



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

---

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ROSIGLITAZONA  
SOBRE LA CARGA Y EL METABOLISMO DE LAS  
LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A**

**KARLA MARGEL RENDÓN SAUER**



**MÉXICO, DF.**

**MAYO, 2007**



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.

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** LUZ DEL CARMEN CASTELLANOS ROMÁN

**VOCAL:** MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES

**SECRETARIO:** ÓSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ

**1er. SUPLENTE:** EUCLIDES ÁVILA CHÁVEZ

**2o. SUPLENTE:** MARTHA PATRICIA NERI PÁEZ

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA**

ÁREA DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

DR. OSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ

---

KARLA MARGEL RENDÓN SAUER

---

Esta tesis la quiero dedicar a todas las personas que me ayudaron a lo largo de mi vida:

**A Dios**, porque aunque a veces tenía mis ratos de duda, siempre estuviste conmigo y nunca me dejaste sola. Porque si no hubieras estado a mi lado, muchas de las cosas que emprendí no las hubiera terminado nunca...

**A Angeles**, mi mamá, porque desde la primaria y todavía en la universidad te aluciné diciendo : “¿Qué no te vas a poner a estudiar?”. Porque gracias a tu dedicación he logrado terminar una carrera y porque siempre me has ayudado mucho en mi vida. Aunque a veces no lo digo muy seguido, muchas gracias por todo.

**A Carlos**, mi papá, porque entendió mi vocación cuando decidí no estudiar Cibernética, y porque hoy le demuestro que sí lo logré. Te quiero mucho papá, ¿ya ves que sí valió la pena salirme de La Salle?

**A Susana**, mi hermana, porque en algún momento fuiste mi ejemplo a seguir, porque quería ser como tú, aunque me desvié un poco y no estudié medicina. Gracias por tus consejos y por las cosas que aprendí de ti.

**A Emerson**, mi novio, porque reconociste lo que había en mí debajo de toda la maraña que me envolvía cuando nos conocimos. Gracias por tu amor y por todo el apoyo que me brindaste entonces y ahora.

**A Óscar**, mi asesor, porque más que eso eres un gran amigo. Gracias por lo que me has enseñado de los lípidos pero sobre todo, por los consejos ajenos a esta tesis.

**A Mariana y Eli**, porque no saben lo mucho que las extraño, porque bailar “Eli Eli” con los conejos era muy divertido y porque no hubieran existido mejores personas con las cuales compartir el espacio en el laboratorio para realizar mi tesis.

**A Paty, Natllely, Nieves y Daniela**, porque gracias a todas ellas mi estancia en la universidad fue lo más divertido que me haya pasado. Gracias por todos esos desvelos comiendo, fumando, tomando café y estudiando. Siempre las voy a llevar en mi corazón.

**A mí**, porque gracias a mi esfuerzo y dedicación logré terminar una licenciatura y estoy muy orgullosa de poder decir que estudié en la Facultad de Química de la UNAM.

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	3
2.1 LIPOPROTEÍNAS	3
2.1.1 COMPONENTES DE LAS LIPOPROTEÍNAS	4
2.1.1.1 LÍPIDOS	4
2.1.1.2 APOLIPOPROTEÍNAS	4
2.1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS	4
2.1.3 METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD	7
2.1.3.1 FACTORES BIOLÓGICOS	7
2.1.3.2 EFECTO DE LA CARGA ELÉCTRICA SOBRE EL METABOLISMO DE LAS HDL	9
2.1.3.3 METABOLISMO DE LAS HDL: TRANSPORTE REVERSO DEL COLESTEROL	9
<b>3. ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA Y SUBCLASES DE HDL</b>	11
<b>4. TIAZOLIDINEDIONAS</b>	14
4.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS TIAZOLIDINEDIONAS	14
4.2 EFECTO DE LAS TZDs SOBRE EL METABOLISMO DE LAS HDL	15
<b>5. JUSTIFICACIÓN</b>	16
<b>6. HIPÓTESIS</b>	17
<b>7. OBJETIVOS</b>	17
7.1 OBJETIVO GENERAL	17
7.2 OBJETIVOS PARTICULARES	17
<b>8. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	18
8.1 ANIMALES	18
8.2 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS	18
8.3 ANÁLISIS DE LABORATORIO	18
8.4 AISLAMIENTO Y MARCAJE DE APO A-I DE CONEJO.	18
8.5 CINÉTICA METABÓLICA DE LA APO A-I DE LAS HDL	19
8.6 AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS SUBPOBLACIONES DE HDL	20
8.7 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD DE CARGA DE SUPERFICIE	21
8.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	23
<b>9. RESULTADOS</b>	24
9.1 PERFIL DE LÍPIDOS Y GLUCOSA	24
9.2 CINÉTICA METABÓLICA DE LA APO A-I DE LAS HDL	24
9.3 SUBCLASES DE HDL Y COMPOSICIÓN QUÍMICA	26
9.4 DENSIDAD DE CARGA DE SUPERFICIE	29
<b>10. DISCUSIÓN</b>	30
<b>11. CONCLUSIONES</b>	35
<b>13. BIBLIOGRAFÍA</b>	36

## ABREVIATURAS

<b>ABCA-1:</b>	Transportador de membrana dependiente de ATP
<b>Apo:</b>	Apolipoproteínas
<b>Cd</b>	Densidad de carga de superficie
<b>CETP:</b>	Proteína de transferencia de ésteres de colesterol
<b>C-HDL:</b>	Colesterol de HDL
<b>C-LDL:</b>	Colesterol de LDL
<b>CT:</b>	Colesterol total
<b>EAC:</b>	Aterosclerosis (Enfermedad aterosclerosa coronaria)
<b>FCR:</b>	Tasa de catabolismo fraccional
<b>HDL:</b>	Lipoproteínas de alta densidad
<b>IDL:</b>	Lipoproteínas de densidad intermedia
<b>LCAT:</b>	Lecitina colesterol acilo transferasa
<b>LDL:</b>	Lipoproteínas de baja densidad
<b>LH:</b>	Lipasa hepática
<b>Lp:</b>	Lipoproteínas
<b>LPL:</b>	Lipoproteína lipasa
<b>PAGE:</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>Pip:</b>	Fosfolípidos
<b>PLTP:</b>	Proteína de transferencia de fosfolípidos
<b>PON:</b>	Paraoxonasa
<b>PPAR:</b>	Receptor activado por proliferador de peroxisomas
<b>PPRE:</b>	Elemento de respuesta a proliferadotes de peroxisomas
<b>PR:</b>	Tasa de producción
<b>SR-BI:</b>	Receptor scavenger clase B tipo I
<b>Tg:</b>	Triacilgliceroles, Triglicéridos
<b>TRC:</b>	Transporte reverso del colesterol
<b>VLDL:</b>	Proteínas de muy baja densidad

## 1. RESUMEN

La enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC) es la primera causa de mortalidad en los países desarrollados y es la segunda causa de muerte en la población adulta en nuestro país, después de la diabetes mellitus (DM).

Estudios epidemiológicos han demostrado una correlación inversa entre las concentraciones de colesterol de HDL (C-HDL) y la incidencia de desarrollar EAC, la cual se ha tratado de explicar por el papel que juegan las HDL en el transporte reverso del colesterol (TRC).

La rosiglitazona, un antidiabético oral y agonista de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ), es capaz de modificar la densidad de carga de superficie (Cd) y no modificar la tasa de catabolismo fraccional (FCR) de las HDL, sugiriendo que tiene efecto sobre el metabolismo de estas lipoproteínas; sin embargo, los mecanismos moleculares aún no han sido bien establecidos.

Para determinar si la rosiglitazona tiene un impacto directo sobre el metabolismo, la composición, la estructura y la densidad de carga de superficie (Cd) de las HDL se administró el fármaco por vía oral a dosis de 0.32 mg/Kg de peso durante 8 semanas a conejos macho (3.5-4.0 kg) de raza Nueva Zelanda. Se realizó una cinética metabólica de A-I de HDL, utilizando un marcaje exógeno con yodo ( $^{125}\text{I}$ ). Los resultados muestran que el tratamiento con rosiglitazona no incrementa los niveles plasmáticos del C-HDL y no modifica la tasa de catabolismo fraccional (FCR) en comparación con el grupo control ( $0.03\pm 0.004$  vs  $0.026\pm 0.006$  h $^{-1}$ ).

La determinación de la densidad de carga de superficie de las HDL por medio de una electroforesis en gel de agarosa, mostró un incremento en la Cd de HDL de conejos tratados con rosiglitazona del 17.66% en comparación con la carga de las HDL antes del tratamiento ( $14.1\pm 6.3$  vs  $12.0\pm 3.9 \times 10^3$  esu/cm $^2$ ;  $p < 0.05$ )

La separación por tamaños de HDL a través de electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente de concentración 3-30% (PAGE), mostró que el tratamiento con rosiglitazona disminuye en un 23% ( $38.9 \pm 12.7$  vs  $50.6 \pm 12.0$ ;  $p < 0.05$ ) la proporción de partículas HDL<sub>2b</sub>, e incrementa las HDL<sub>3c</sub> en un 95% ( $3.9 \pm 2.8$  vs  $2.0 \pm 1.5$ ;  $p < 0.05$ ) en comparación con el pretratamiento.

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que el tratamiento con pioglitazona incrementa la FCR de las HDL. En el presente estudio, el tratamiento con el mismo fármaco disminuyó la Cd de HDL de conejos un 36.3% en comparación con la carga de las HDL antes del tratamiento ( $7.8 \pm 1.4$  vs  $12.2 \pm 1.2$  esu/cm<sup>2</sup>;  $p < 0.05$ )

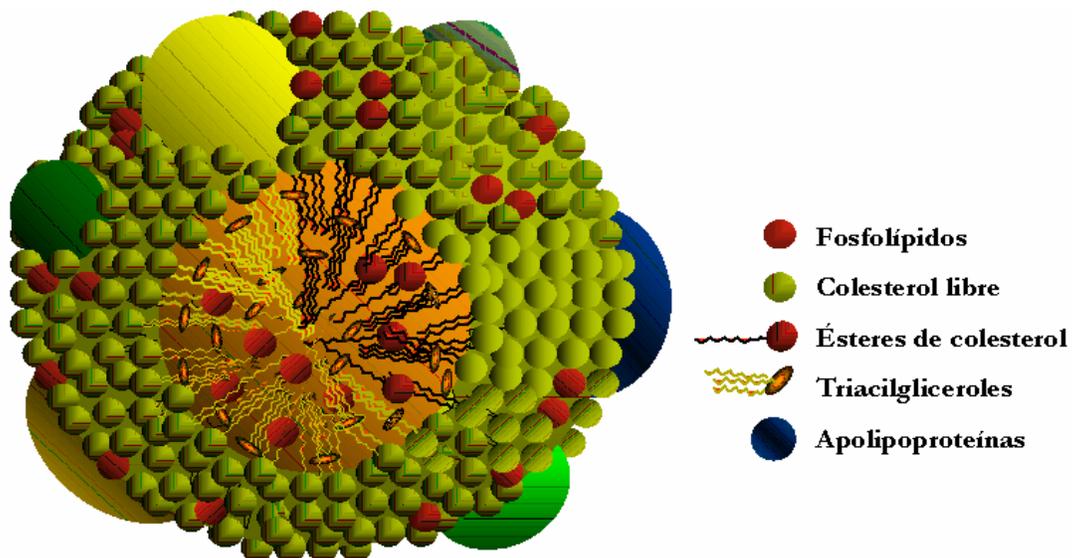
Por lo tanto, el aumento en la carga de superficie concomitante a un FCR de las HDL que no se modifica por el tratamiento con rosiglitazona, sugiere que la Cd de las HDL es un factor determinante en la velocidad de catabolismo de la apo A-I de las HDL. A estos resultados, se asocia un enriquecimiento en el contenido de fosfolípidos y apo- A-I por lo que la composición química y estructural de las HDL también podría jugar un papel importante en la densidad de carga y el metabolismo de estas lipoproteínas. En resumen, el tratamiento con rosiglitazona modifica el tamaño, composición y densidad de carga de las HDL, pero no altera el catabolismo de estas lipoproteínas. Estas modificaciones sugieren que la carga de superficie puede ser un factor determinante en la velocidad de eliminación de las HDL. Esta propuesta debe ser demostrada específicamente en estudios posteriores.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 LIPOPROTEÍNAS

Los lípidos son moléculas relativamente insolubles en agua. Por este motivo, para ser transportadas en la sangre desde su lugar de síntesis hasta su destino final, forman complejos macromoleculares y pseudomicelares con proteínas. Estos complejos reciben el nombre de lipoproteínas (Lp).

Las lipoproteínas (Fig.1) están constituidas de un núcleo de lípidos no polares (triacilgliceroles y ésteres de colesterol), rodeadas de una mezcla de lípidos anfipáticos (fosfolípidos y colesterol libre), y por proteínas llamadas apolipoproteínas que estabilizan el complejo macromolecular.



**Fig. 1.** Esquema general de la composición de las lipoproteínas. Se muestran los lípidos hidrofóbicos del núcleo, en su superficie los lípidos anfipáticos y las apolipoproteínas que estabilizan a la lipoproteína.

## **2.1.1 COMPONENTES DE LAS LIPOPROTEÍNAS**

### **2.1.1.1. LÍPIDOS**

Los lípidos son moléculas de origen biológico solubles en disolventes orgánicos, y muy poco solubles en agua. Presentan gran diversidad de estructuras y funciones, además de formar parte de las lipoproteínas plasmáticas y de las membranas. Algunas de sus funciones son: participar como cofactores enzimáticos, agentes emulsionantes, como fuente de energía y formar parte de la estructura de hormonas y de mensajeros intracelulares. Los principales lípidos en el plasma humano son el colesterol, los fosfolípidos, los triacilgliceroles y los ácidos grasos.

### **2.1.1.2 APOLIPOPROTEÍNAS**

Las apolipoproteínas son el componente proteico de las lipoproteínas y tienen la función de estabilizar la pseudomicela lipídica, mediante uniones no covalentes entre los lípidos que conforman al complejo macromolecular.

Estos polipéptidos son de peso molecular variable, actúan como ligandos de receptores y como cofactores de enzimas del metabolismo de los lípidos. Las diferentes apolipoproteínas y sus principales características se resumen en el Cuadro 1 [1].

## **2.1.2. CLASIFICACIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS**

Las lipoproteínas se han clasificado de acuerdo a su densidad de flotación, a su movilidad electroforética y a su contenido en apolipoproteínas.

Las características de movilidad electroforética y de composición química de las lipoproteínas se detallan en el Cuadro 2 [2].

**CUADRO 1. CARACTERÍSTICAS DE LAS APOLIPOPROTEÍNAS**

<b>Apo</b>	<b>LOCALIZACIÓN</b>	<b>SITIO DE SÍNTESIS</b>	<b>FUNCIÓN</b>
A-I	HDL, Qm	Intestino Hígado	Principal componente de las HDL, activador de LCAT, estimula el eflujo del colesterol.
A-II	HDL	Intestino Hígado	Principal proteína componente de HDL, inhibidor de LH y de la LCAT.
A-IV	HDL, Qm	Intestino	Activador de LCAT, modulador de LPL y estimula el eflujo de colesterol.
B-100	VLDL, LDL	Hígado	Ligando para receptor de LDL.
B-48	Qm	Intestino	Proteína estructural de los Qm.
C-I	HDL, VLDL, Qm	Hígado	Activador de LCAT, inhibe la captación hepática de Tg.
C-II	HDL, VLDL, Qm	Hígado	Activador LPL, inhibición de la captación hepática de Lp-apo B-100.
C-III <sub>0,1,2</sub>	HDL, VLDL, Qm	Hígado	Inhibidor de la LPL.
E <sub>2,3,4</sub>	VLDL, HDL	Hígado	Ligando de receptor de LDL y de residuos de Qm, estimula el eflujo de colesterol.

Tg: Triacilglicerol, HDL: Lipoproteínas de alta densidad, Qm: Quilomicrones, LDL: Lipoproteínas de baja densidad, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, LCAT: Lecitina: colesterol aciltransferasa, LPL: Lipoproteína lipasa, LH: Lipasa hepática.

□ De acuerdo a su densidad de flotación se conocen cinco clases de lipoproteínas:

a) Quilomicrones (Qm)

Son las partículas de mayor tamaño (>70 nm) y las de menor densidad ( $d < 0.94$  g/mL), con respecto al resto de las otras lipoproteínas. Tienen un alto contenido en triacilglicerol y sus apolipoproteínas son: B-48, A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E.

b) Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, Very Low Density Lipoproteins)

Su tamaño varía desde 30-70 nm y su densidad está comprendida en un intervalo de 0.94 a 1.006 g/mL. Contienen principalmente triacilgliceroles, apo B-100, C-I, C-II, C-III y E.

c) Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, Intermediate Density Lipoproteins)

Su tamaño varía desde 20-30 nm y su densidad está comprendida en un intervalo de 1.006 a 1.019 g/mL. Estas partículas contienen colesterol y triacilgliceroles, apo B-100, C-I, C-II, C-III y E.

d) Lipoproteínas de baja densidad (LDL, Low Density Lipoproteins)

Su tamaño varía desde 18-30 nm y su densidad está comprendida en un intervalo de 1.019 a 1.063 g/mL.

Tienen un alto contenido en colesterol y apo B-100.

e) Lipoproteínas de alta densidad (HDL, High Density Lipoproteins)

Su tamaño varía desde 5-12 nm y su densidad está comprendida en un intervalo de 1.063 a 1.210 g/mL. Estas partículas tienen un alto contenido en proteínas y fosfolípidos y colesterol. Su apolipoproteína principal es la apo A-I, además contienen apoA-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E.

Las HDL, a su vez, pueden ser separadas en 2 subpoblaciones:

- HDL<sub>2</sub>: con densidad entre 1.063 y 1.120 g/mL
- HDL<sub>3</sub>: con densidad entre 1.120 y 1.210 g/mL.

□ De acuerdo a su migración electroforética se distinguen tres tipos de lipoproteínas:  $\alpha$ ,  $\beta$  y pre- $\beta$ .

□ De acuerdo a su contenido en apolipoproteínas, las lipoproteínas se pueden clasificar en dos poblaciones:

a) Las lipoproteínas que contienen apo A-I: Lp A-I y Lp A-II: En esta clasificación podemos encontrar a las HDL.

b) Las lipoproteínas que contienen apo B: Lp B; Lp B: E; Lp B: C-III y Lp B: C-III: E.

En esta clasificación podemos encontrar a las VLDL, IDL, LDL y los Qm.

## CUADRO 2. PROPIEDADES DE LAS LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Lp	MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA	PROTEÍNA (%)	Plp (%)	Tg (%)	C. L. (%)	C. E. (%)
Qm	Origen	1-2	3-6	90-95	1-3	2-4
VLDL	Pre-beta	6-10	15-20	45-65	4-8	5
IDL	Pre-beta beta	20	30	35	----	35
LDL	Beta	18-22	18-24	4-8	6-8	45-50
HDL	Alfa	45-55	26-32	2-7	3-5	15-20

Qm: Quilomicrones, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia, LDL: Lipoproteínas de baja densidad, HDL: Lipoproteínas de alta densidad, Plp: fosfolípidos, Tg: Triacilgliceroles, C. L.: Colesterol libre, C. E.: Colesterol esterificado.

### 2.1.3. METABOLISMO DE LIPOROTEINAS DE ALTA DENSIDAD

El metabolismo intravascular de las HDL está determinado tanto por factores biológicos como por factores fisicoquímicos que se presentan a continuación.

#### 2.1.3.1 FACTORES BIOLÓGICOS

La composición de las lipoproteínas plasmáticas se modifica continuamente, como resultado del intercambio dinámico y la transferencia de lípidos que existen entre ellas durante su metabolismo intravascular. Una gran variedad de enzimas, proteínas de transporte y algunos receptores de membrana como el receptor scavenger (“limpiador”) clase B tipo I (SR-BI), el transportador de membrana dependiente de ATP (ABCA-1), el receptor para apolipoproteínas B/E (Re-apo B/E) están involucrados en este metabolismo. Estas proteínas contribuyen a determinar la concentración plasmática de los lípidos, favoreciendo el transporte o la hidrólisis de los mismos.

En el Cuadro 3 se presentan algunas características destacables de las enzimas y proteínas de transporte que intervienen en el metabolismo de las lipoproteínas [1, 3].

**CUADRO 3. ENZIMAS Y PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS**

NOMBRE	FUNCIÓN	ORIGEN
LCAT	Cataliza la transferencia de un ácido graso proveniente de la lecitina o fosfatidilcolina, al colesterol libre que se encuentra presente en las HDL y en las LDL. Contribuye a la maduración de HDL.	Hepático
LH	Hidroliza los triacilglicerolos y fosfolípidos de HDL, IDL y LDL. Es cofactor de SR-BI para una captación selectiva, así como la generación de apo A-I libre de lípidos.	Hepático
LPL	Hidroliza los triacilglicerolos de VLDL y Qm utilizando C-II como cofactor. Favorece la generación de precursores de HDL.	Tejido adiposo y muscular, pared endotelial, pulmón.
CETP	Intercambia ésteres de colesterol por triacilglicerolos entre las HDL <sub>2</sub> y las lipoproteínas que contienen apo B.	Tejido adiposo, hepático, intestino delgado
ABCA-1	Modulación del flujo de colesterol y fosfolípidos. Favorece a la maduración de HDL.	Hígado, macrófagos e intestino
Re-apo B/E	Receptor para lipoproteínas que contienen apo B y E. Incrementa el flujo de colesterol vía los hepatocitos.	Hígado

LCAT: Lecitina colesterol aciltransferasa; LH: Lipasa hepática; LPL: Lipasa lipoprotéica; CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol. PLTP: Proteína de transferencia de fosfolípidos, SR-BI: Receptor scavenger BI, ABCA-1: Transportador de membrana dependiente de ATP, Re-apo B/E: receptor para apolipoproteínas B/EQm: Quilomicrones, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia, VLDL: Lipoproteínas de baja densidad, HDL: Lipoproteínas de alta densidad.

El efecto de las proteínas mencionadas en el cuadro 3 sobre la remodelación de las lipoproteínas depende de diferentes factores fisiológicos y fisicoquímicos, dentro de los que destacan el contenido de lípidos [4], el diámetro hidrodinámico [5] y la carga eléctrica de superficie, cuyos efectos se detallan a continuación.

### **2.1.3.2 EFECTO DE LA CARGA ELÉCTRICA SOBRE EL METABOLISMO DE LAS HDL**

Existen factores intrínsecos que pueden modificar el metabolismo de las HDL, dentro de los cuales tenemos a la densidad de carga de superficie (Cd), que se define como las unidades electrostáticas de una partícula por unidad de superficie [6]. Investigaciones realizadas con HDL reconstituidas han demostrado que la carga y la conformación de la apo AI afectan directamente el metabolismo in vitro de estas lipoproteínas, sugiriendo que la carga es una característica biofísica que puede regular su catabolismo en el plasma [6,7]. Asimismo, la remodelación de las HDL por los factores biológicos como las enzimas LCAT, CETP, PLTP y LH, puede alterarse por la carga de superficie de las HDL [8, 9, 10].

Davidson y colaboradores [11] reportaron que mientras más positivamente cargada esté la partícula HDL, es más fácilmente catabolizada del plasma. Aproximadamente el 90% de la carga de las HDL es debida a la apo AI, mientras que el 10% restante se debe a los fosfolípidos presentes en la superficie de la partícula.

De manera similar el receptor SR-BI, el cual se une a las HDL para el intercambio de colesterol, también es sensible a las cargas electrostáticas y se une a los fosfolípidos con una gran afinidad [12].

### **2.1.3.3 METABOLISMO DE LAS HDL: TRANSPORTE REVERSO DEL COLESTEROL**

Las HDL han sido catalogadas como partículas antiaterogénicas ya que evitan la formación de placa ateromatosa, a través de varios mecanismos entre los que se encuentra el transporte reverso del colesterol (TRC), que se define como el regreso de

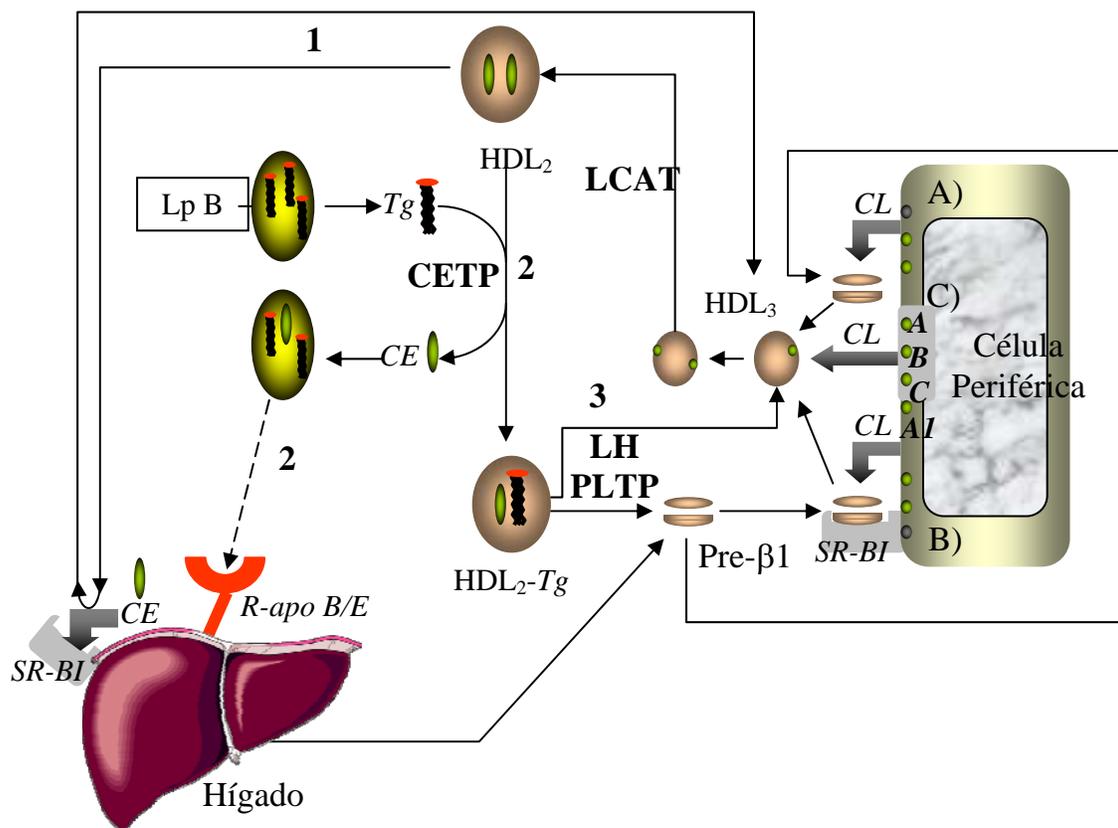
colesterol proveniente de las células periféricas hacia el hígado para su excreción o reciclaje [12, 13].

La primera etapa del TRC (Fig. 2) es el eflujo de colesterol y fosfolípidos a través de diversos mecanismos de las células hacia las HDL pequeñas, tipo pre- $\beta$  que son partículas discoidales tipo HDL<sub>3</sub> [14]. Una vez en estas partículas, el colesterol se esterifica por la enzima plasmática lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT) y los ésteres de colesterol formados, se mueven rápidamente al núcleo de las HDL dando origen a HDL de mayor tamaño y menor densidad, tipo HDL<sub>2</sub>.

A partir de ahí, el colesterol ya esterificado puede tomar tres caminos:

1. Puede ser eliminado directamente de la lipoproteína por un mecanismo en el cual interviene el receptor hepático SR-BI, generando así partículas pequeñas, HDL<sub>3</sub>, capaces de reiniciar el ciclo de captación de colesterol
2. Por medio de diversas reacciones de transferencia, en las que interviene la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), el colesterol de las HDL<sub>2</sub> es intercambiado por triacilgliceroles provenientes de lipoproteínas ricas en apo B, como VLDL e IDL. Por otra parte, la apo-C y apo-E pasan a los quilomicrones y VLDL. El colesterol de las lipoproteínas ricas en apo B puede eliminarse mediante el receptor para apo B/E del hígado.
3. Las HDL<sub>2</sub> ricas en triglicéridos provenientes de las lipoproteínas ricas en apo B, son sustrato de la lipasa hepática (LH) que hidroliza los triacilgliceroles de las HDL<sub>2</sub>, y en sinergia con la actividad de la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP), remodela los remanentes de HDL en partículas pre- $\beta$  y HDL<sub>3</sub>, ambas con la capacidad de reiniciar el ciclo.

Es así como el colesterol de los tejidos periféricos llega al hígado para ser reciclado y excretado a través de las vías biliares [15].



**Fig.2** Transporte Reverso del Colesterol. Mecanismo por el cual las lipoproteínas de alta densidad (HDL) transportan el colesterol excedente de las células periféricas al hígado. Lp- B: Lipoproteínas ricas en apo B (VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad, LDL: lipoproteínas de baja densidad y Qm: Quilomicrones). LCAT: Lecitina colesterol aciltransferasa; LH: Lipasa hepática; CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol, PLTP: Proteína de transferencia de fosfolípidos, SR-BI: Receptor scavenger BI, ABCA-1: Transportador de membrana dependiente de ATP, CL: Colesterol libre, HDL<sub>2</sub>-Tg: HDL<sub>2</sub> enriquecidas con triglicéridos

### 3. ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA Y SUBCLASES DE HDL

La enfermedad arterial coronaria (EAC), es una forma específica de un proceso inflamatorio crónico resultado de las interacciones entre las lipoproteínas del plasma, componentes celulares (monocitos/macrófagos, linfocitos T, células endoteliales y células de músculo liso) y la matriz extracelular de la pared arterial [16]. En esta enfermedad existe depósito de lípidos que conforman la placa ateromatosa [17].

La EAC puede iniciar con la infiltración de lipoproteínas de baja densidad (LDL) al espacio subendotelial y una vez depositadas en la íntima son blanco de modificaciones químicas, como la oxidación debido al estrés oxidativo [18].

Las LDL oxidadas (LDLox) son factores quimiotácticos para monocitos circulantes, que atraviesan el endotelio vascular y se diferencian en macrófagos [19], capaces de fagocitar a las LDLox. El déficit enzimático para degradar los lípidos y lipoperóxidos, tiene como consecuencia un cúmulo de éstos en el citoplasma del macrófago, al cual se le denomina célula espumosa. Antes de morir, las células espumosas liberan una gran cantidad de citocinas que dan por resultado, la expresión elevada de moléculas de adhesión exacerbando así el proceso inflamatorio [16].

Se ha observado que la evolución de las placas hacia procesos trombóticos depende más de la composición de la placa que del grado de estenosis [18].

Existen varios factores de riesgo asociados al desarrollo de EAC, entre los que encontramos edad, sexo, factores genéticos, hipertensión, obesidad, dislipidemias, resistencia a la insulina y diabetes [19].

De acuerdo con los estudios epidemiológicos existe una relación inversa entre los niveles plasmáticos de C-HDL y el riesgo de desarrollar EAC [14, 20, 21].

Esta relación inversa puede ser debida a que las HDL presentan características antiaterogénicas; son anti-inflamatorias, anti-oxidantes, anti-trombóticas, pro-fibrinolíticas, además de participar en el TRC [22].

Sin embargo, el hecho de que las concentraciones de colesterol de HDL (C-HDL) se modifiquen, no significa que estos cambios sean benéficos con respecto a la aterosclerosis; ya que las HDL se remodelan continuamente generando una gran heterogeneidad de partículas que difieren en forma, tamaño, densidad, carga, composición, y muy probablemente en función antiaterosclerosa [14].

Existen dos subpoblaciones de HDL: las partículas HDL<sub>2</sub> y HDL<sub>3</sub>. Las partículas HDL<sub>2</sub>, cuya densidad está comprendida en un intervalo desde 1.063 hasta 1.120 g/mL, pueden subclasificarse a su vez en HDL<sub>2b</sub> y HDL<sub>2a</sub>. Las HDL<sub>2b</sub> tienen un diámetro hidrodinámico desde 10.58 hasta 12.36 nm y las HDL<sub>2a</sub> de 9.94 a 10.58 nm.

Por otro lado, las partículas HDL<sub>3</sub>, cuya densidad está comprendida en el intervalo de 1.120 a 1.210 g/mL, se clasifican en tres subpoblaciones, las HDL<sub>3a</sub>, HDL<sub>3b</sub>, y las HDL<sub>3c</sub>, con intervalos de diámetro hidrodinámico de 8.98 a 9.94 nm, 8.45 a 8.98 nm y 7.90 a 8.45 nm, respectivamente [23].

El papel cardioprotector de las subclases de HDL es controvertido. Sich y colaboradores [24] sugieren que las partículas HDL grandes tienen un efecto cardioprotector ya que demostraron que los pacientes que presentaban una proporción mayor de HDL<sub>2b</sub> tenían menor prevalencia de desarrollar EAC en comparación con otro grupo donde todas las subpoblaciones de HDL estaban incrementadas. Asztalos y colaboradores también reportaron que los cambios en la concentración de partículas grandes, estaban significativa e inversamente relacionados con la tasa de estenosis arterial coronaria [25]. Otros estudios reportaron que los pacientes con deficiencia de actividad CETP o que han sido tratados con un inhibidor de esta proteína, incrementaron sus niveles de colesterol de HDL, gracias a la acumulación de partículas grandes del tipo HDL<sub>2b</sub> [26, 27]. En contraste, estudios realizados en sujetos con hipoalfalipoproteinemia, sugieren que el incremento en la proporción de HDL pequeñas, no se asocia a un aumento en el riesgo de desarrollar EAC [28], además de que este tipo de partículas, son mejores aceptores del colesterol y promueven el eflujo del mismo a partir de las células periféricas [29]. También se ha demostrado que la capacidad antioxidante in vitro de las HDL está en relación inversa a su tamaño; de esta manera, las HDL<sub>3c</sub> son las partículas que evitan por más tiempo la oxidación de las LDL [30]. Esta controversia acerca de

cuál fracción de las HDL es la que posee mayor capacidad antiaterogénica requiere de más estudios para ser resuelta inequívocamente.

#### **4. TIAZOLIDINEDIONAS**

Las tiazolidinedionas (TZDs), son antidiabéticos orales y sensibilizadores de la insulina. Promueven la disminución de los niveles de ácidos grasos por un incremento en la  $\beta$ -oxidación y un incremento en la captación en el hígado.

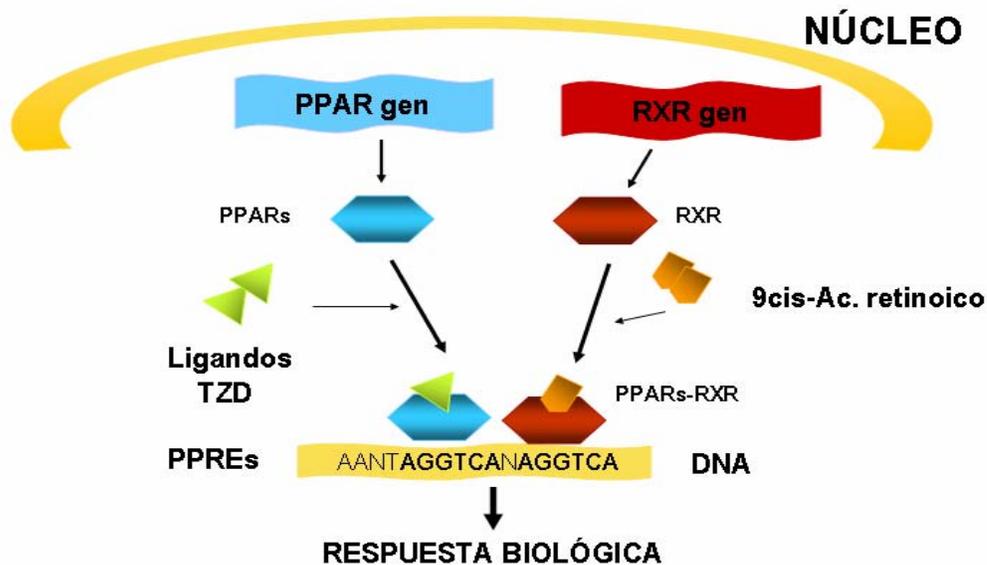
Diversos estudios epidemiológicos han reportado incrementos en los niveles plasmáticos de C-HDL con estos fármacos, sugiriendo que afectan el metabolismo de las HDL [31 32].

##### **4.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS TIAZOLIDINEDIONAS**

Las TZDs son ligandos sintéticos de una subclase de receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs), los PPAR $\gamma$  [33]. Los PPAR son factores de transcripción dependientes de ligando. Se han determinado tres genes diferentes  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ .

Los PPAR $\gamma$  se expresan principalmente en tejido adiposo, hepatocitos, células endoteliales, y macrófagos. Por tanto, el tratamiento con TZDs no sólo mejora la sensibilidad a la insulina sino que conduce a una disminución en los niveles de triglicéridos en plasma, incrementan los niveles de C-HDL y disminuyen la presión arterial [34].

En el núcleo de la célula (Fig. 3), los PPARs activados por su ligando forman un heterodímero con el receptor del ácido retinóico (RXR). Una vez formado, el heterodímero PPAR: RXR se une a elementos de respuesta específicos (secuencias de DNA), llamados elementos de respuesta a la proliferación de peroxisomas (PPER).



**Fig. 3** Mecanismo de acción de los PPAR $\gamma$ . TZD: Tiazolidindionas, PPAR: Receptor activado por proliferador de peroxisomas; RXR: Receptor del 9-cis ácido retinóico.

Entre los genes que contienen elementos de respuesta específicos se encuentran los que controlan la homeostasis de la glucosa [35]. Por otro lado, las TZDs activan la expresión de genes relacionados con la inflamación vascular, regulan la expresión de citocinas, regulan la expresión de moléculas de adhesión de células vasculares [36, 37]. Además, las TZDs regulan la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos [38].

#### **4.2 EFECTO DE TZDs SOBRE EL METABOLISMO DE LAS HDL**

Las tiazolidinedionas pueden ser usadas también para reducir la morbilidad y mortalidad asociada al riesgo cardiovascular [39]. Estudios previos de nuestro laboratorio, demostraron que la pioglitazona induce incrementos en las concentraciones plasmáticas de C-HDL y reduce los niveles plasmáticos de triglicéridos.

El tratamiento con pioglitazona también incrementa la proporción de partículas pequeñas HDL<sub>3c</sub>, e incrementa la tasa de catabolismo de la apo AI de estas

lipoproteínas, sugiriendo que las partículas pequeñas se catabolizan más rápido. Este efecto puede explicar en parte la capacidad antiaterogénica de este fármaco [40].

Nuestro laboratorio también reportó que las partículas HDL de mayor tamaño se metabolizan más lento que las HDL<sub>3c</sub> [5]. Estas diferencias en el catabolismo sugieren que el tamaño de las HDL, también es un factor importante en el catabolismo de las mismas.

Por otro lado, Khan y colaboradores [41] reportan que la rosiglitazona, de la misma manera que la pioglitazona, incrementa los niveles plasmáticos de C-HDL pero, a diferencia de la pioglitazona, incrementa simultáneamente los niveles de triglicéridos. El hecho de que los efectos farmacológicos de ambos fármacos no sean los mismos a pesar de ser fármacos de la misma familia, sugiere que el metabolismo de las HDL con ambos fármacos también puede ser diferente.

## **5. JUSTIFICACIÓN**

El catabolismo acelerado de las partículas HDL es un factor importante que puede determinar las concentraciones plasmáticas del C-HDL, y ser el resultado de modificaciones en la carga, el tamaño y la composición de estas lipoproteínas.

Teniendo en cuenta que la densidad de carga de superficie es un factor biofísico que puede modificar el metabolismo de las HDL, es importante establecer si el catabolismo de estas partículas se ve alterado por cambios en la Cd y en la composición de las HDL. Estudiar el mecanismo que da origen al incremento del C-HDL durante el tratamiento con rosiglitazona, contribuirá a explicar la relación que existe entre el metabolismo, la composición, el tamaño y la densidad de carga de las partículas HDL generadas con el fármaco. Estas modificaciones en el metabolismo de las HDL se podrían volver un objetivo terapéutico para el desarrollo de nuevos tratamientos.

## **6. HIPÓTESIS**

- Dado que la pioglitazona incrementa el catabolismo de las HDL en plasma, es posible que la rosiglitazona tenga el mismo efecto. De ser así, habrá cambios en la densidad de carga de las HDL así como su composición, lo cual contribuirá a un incremento del catabolismo de las HDL.

## **7. OBJETIVOS**

### **7.1 OBJETIVO GENERAL**

- Estudiar el efecto de la rosiglitazona sobre la cinética metabólica y sobre la estructura de las HDL.

### **7.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Caracterizar el perfil lipídico en los modelos animales con y sin tratamiento con rosiglitazona.
- Determinar el efecto de la rosiglitazona sobre el catabolismo de la apo A1 de las HDL.
- Determinar el efecto de las tiazolidinedionas sobre la densidad de carga de superficie de las HDL.

## **8. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **8.1 ANIMALES**

Se utilizaron conejos macho, raza Nueva Zelanda de 3.5-4,0 Kg de peso. Todos recibieron alimentación *ad libitum* diariamente (Lab rabbit diet, purina). A un grupo se le administró rosiglitazona por vía oral en suspensión acuosa en una dosis de 0.34 mg/Kg/día durante 8 semanas. El otro grupo recibió pioglitazona por vía oral en suspensión acuosa en una dosis de 1.75 mg/Kg/día durante 8 semanas.

### **8.2 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS**

Las muestras sanguíneas se obtuvieron por punción de la vena marginal de las orejas, después de un ayuno de 12 h, usando como anticoagulante heparina (1000 UI/mL, 10 µL/mL). El plasma se separó centrifugando a 3,000 rpm durante 10 min. Las HDL se separaron utilizando plasma fresco. El resto de las muestras de plasma se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

### **8.3 ANÁLISIS DE LABORATORIO**

La concentración de colesterol total, triacilgliceroles, fosfolípidos y colesterol libre, se determinó mediante métodos enzimáticos-colorimétricos comerciales. El colesterol de HDL se determinó en el sobrenadante, después de precipitar las apo B con una solución de sulfato de dextrán/magnesio. La determinación de proteínas totales se realizó por el método de Lowry [42].

### **8.4 AISLAMIENTO Y MARCAJE DE APO A-I DE CONEJO.**

Las HDL de conejos se aislaron por centrifugación secuencial, ajustando el plasma a una densidad de 1.21 g/mL con KBr sólido, posteriormente se dializaron intensivamente contra  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  5 mM. Las HDL aisladas se deslipidaron con una mezcla etanol-éter (2:1, v/v). Se extrajo la parte proteica y ésta se disolvió en una solución amortiguadora de Tris-HCl 30 mM y Urea 6 M a pH=8.0; esta mezcla se sometió a una cromatografía

de intercambio aniónico, usando una columna UNO™ Q1 (Bio-Rad) acoplada a un sistema de cromatografía Bio-Rad Duo Flow. La elusión de proteínas se realizó con un gradiente lineal de NaCl 0.1 M en la misma solución amortiguadora. Se colectaron fracciones de 250  $\mu$ L y se seleccionaron solo aquellas que contenían apo A-I. Posteriormente se dializaron contra bicarbonato de amonio 5 mM. La presencia de apo A-I se verificó realizando una electroforesis en gradiente de poliacrilamida 4-21% con SDS 10% y tiñendo las bandas con azul de Coomasie. La pureza obtenida fue del 98%. La concentración de apo A-I fue estimada por espectrofotometría, usando un coeficiente de extinción molar de  $1.13 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

El marcado de la apo A-I se llevó a cabo por el método de monoclóruo de yodo modificado por Bilheimer y colaboradores [43] que consistió en mezclar 1 mg de proteína con 1 mCi de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  y 7  $\mu$ L de una solución 10mM de ICl. La proteína marcada fue separada del yodo libre pasando la mezcla a través de una columna de Sephadex G-25 1.0x10.0 cm (50-150  $\mu$ m). La proteína marcada,  $^{125}\text{I}$ -apo A-I, fue reincorporada a las HDL obtenidas de conejos normales, incubando esta mezcla 1 h a 37°C. Para separar la  $^{125}\text{I}$ -apo A-I que no se incorporó a las HDL, se realizó una ultracentrifugación ajustando la mezcla con KBr sólido a una densidad=1.25 g/mL. Las  $^{125}\text{I}$ -HDL, se dializaron con una solución de NaCl 0.15 M. La solución se esterilizó usando filtros de 0.22  $\mu$ m y se almacenó a 4°C hasta su uso.

## **8.5 CINÉTICA METABÓLICA DE LA APO A-I DE LAS HDL**

A los animales en estudio tratados con rosiglitazona, se les mantuvo en ayuno de 12 h previo a la cinética. El estudio cinético se llevó a cabo después de 8 semanas de tratamiento. Éste consistió en administrar en las venas marginales de la oreja, un bolo de  $^{125}\text{I}$ -HDL, conteniendo 1.48 mg de proteína equivalente a  $1.23 \times 10^6$  cpm de  $^{125}\text{I}$ , en un volumen total de 500  $\mu$ L. A continuación se obtuvieron muestras de sangre de 1 mL de

la vena marginal opuesta, a diferentes tiempos: a los 10 min, y posteriormente a 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 h, después de la aplicación de las  $^{125}\text{I}$ -HDL.

De cada una de estas muestras se separó una alícuota de 500  $\mu\text{L}$  de plasma y se analizaron en un contador de radiación gamma durante 1 min. Las cuentas (cpm) fueron corregidas por el decaimiento de radiactividad natural del yodo, basándose en la siguiente fórmula:

$$N = N_0 \times e^{-\lambda t} \text{ Donde:}$$

$N_0$  = actividad inicial, para  $t=0$

$N$  = actividad al tiempo  $t$

$\lambda$  = Constante de decaimiento (60 días)

Las curvas de decaimiento,  $^{125}\text{I}$ , fueron construidas, considerando el 100% de radiactividad, a las cuentas obtenidas en la muestra tomada a los 10 min. Los porcentajes de la cinética de radiactividad fueron adaptados a un modelo bicompartimental usando un programa de computadora SAAM II, de donde se obtuvo la tasa de catabolismo fraccional (FCR) [44].

## **8.6 AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS SUBPOBLACIONES DE HDL**

Las HDL fueron separadas por ultracentrifugación secuencial (Beckman Optima TLX) en tubos de policarbonato. Se aislaron en primer lugar las lipoproteínas que contienen apo B con una densidad menor a 1.063 g/mL, ajustando el plasma fresco con KBr sólido a una densidad de 1.063 mg/mL y centrifugando a 100,000 rpm durante 2 h 30 min. Posteriormente se aislaron las HDL, ajustando con KBr sólido a una densidad de 1.21 g/mL y centrifugando a 100,000 rpm durante 3 h. Finalmente las HDL obtenidas fueron lavadas ajustándolas con una solución de KBr de densidad 1.25 mg/mL y centrifugando a 100,000 rpm durante 3 h. En estas condiciones del 80% a 85% de la apo A-I del total del plasma se recupera en las fracciones de las HDL. Estas HDL se

dializaron en una solución amortiguadora de TBE (Tris 0.09 M, ácido bórico 0.08 M, EDTA 3mM; pH=8.4)

Para determinar la estructura, homogeneidad y diámetro de las HDL, se realizó una electroforesis en condiciones nativas en gradiente de poliacrilamida 3-30%, utilizando como referencia marcadores de proteínas de alto peso molecular (tiroglobulina, 17 nm; ferritina, 12.2 nm; catalasa, 10.4 nm; lactato deshidrogenasa, 8.2 nm; y albúmina, 7.1 nm.) [45]. Las bandas se tiñeron con azul de Coomasie y finalmente se analizaron por densitometría para determinar los diámetros de las HDL (HDL<sub>2b</sub> 10.58-12.36 nm, HDL<sub>2a</sub> 9.94-10.58 nm, HDL<sub>3a</sub> 6.98-9.94 nm, HDL<sub>3b</sub> 8.45-8.98 nm, HDL<sub>3c</sub> 7.90-8.45 nm) [5].

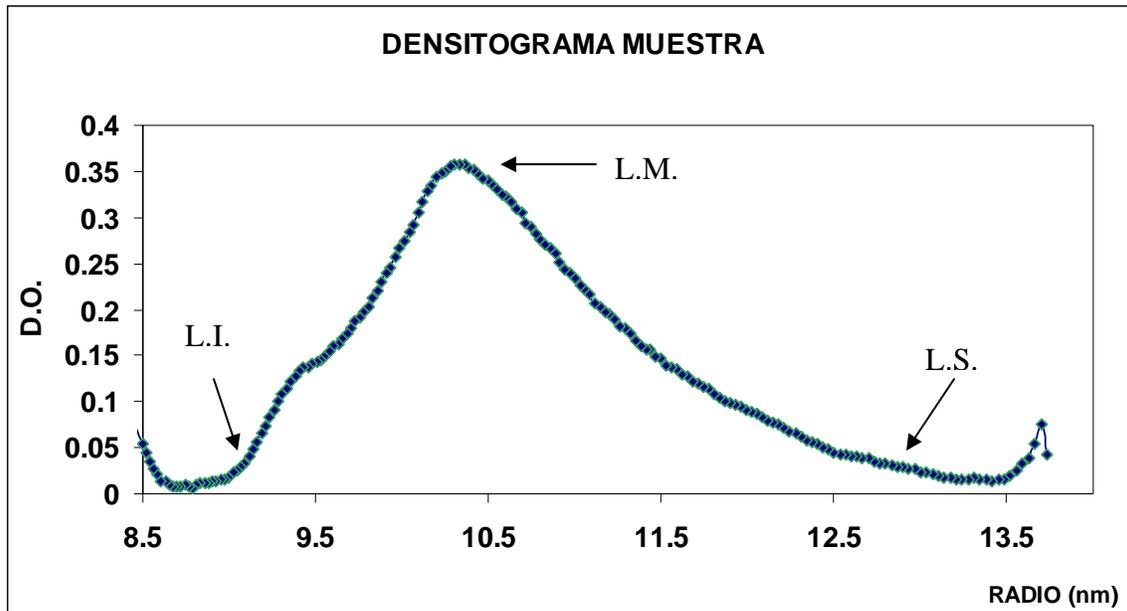
### **8.7 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD DE CARGA DE SUPERFICIE**

Para la determinación de la densidad de carga de superficie de las HDL se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.05% de acuerdo al método descrito por Sparks y Phillips [6] con modificaciones realizadas en nuestro laboratorio. Las HDL se aplicaron en los pozos del gel (4 µg de proteína cbp 10 µL de buffer Tris 88 mM-Glicina 0.179 M, pH 8.6), permitiendo que penetraran durante 8 minutos antes de que se aplicara el campo eléctrico (180 V, 30 min.).

Al finalizar la electroforesis, el gel fue fijado en una mezcla etanol-ácido acético-agua 60:10:30 (v/v/v); posteriormente, las bandas se tiñeron con negro de amido. Una vez teñidas, el gel fue desteñido con una solución etanol-NaCl 20%, 1:1 (v/v), lavado con agua desionizada y secado (80°C). Finalmente se analizó por densitometría.

La densidad de carga de superficie está en función del radio de las HDL. Por lo tanto, para el cálculo de la Cd, es necesario hacer uso de densitogramas obtenidos en la determinación de las subclases de HDL. A partir de éstos (Fig. 4), se utilizan tres puntos (tres valores del diámetro hidrodinámico de la partícula) con el objeto de reportar la Cd como un intervalo. Estos puntos son:

- a) El límite inferior que es el diámetro donde inicia la curva.
- b) El límite máximo que es el diámetro en el cual se alcanza la D. O. máxima del densitograma.
- c) El límite superior que es el diámetro donde finaliza la curva



**Fig. 4** Densitograma muestra en donde se ejemplifican los tres límites para el cálculo de la densidad de carga de superficie. L.I.: Límite inferior, L. M.: Límite máximo, L. S.: Límite superior

Posteriormente, se obtiene la movilidad electroforética (U) dividiendo la velocidad electroforética (distancia de migración en mm entre el tiempo de migración en segundos) entre el potencial electroforético (voltaje aplicado entre la distancia del gel en cm).

La carga neta o valencia, que representa el número de cargas negativas que tiene en exceso la partícula, es estimada considerando a la lipoproteína como una esfera. Es obtenida con la siguiente fórmula [6]:

$$V = \frac{(6.25 \times 10^7) \times U \times 6 \times \pi \times r \times \eta (1 + kr + kr_i)}{f \times (1 + kr_i)}$$

Donde:

$r$  = diámetro de la partícula (cm)

$\eta$  = coeficiente de viscosidad (0.0089 poise)

$r_i$  = radio del contraión ( $2.5 \times 10^{-8}$  cm, correspondiente al  $\text{Na}^+$ )

$k$  = constante de Debye-Huckel dependiente de la fuerza iónica ( $7.3074 \times 10^6$  para una fuerza iónica de 0.05)

$f$  = función polinomial de  $r$

Finalmente, la densidad de carga de superficie en unidades electrostáticas (-esu/cm<sup>2</sup>)

se estima mediante la siguiente fórmula [41]: 
$$Cd = \frac{V \times 4.8 \times 10^{-10}}{4 \times \pi \times r^2}$$

## 8.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos están expresados como la media $\pm$ DE. Las diferencias significativas entre las medias se evaluaron utilizando la prueba paramétrica t de Student pareada cuando se comparó el valor del parámetro después de la intervención contra el valor antes en el mismo animal. Cuando el análisis se hizo comparando grupos control contra tratado se utilizó la prueba t de Student no pareada. Cada uno de los parámetros que se estudiaron fue determinado antes y después del tratamiento con rosiglitazona. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró significativo.

## 9. RESULTADOS

### 9.1 PERFIL DE LÍPIDOS Y GLUCOSA

En el Cuadro 4 se presentan las concentraciones plasmáticas de C-Total, C-HDL, triglicéridos y glucosa del grupo en estudio, antes y después de 8 semanas de tratamiento con rosiglitazona. El tratamiento con rosiglitazona incrementó los niveles plasmáticos de triglicéridos un 20.4% ( $p < 0.05$ ). El tratamiento no modifica las concentraciones de C-HDL.

**CUADRO 4. CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE LÍPIDOS Y GLUCOSA**

<b>PARÁMETRO (n=14)</b>	<b>PRETRATAMIENTO (mg/mL)</b>	<b>POSTRATAMIENTO (mg/mL)</b>
<b>GLUCOSA</b>	111.1±18.8	114.5±22.5
<b>TRIGLICÉRIDOS</b>	40.6±8.1	58.5±18.7*
<b>COLESTEROL TOTAL</b>	30.9±15.0	28.3±10.5
<b>COLESTEROL HDL</b>	14.3±8.3	15.3±7.7

Los valores están expresados como media± DE.

\* $p < 0.05$  vs grupo pretratamiento.

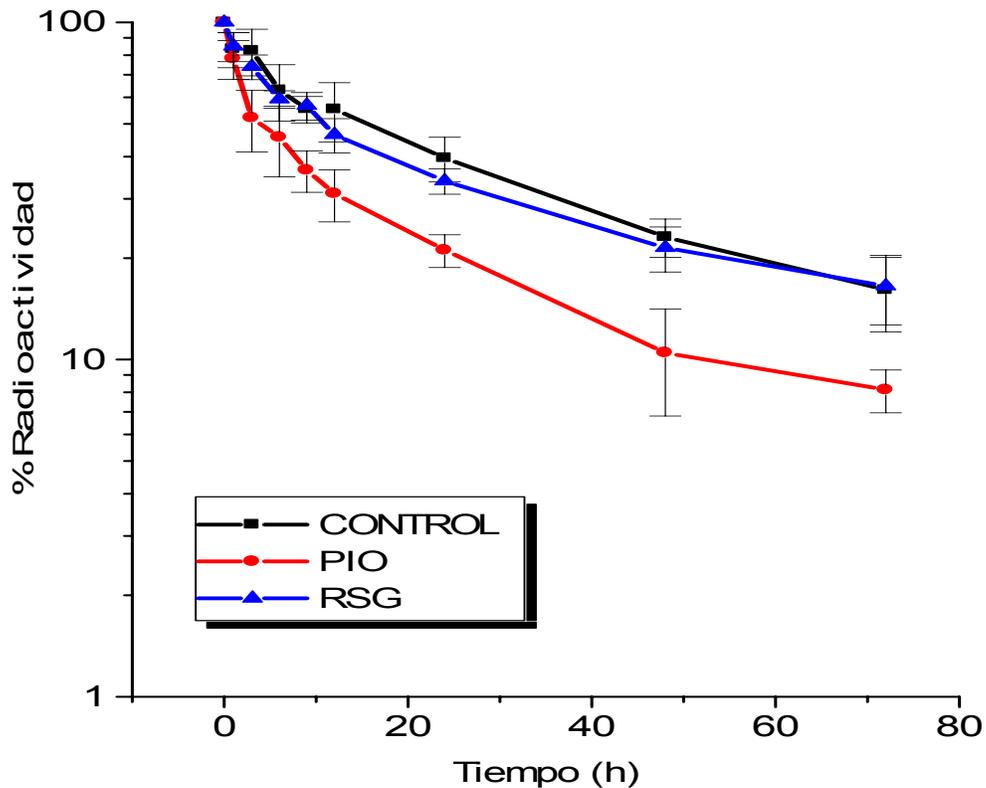
t de Student pareada

### 9.2 CINÉTICA METABÓLICA DE LA APO A-I DE LAS HDL

A través de estudios cinéticos, podemos evaluar la tasa de catabolismo (FCR, fractional catabolic rate) que refleja el metabolismo de las partículas HDL completas. En la Fig. 5 se presentan las gráficas de decaimiento radiactivo de la apo A-I de las HDL del grupo control, del grupo tratado con rosiglitazona y de un grupo previamente tratado con pioglitazona [40]. Se puede observar que la radiactividad del plasma del grupo tratado con pioglitazona desaparece más rápido en comparación con el grupo control y con el grupo tratado con rosiglitazona. Para poder comparar estos resultados, los puntos

experimentales de estas curvas se adaptaron a un modelo bicompartimental que permite calcular la FCR de la apo A-I.

En el Cuadro 5 se muestran los FCR de la apo AI de los diferentes grupos. El estudio previo realizado en nuestro laboratorio con pioglitazona, había demostrado que a dosis de 1.74 mg/Kg incrementó un 119.2% la tasa de catabolismo comparado con el control [40]. En cuadro 5 se incluye este resultado con fines comparativos. En contraste con la pioglitazona, el tratamiento con rosiglitazona a dosis de 0.34 mg/Kg no modifica el FCR de la apo AI.



**Fig. 5** Curva de % de radioactividad inicial de la  $^{125}\text{I}$ -apo A-I de las HDL. Se muestran los diferentes grupos en estudio. CONTROL: grupo sin tratamiento, PIO: grupo tratado con pioglitazona (1.74 mg/Kg), RSG: grupo tratado con rosiglitazona (0.34 mg/Kg) Los valores están expresados como media $\pm$ DE. La radioactividad fue normalizada en función del resultado al tiempo de 10 min.

**CUADRO 5. FCR DE <sup>125</sup>I-APO A-I DE LAS HDL DE LOS GRUPOS EN ESTUDIO.**

FCR (h <sup>-1</sup> )	ROSIGLITAZONA (0.34 mg/Kg)	PIOGLITAZONA (1.74 mg/Kg)
CONTROL	0.026±0.006	0.026±0.006
POSTRATAMIENTO	0.030±0.004	0.057±0.014*

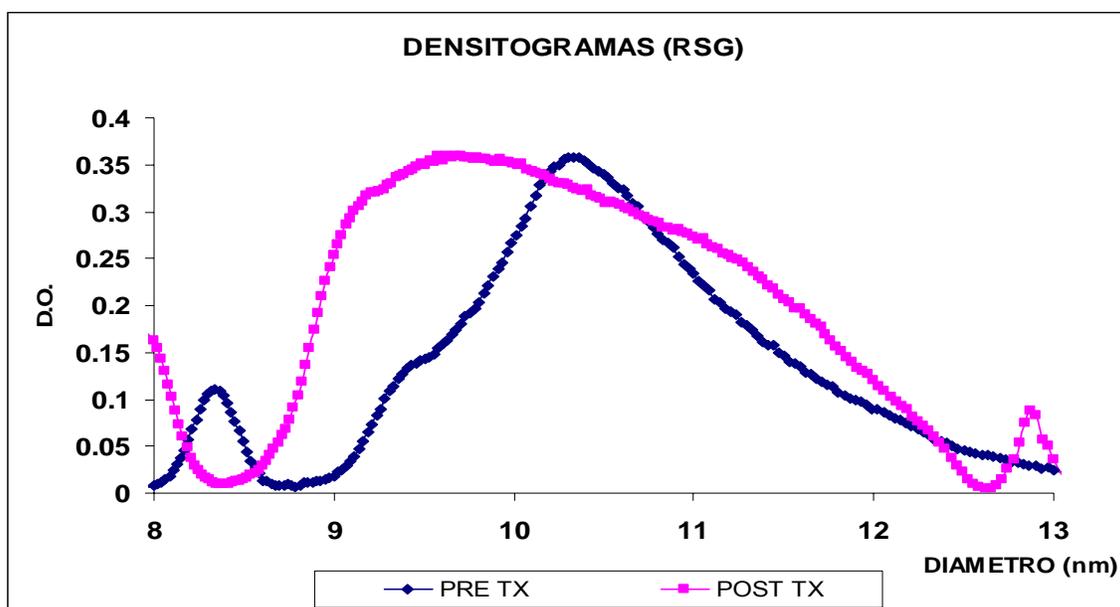
FCR: Tasa de catabolismo, PIO: grupo tratado con pioglitazona, RSG: grupo tratado con rosiglitazona.

Los valores están expresados como media±DE.

\* de Student no pareada, p<0.05 vs grupo control. t

### 9.3 SUBCLASES DE HDL Y COMPOSICIÓN QUÍMICA

Los cambios estructurales y de composición en las partículas HDL podrían explicar los cambios que se presentan en el catabolismo de estas partículas. Por lo tanto, la siguiente etapa en este estudio es determinar los posibles cambios en las HDL con cada una de las TZDs empleadas. En cuanto a las subclases de HDL, en la Fig. 6 se muestra el análisis de densitometría de los geles nativos de las HDL del grupo en estudio tratado con rosiglitazona.



**Fig. 6** Efecto de la rosiglitazona (RSG) en los densitogramas de los geles antes y después del tratamiento. PRE TX: grupo pretratamiento, POST TX: grupo postratamiento

Las HDL del grupo pretratamiento muestran una distribución de tipo Gaussiana, con un pico máximo a  $10.3 \pm 0.6$  nm, el cual se desplazó hacia  $9.6 \pm 0.45$  nm cuando se administró rosiglitazona. La integración parcial de los densitogramas correspondiente a las HDL de cada uno de los animales incluidos en el estudio permite el cálculo de la proporción relativa de las HDL y se resume en el Cuadro 6. Se puede observar, que el tratamiento con 0.34 mg/Kg de rosiglitazona disminuye la proporción de partículas grandes HDL<sub>2b</sub> en un 23% ( $p < 0.05$ ), con un aumento concomitante en las partículas pequeñas HDL<sub>3b</sub> y HDL<sub>3c</sub> del 136% y 95%, respectivamente.

**CUADRO 6. DISTRIBUCIÓN RELATIVA DE LAS SUBCLASES DE HDL (% DE PROTEÍNA DE HDL TOTAL) DE LOS GRUPOS EN ESTUDIO.**

SUBPOBLACIÓN	ROSIGLITAZONA (0.34 mg/Kg)	
	PRETRATAMIENTO (n=14)	POSTRATAMIENTO (n=14)
HDL2b	50.6±12.0	38.9±12.7*
HDL2a	21.9±4.5	22.3±4.8
HDL3a	21.8±8.3	26.4±8.9
HDL3b	3.6±2.7	8.5±5.1*
HDL3c	2.0±1.5	3.9±2.8*

Los valores están expresados como media  $\pm$ DE.

\* t de Student pareada,  $p < 0.05$  vs grupo pretratamiento.

La composición química de las HDL es un factor importante para su metabolismo y muy probablemente para su funcionalidad. Por esta razón, se determinó la composición de lípidos y apolipoproteínas porcentual del grupo en estudio antes y después del tratamiento con rosiglitazona.

Los resultados se presentan en los Cuadros 7 y 8.

**CUADRO 7. COMPOSICIÓN PORCENTUAL EN LÍPIDOS DEL TOTAL DE LAS PARTÍCULAS HDL DE LOS GRUPOS EN ESTUDIO.**

(%)	ROSIGLITAZONA (0.34 mg/Kg) (n=14)	
	PRETRATAMIENTO	POSTRATAMIENTO
LÍPIDOS		
C.T.	13.8±5.7	14.1±6.6
Tg.	5.4±3.4	6.5±2.3
Plp.	25.6±7.4	32.4±6.3*
Proteína	55.2±14.5	47.9±9.7*

C.T.: Colesterol total, Plp: fosfolípidos, Tg:Triacilgliceroles.

Los valores están expresados como media ±DE.

\* t de Student pareada, p<0.05vs grupo pretratamiento.

**CUADRO 8. COMPOSICIÓN PORCENTUAL EN APOLIPOPROTEÍNAS DEL TOTAL DE LAS PARTÍCULAS HDL DE LOS GRUPOS EN ESTUDIO.**

(%)	ROSIGLITAZONA (0.34 mg/Kg) (n=14)	
	PRETRATAMIENTO	POSTRATAMIENTO
Apo		
Apo A-IV	6.5±1.3	9.8±5.1
Apo E	11.9±6.3	10.7±2.4
Apo A-I	59.1±5.8	62.5±4.9*
Apo A-II	8.4±3.4	7.7±3.9
Apo C's	4.9±3.1	2.1±1.5*

Apo: Apolipoproteína.

Los valores están expresados como media ±DE.

\* t de Student pareada, p<0.05vs grupo pretratamiento.

El tratamiento con rosiglitazona enriquece de fosfolípidos la superficie de las HDL en un 26.5% (p<0.05). Con respecto a la composición de apolipoproteínas, la rosiglitazona incrementa la proporción de apo AI en un 5.8% (p<0.05) y disminuye la proporción de apo C's en un 57.1% (p<0.05).

## 9.4 DENSIDAD DE CARGA DE SUPERFICIE

La densidad de carga de superficie afecta directamente el metabolismo in vitro de las HDL, es decir, la carga de la partícula es una característica que puede regular su catabolismo en el plasma debido a las interacciones electrostáticas entre estas lipoproteínas y las enzimas y proteínas involucradas en el TRC, lo que afecta la remodelación de la partícula.

La pioglitazona incrementa el catabolismo de las HDL [40], pero los resultados del presente estudio muestran que la rosiglitazona no lo hace. Es posible que la densidad de carga de superficie de las HDL, esté involucrada en los efectos tan diferentes sobre la tasa de catabolismo que presentan la pioglitazona y la rosiglitazona. Por esta razón se determinó la densidad de carga de superficie de las HDL de los grupos en estudio antes y después del tratamiento con pioglitazona y rosiglitazona. Los resultados se muestran en el Cuadro 9.

**CUADRO 9. DENSIDAD DE CARGA DE SUPERFICIE DE LAS HDL**

LÍMITES	Cd ( -) x10 <sup>3</sup> esu/cm <sup>2</sup> )			
	ROSIGLITAZONA (0.34 mg/Kg)		PIOGLITAZONA (1.74 mg/Kg)	
	PRETRATAMIENTO (n=14)	POSTRATAMIENTO (n=14)	PRETRATAMIENTO (n=6)	POSTRATAMIENTO (n=6)
<b>INFERIOR</b>	13.5±4.3	15.8±6.7*	14.0±0.8	8.6±1.3*
<b>MÁXIMO</b>	12.0±3.9	14.1±6.3*	12.2±1.2	7.8±1.4*
<b>SUPERIOR</b>	9.9±3.1	11.9±5.4*	10.2±1.1	6.8±1.2*

Los valores están expresados como Media ±DE.

\* t de Student pareada, p<0.05vs grupo pretratamiento.

El cuadro muestra que el tratamiento con rosiglitazona incrementa la densidad de carga de superficie de las HDL en los límites inferior, máximo y superior, en un 16.3%, 17.6% y 20.9% (p<0.05) respectivamente. La Cd, por lo tanto, está comprendida en un intervalo desde -13.5±4.3 hasta -9.9±3.1 x10<sup>3</sup> esu/cm<sup>2</sup> antes del tratamiento con

rosiglitazona; posterior a éste, el intervalo se desplaza a un intervalo desde  $-15.8 \pm 6.7$  hasta  $-11.9 \pm 5.4 \times 10^3$  esu/cm<sup>2</sup>, por lo que el tratamiento con rosiglitazona modifica a las HDL convirtiéndolas en partículas más electronegativas.

Por el contrario, el tratamiento con pioglitazona disminuye la densidad de carga de superficie de las HDL en los límites inferior, máximo y superior, en un 38.7%, 36.3% y 33.3% ( $p < 0.05$ ), respectivamente. La Cd, por lo tanto, está comprendida en un intervalo desde  $-14.0 \pm 0.8$  hasta  $-10.2 \pm 1.1 \times 10^3$  esu/cm<sup>2</sup> antes del tratamiento con pioglitazona; posterior a éste, el intervalo se desplaza a un intervalo desde  $-8.6 \pm 1.3$  a  $-6.8 \pm 1.2 \times 10^3$  esu/cm<sup>2</sup>, por lo que el tratamiento con pioglitazona modifica a las HDL convirtiéndolas en partículas menos electronegativas que las producidas por la rosiglitazona.

## 10. DISCUSIÓN

Estudios realizados en nuestro laboratorio, demostraron que la pioglitazona en una dosis de 1.74 mg/Kg disminuye la proporción de partículas grandes HDL<sub>2b</sub> en un 6%, lo que tiene como consecuencia un incremento en la proporción de partículas pequeñas HDL<sub>3c</sub> en un 30%. Estos efectos son muy parecidos a los producidos por la rosiglitazona.

Sin embargo, a diferencia de la rosiglitazona, la pioglitazona disminuye el porcentaje de fosfolípidos en un 63% y disminuye el porcentaje de apo AI en un 15%

Existe controversia en los efectos que tienen las tiazolidinedionas sobre las concentraciones plasmáticas de lípidos [45, 46]; en este ámbito, el presente trabajo de investigación contribuye a comprender los efectos de la rosiglitazona sobre el metabolismo, estructura y carga de superficie de las HDL. Nuestros resultados demuestran que en el conejo la rosiglitazona en una dosis de 0.34 mg/Kg incrementa

las concentraciones plasmáticas de triglicéridos, produce un aumento en la densidad de carga de superficie de las HDL y no modifica la tasa de catabolismo (FCR) de la apo A-I de estas partículas. Estas modificaciones se observaron con una dosis de rosiglitazona equivalente a 3 veces la dosis habitual en el humano. Con esta dosis, el tratamiento con rosiglitazona también provocó un incremento en la proporción de partículas pequeñas del tipo HDL<sub>3b</sub> y HDL<sub>3c</sub>, así como una disminución en las partículas grandes HDL<sub>2b</sub>. Además, se generaron HDL ricas en fosfolípidos y en apo AI. En cuanto a la carga de superficie, el tratamiento con pioglitazona en una dosis también equivalente a 3 veces la máxima recomendada en el humano, generó partículas HDL con densidad de carga menor que las generadas con la rosiglitazona.

Estudios realizados en nuestro laboratorio [40], demostraron que el tratamiento con pioglitazona disminuye la proporción de partículas grandes HDL<sub>2b</sub> e incrementa la proporción de partículas pequeñas HDL<sub>3c</sub>, de manera muy similar a la rosiglitazona. Sin embargo, a diferencia de la rosiglitazona, la pioglitazona disminuye el porcentaje de fosfolípidos y de apo AI. Por otro lado, se reportó [40] que el tratamiento con 1.74 mg/Kg de pioglitazona duplica el FCR de la apo AI de las HDL.

En nuestro estudio, observamos que la rosiglitazona incrementa las concentraciones plasmáticas de triglicéridos y no incrementa las concentraciones de C-HDL. Diversos estudios sugieren, que existen diferencias en el perfil lipídico de pacientes tratados con pioglitazona y rosiglitazona. De hecho, se ha demostrado que el tratamiento con pioglitazona se asocia a mejores efectos benéficos que el tratamiento con rosiglitazona en relación a los niveles de lípidos [41, 47-49]. Esto puede ser debido a que la pioglitazona, además de ser agonista de los PPAR $\gamma$ , también lo es de los PPAR $\alpha$  [41]. En acuerdo con esta idea, Los fibratos, fármacos cuyas propiedades antiaterogénicas han sido demostradas [50, 51] son agonistas de los PPAR $\alpha$ , principalmente reducen los

niveles de triglicéridos en plasma e incrementan el C-HDL, como lo hace la pioglitazona [52, 53].

Con respecto a la expresión del gen de la apo A-I, éste es regulado por los PPAR $\alpha$  [54]. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con rosiglitazona incrementa la proporción de apo AI en las HDL. Es posible que con la rosiglitazona se estimule el promotor del gen de la apo AI. Esto debe comprobarse con la obtención de la tasa de producción de apo AI. Sin embargo, aún cuando la apo AI de las HDL se ve incrementada tras el tratamiento con rosiglitazona, la tasa de catabolismo fraccional (FCR) no se modifica. Esto es totalmente contrario a lo que sucede con la pioglitazona. Carreón y colaboradores [40] sugieren que el incremento en la tasa de catabolismo de la apo A-I de las HDL inducido por la pioglitazona, puede estar relacionado con las propiedades antiaterogénicas del fármaco. Algunos pacientes con niveles de C-HDL por debajo de 10 mg/dL y que no tienen historia familiar ni personal de EAC, se caracterizan por catabolizar rápidamente la apo AI de las HDL [28, 55]. Asimismo, los fibratos, fármacos con capacidades antiaterogénicas, inducen un aumento del catabolismo de la apo AI de las HDL [56].

El fundamento metabólico del por qué el hipercatabolismo de las HDL es potencialmente cardioprotector no ha sido bien elucidado, pero puede estar relacionado con el tamaño de la partícula. Estudios previos de nuestro laboratorio [40] demostraron que el FCR de la apo A-I de las HDL, se asocia directamente con la proporción relativa de partículas pequeñas, HDL<sub>3c</sub>. Por otra parte, estudios con ratas hipotiroideas demuestran que las partículas grandes de tipo HDL<sub>2b</sub> y HDL<sub>2a</sub> se catabolizan más lento que las partículas pequeñas de tipo HDL<sub>3c</sub> [5].

Con base en estas observaciones, se postula que el hipercatabolismo de la apo A-I de las HDL es el resultado de una reducción del tamaño de estas lipoproteínas. Sin embargo, el tamaño no es el único factor que puede alterar el catabolismo de las HDL

en plasma, ya que el tratamiento con rosiglitazona también produce partículas pequeñas del tipo HDL<sub>3c</sub> y estas no modifican su catabolismo por acción del fármaco.

Otra explicación al aumento de la proporción relativa de HDL<sub>3c</sub> podría darse por el SR-BI, que es otro factor que está regulado por las tiazolidinedionas e interviene en el metabolismo de las HDL. Estudios realizados en ratones transgénicos para SR-BI, han demostrado que la estimulación de este receptor, se asocia a la producción de partículas pequeñas y densas, mientras que cuando disminuye la expresión del SR-BI, el tamaño de la partícula incrementa [57].

Además del tamaño, debemos tomar en cuenta otros factores para explicar el catabolismo de la apo A-I. Si bien es cierto que la densidad de carga es función del diámetro de la partícula [6], el tamaño no altera del todo el catabolismo, ya que la pioglitazona y la rosiglitazona generan partículas de tamaño similar; ambos fármacos disminuyen HDL<sub>2b</sub> en un 6% y 23% respectivamente, e incrementan las HDL<sub>3c</sub> en un 30% y 95% respectivamente. Sin embargo, la pioglitazona sí modifica la FCR, mientras que la rosiglitazona no lo hace como demostramos en el presente estudio. Por lo tanto, el contenido de lípidos, lipoproteínas y composición química de las HDL son también importantes para modificar los parámetros cinéticos de estas lipoproteínas [58]. La densidad de carga de superficie de las HDL puede verse influenciada por los factores antes mencionados.

Por ejemplo, Desrumaux y colaboradores [59], sugieren que la apo AI incrementa la densidad de carga de las HDL. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con rosiglitazona incrementa la proporción de apo AI de las HDL en un 5.8%, lo que probablemente explique por qué las HDL generadas con el tratamiento sean tan electronegativas. En contraste, el tratamiento con pioglitazona, reduce la proporción de apo AI en un 15%, lo que las convierte en partículas menos electronegativas. Otros estudios [11, 58, 60] sugieren que la electronegatividad de las HDL radica

principalmente en la presencia de lípidos cargados negativamente como los fosfolípidos. Esta puede ser una explicación adicional a las diferencias tan radicales en la carga de las HDL, ya que el tratamiento con rosiglitazona incrementa la proporción de fosfolípidos de la partícula, y la pioglitazona disminuye esta proporción.

La densidad de carga no sólo altera el catabolismo sino la interacción de las HDL con los factores plasmáticos involucrados en su remodelamiento como las enzimas LCAT, CETP, PLTP y LH [9, 10] y el receptor SR-BI [12].

Saku y colaboradores [61], demostraron que HDL pequeñas son catabolizadas rápidamente en conejos y que estas HDL son menos electronegativas. Por lo tanto, postulamos que el hecho de que las HDL generadas por la rosiglitazona no puedan ser catabolizadas rápidamente como las generadas por la pioglitazona tiene su origen en la densidad de carga de la partícula. Nuestro postulado se basa en que mientras menos electronegativa sea una partícula, más rápido se eliminará del plasma. Esto podría tener su explicación en que los sitios para la eliminación de las HDL/apo AI, se localizan principalmente en los riñones [62], donde las partículas HDL pequeñas y la apo AI son filtradas a través del glomérulo y degradadas por las células del túbulo proximal [62-64]. Investigaciones realizadas en humanos y animales mostraron que las paredes de los capilares del glomérulo son selectivas a la carga [65, 66]. La presencia de sitios cargados negativamente dentro de las paredes del glomérulo, impide la filtración de moléculas aniónicas, por simple repulsión de cargas.

Por lo tanto, es concebible, que las HDL muy electronegativas se catabolicen más lento. Por el contrario, partículas menos electronegativas, como las HDL generadas por la pioglitazona, alcanzarán rápidamente sus sitios catabólicos y por tanto su catabolismo es acelerado.

En resumen, el tratamiento con rosiglitazona no modifica el catabolismo de la apo A-I de las HDL, lo que está asociado a una mayor proporción de HDL pequeñas, enriquecidas de fosfolípidos y apo AI.

La trascendencia de estos hallazgos se ubica en la capacidad antiaterogénica de las HDL generadas durante el tratamiento con tiazolidinedionas. Además, estudios recientes han demostrado que las HDL pequeñas, poseen un potencial antioxidante superior al resto de las subclases de HDL, y esto se asocia a una disminución en la oxidación de las LDL [30].

Sin pretender extrapolar estos resultados al humano, nuestro modelo experimental nos permitió explicar y determinar las acciones de la rosiglitazona sobre el metabolismo de las HDL. Estos efectos se lograron con una dosis de 0.34 mg/Kg que equivale a 3 la dosis máxima en humanos que es de 8 mg/Kg.

## **11. CONCLUSIONES**

El tratamiento con rosiglitazona modifica el tamaño, composición y densidad de carga de las HDL. Estas modificaciones demuestran que existe una relación entre el metabolismo y la carga de las partículas.

Este estudio fortalece la idea de que la carga de las HDL es un factor muy importante, que altera el catabolismo de estas partículas y sus interacciones con las proteínas y receptores involucrados en el metabolismo de lípidos; lo que puede determinar las concentraciones plasmáticas del C-HDL. Además este estudio nos permite postular que las propiedades antiaterogénicas de las HDL no sólo dependen de las concentraciones plasmáticas del C-HDL si no de su composición, contenido en apolipoproteínas y densidad de carga.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Von Eckardstein, A., Huang, Y., Assmann, G. Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. *Curr. Opin. Lipidol.* 1994; 5: 404-416.
2. Aguilar, C., Gómez, F. Lipoproteínas y aterogénesis. *Metabolismo normal de las lipoproteínas. Revista del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.* 1989; 2: 22-28.
3. Von Eckardstein, A., Nofer, J.R., Assmann, G. HDL and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 21: 13-27.
4. Rashid, S., Uffelman, K., Lewis, G. The mechanism of HDL lowering in hypertriglyceridemic, insulin-resistant states. *J. Diabetes Complications.* 2002; 16: 24-28.
5. Huesca-Gómez, C., Franco, M., Luc, G., Montaña, L., Posadas-Romero, C., Pérez-Méndez, O. Chronic hypothyroidism induces abnormal structure of high-density lipoproteins and impaired kinetics of apolipoprotein A-I in the rat. *Metabolism.* 2002; 51: 443-450.
6. Sparks, D., Phillips, M. Quantitative measurement of lipoprotein surface charge by agarose gel electrophoresis. *J. Lip. Res.* 1991; 33: 123-130.
7. Zhao, Y., Sparks, D., Marcel, D. Specific phospholipids association with apolipoprotein A-I stimulates cholesterol efflux from human fibroblasts. Studies with reconstituted sonicated lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 25145-25151.

8. Sparks, D., Anantharamaiah, G., Segrest, J., Phillips, M. Effect of the cholesterol content of reconstituted LpA-I on lecithin:cholesterol acyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 5151-5157.
9. Nishida, H., Arai, H., Nishida, T. Cholesteryl ester transfer mediated by lipid transfer protein as influenced by changes in the charge characteristics of plasma lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 16352-16360.
10. Coffill, C., Ramsamy, T., Hutt, D., Schultz, J., Sparks, D. Diacylglycerol is the preferred substrate in high density lipoproteins from human hepatic lipase. *J. Lip. Res.* 1987; 38: 2224-2231.
11. Davidson, W., Sparks, D., Lund-Katz, S., Phillips, M. The molecular basis for the difference in charge between pre-beta and alpha-migrating high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 8959-8965.
12. Rigotti, A., Acton, L., Krieger, M. The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 16221-16224.
13. Von Eckardstein, A., Nofer, J., Assmann, G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 21: 13-27.
14. Barter, P. CETP and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20: 2029-2031.
15. Assmann, G., Gotto, A. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation.* 2004; 109 [suppl III]: III-8-III-14.
16. Sviridov, D., Nestel, P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2002; 161: 245-254.

17. Fan, J., Watanabe, T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb.* 2003; 10: 63-71.
18. Shih, D., Welch, C., Lusis, A.J... New insights into atherosclerosis from studies with mouse models. *Mol Med Today.* 1995; 8:364-372.
19. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002; 420: 868-874.
20. Aguilar-Salinas, C., Vázquez-Chávez, C., Gamboa-Marrufo, R., García-Soto, N., De Jesús Ríos-González, J., Holguín, R., Vela, S., Ruiz-Álvarez, F., Mayagoitia, S. Obesity, diabetes, hypertension, and tobacco consumption in an urban adult Mexican population. *Arch. Med. Res.* 2001; 32: 446-453.
21. Assmann, G., Schulte, H., Von Eckardstein, A., Huang, Y. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk: the PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis.* 1996; 124: S11-S20.
22. Prediman, K., Sanjay, K., Jan, N., Bojan, C. Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins, an idea whose time for testing is coming, part I. *Circulation.* 2001; 104: 2376-2386.
23. Huesca-Gómez, C., Carreón-Torres, E., Montañó, L., Franco, M., Posadas-Romero, C., Pérez-Méndez, O. Contribution of cholesteryl ester transfer protein and lecithin: cholesterol acyltransferase to HDL size distribution. *Endocrin. Res.* 2004; 30: 403-415.
24. Sich, D., Saïdi, Y., Giral, P., Lagrost, L., Egloff, M., Auer M., Gautier, V., Turpin, G., Beucler, I. Hyperalphalipoproteinemia: Characterization of a cardioprotective profile associating increased high-density lipoprotein<sub>2</sub> levels and decreased hepatic lipase activity. *Metabolism.* 1998; 47: 965-973

25. Asztalos, B., Batista, M., Horvath, K., Cox, C., Dallal, G., Morse, J., Brown, G., Schaefer, E. Change in  $\alpha_1$  HDL concentration predicts progression in coronary artery stenosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 23: 847-852.
26. Chapman, J. Therapeutic elevation of HDL-cholesterol to prevent atherosclerosis and coronary heart disease. *Pharmacology Therapeutics.* 2006; 111: 893-908.
27. Clark, R. Raising high-density lipoprotein with cholesteryl ester transfer protein inhibitors. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2006; 6:162-168.
28. Pérez-Méndez, O., Castro, G., Fruchart, J., Luc, G. Kinetic and metabolic studies of apo A-I and Apo-II in an hypoalphalipoproteinemic patient. *Eur. J. Neurology.* 1995; 2: 77.
29. Barkia, A., Puchois, P., Ghalim, N., Torpier, G., Barbaras, R., Ailhaud, G., Fruchart, J. Differential role of apolipoprotein A<sub>1</sub>-containing particles in cholesterol efflux from adipose cells. *Atherosclerosis.* 1991; 81: 135-146.
30. Kontush, A., Chantepie, S., Nobécourt, E., Hansel, B., de Faria, E., Jacqueminet, S., Grimaldi, A., Chapman, J. Small dense HDL particles exert potent protection of LDL against oxidative stress which is impaired in atherogenic dyslipidemias. *Atherosclerosis. Suppl.* 2004; 5: 38.
31. Barbier, O., Torra, I., Duguay, Y., Blanquart, C., Fruchart, J., Glineur, C., Staels, B. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22: 717-726.
32. Reginato, M., Lazar, M. A. Mechanisms by which thiazolidinediones enhance insulin action. *Trends Endocrinol. Metab.* 1999; 10: 9-13.

33. Walkzacz, R., Tontonoz, P. PPARadigms and PPARadoxes: expanding roles of PPAR $\gamma$  in the control of lipid metabolism. *J. Lipid Res.* 2002; 43: 176-186.
34. Saltiel, A., Olefsky, J. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and Type II diabetes. *Diabetes.* 1996; 47: 507-514.
35. Gegick, C., Alheimer, M. Thiazolidinediones: comparison of long-term effects on glycemic control and cardiovascular risk factors. *Curr. Med. Res. Opin.* 2002; 18: 363-370.
36. Klappacher, W., Glass, C. Roles of peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$  in lipid homeostasis and inflammatory responses of macrophages. *Curr. Opin. Lipidol.* 2002; 13: 305-312.
37. Minako, I., Kensuke, E., Ken-ichi, H., Shujiro, I., Weihua, N., Qingwei, Z., Makoto, U., Shiro, T., Toshihiro, I., Akira, T. Antiinflammatory and antiarteriosclerosis effects of pioglitazone. *Hypertension.* 2002; 40: 287-293.
38. Akiyama, T., Sakai, S., Lambert, G., Nicol, J., Matsususe, K., Pimprale, S., Lee, Y., Ricote, M., Glass, C. Conditional distribution of the peroxisomes proliferator-activated receptor  $\gamma$  gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apo E in macrophages and reduced cholesterol efflux. *Mol. Cel. Biol.* 2002; 22: 2607-2619.
39. Edelman, S. The role of the thiazolidinediones in the practical management of patients with type 2 diabetes and cardiovascular risk factors. *Rev. Cardiovasc. Med.* 2003; 4(suppl 6): S29-S37.

40. Carreón-Torres, E., Juárez-Meavepeña, M., Cardoso-Saldaña, G., Huesca-Gómez, C., Franco, M., Fievet, C., Luc, G., Juárez-Oropeza, M., Pérez-Méndez, O. Pioglitazone increases the fractional catabolic and production rates of high Density lipoproteins apo AI in the New Zealand White Rabbit. *Atherosclerosis*. 2005; 181: 233-240.
41. Khan, M., St. Peter, J., Xue, J. A prospective, randomized comparison of the metabolic effects of pioglitazone or rosiglitazone in patients with type 2 diabetes who were previously treated with troglitazone. *Diabetes Care*. 2002; 25: 708-711.
42. Lowry, O., Rosebrough, H., Farr, A. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 1951; 193: 265-275.
43. Bilheimer, D., Eisenberg, D., Levy, R. The metabolism of very low density lipoproteins. Preliminary in vitro and in vivo observations. *Biochim. Biophys. Acta*. 1972; 260: 212-221.
44. Lewis, G., Lamarche, B., Uffelman, K., Heatherington, A., Honig, M., Szeto, L., Barrett, P. Clearance of postprandial and lipolytically modified human HDL in rabbits and rats. *J. Lipid Res*. 1997; 38: 1771-1778.
45. Van Wijk, J., De Koning, E., Martens, E., Rabelink, T. Thiazolidinediones and blood lipids in type 2 diabetes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2003; 23: 1744-1749.
46. King, K. History of insulin: from discovery to modern alternatives. *Br. J. Nurs*. 2003; 12: 1137-41.

47. Boyle, P., King, A., Olansky, L., Marchetti, A., Lau, H., Magar, R., Martin, J. Effects of pioglitazone and rosiglitazone on blood lipid levels and glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a retrospective review of randomly selected medical records. *Clin. Ther.* 2002; 24: 378-396.
48. King, A. A comparison in a clinical setting of the efficacy and side effects of three thiazolidinediones. *Diabetes Care.* 2002; 23: 557.
49. LaCivita, K., Villarreal, G. Differences in lipid profiles of patients given rosiglitazone followed by pioglitazone. *Curr. Med. Res. Opin.* 2002; 18: 363-370.
50. Rubins, H., Robins, S., 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: 410-418.
51. Bloomfield, R., Davenport, J., Babikian, V., Brass, L., Collins, D., Wexler, L., Wagner, S., Papademetriou, V., Rutan, G., Robins, S. Reduction in stroke with gemfibrozil in men with coronary heart disease and low HDL cholesterol: The Veterans Affairs HDL Intervention Trial (VA-HIT). *Circulation.* 2001; 103: 2828-2833.
52. Bocher, V., Chinetti, G., Fruchart, J., Staels, B. Role of the peroxisome proliferators-activated receptors (PPARS) in the regulation of lipids and inflammation control. *J. Soc. Biol.* 2002; 196: 47-52.
53. Neve, B., Fruchart, J., Staels, B. Role of the peroxisome proliferators-activated receptors (PPARS) in atherosclerosis. *Biochem. Pharmacol.* 2000; 60: 1245-1250.
54. Sakamoto, J., Kimura, H., Moriyama, S., Odaka, H., Momose, Y., Sugiyama, H. Activation of human peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR) subtypes by pioglitazone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 278: 704-711.

55. Pérez-Méndez, O., Bruckert, E., Franceschini, G., Duhal, N., Lacroix, B., Bonte, J., Sirtori, C., Fruchart, J., Turpin, G., Luc G. Metabolism of apolipoproteins A-I and A-II in subjects carrying similar apo A-I mutations, apo A-I Milano and apo A-I Paris. *Atherosclerosis*. 2000; 148: 317-326.
56. Huesca-Gómez, C., Luc, G., Fruchart, J., Pérez-Méndez, O. Ciprofibrate increases synthesis and catabolic rates of HDL, apo A-I and apo A-II in patients with hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis Supplements*. 2004; 5: 65
57. Webb, N., Cai, L., Ziemba, K., Yu, J., Kindy, M., Van der Westhuyzen, D., de Beer, F. The fate of HDL particles in vivo after SR-BI-mediated selective lipid uptake. *J. Lipid. Res*. 2002; 43: 1890-1898.
58. Morton, R., Greene, D. CETP and lipid transfer inhibitor protein are uniquely affected by the negative charge density of the lipid and protein domains of LDL. *J. Lip. Res*. 2003; 44: 2287-2296.
59. Desrumaux, C., Athias, A., Masson, D., Gambert, P., Lallemand, C., Lagrost, L. Influence of the electrostatic charge of lipoprotein particles on the activity of the human plasma phospholipids transfer protein. *Clin. Chim. Acta*. 1994; 231:147-160.
60. Pattnaik, N., Zilversmit, D. Interaction of cholesteryl ester exchange protein with human plasma lipoproteins and phospholipids vesicles. *J. Biol. Chem*. 1979; 254: 2782-2786.
61. Saku, K., Liu, T., Ohta, S., Jimi, I., Matsuda, K. Plasma HDL levels are regulated by the catabolic rate of large particles of lipoprotein containing apo-AI. *Biochem, Biophys. Res. Commun*. 1994; 200: 557-561.
62. Glass, C., Pittman, G., Keller, A., Steinberg, D. Tissue sites of degradation of apolipoprotein A-I in the rat. *J. Biol. Chem*. 1983; 258: 7161-7167.

63. Peterson, D., Hjelle, J., Carone, F., Moore, P. Renal handling of plasma high density lipoprotein. *Kidney Int.* 1984; 26: 411-421.
64. Segal, P., Gidez, L., Vega, D., Edelstein, H., Eder, A., Roheim, P. Apoproteins of high density lipoproteins in the urine of normal subjects. *J. Lipid. Res.* 1979; 20: 772-783.
65. Guasch, A., Deen, W., Myers, B. Charge selectivity of the glomerular filtration barrier in healthy and nephrotic humans. *J. Clin. Invest.* 1993; 92: 2274-2282.
66. Myers, B., Guasch, A. selectivity of the glomerular filtration barrier in healthy and nephritic humans. *Am. J. Nephrol.* 1993; 13: 311-317.