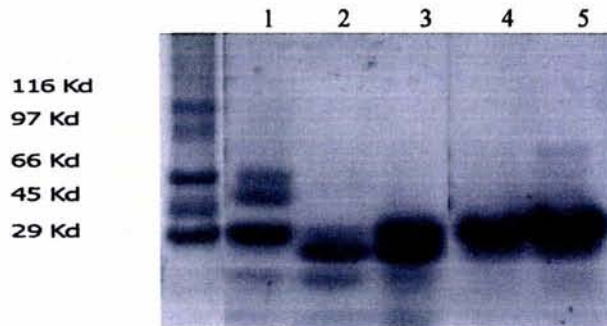
HDL sin lípidos

- Sistema de cromatografía Duo Flow de Bio-Rad.
- Columna UNO Q1
- Buffer A: Tris-HCl 30mM + 6M Urea, pH= 8.
- Buffer B: buffer A + NaCl 100mM
- Gradiente: 50% de Buffer B
- Flujo: 2 mL/min por 15 mL

Cromatograma de la separación de la apo A-I.



Electroforesis de los picos



Las fracciones correspondientes a los picos 3,4, son las que contenían únicamente apo A-I.

Chronic Hypothyroidism Induces Abnormal Structure of High-Density Lipoproteins and Impaired Kinetics of Apolipoprotein A-I in the Rat

Claudia Huesca-Gómez, Martha Franco, Gérald Luc, Luis F. Montañó, Felipe Massó, Carlos Posadas-Romero, and Oscar Pérez-Méndez

Abnormal levels of plasma high-density lipoproteins (HDL) commonly reflect altered metabolism of the major HDL-apolipoprotein A-I (apo A-I). It is well known that thyroid hormones are involved in the regulation of lipoprotein metabolism, inducing significant changes in the concentration, size, and composition of plasma HDL. The purpose of this study was to evaluate the mechanisms responsible of the decreased HDL-apo A-I in chronic thyroidectomized rats (Htx) and to assess the role of HDL structure in apo A-I turnover. Htx rats were found to have a 3-fold increase in low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), whereas HDL-C and apo A-I showed a 25.9% and 22.6% decrease compared to controls ($P < .05$), thus suggesting a defect in HDL metabolism. Turnover studies of apo A-I incorporated into normal HDL, using exogenous ^{125}I -radiolabeling, confirmed an altered fractional catabolic rate (FCR) in Htx rats ($0.097 \pm 0.009 \text{ d}^{-1}$ v $0.154 \pm 0.026 \text{ d}^{-1}$ for Htx and control rats, respectively, $P < .005$). Apo A-I production rates calculated with autologous HDL data showed that apo A-I synthesis was decreased to a higher extent than the already reduced apo A-I catabolism, thus explaining the low apo A-I plasma levels in Htx rats. Composition analysis of HDL-Htx revealed increased phospholipid and apo E content, whereas apo A-IV was diminished. Such structural changes contribute to the reduced apo A-I catabolism as demonstrated with further kinetic turnover studies in normal rats treated with ^{125}I -radiolabeled apo A-I reincorporated into HDL isolated from plasma of Htx rats (FCR, 0.102 ± 0.017 v $0.154 \pm 0.026 \text{ d}^{-1}$, for Htx and normal rats, respectively, $P < .005$). In summary, chronic hypothyroidism in rat a species that lacks cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity is characterized by low HDL-C and apo A-I plasma levels as a result of a low apo A-I production rate that exceeds a decreased FCR. Both structural abnormalities of HDL and changes induced in the animal that affect HDL catabolism contribute to the low FCR of apo A-I in the hypothyroid state. Copyright 2002, Elsevier Science (USA). All rights reserved.

HIGH-DENSITY lipoprotein (HDL) and its major protein, apolipoprotein (apo) A-I play an important role in reverse cholesterol transport (RCT)¹ that explains their negative correlation with the incidence of atherosclerotic heart disease.^{2,3} Considerable heterogeneity in both size and composition has been observed within HDL, some as the result of changes in lipid composition mediated by lipid-modifying enzymes and exchange proteins, others due to the variable composition of apolipoprotein distribution. The latter has a functional meaning; ie, small apo A-I- or apo E-containing HDL particles have been described as the initial cholesterol acceptors in the RCT to the liver.^{4,5}

Low plasma levels of HDL may be the result of an abnormal biosynthesis of apo A-I.⁶ In this context, it has been demonstrated that thyroid hormones upregulate apo A-I biosynthesis in vitro⁷⁻¹⁰; animals treated with L-triiodothyronine or thyromimetic compounds increase apo A-I expression.^{11,12} In contrast, thyroid hormone deficiency lowers intracellular apo A-I mRNA in rats,¹³ and decreases HDL binding capacity in isolated rat liver cells, which may contribute to the reduced HDL clearance in hypothyroid animals.¹⁴

Despite of the role of thyroid hormones in the upregulation of the apo A-I gene, HDL-cholesterol (HDL-C) plasma levels are normal¹⁵⁻¹⁷ or even increased,^{18,19} in human hypothyroidism. In addition, thyroxine (T_4) therapy does not seem to increase serum HDL-C.²⁰ Low cholesteryl ester transfer protein (CETP) activities present in human hypothyroidism^{21,22} provide an explanation to these paradoxical results. Low CETP activities induce cholesterol accumulation in HDL particles that results in high HDL-C plasma levels.^{23,24} The latter probably counterbalance the decreased synthesis of apo A-I induced by hypothyroid status, as it has been demonstrated in vitro,^{10,13} and consequently HDL-C plasma levels become normal or increased in hypothyroid patients.¹⁵⁻¹⁹ This suggests that HDL

metabolism is altered in hypothyroid patients, even if HDL-C plasma levels are normal.

HDL-C plasma levels are affected by a delayed HDL-apolipoprotein catabolism,²⁵ leading to an impaired RCT associated with an increased risk of coronary heart disease.²⁴ Lipoprotein structure is one factor affecting HDL-apolipoprotein catabolism.²⁶⁻²⁹ Since structural changes in HDL subfractions have been described in hypothyroid status,^{10,22} an altered HDL-apo A-I turnover could be expected in hypothyroid patients.

Because little is known about the apo A-I kinetic behavior in the hypothyroid status, the aim of this study was to evaluate the mechanisms responsible of the decreased HDL-apo A-I in chronic hypothyroidism, and to assess the role of HDL structure in apo A-I turnover. To avoid the secondary effects of low CETP activities on HDL metabolism on hypothyroid status, we selected the rat for our studies because this species does not express CETP,³⁰ and thus the direct effects of hypothyroidism on lipid profile and HDL metabolism could be determined. Our results demonstrated that chronic hypothyroidism is associated with an impaired HDL metabolism expressed by low HDL-C

From the Physiology, Nephrology, Cellular Biology, and Endocrinology Departments, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez," México D.F., México; and the Department of Atherosclerosis and INSERM UR545, Institut Pasteur de Lille, Lille, France.

Submitted April 11, 2001; accepted October 15, 2001.

Supported by CONACYT Grant No. J28942M.

Address reprint requests to Oscar Pérez-Méndez, PhD, Physiology Department, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" Juan Badiano 1, Sección XVI, 14080 México D.F., México.

Copyright 2002, Elsevier Science (USA). All rights reserved.

0026-0495/02/5104-0008\$35.00/0

doi:10.1053/meta.2002.31323

and apo A-I plasma levels, and that the modifications in the chemical composition of HDL induced by chronic hypothyroidism are associated to apo A-I catabolic rates.

MATERIALS AND METHODS

Induction of Hypothyroidism

Male Wistar rats weighing 250 to 300 g underwent surgical thyroidectomy with parathyroid reimplant, as previously described.³¹ Briefly, under ether anesthesia, the trachea was exposed, and the parathyroid glands were visualized, dissected from the thyroid gland, and reimplanted into the surrounding neck muscles. The thyroid gland was then carefully dissected, to avoid injury to the laryngeal nerves, and completely excised. The effectiveness of this procedure was assessed by evaluation of serum calcium, phosphate, and T_4 concentrations in 10 sham rats (Ctrl) and 10 thyroidectomized (Htx) rats using standard techniques (calcium, 10.1 ± 0.7 Ctrl v 9.7 ± 0.7 mg/dL Htx, $P =$ not significant [NS]; phosphate, 6.9 ± 0.4 Ctrl v 6.5 ± 1.1 mg/dL Htx, $P =$ NS; T_4 , 5.1 ± 0.3 Ctrl v 1.3 ± 0.2 μ g/mL Htx, $P < .05$; Diagnostic Products Corporation (Los Angeles, CA) radioimmunoassay [RIA]). The animals were used for further studies performed 16 weeks after thyroidectomy.

Blood Samples

Unless otherwise indicated, arterial blood from Htx and Ctrl male Wistar rats was obtained after a 12-hour fast by abdominal aortic puncture under pentobarbital anesthesia (30 mg/kg) and collected into EDTA tubes (1 mg/mL). Plasma was immediately separated by centrifugation at 4°C and conserved with 0.5 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 2 mmol/L benzamide, 100 UI aprotinin, and 0.01% NaN_3 . Lipoprotein fractionation was started within 2 hours of isolation.

Analytical Methods

Plasma cholesterol, triglycerides, phospholipids, and free cholesterol were determined by commercially available procedures (Menarini, Firenze, Italy; Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany). Lipoproteins cholesterol and triglycerides were assessed by sequential ultracentrifugation. Rat apo A-I and apo A-II were quantified by laser immunonephelometry using monoclonal antibodies. Total lipoprotein protein was estimated by a modification of the Lowry procedure.³² Cholesteryl esters were calculated as the difference between total and free cholesterol multiplied by a factor of 1.68.³³

Isolation and Analysis of Rat HDL

HDL were separated by ultracentrifugation in a Beckman Optima TLX table centrifuge at 110,000 rpm in 3.2-mL polycarbonate tubes. Total apo B-containing lipoproteins (density < 1.063 g/dL) were obtained after 2.16 hours, whereas total HDL ($1.063 < \text{density} < 1.21$ g/mL) took 2.5 hours. Under these conditions, 80% to 85% of total plasma apo A-I was recovered in the HDL fraction without apo B contamination. Unless otherwise indicated, HDL were dialyzed against 5 mmol/L ammonium bicarbonate buffer, pH 7.5.

HDL composition analysis was performed using albumin-free isolated lipoproteins in 0.09 mol/L Tris, 0.08 mol/L boric acid, 3 mmol/L EDTA buffer, pH 8.4. The homogeneity and hydrodynamic diameter of HDL was estimated by nondenaturing 5% to 30% gradient polyacrylamide gel electrophoresis using reference globular proteins (thyroglobulin, 17 nm; ferritin, 12.2 nm; catalase 10.4 nm; lactate dehydrogenase, 8.2 nm; and albumin, 7.1 nm; high molecular weight calibration kit, Pharmacia, Uppsala, Sweden).³⁴ Cholesterol and triglycerides in isolated HDL particles were determined as described in the analytical methods section.

Apolipoprotein composition of lyophilized HDL was analyzed by

sodium dodecyl sulfate (SDS) 4% to 21% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) according to the procedure used by Laemmli.³⁵ Similar amounts of total protein were loaded in the wells. Protein bands were visualized by staining in 0.045% Coomassie Blue R250. The relative amount of each apolipoprotein was estimated by quantifying Coomassie Blue R250 extracted from stained bands with pyridine as described previously.²⁹

Rat apo A-I Purification and HDL Radiolabeling

Lyophilized HDL were delipidated with ethanol-ether 2:1 (vol:vol) and the HDL protein moiety was dissolved in 30 mmol/L Tris, 6 mol/L urea buffer, pH 8.0. Apo A-I was purified by anion-exchange chromatography using an UNO Q1 column (BioRad, Hercules, CA) coupled to a Bio-Rad Duo Flow chromatography system. Protein elution was accomplished by a linear gradient of the same buffer containing 100 mmol/L NaCl. Fractions of 250 μ L were collected and those containing only apo A-I, assessed by SDS PAGE, were pooled, dialyzed against 5 mmol/L ammonium bicarbonate and lyophilized. Apo A-I concentration was estimated by spectrophotometry assuming a molar extinction coefficient of $1.13 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Purity was assessed to be at least 98% by scan Coomassie Blue-stained 4% to 21% PAGE.

Apo A-I radiolabeling was performed by the iodine monochloride method as modified by Bilheimer et al.³⁶ Briefly, 1 mg of rat apo A-I was mixed with 1 mCi of carrier-free Na^{125}I and ICl to a final ICl:protein ratio of 2.5:1. Labeled apo A-I was separated from free iodine by passing the mixture over a $1.0 \times 10 \text{ cm}$ Sephadex G-25 column. Labeled ^{125}I -apo A-I was reincorporated into HDL obtained from normal, euthyroid rats (HDL-n) or from hypothyroid rats (HDL-Htx) as described elsewhere.³⁷ Briefly, ^{125}I -labeled apo A-I was combined with HDL (35 mg protein) and incubated for 1h at 37°C. The density of the mixture was adjusted to 1.25 with KBr and ultracentrifuged to separate the HDL from free apo A-I. By this method, about 0.35% of total HDL protein was ^{125}I -apo A-I. Labeled HDL were dialyzed against sterile 0.15 mol/L NaCl solution. Virtually all of the counts in this fraction were precipitable with 10% trichloroacetic acid. The solution was sterile-filtrated using 0.22- μ m filters (Millipore, Bedford, MA) and kept at 4°C until use.

Apo A-I Turnover Studies

Animals were maintained on a 12:12-hour light-dark cycle and fed Purina (St Louis, MO) rat chow throughout the study. All Ctrl animals were sham-operated. Four rat groups were included, 2 were Htx and 2 were Ctrl; 1 Htx and 1 Ctrl group received ^{125}I -apo A-I-labeled HDL-n, whereas the other 2 received ^{125}I -apo A-I-labeled HDL-Htx. Ten animals were lightly restrained with pentobarbital (15 mg/kg) and then 10 mg of HDL-n or HDL-Htx containing approximately 4×10^7 cpm of ^{125}I in a total volume of 0.3 mL was injected as a bolus into the penis vein. Blood samples of 200 μ L were obtained from a tail vein 5 minutes after injection and then at 15 minutes, 30 minutes, and 1, 2, 5, 10, 15, 24, 32, 48, and 72 hours. Three 20- μ L ^{125}I -apo A-I-labeled aliquots of serum were counted in a gamma counter for 1 minute. Measured gamma counts were corrected for natural radioactivity decay. ^{125}I decay curves were constructed by considering as 100%, the radioactivity in the 5-minute serum sample.

Percentages of initial radioactivity kinetics were fitted to biexponential functions using the computer program SAAM30.³⁸ The time length of the radiotracer turnover study allowed the use of this mathematical function in the kinetic analysis of the data. Residence times were obtained from the area under the curve and the fractional catabolic rate (FCR) is the reciprocal of the residence time. We assumed that animals were under steady-state as variances in the plasma levels of apo A-I are quite small in this type of study.³⁷ On the basis of this assumption, FCR equals the fractional synthetic rate (FSR). Next, apo A-I production rate (PR) by 100 g of weight was determined using the formula, $\text{PR} =$

(FSR \times plasma apo A-I concentration \times total plasma volume) \times 100/(body weight). Plasma volume was assumed to be 0.04 mL/g body weight for both groups since hematocrit and total blood volume expressed as percentage of body weight in Htx rats are similar to Ctrl rats, as previously reported.^{39,40}

Statistical Analysis

Data are expressed as the mean \pm SD. Comparisons of experimental versus control groups were made using Student's *t* test. Associations between different parameters were determined by Pearson correlation analysis. Differences were considered significant at $P < .05$.

RESULTS

Effect of Chronic Hypothyroidism on Plasma Lipid and Lipoprotein Parameters

Weight, lipids, and apolipoproteins plasma levels in hypothyroid and control rat groups are reported in Table 1. The hypothyroid group had several lipid and lipoprotein alterations compared to the control group; total plasma triglycerides were slightly but significantly reduced, mainly due to a reduction of about 37% in very-low-density lipoprotein (VLDL)-triglycerides (23.4 ± 7.6 v 37.2 ± 11.3 mg/dL for Htx and control groups, respectively, $P < .05$). No significant alterations were observed in triglycerides of other lipoprotein fractions (results not shown). In contrast with LDL-C, which was 3 times higher in the Htx group, HDL-C levels were about 25% lower than those of control group ($P < .05$). Redistribution of cholesterol between lipoproteins induced by the hypothyroid status resulted in a total plasma cholesterol value that tended to be increased, but without reaching statistical significance. Apo A-I plasma levels in Htx decreased to a similar extent as HDL-C ($\sim 22\%$ lower than controls). Although Htx rats were smaller compared to controls at 16 weeks of follow-up, there was no correlation between weight and LDL-C ($r = -0.721$, $P = \text{NS}$ for Htx; $r = 0.421$, $P = \text{NS}$ for Ctrl). Similarly, weight did not correlate with any HDL parameter, i.e., HDL-C, apo A-I, and apo A-II.

HDL Structure Analysis

To investigate the possible HDL structure changes associated to hypothyroidism, we first estimated the hydrodynamic HDL diameter by electrophoresis in native polyacrylamide gradient. Densitometric profiles of the Coomassie Blue-stained

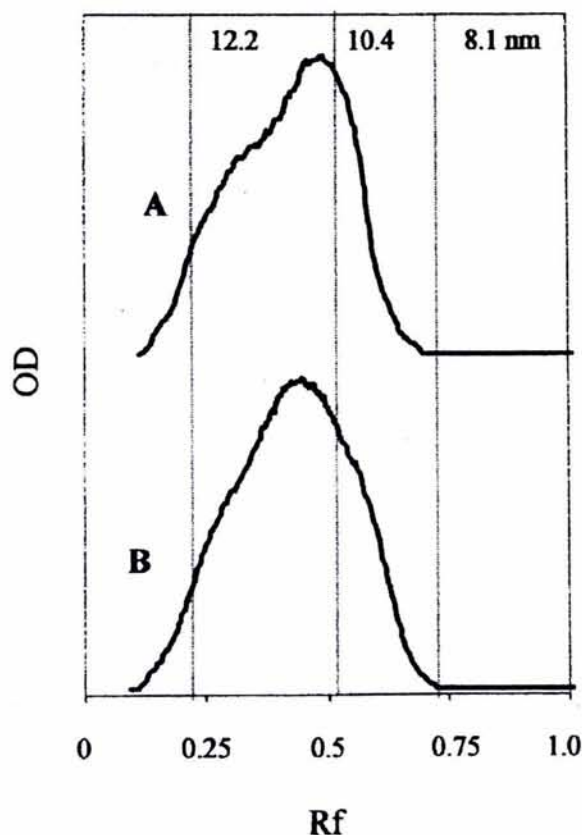


Fig 1. Gradient gel electrophoresis analysis of HDL isolated by sequential ultracentrifugation. Total HDL ($1.063 < \rho < 1.12$) were isolated and subjected to electrophoresis in polyacrylamide gradient (5% to 30%) gels for 24 hours at 120 V. The gels were then stained with Coomassie Blue and scanned using a Bio-Rad densitometer. The vertical axis represents arbitrary units of absorbance at 600 nm. Rf values shown are the distances traveled in the gel relative to lactate dehydrogenase and human albumin. The positions of standard proteins of known Stokes diameter are indicated. The profiles presented are representative results from (A) normal, and (B) Htx groups.

gels are presented in Fig 1. The profile obtained from control animals (Fig 1A) indicates a distribution of HDL particles with a mean Stokes diameter size of 11.0 ± 0.1 nm (Table 2). The profile obtained from hypothyroid animals (Fig 1B) indicates a shift to larger sizes, with a mean Stokes diameter of 11.4 ± 0.1 nm ($P < .05$). The rise of HDL-Htx diameter was associated with a slight but significant phospholipid enrichment (Table 2).

Further characterization of hypothyroid rat HDL involved the apolipoprotein composition. HDL-apolipoproteins were separated by 4% to 21% SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue. Apolipoprotein proportion was assessed by spectrometry of pyridine-eluted colorant for each protein band. The results obtained with HDL-n and HDL-Htx are illustrated in Fig 2. There was a decrease, although not significant, in apo A-I content in HDL-Htx. The total amount of apo E in HDL-Htx was, on average, 89% higher than in control HDL as opposed

Table 1. Weight, Lipids, and Apolipoprotein Plasma Levels in Hypothyroid and Control Rat Groups

	Group	
	Hypothyroid (n = 11)	Control (n = 12)
Weight (g)	421 \pm 28.6*	508.5 \pm 49.9
Plasma triglycerides (mg/dL)	43.8 \pm 8.2*	53.9 \pm 12.6
Plasma cholesterol (mg/dL)	53.5 \pm 14.3	47.9 \pm 13.2
LDL-C (mg/dL)	24.8 \pm 8.9*	8.3 \pm 3.7
HDL-C (mg/dL)	22.9 \pm 6.6*	30.9 \pm 9.4
Apo A-I (mg/dL)	27.1 \pm 2.6*	35.0 \pm 6.4
Apo A-II (mg/dL)	18.3 \pm 3.9	23.0 \pm 11.0

NOTE. Values are mean \pm SD.

*Significantly different from control ($P < .05$).

Table 2. Strokes Diameter and Mass Composition of Rat HDL

	HDL-n	HDL-Htx
Strokes diameter (nm)	11.0 ± 0.1	11.4 ± 0.1*
Free cholesterol (%)	4.3 ± 1.7	3.8 ± 0.6
Cholesterol esters (%)	33.8 ± 7.8	34.3 ± 4.0
Triglycerides (%)	2.4 ± 1.2	1.5 ± 0.7
Phospholipids (%)	22.1 ± 1.7	26.1 ± 1.9*
Proteins (%)	37.3 ± 3.4	34.3 ± 4.6

NOTE. HDL were isolated by sequential ultracentrifugation from control (HDL-n, n = 4) and chronic hypothyroid rats (HDL-Htx, n = 4), and analyzed separately. Composition is expressed as the percentage of the total dry mass. Results are expressed as mean ± SD.

*Significantly different from control ($P < .05$).

to a significant reduction (40%) in the amount of apo A-IV in HDL from hypothyroid rats.

Apo A-I Turnover Studies

Our first series of experiments was designed to determine the effect of chronic hypothyroidism on the in vivo metabolism of normal ^{125}I -apo A-I incorporated into HDL-n. Radioactivity decay curves of the mean ± SD of each time point for both groups are shown in Fig 3A. In Htx rats (n = 8), the apo A-I radioactivity decay curve had a shallower slope and a higher final radioactivity than did the mean of 8 control rats, indicating a delayed apo A-I catabolism. The calculated FCR of labeled

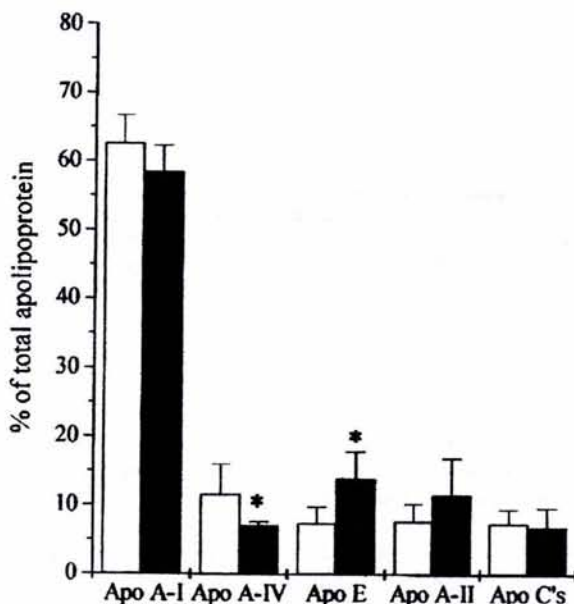


Fig 2. Percentage of apolipoprotein composition of plasma HDL-n (□) and HDL-Htx (■) isolated by sequential ultracentrifugation. HDL apolipoproteins were separated by polyacrylamide gradient gel electrophoresis in presence of sodium dodecyl sulfate. Proteins were stained with Coomassie Blue and the fixed colorant was eluted in pyridine. The absorbance of the pyridine-eluted colorant at 605 nm was measured on every protein band. Protein percentage was calculated on the basis of total protein absorbance. Bars are the percentage means ± SD. * $P < .05$.

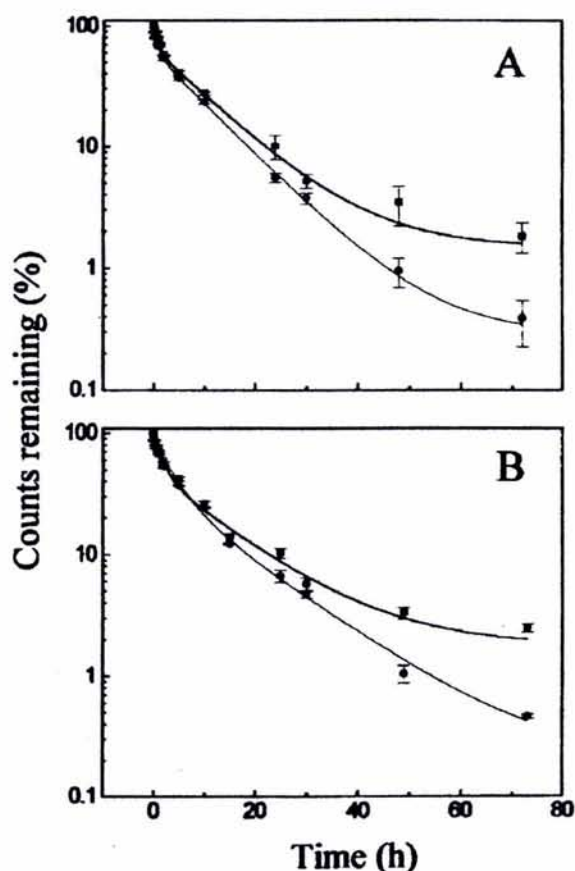


Fig 3. Plasma radioactivity decay curves of ^{125}I -apo A-I in (A) HDL-n and (B) HDL-Htx. Data are given as mean ± SD for normal (●) and Htx rats (■).

apo A-I incorporated into HDL-n was markedly lower for the Htx group (37%) than for the control group (Table 3).

Since it has been reported that hypothyroidism induces structural changes in HDL, we decided to further investigate whether these changes influence the catabolism of apo A-I as well. Therefore, our second series of turnover studies was performed with labeled apo A-I incorporated into HDL from

Table 3. Kinetic Parameters of ^{125}I -apo A-I Incorporated Into HDL-Htx or HDL-n

Recipient	^{125}I -apo A-I		
	FCR (d^{-1})		PR (mg [100 $g^{-1} \cdot d^{-1}$])
	HDL-n	HDL-Htx	
Hypothyroid (n = 8)	0.097 ± 0.009*	0.082 ± 0.006	0.106 ± 0.015
Control (n = 8)	0.154 ± 0.026†	0.102 ± 0.017	0.253 ± 0.047
	$P < .005$	$P < .05$	$P < .005$

NOTE. FCRs were calculated from radioactivity decay curves as described in the Methods. Production rates from data obtained with autologous HDL. Values are given as the best estimate ± SD.

* $P < .005$ for FCR between HDL-Htx and HDL-n in Htx rats.

† $P < .005$ for FCR between HDL-Htx and HDL-n in control rats.

hypothyroid rats. Our results show that during the 72 hours of the study, radioactivity decay of ^{125}I -labeled apo A-I in HDL-Htx was lower in hypothyroid rats than in control rats (Fig 3B). Thus, the calculated apo A-I FCR for the hypothyroid group was about one fifth lower than that of the control group (Table 3). Table 3 shows that the apo A-I FCRs were always, and independently from the recipient, lower when HDL-Htx were used compared to the values obtained with HDL-n. The most striking difference in apo A-I FCR (1.9-fold decrease) was observed when homologous HDL were used, ie, HDL-Htx in hypothyroid rats and HDL-n in the control group. Since apo A-I FCR was dependent of the source of HDL, and PR was calculated using the values of apo A-I FCR obtained with homologous HDL, we determined that the apo A-I PR of hypothyroid rats was 2.4-fold lower than that of the control group (Table 3).

DISCUSSION

Hypercholesterolemia is a common feature in hypothyroidism since thyroid hormones upregulate LDL-receptor expression.⁴¹⁻⁴³ High LDL-cholesterol levels were the most striking lipoprotein abnormality in our hypothyroid animal model. However, total cholesterol plasma levels remained similar to that of the control group because of the concomitant decrease in the HDL-C fraction. Thyroidectomized rats indeed had significantly lower HDL-C and apo A-I plasma levels than controls, reinforcing the effect of hypothyroid status on HDL metabolism. Nevertheless, low HDL-C is not a common finding in human hypothyroidism. One important difference between HDL metabolism in the rat and in primates is the absence in the former of CETP.³⁰ As a result, the rat does not transfer the cholesterol ester-laden core of HDL to VLDL, thus providing a suitable model for the study of HDL metabolism without the influence of changes in the CETP activity; it is well known that this activity has an inverse correlation with HDL-C plasma levels,^{44,45} and thus low CETP activities contribute to the increase in HDL-C reported in human hypothyroidism.^{21,22} In the present study using chronic Htx rats we have demonstrated an altered metabolism of HDL that results in low HDL-C and apo A-I plasma levels. It is possible that this altered HDL metabolism might be present in human hypothyroidism, the difference being that there are low CETP activities^{21,22} that may mask the expected low HDL plasma levels. This hypothesis is supported by the stimulating effect of thyroid hormones on CETP plasma activity that decreases HDL-C plasma levels, recently demonstrated *in vivo* using transgenic human CETP mice.⁴⁶

Since it is well known that the lack of thyroid hormones limits growth,⁴⁷ and the rats were thyroidectomized when they reached half of their maximal weight, Htx animals grew less than the controls, as expected. However, it can be argued that Htx rats were smaller than controls because of less food intake and that this may be the origin of the observed HDL alterations in the former. Hypocaloric diets frequently result in an increase of HDL-C and a decrease of LDL-C.⁴⁸ We observed an opposite situation in Htx rats, ie, low HDL-C and elevated LDL-C; therefore, we can conclude that the origin of the lipid alterations was not a low food intake. Moreover, statistical analysis was not able to show any correlation between weight and HDL

parameters. Another environmental parameter that may alter the lipid profile is exercise. Even if Htx rats were more lethargic than sham controls, the small area of the cage limited physical activity in the latter. In addition, mild exercise during a period comparable to that of our experiments is not enough to modify the lipid profile.⁴⁹ Thus, increased physical activity in sham rats compared to the Htx group as the origin of the lipid abnormalities can be ruled out.

Significant changes occurred in the size and composition of plasma HDL particles in hypothyroid rats. In accordance with previous reports,^{10,50,51} we found larger HDL particles in the plasma of hypothyroid rats. Associated with this, the content of apo E was significantly increased as opposed to apo A-IV, which was decreased. HDL apo E enrichment has already been observed in Htx rats^{6,10} and might be secondary to the lack of thyroid hormones, since an enhanced degradation of mature apo E mRNA has been demonstrated in thyroid hormone-treated HepG2 cells.⁵² Our results showed an increase in apo A-IV content. In this regard, chronic administration of triiodothyronine increases the amount of apo A-IV mRNA in the cytoplasm of rat liver cells⁵³; therefore, it is possible that the lack of thyroid hormones might result in diminished apo A-IV synthesis¹⁰ and apo A-IV-poor HDL. Another difference between HDL from Htx rats and controls was the increased phospholipid content probably due to an impaired phospholipid transfer protein (PLTP) activity associated with low HDL-C^{54,55}; however, when PLTP activity was measured using an external phospholipid donor, no difference was observed between groups (data not shown). Thus, the slight HDL phospholipid enrichment in Htx rats might be attributed to the changes in apolipoprotein composition (apo E and apo A-IV).

Turnover studies performed in Htx rats demonstrated a low catabolism of labeled apo A-I incorporated into HDL-n. Since low HDL-binding capacity has been demonstrated in isolated liver cells from Htx rats,¹⁴ it is possible that chronic hypothyroidism might affect the catabolic sites of apo A-I, contributing to the diminished clearance of HDL.

A high catabolic rate, a low synthetic rate, or both may explain the low apo A-I plasma levels in Htx rats. Turnover studies using autologous HDL, ie, HDL-Htx in Htx rats and HDL-n in a control group, revealed a 1.9-fold decrease in the catabolism of apo A-I in Htx. This low catabolism is consistent with low apo A-I plasma levels only when protein synthesis diminishes to levels below the catabolic rate. Thus, low apo A-I plasma levels in Htx rats are based on an unbalance between synthesis and catabolism, ie, a decreased apo A-I production rate (2.4-fold decrease) that exceeds the low FCR (1.9-fold decrease). Our results are consistent with a low synthesis and a low quantity of intracellular apo A-I mRNA in hypothyroid rats,¹³ and with a decrease in ^{14}C -leucine incorporation into apo A-I after 2 hours of labeled aminoacid injection in propylthiouracil (PTU) hypothyroidism-induced rats.¹⁰ Furthermore, since thyroid hormones increase the stability of nuclear apo A-I mRNA precursors,¹³ the lack of such hormones would result in a low apo A-I synthesis as observed in Htx rats.

Kinetic studies performed in subjects without a history of coronary heart disease and very low levels of apo A-I^{29,56,57} showed that low apo A-I plasma levels are the consequence of hypercatabolism and unaffected synthesis. These patients do

not develop atherosclerosis probably because their RCT is enhanced, ie, less HDL particles transport a normal amount of cholesterol to the liver because they do it much faster. In contrast, a decreased apo A-I catabolism could be associated with the development of coronary heart disease, as in CETP deficiency.²⁴ Low catabolism and normal synthesis of apo A-I in CETP-deficient patients result in high levels of HDL-C. Despite the high HDL-C levels, cholesterol accumulates in coronary arteries, which may be indicative of impaired RCT. Our study demonstrates that the lack of thyroid hormones has a primary effect on HDL metabolism, particularly decreased apo A-I synthesis and catabolism. Such a kinetic imbalance may result in an impaired RCT, enhancing the atherosclerotic effect of the concomitant high LDL-C in the hypothyroid status.

Since hypothyroidism induced changes in the HDL structure, we were concerned whether these structural variations influenced the kinetic behavior of apo A-I. We therefore performed a second series of kinetic studies reincorporating apo A-I into HDL isolated from Htx animals. In agreement with the first series of turnover studies where we used HDL-n, apo A-I FCR was decreased in Htx animals, thus reinforcing the possibility of altered catabolic sites for apo A-I. Further analysis comparing the apo A-I FCR values obtained with control rats demonstrated that apo A-I in HDL-Htx was catabolized at lower rates than in HDL-n, which strongly suggests that both HDL structure and composition influence apo A-I turnover. Similar results were obtained with the groups of Htx rats. Apo A-I in HDL-n was catabolized faster than in HDL-Htx, supporting the idea that changes in the structure of HDL induced by hypothyroid status contributes to the low apo A-I FCR. Changes in apolipoprotein size, composition, or both might account for the low turnover of HDL-Htx. Increased apo A-I FCR has been demonstrated in severe hypoalphalipoproteinemic patients possessing small HDL particles.^{56,57} Moreover, large HDL detected in human CETP deficiency are associated with delayed catabolism of apo A-I and apo A-II.²⁵ As a consequence, one would expect low catabolism of the large HDL particles in Htx rats.

Large HDL particles are not always associated with low apo

A-I catabolic rates; Lewis et al⁵⁸ demonstrated, in rats, an increased apo A-I FCR using large HDL particles rich in triglycerides. These results suggest that HDL apolipoprotein composition plays an important role on apo A-I catabolism; thus, structure may determine the efficiency of HDL in the transport of cholesterol to the liver. The main difference between Htx and HDL-n was the apolipoprotein distribution. Our results showed that HDL-Htx were enriched in apo E. Nevertheless, despite the high content of apo E, which enhances HDL clearance,^{25,56,59} the low catabolic rates of apo A-I in HDL-Htx seem to be the consequence of both low content of apo A-IV, which has been associated with HDL hypercatabolism⁶⁰ and increased size of the particle. It has been suggested that the HDL alterations associated with thyroid dysfunction are in part the result of low CETP activities.^{21,22} Our results using rats, a species lacking CETP activity, demonstrated that the changes in apolipoprotein composition and particle size contribute to the abnormalities in apo A-I turnover, which may impact RCT, thus enhancing the atherosclerotic process frequently associated with hypothyroidism.

In summary, this study demonstrates that chronic hypothyroidism in the rat, an animal that lacks CETP activity, is characterized by low HDL-C and apo A-I plasma levels as a consequence of the low apo A-I synthesis rate that exceeds the low FCR. Moreover, slight structural modifications of HDL and changes induced in the animals that affect HDL catabolism significantly contributed to the decrease in apo A-I catabolism in the hypothyroid state. These results raise the possibility that an impaired HDL metabolism may exist in human hypothyroidism, even in the absence of altered HDL or apo A-I plasma levels. Whether these changes affect cholesterol transport from peripheral cells to the liver and contribute to the atherosclerotic process frequently present in hypothyroid patients remains to be elucidated.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Cathrine Fievet and Jacques Fremaux for apo A-I and apo A-II determinations. We are indebted to Muriel Bouilly for the determination of PLTP activities, and to Aida Medina for excellent technical assistance.

REFERENCES

- Fielding CJ, Fielding PE: Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 36:211-228, 1995
- Miller NE: High-density lipoprotein: A major risk factor for coronary atherosclerosis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1:603-622, 1987
- Parra HJ, Arveiler D, Evans AE, et al: A case-control study of lipoprotein particles in two populations at contrasting risk for coronary heart disease. The ECTIM Study. *Arterioscler Thromb* 12:701-707, 1992
- Castro GR, Fielding CJ: Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry* 27:25-29, 1988
- Huang Y, von EA, Wu S, et al: A plasma lipoprotein containing only apolipoprotein E and with gamma mobility on electrophoresis releases cholesterol from cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1834-1838, 1994
- Breslow JL: Familial disorders of high-density lipoprotein metabolism, in Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS (eds): *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York, NY, McGraw-Hill, 1989, pp 1267-1282
- Strobl W, Gorder NL, Lin-Lee YC, et al: Role of thyroid hormones in apolipoprotein A-I gene expression in rat liver. *J Clin Invest* 85:659-667, 1990
- Lin-Lee YC, Soyak SM, Surguchov A, et al: Thyroid hormone influences conditional transcript elongation of the apolipoprotein A-I gene in rat liver. *J Lipid Res* 36:1586-1594, 1995
- Taylor AH, Wishart P, Lawless DE, et al: Identification of functional positive and negative thyroid hormone-responsive elements in the rat apolipoprotein AI promoter. *Biochemistry* 35:8281-8288, 1996
- Apostolopoulos JJ, Marshall JF, Howlett GJ: Triiodothyronine increases rat apolipoprotein A-I synthesis and alters high-density lipoprotein composition in vivo. *Eur J Biochem* 194:147-154, 1990
- Taylor AH, Stephan ZF, Steele RE, et al: Beneficial effects of a novel thymimetic on lipoprotein metabolism. *Mol Pharmacol* 52:542-547, 1997
- Ness GC, Lopez D, Chambers CM, et al: Effects of L-triiodo-

- thyronine and the thyromimetic L-94901 on serum lipoprotein levels and hepatic low-density lipoprotein receptor, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and apo A-I gene expression. *Biochem Pharmacol* 56:121-129, 1998
13. Fong BS, Greco AV, Angel A: Hypothyroidism reduces HDL binding to rat liver cells. *Atherosclerosis* 79:1-8, 1989
14. Verdugo C, Perrot L, Ponsin G, et al: Time-course of alterations of high-density lipoproteins (HDL) during thyroxine administration to hypothyroid women. *Eur J Clin Invest* 17:313-316, 1987
15. Abrams JJ, Grundy SM: Cholesterol metabolism in hypothyroidism and hyperthyroidism in man. *J Lipid Res* 22:323-338, 1981
16. Valdemarsson S, Hedner P, Nilsson-Ehle P: Dyslipoproteinemia in hypothyroidism of pituitary origin: Effects of L-thyroxine substitution on lipoprotein lipase, hepatic lipase, and on plasma lipoproteins. *Acta Endocrinol* 103:192-197, 1983
17. Muls E, Rosseneu M, Bleton V, et al: Serum lipids and apolipoproteins A-I, A-II and B in primary hypothyroidism before and during treatment. *Eur J Clin Invest* 14:12-15, 1984
18. Scottolini AG, Bhagavan NV, Oshiro TH, et al: Serum high-density lipoprotein cholesterol concentrations in hypo- and hyperthyroidism. *Clin Chem* 26:584-587, 1980
19. Danese MD, Ladenson PW, Meinert CL, et al: Clinical review 115: Effect of thyroxine therapy on serum lipoproteins in patients with mild thyroid failure: A quantitative review of the literature. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2993-3001, 2000
20. Dullaart RP, Hoogenberg K, Groener JE, et al: The activity of cholesteryl ester transfer protein is decreased in hypothyroidism: A possible contribution to alterations in high-density lipoproteins. *Eur J Clin Invest* 20:581-587, 1990
21. Tan KC, Shiu SW, Kung AW: Effect of thyroid dysfunction on high-density lipoprotein subfraction metabolism: Roles of hepatic lipase and cholesteryl ester transfer protein. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2921-2924, 1998
22. Tall AR: Plasma cholesteryl ester transfer protein and high-density lipoproteins: New insights from molecular genetic studies. *J Intern Med* 237:5-12, 1995
23. Yamashita S, Maruyama T, Hirano KI, et al: Molecular mechanisms, lipoprotein abnormalities and atherogenicity of hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis* 152:271-285, 2000
24. Ikekawa K, Rader DJ, Sakamoto T, et al: Delayed catabolism of high-density lipoprotein apolipoproteins A-I and A-II in human cholesteryl ester transfer protein deficiency. *J Clin Invest* 92:1650-1658, 1993
25. Rader DJ, Castro G, Zech LA, et al: In vivo metabolism of apolipoprotein A-I on high density lipoprotein particles LpA-I and LpA-I-A-II. *J Lipid Res* 32:1849-1859, 1991
26. Braschi S, Neville TA, Vohl MC, et al: Apolipoprotein A-I charge and conformation regulate the clearance of reconstituted high density lipoprotein in vivo. *J Lipid Res* 40:522-532, 1999
27. Colvin P, Moriguchi E, Barrett H, et al: Production rate determines plasma concentration of large high-density lipoprotein in non-human primates. *J Lipid Res* 39:2076-2085, 1998
28. Colvin PL, Moriguchi E, Barrett PH, et al: Small HDL particles containing two apoA-I molecules are precursors in vivo to medium and large HDL particles containing three and four apoA-I molecules in non-human primates. *J Lipid Res* 40:1782-1792, 1999
29. Perez-Mendez O, Bruckert E, Franceschini G, et al: Metabolism of apolipoproteins AI and AII in subjects carrying similar apoAI mutations, apoAI Milano and apoAI Paris. *Atherosclerosis* 148:317-325, 1999
30. Oschry Y, Eisenberg S: Rat plasma lipoproteins: Re-evaluation of a lipoprotein system in an animal devoid of cholesteryl ester transfer activity. *J Lipid Res* 23:1099-1106, 1982
31. Franco M, Tapia E, Martinez F, et al: Adenosine regulates renal nitric oxide production in hypothyroid rats. *J Am Soc Nephrol* 10:1681-1688, 1999
32. Lowry OH, Rosebrough HJ, Farr AL, et al: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951
33. Tailleux A, Torpier G, Caron B, et al: Immunological properties of apoB-containing lipoprotein particles in human atherosclerotic arteries. *J Lipid Res* 34:719-728, 1993
34. Williams PT, Krauss RM, Nichols AV, et al: Identifying the predominant peak diameter of high-density and low-density lipoproteins by electrophoresis. *J Lipid Res* 31:1131-1139, 1990
35. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970
36. Bilheimer DW, Eisenberg D, Levy RI: The metabolism of very low density lipoproteins. Preliminary in vitro and in vivo observations. *Biochim Biophys Acta* 260:212-221, 1972
37. Kaysen GA, Hoye E, Jones HJ: Apolipoprotein AI levels are increased in part as a consequence of reduced catabolism in nephrotic rats. *Am J Physiol* 268:F532-F540, 1995
38. Berman M: SAAM Manual. Bethesda, MD, National Institutes of Health, 1978
39. Paniagua R, Franco M, Rodriguez E, et al: Impaired atrial natriuretic factor systemic clearance contributes to its higher levels in uremia. *J Am Soc Nephrol* 2:1704-1708, 1992
40. Franco M, Bobadilla N, Suárez J, et al: Participation of adenosine in the renal hemodynamic abnormalities of hypothyroidism. *Am J Physiol* 270:F254-F262, 1996
41. Salter AM, Hayashi R, al-Seeni M, et al: Effects of hypothyroidism and high-fat feeding on mRNA concentrations for the low-density-lipoprotein receptor and on acyl-CoA:cholesterol acyltransferase activities in rat liver. *Biochem J* 276:825-832, 1991
42. Hudig F, Bakker O, Wiersinga WM: Tri-iodothyronine prevents the amiodarone-induced decrease in the expression of the liver low-density lipoprotein receptor gene. *J Endocrinol* 152:413-421, 1997
43. Wiseman SA, Powell JT, Humphries SE, et al: The magnitude of the hypercholesterolemia of hypothyroidism is associated with variation in the low-density lipoprotein receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 77:108-112, 1993
44. Kurasawa T, Yokoyama S, Miyake Y, et al: Rate of cholesteryl ester transfer between high and low density lipoproteins in human serum and a case with decreased transfer rate in association with hyperalphalipoproteinemia. *J Biochem* 98:1499-1508, 1985
45. Brown ML, Inazu A, Hesler CB, et al: Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins. *Nature* 342:448-451, 1989
46. Berti JA, Amaral ME, Boschero AC, et al: Thyroid hormone increases plasma cholesteryl ester transfer protein activity and plasma high-density lipoprotein removal rate in transgenic mice. *Metabolism* 50:530-536, 2001
47. Goodman HM: Basic Medical Endocrinology. New York, NY, Raven, 1994
48. Noakes M, Clifton PM: Weight loss and plasma lipids. *Curr Opin Lipidol* 11:65-70, 2000
49. Woolf-May K, Kearney EM, Owen A, et al: The efficacy of accumulated short bouts versus single daily bouts of brisk walking in improving aerobic fitness and blood lipid profiles. *Health Educ Res* 14:803-815, 1999
50. Meyer BJ, Ha YC, Barter PJ: Effects of experimental hypothyroidism on the distribution of lipids and lipoproteins in the plasma of rats. *Biochim Biophys Acta* 1004:73-79, 1989
51. Krul ES, Dolphin PJ: Secretion of nascent lipoproteins by isolated hepatocytes from hypothyroid and hypercholesterolemic rats. *Biochim Biophys Acta* 713:609-621, 1982

52. Vandenbrouck Y, Janvier B, Lorient C, et al: The modulation of apolipoprotein E gene expression by 3,3',5-triiodothyronine in HepG2 cells occurs at transcriptional and post-transcriptional levels. *Eur J Biochem* 224:463-471, 1994
53. Lin-Lee YC, Strobl W, Soyak S, et al: Role of thyroid hormone in the expression of apolipoprotein A-IV and C-III genes in rat liver. *J Lipid Res* 34:249-259, 1993
54. Jiang XC, Bruce C, Mar J, et al: Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. *J Clin Invest* 103:907-914, 1999
55. Jiang X, Francone OL, Bruce C, et al: Increased prebeta-high density lipoprotein, apolipoprotein AI, and phospholipid in mice expressing the human phospholipid transfer protein and human apolipoprotein AI transgenes. *J Clin Invest* 98:2373-2380, 1996
56. Elkhailil L, Majd Z, Bakir R, et al: Fish-eye disease: Structural and in vivo metabolic abnormalities of high-density lipoproteins. *Metabolism* 46:474-483, 1997
57. Perez-Mendez O, Castro G, Fruchart J, et al: Kinetic and metabolic studies of apo A-I and apo A-II in a hypoalphalipoproteinemic patient. *Eur J Neurol* 2:77, 1995 (suppl 2, abstr)
58. Lewis GF, Lamarche B, Uffelman KD, et al: Clearance of postprandial and lipolytically modified human HDL in rabbits and rats. *J Lipid Res* 38:1771-1778, 1997
59. Kushwaha RS, Foster DM, Murthy VN, et al: Metabolism of larger high density lipoproteins accumulating in some families of baboons fed a high cholesterol and high saturated fat diet. *J Lipid Res* 30:1147-1159, 1989
60. Rader DJ, Schafer J, Lohse P, et al: Rapid in vivo transport and catabolism of human apolipoprotein A-IV-1 and slower catabolism of the apoA-IV-2 isoprotein. *J Clin Invest* 92:1009-1017, 1993

Decreased activity of lecithin:cholesterol acyltransferase and hepatic lipase in chronic hypothyroid rats: Implications for reverse cholesterol transport

Martha Franco,¹ Graciela Castro,² Luis Romero,³ Juan Carlos Regalado,³ Aida Medina,⁴ Claudia Huesca-Gómez,³ Serafín Ramírez,³ Luis F. Montañón,⁵ Carlos Posadas-Romero⁴ and Oscar Pérez-Méndez³

*Departments of*¹*Nephrology;* ³*Physiology;* ⁴*Endocrinology;* ⁵*Cellular Biology, Instituto Nacional de Cardiología 'Ignacio Chávez', México;* ²*Atherosclerosis and INSERM U325, Institut Pasteur de Lille, Lille, France*

Abstract

Chronic hypothyroidism is frequently associated with atherosclerosis due to increased cholesterol plasma levels; nevertheless, the contribution of impaired reverse cholesterol transport (RCT) in this process has not been completely elucidated. The aim of this study was to evaluate the effect of thyroidectomy (Htx) upon the main stages of RCT in rats. Plasma lipid alterations induced by thyroidectomy showed a slight, but significant, reduction of total plasma triglycerides, a 300% increase of LDL-cholesterol and a 25% decrease in HDL-cholesterol compared to control rats. We evaluated the first stage of RCT determining ³H-cholesterol efflux in Fu5AH cells. The capacity of HDL obtained from Htx rats to promote cholesterol efflux was similar to that of controls. Lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) activity, the second stage and the driving force of RCT was 30% lower in Htx animals compared to controls, as determined by reconstituted HDL used as an external substrate. Lipoproteins are remodeled by hepatic lipase; the mean activity of this enzyme in postheparin plasma of Htx animals was reduced by 30% compared to controls, thus suggesting an impaired HDL remodeling by this enzyme in the hypothyroid status. In contrast, lipoprotein lipase activity in the Htx group was unchanged. In summary, this study demonstrates that chronic hypothyroidism in the rat induced an impaired RCT mainly at the cholesterol esterification, and HDL remodeling mediated by hepatic lipase. The latter probably results in an abnormal HDL structure, i.e. phospholipid enrichment, which contributes to decrease HDL-apo AI fractional catabolic rates. (*Mol Cell Biochem* 246: 51–56, 2003)

Key words: reverse cholesterol transport, cholesterol efflux, high-density lipoproteins, lecithin:cholesterol acyltransferase, hepatic lipase, hypothyroidism

Introduction

Low plasma levels of high-density lipoproteins (HDL) correlate with a high risk of atherosclerotic heart disease [1, 2]. Such a diminished concentration of HDL affect reverse cholesterol transport (RCT) [3, 4], which is the metabolic pathway responsible for the movement of cholesterol excess from peripheral tissues to the liver for lipoprotein recycling or

excretion. The RCT pathway could be defined as a progression of closely interconnected events [3], among which four are considered as the most relevant: (a) the free cholesterol efflux from extrahepatic cells and its uptake by HDL [4]; (b) the free cholesterol esterification by lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT); (c) the transfer of cholesterol to other apolipoproteins by the cholesterol ester transfer protein (CETP) or directly to the liver by hepatic scavenger re-

ceptor B type I (SR-BI) [5]; and (d) the remodelling of HDL by the phospholipid transfer protein and hepatic lipase to re-initiate the cholesterol efflux from peripheral tissues [6, 7]. As a consequence, physiopathological conditions that could alter the HDL plasma levels, the RCT pathway, or both, may contribute to atherosclerosis.

Thyroid hormones seem to have a direct impact on HDL synthesis, since these hormones up-regulate the *in vitro* biosynthesis of apo A-I, [8] the major protein of HDL. Thyroid hormone deficiency lowers intracellular apo A-I mRNA in rats [9]. Despite of the role of thyroid hormones in the up-regulation of the apo A-I gene, HDL-cholesterol (HDL-C) plasma levels are normal or even increased in human hypothyroidism [10–12]. In addition, T4 therapy does not seem to increase serum HDL-C [13]. Low cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity present in human hypothyroidism [14, 15] provide an explanation for these paradoxical results. Low CETP activity induces cholesterol accumulation in HDL particles that result in high HDL-C plasma levels [16, 17]. The latter probably counterbalance the decreased synthesis of apo A-I induced by the hypothyroid status, as it has been demonstrated *in vitro* [8, 9]; consequently, HDL-C plasma levels become normal or increased in hypothyroid patients [10–12]. As a consequence, low HDL-C plasma levels could be expected in the absence of CETP activity. Using chronic hypothyroid rats, a species lacking CETP expression, we have recently demonstrated that low HDL-apo AI plasma levels, are the result of a delayed synthesis that outweighs the low catabolism observed in these animals [18]; such a metabolic behavior is in part the result of larger apo E-enriched HDL. Because of the abnormal HDL structure, an impaired RCT pathway contributing to an increased risk of coronary heart disease frequently observed in hypothyroid patients could be expected.

In order to elucidate whether the low plasma levels and structural changes of HDL affect RCT in hypothyroid rats, we evaluated the first two stages of the process, the HDL capacity to promote cholesterol efflux from cells, and LCAT activity. We further determined the activity of hepatic and lipoprotein lipases in order to establish their contribution to HDL structural abnormalities.

Materials and methods

Induction of hypothyroidism

Male Wistar rats weighing 250–300 g underwent surgical thyroidectomy with parathyroid reimplant, as previously described [19]. Briefly, under ether anesthesia, the trachea was exposed, and the parathyroid glands were dissected from the thyroid gland, and reimplanted into the neck muscles. The thyroid gland was then dissected and completely excised. The

effectiveness of this procedure was assessed by evaluation of serum calcium, phosphate, and T4 concentrations in 10 sham rats (Ctrl) and 10 thyroidectomized (Htx) rats using standard techniques (Ca 10.1 ± 0.7 Ctrl vs. 9.7 ± 0.7 mg/dL Htx, $p = \text{NS}$; phosphate 6.9 ± 0.4 Ctrl vs. 6.5 ± 1.1 mg/dL Htx, $p = \text{NS}$; T4 5.1 ± 0.3 Ctrl vs. 1.3 ± 0.2 $\mu\text{g/ml}$ Htx, $p < 0.05$, Diagnostic Products Corporation RIA). The animals were used for further studies performed 16 weeks after thyroidectomy. Animals were maintained in a 12:12-h light-dark cycle and fed Purina rat chow throughout the study. All control animals were sham operated. All the animals used in the experiments were treated according to our institutional guidelines for laboratory research.

Blood samples

Arterial blood from hypothyroid and normal sham male Wistar rats was obtained after 12 h fast by abdominal aortic puncture under pentobarbital anaesthesia (30 mg/Kg) and collected in EDTA (1 mg/mL). Plasma was immediately separated by centrifugation at 4°C. Lipoprotein fractionation was started within 2 h of isolation. To obtain samples for post-heparin lipase activity determination, rats were anesthetized with sodium pentobarbital (30 mg/kg, i.p.); polyethylene tubing (PE-50) was used to catheterize the left carotid artery to take samples and to infuse heparin. Blood samples (2 mL) were taken (preheparin sample) and the volume was replaced with blood from a normal or hypothyroid donor rat. Heparin (100 mU/g of body wt) diluted in a saline solution to a final volume of 0.25 mL were infused by the catheter, and washed with 0.5 mL of saline solution. A 5 mL post-heparin sample was taken 10 min later and the rat was killed with an excess of pentobarbital.

Analytical methods

Plasma cholesterol, triglycerides, phospholipids and free cholesterol were determined by commercially available procedures (Menarini, Torino Italy and Boehringer-Mannheim, Mannheim Germany). Total lipoprotein protein was estimated by a modification of the Lowry procedure [20].

Isolation of Htx or normal rat HDL

HDL were separated by ultracentrifugation in a Beckman optima TLX table centrifuge at 110,000 rpm at 10°C in 3.2 mL polycarbonate tubes as previously described [18]. HDL were dialyzed against 10 mM phosphate buffer (PBS), pH 7.5. As we have already demonstrated HDL from the Htx group were larger and had a significant reduction in the

amount of apo A-IV, and were enriched in phospholipids and apo E [18].

Cholesterol efflux

Cellular cholesterol efflux was determined using rat Fu5AH hepatoma cells following the procedure described by de la Llera Mora *et al.* [21]. Briefly, the cells were maintained in minimal essential medium (MEM) containing 5% calf serum; 20,000 Fu5AH cells/mL were plated on 2.4-cm multiwell plates using 2 mL/well. Two days after plating, membranes were labelled with ^3H -cholesterol (1 μCi /well) for 60-h. To allow equilibration of the radioactive label, cells were rinsed and incubated for 24 h in MEM containing 0.5% bovine serum albumin. To determine cholesterol efflux, the cells were washed with PBS and incubated at 37°C for 3 h with serum or HDL. For this, the serum of Htx or control rats was diluted into de culture medium (5% v/v). HDL were diluted to 50 μg /mL (expressed as total HDL protein concentration) into the culture medium. At the end of the efflux period, the medium was removed and centrifuged to discard cell debris. The cell monolayer was washed three times with iced PBS and harvested with 0.5 mL of 0.1 mol/L NaOH. Finally, radioactivity was measured in both the medium and the cells by liquid scintillation in a Beckman LS 600C counter. Cholesterol efflux was expressed as the percentage of total label released. Each sample was tested by triplicate.

LCAT activity assays

α -LCAT activity was measured by the method of Chen and Albers [22]. Briefly: apoA1/phosphatidylcholine/ ^{14}C -cholesterol complexes (HDLr) were incubated with either Htx or control rat plasma in a shaking water bath for 1 h at 37°C (esterification was linear during this time). The reaction was stopped, and lipids were extracted with chloroform-methanol 2:1. Esterified and unesterified cholesterol were separated by thin-layer chromatography, and the radioactivity was counted.

Lipases activity

Lipases activity was assessed using a glycerol stabilized phospholipid-triglyceride emulsion as substrate [23]. Briefly, 1.2 g of purified olive oil was mixed with 36 mg of phosphatidylcholine and 12.5 g of glycerol. The mixture was sonicated for 5 min at 20 watts. Total lipase activity was determined using 100 μL of postheparine plasma in 900 μL of 150 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.5 buffer containing 50 mU

Heparin, 3.75% human albumin, 5% of heat-inactivated rat serum as apo CII source and 50 μL of the triglyceride emulsion. The reaction mixture was incubated 1 h at 37°C and the reaction was stopped and the fatty acids produced by the lipolysis were extracted by the method of Belfrage and Vaughan [24]. The fatty acids in the organic phase were estimated by a manual titration method using 1.25 mM NaOH in absolute ethanol and thymol blue as final-point indicator. Quantitative results were obtained using a standard curve of palmitic acid between 2 and 8 mM. Basal free fatty acids were determined in preheparin plasmas and subtracted from lipase activities. Hepatic lipase (HL) activity was determined as described for total lipase activities, but using a reaction buffer that lacked apo CII source, and containing 1 M of NaCl. This buffer inhibits lipoprotein lipase (LPL). LPL activity was calculated by subtracting HL activity from total lipase activity. One unit of lipase activity is defined as 1 mmol of fatty acid produced per hour.

Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm S.D. Comparison of experimental vs. control groups was made using the Student's *t*-test, and Pearson's correlation analysis. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Lipid profile

Plasma lipid alterations induced by thyroidectomy were characterized by a slight but significant reduction of total plasma triglycerides (Table 1). We also observed a 300% increase in LDL-cholesterol and a 25% decrease in HDL-cholesterol compared to control group (Table 1). We corroborate our previous observation that plasma cholesterol although modified, did not reach significant differences [18].

Table 1. Lipids and apolipoproteins plasma profile (mg/dL) in hypothyroid and control rats

Group	Hypothyroid (n = 10)	Control (n = 10)
Plasma triglycerides	42.8 \pm 7.2*	52.4 \pm 12.3
Plasma cholesterol	54.0 \pm 13.7	48.1 \pm 11.2
LDL-Cholesterol	25.3 \pm 8.4*	8.5 \pm 3.8
HDL-Cholesterol	23.4 \pm 6.1*	32.5 \pm 8.2

Values are expressed as mean \pm S.D. *Significantly different from control ($p < 0.05$).

Cholesterol efflux and LCAT activity

The first stage of RCT, that is, the removal of cholesterol from peripheral tissues, showed that the proportion of cellular cholesterol released by serum of Htx rats vs. control serum was similar after 3 h of incubation (Fig. 1). Similarly, HDL from Htx rats promoted an average cholesterol efflux of 10%, comparable to the capacity of HDL-Ctrl to remove cholesterol from cell membranes (10.4%) under the same conditions (Fig. 1). Positive controls of human HDL₃ at 100 µg/mL promoted 15.7% of cholesterol efflux, comparable to the efflux promoted using rat HDL (data not shown).

Activities of enzymes involved in RCT

Once cholesterol is integrated to HDL surface, the next stage in RCT is cholesterol esterification by LCAT. Enzyme activity was assessed using phospholipids/apo AI/cholesterol-reconstituted HDL as external substrate, which is indicative of the enzyme concentration [22]. Mean plasma LCAT activities of Htx rats determined by this method, were about 30% lower compared to control group (Table 2). After cholesterol esters are brought to the liver, HDL remodeling take place in part by the hepatic lipase. Using an external source of triglycerides, mean HL activity in Htx group was reduced by 30% compared to control group, meaning that chronic hypothyroid status results in a decreased expression of the enzyme. HL activities did not show any significant correlation

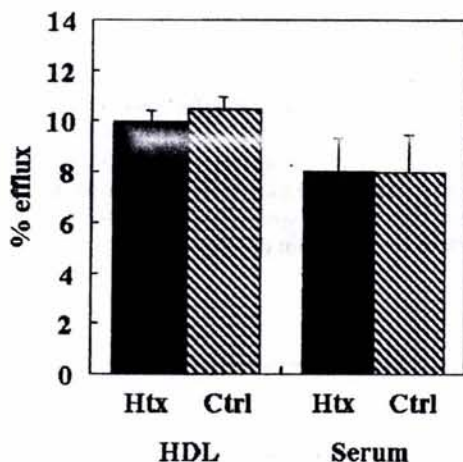


Fig. 1. Bar graph showing the percentage of relative efflux of cholesterol \pm S.D. from Fu5AH cells incubated with HDL (50 µg/mL final concentration in culture medium) or serum (5% in culture medium) of Htx (solid bars, $n = 8$) and control rats (dashed bars, $n = 8$). Membrane cells were loaded with ^3H -cholesterol and incubated for 3 h, as described in the 'Materials and methods' section.

Table 2. Enzyme activity of lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT), hepatic lipase (LH), and lipoprotein lipase (LPL) in Htx and Control rats

Enzyme	Group	
	Htx ($n = 8$)	Control ($n = 8$)
LCAT (% esterification/h/100µl plasma)	12.2 \pm 3.0*	17.3 \pm 5.3
LH (mU/mL plasma)	318.57 \pm 101.81*	451.16 \pm 23.88
LPL (mU/mL plasma)	251.85 \pm 155.41	247.50 \pm 80.10

* $p < 0.05$ vs. Control.

with plasma lipids nor with HDL-lipid contents (data not shown). Since triglycerides in HDL have their origin mainly in passive exchange with chylomicrons and VLDL, LPL that catalyze the triglyceride contained in those lipoproteins may have an indirect effect on HDL structure. In this study, Htx rats presented low triglyceride plasma levels, which suggest high LPL activities. However, the LPL activity in Htx animals was similar to those of controls (Table 2). These results indicate that the enzyme has a minimal contribution to altered HDL structure found in chronic hypothyroidism in rats.

Discussion

Atherosclerosis is a common feature in chronic hypothyroidism usually attributed to an increase in cholesterol plasma levels since thyroid hormones up-regulate LDL-receptor expression [25, 26]. High LDL-cholesterol levels were in fact the most striking lipoprotein abnormality in our hypothyroid animal model. Nevertheless, the role of an impaired RCT in this physiopathological condition has not been considered, because HDL plasma levels are frequently normal or even elevated [10–12]. One important difference between HDL metabolism in the rat versus primates is the absence of CETP in the former [27]; as a result, the rat does not transfer the cholesterol ester-laden core of HDL to VLDL, thus providing a suitable model for the study of HDL metabolism without the influence of variations in the CETP activity. Using the rat model, we have recently demonstrated that hypothyroidism results in significantly larger HDL, enriched in apo E and phospholipids, and poor in apo AIV content [18]. Such HDL abnormalities contribute to decrease HDL-apo AI catabolism suggesting an impaired RCT in chronic hypothyroid rats that may contribute to the development of atherosclerosis in the hypothyroid status. In the present work, we analyzed some stages of RCT, in order to establish if there are other abnormalities in this pathway associated with chronic hypothyroidism.

The first RCT stage is the cholesterol efflux from peripheral cells to HDL particles. Since HDL size determines their

capacity to accept cholesterol [4], i.e. small apo AI-containing HDL promote more cholesterol efflux and HDL are larger in Htx rats, it could be expected that cholesterol efflux would be impaired in these animals. However, the capacity of serum of Htx rats as well as HDL from Htx rats to promote cholesterol efflux from culture cells is similar to that of control serum or HDL isolated from control rats. These results strongly suggest that structural modifications of HDL from Htx rats [18], do not alter the capacity to accept cholesterol from cells. SR-BI expression is abundant in Fu5AH cells [28] suggesting that HDL from Htx rats interacted normally with the SR-BI efflux pathway. Such SR-BI-mediated cholesterol efflux is strongly dependent on the content and composition of phospholipids in the HDL fraction [29]. Since HDL from Htx animals were 18% enriched in phospholipids [18], the expected decrease in cholesterol efflux, promoted by large HDL from Fu5AH cells, might be counterbalanced by the high HDL-phospholipid content.

Once cholesterol is incorporated into HDL, it is esterified by LCAT. Two different activities have been described for LCAT; α -LCAT activity corresponds to cholesterol esterification in HDL, and β -LCAT indicates cholesterol esterification in VLDL/LDL [30]. Our results showed that α -LCAT activity was reduced in Htx rats using an external HDLr for cholesterol esterification, which is indicative of low LCAT concentration [22]. As LCAT is generally considered the driving force of RCT, this abnormality can be added to the dysfunction of the whole metabolic pathway. It could be argued that LCAT mass does not always reflect *in vivo* esterification rates because they depend upon the nature and concentration of plasma lipoproteins. Nevertheless, high plasma levels of LDL particles and low concentration of HDL from Htx rats are favorable for the β -LCAT over the α -LCAT activity *in vivo* [31]. As a consequence, it can be stated that chronic hypothyroidism results in an impaired RCT at the HDL-cholesterol esterification stage.

Concerning the general lipoprotein metabolism, low LCAT activities has been recently demonstrated in patients with high LDL-cholesterol levels [31]. Our animal model presents a similar feature, low LCAT activity/high LDL-cholesterol, thus supporting the hypothesis that low LCAT activity is a consequence of hypercholesterolemia [31]. Such hypothesis implies that high LDL-cholesterol plasma concentrations contribute at two different levels to the development of atherosclerosis, firstly by cholesterol deposition into the sub-endothelial space, and secondly, by decelerate RCT rate at the cholesterol esterification stage. Whether or not plasma cholesterol down-regulates LCAT expression remains to be elucidated.

After cholesterol reaches the liver, HDL are remodeled particularly by the phospholipid transport protein (PLTP) and by HL which also possess a phospholipase activity [32]. Since HDL from Htx rats were significantly enriched in phospho-

lipids [18], we expected an impaired HL or phospholipid transfer protein (PLTP) activity in Htx group. PLTP activity was measured, using an external phospholipid donor and no difference was observed between groups (data not shown). On the other hand, HL activity, determined by an external substrate (reconstituted HDL) method that is indicative of HL mass, was decreased in agreement with previous reports in hypothyroidism [15, 33]. In those reports, plasma levels of HDL subfractions correlated with HL activities [15] and T4 treatment resulted in a decrease of HDL₂-phospholipids in hypothyroid patients [33]. In our animal model we found low HL activities and both high phospholipid content in HDL and low plasma levels of those lipoproteins. Together these results suggest that a low HL postheparine plasma level in hypothyroidism increases the phospholipid content of HDL; however, we failed to demonstrate a correlation between postheparin HL activities and phospholipids in HDL, probably because the HDL-phospholipids from Htx rats had only slight variations between individuals [18] and the variation in HL activities is wide in each group. Conversely, HL triglyceride lipase activity seems to have a minor effect in HDL structure since HDL-triglyceride content remains constant, as it has been observed in this work and in previous reports [15, 18, 33].

In summary, this study demonstrates that chronic hypothyroidism in the rat, an animal that lacks CETP activity, induced an impaired RCT, mainly in cholesterol esterification and HDL remodeling by HL. The latter probably results in an abnormal HDL structure, i.e. phospholipid enrichment, which contributes to decreased HDL-apo AI fractional catabolic rates as it has been previously demonstrated [18]. Whether such RCT impairment contributes to atherosclerosis development in hypothyroid status remains to be elucidated.

Acknowledgements

This work was supported by CONACYT grant No. J28942M. We are indebted to Muriel Bouilly for the determination of PLTP activities.

References

1. Miller NE: High-density lipoprotein: A major risk factor for coronary atherosclerosis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1: 603-622, 1987
2. Parra HJ, Arveiler D, Evans AE, Cambou JP, Amouyel P, Bingham A, McMaster D, Schaffer P, Douste-Blazy P, Luc G: A case-control study of lipoprotein particles in two populations at contrasting risk for coronary heart disease. The ECTIM Study. *Arterioscler Thromb* 12: 701-707, 1992
3. Fielding CJ, Fielding PE: Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 36: 211-228, 1995

4. Castro GR, Fielding CJ: Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre- β -migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry* 27: 25-29, 1988
5. Matveev S, Uittenbogaard A, van Der Westhuyzen D, Smart EJ: Caveolin-1 negatively regulates SR-BI mediated selective uptake of high-density lipoprotein-derived cholesteryl ester. *Eur J Biochem* 268: 5609-5616, 2001
6. Jiang X, Francone OL, Bruce C, Milne R, Mar J, Walsh A, Breslow JL, Tall AR: Increased prebeta-high density lipoprotein, apolipoprotein AI, and phospholipid in mice expressing the human phospholipid transfer protein and human apolipoprotein AI transgenes. *J Clin Invest* 98: 2373-2380, 1996
7. Barrans A, Collet X, Barbaras R, Jaspard B, Manent J, Vieu C, Chap H, Perret B: Hepatic lipase induces the formation of pre-beta 1 high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich HDL2. A study comparing liver perfusion to *in vitro* incubation with lipases. *J Biol Chem* 269: 11572-11577, 1994
8. Taylor AH, Wishart P, Lawless DE, Raymond J, Wong NC: Identification of functional positive and negative thyroid hormone-responsive elements in the rat apolipoprotein AI promoter. *Biochemistry* 35: 8281-8288, 1996
9. Apostolopoulos JJ, Marshall JF, Howlett GJ: Triiodothyronine increases rat apolipoprotein A-I synthesis and alters high-density lipoprotein composition *in vivo*. *Eur J Biochem* 194: 147-154, 1990
10. Valdemarsson S, Hedner P, Nilsson-Ehle P: Dyslipoproteinaemia in hypothyroidism of pituitary origin: Effects of L-thyroxine substitution on lipoprotein lipase, hepatic lipase, and on plasma lipoproteins. *Acta Endocrinol* 103: 192-197, 1983
11. Muls E, Rosseneu M, Bleton V, Lesaffre E, Lamberigts G, De Moor P: Serum lipids and apolipoproteins A-I, A-II and B in primary hypothyroidism before and during treatment. *Eur J Clin Invest* 14: 12-15, 1984
12. Scottolini AG, Bhagavan NV, Oshiro TH, Abe SY: Serum high-density lipoprotein cholesterol concentrations in hypo- and hyperthyroidism. *Clin Chem* 26: 584-587, 1980
13. Danese MD, Ladenson PW, Meinert CL, Powe NR: Clinical review 115: Effect of thyroxine therapy on serum lipoproteins in patients with mild thyroid failure: A quantitative review of the literature. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 2993-3001, 2000
14. Dullaart RP, Hoogenberg K, Groener JE, Dikkeschei LD, Erkelens DW, Doorenbos H: The activity of cholesteryl ester transfer protein is decreased in hypothyroidism: A possible contribution to alterations in high-density lipoproteins. *Eur J Clin Invest* 20: 581-587, 1990
15. Tan KC, Shiu SW, Kung AW: Effect of thyroid dysfunction on high-density lipoprotein subfraction metabolism: Roles of hepatic lipase and cholesteryl ester transfer protein. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2921-2924, 1998
16. Tall AR: Plasma cholesteryl ester transfer protein and high-density lipoproteins: New insights from molecular genetic studies. *J Intern Med* 237: 5-12, 1995
17. Yamashita S, Maruyama T, Hirano KI, Sakai N, Nakajima N, Matsuzawa Y: Molecular mechanisms, lipoprotein abnormalities and atherogenicity of hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis* 152: 271-285, 2000
18. Huesca-Gomez C, Franco M, Luc G, Montañó LF, Masso F, Posadas-Romero C, Pérez-Méndez O: Chronic hypothyroidism induces abnormal structure of high-density lipoproteins and impairs kinetics of apolipoprotein A-I in the rat. *Metabolism* 51: 443-450, 2002
19. Franco M, Tapia E, Martínez F, Davila ME, Grimaldo JI, Medina K, Herrera-Acosta J: Adenosine regulates renal nitric oxide production in hypothyroid rats. *J Am Soc Nephrol* 10: 1681-1688, 1999
20. Lowry OH, Rosebrough HJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
21. de la Llera Mora M, Atger V, Paul JL, Fournier N, Moatti N, Giral P, Friday KE, Rothblat G: A cell culture system for screening human serum for ability to promote cellular cholesterol efflux. Relations between serum complement, esterification and transfer. *Arterioscler Thromb* 14: 1056-1065, 1994
22. Chen C, Albers JJ: Characterization of proteoliposomes containing apolipoprotein A-I. A new substrate for the measurement of lecithin cholesterol acyltransferase activity. *J Lipid Res* 23: 680-691, 1982
23. Nilsson-Ehle, Schotz MC: A stable, radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 17: 536-41, 1976
24. Belfrage P, Vaughan M: Simple liquid-liquid partition system for isolation of labeled oleic acid from mixtures with glycerides. *J Lipid Res* 10: 341-344, 1969
25. Hudig F, Bakker O, Wiersinga WM: Tri-iodothyronine prevents the amiodarone-induced decrease in the expression of the liver low-density lipoprotein receptor gene. *J Endocrinol* 152: 413-421, 1997
26. Wiseman SA, Powell JT, Humphries SE, Press M: The magnitude of the hypercholesterolemia of hypothyroidism is associated with variation in the low-density lipoprotein receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 108-112, 1993
27. Oschry Y, Eisenberg S: Rat plasma lipoproteins: Re-evaluation of a lipoprotein system in an animal devoid of cholesteryl ester transfer activity. *J Lipid Res* 23: 1099-1106, 1982
28. Jian B, de la Llera-Moya M, Ji Y, Wang N, Phillips MC, Swaney JB, Tall AR, Rothblat GH: Scavenger receptor class B type I as a mediator of cellular cholesterol efflux to lipoproteins and phospholipid acceptors. *J Biol Chem* 273: 5599-5606, 1998
29. Fournier N, Paul JL, Atger V, Cogny A, Soni T, de la Llera-Moya M, Rothblat G, Moatti N: HDL phospholipid content and composition as a major factor determining cholesterol efflux capacity from Fu5AH cells to human serum. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 2685-2691, 1997
30. Carlson LA, Holmquist L: Evidence for the presence in human plasma of lecithin:cholesterol acyltransferase activity (β -LCAT) specifically esterifying free cholesterol of combined pre- β - and β -lipoproteins: Studies of fish eye patients and control subjects. *Acta Med Scand* 218: 197-205, 1985
31. Lee M, Kim JQ, Oh H, Park M: Studies on plasma lipid profiles, and LCAT and CETP activities according to hyperlipoproteinemia phenotypes (HLP). *Atherosclerosis* 159: 381-389, 2001
32. Hime NJ, Barter PJ, Rye KA: Evidence that apolipoprotein A-I facilitates hepatic lipase mediating phospholipid hydrolysis in reconstituted HDL containing apolipoprotein AII. *Biochemistry* 40: 5496-5505, 2001
33. Pazos F, Alvarez JJ, Rubies-Prat J, Varela C, Lasuncion MA: Long-term thyroid replacement therapy and levels of lipoprotein(a) and other lipoproteins. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 652-656, 1995