



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

**INFLUENCIA DE LA NEFROPATÍA EN EL CATABOLISMO DE LAS
LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL).**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

PAOLA TOLEDO IBELLES

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS
DR. ÓSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ**

**COMITÉ TUTOR
DRA. MARTHA FRANCO GUEVARA
DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO**

MÉXICO, D.F.

ABRIL, 2011



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.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 31 de enero de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **TOLEDO IBELLES PAOLA** con número de cuenta **300204719** con la tesis titulada **"INFLUENCIA DE LA NEFROPATÍA EN EL CATABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL)."**, realizada bajo la dirección del: **DR. OSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ**

Presidente: DR. JAIME MAS OLIVA
Vocal: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
Secretario: DRA. MARTHA FRANCO GUEVARA
Suplente: DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO
Suplente: DRA. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a. 28 de marzo de 2011

Mi del Coro Arizmendi

DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

Agradecimientos

Agradezco al Posgrado de Ciencias Biológicas de la UNAM, porque me ha permitido estudiar y desarrollarme en la investigación científica, con las excelentes oportunidades que brinda este programa.

A CONACYT por la beca otorgada para el desarrollo de mis estudios de maestría; este apoyo me ha permitido crecer tanto a nivel académico como personal.

El presente estudio forma parte del proyecto apoyado por CONACYT con el número de registro 132473.

Agradezco al Comité tutor que tuvo la paciencia y disposición de desarrollar conmigo este proyecto.

A la Dra Martha Franco Guevara porque su valiosa ayuda académica, experimental y moral me hacen admirarla y apreciarla mucho más cada día.

Al Dr. José de Jesús García Trejo por la paciencia e interés que me mostró durante este trabajo.

Muy especialmente, agradezco al Dr. Óscar Pérez Méndez, mi tutor principal. Por haberme dado la oportunidad de aprender y crecer en su laboratorio, además de haberme presentado la ciencia que me fascina y a la que espero contribuir con la misma convicción con que me ha enseñado. Por todo su tiempo y la buena disposición con la que siempre alentó mis aptitudes y combatió mis ignorancias.

Al Instituto Nacional de Cardiología, porque en sus instalaciones he tenido el tiempo y oportunidad de aprender, entender y ser feliz en muchos sentidos.

Agradezco al personal del Departamento de Bioterio del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", por toda la amabilidad y excelente disposición con la que siempre me mostraron que estaban dispuestos a ayudar. Al Dr. Carlos Tena, por la ayuda y comprensión con la que alentó este proyecto.

Agradecimientos

A la UNAM, porque se me llena el pecho de orgullo al sentirme parte de ella. Porque deseo verdaderamente regresarle con mi esfuerzo el enorme aporte que ha tenido en mi vida.

A los excelentes maestros que he logrado conocer. Me han ayudado a crecer como persona, ser feliz, y valorar el pensamiento y la ciencia, en particular la bioquímica, con un gran cariño.

A mis abuelos y mi madre. Porque gracias a ustedes me he convertido en la persona que hoy soy, y he logrado llegar a este punto de mi vida.

A mis hermanos, por permitirme conocerlos, ser parte de sus vidas, apreciarlos como humanos y quererlos de verdad.

A mis pequeños sobrinos Emilio y Andrés, quienes me inspiran a crecer, a desear un mundo mejor y a quererlos vehementemente.

A los amigos que han sido mi apoyo fundamental. Porque siempre he podido contar con que me recuerden que sí existen personas por las que decir “humano” evoca razonamiento, amabilidad, honestidad, dignidad y mucho más. Cecilia, Antonio, Mónica, Héctor, Ileana, Nancy, Iván, Pedro, Mauricio, Alin y Miriam, si hoy digo “amigos” con verdadera convicción y estrujándome un poco el alma, es por ustedes.

A todas las personas que me ayudaron en el transcurso de este proyecto. Además de su invaluable apoyo técnico, quiero agradecerles mucho el haberme ofrecido siempre su amabilidad sincera. Quiero hacer especial mención de los alumnos de programas de estancias intersemestrales (Cuitláhuac, Paulette, Magaly, Miriam, Diana y Rafael) así como a Ezequiel.

A los miembros del laboratorio de nefrología, Sr. José Santamaría, Magdalena, Juan Alfredo, y a mis compañeros Horacio y Said, a quienes me alegra enormemente haber conocido y aprendido de ellos. Gracias también por su sonrisa indeleble.

A los miembros del Departamento de Endocrinología, por todas la cordialidad con la que me trataron.

Índice

Tema	Página
1. RESUMEN	1
Abstract	3
2. ANTECEDENTES	
Lipoproteínas	5
<i>Figura 1. Esquema de la estructura de las lipoproteínas</i>	5
Clasificación de las lipoproteínas	6
Lipoproteínas de alta densidad	8
Enfermedad aterosclerosa coronaria	11
Metabolismo de las HDL	12
<i>Figura 2. Transporte reverso del colesterol</i>	13
Influencia del riñón en la EAC	16
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS	19
Objetivo general	19
Objetivos particulares	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS	
Animales	20
Obtención de muestras	20
Análisis de laboratorio	20

Análisis de depuración y proteinuria	21
Presión arterial media y hematocrito	21
Aislamiento y análisis de subpoblaciones de HDL	22
<i>Figura 3. Migración de muestra de HDL en PAGE nativo</i>	23
Estudios cinéticos	24
Determinación de carga de superficie	25
Actividad LCAT	27
Análisis estadístico	28
6. RESULTADOS	
Caracterización bioquímica del modelo de nefrectomía parcial	29
Cuantificación de subclases de HDL	29
<i>Figura 4. Cambio en concentración de colesterol total</i>	31
<i>Figura 5. Cambio en especies de colesterol</i>	32
Actividad LCAT	37
Catabolismo de HDL	38
<i>Figura 6. Radiactividad residual de HDL-¹²⁵I</i>	38
<i>Figura 7. Decaimiento de radiactividad de subpoblaciones</i>	41
<i>Figura 8. Decaimiento de radiactividad HDL3c</i>	42
Carga de superficie	43
7. DISCUSIÓN	44
8. CONCLUSIONES	51
9. PERSPECTIVAS	52
10. BIBLIOGRAFÍA	53
11. APÉNDICES	
Apéndice 1. Proteinuria por turbidimetría	62

Apéndice 2. Determinación de proteínas por el método de Lowry	63
Apéndice 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas	64
Apéndice 4. Tinción de lípidos en fase semisólida	65
Apéndice 5. Determinación de carga de superficie	66

Resumen

La enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC) es la segunda causa de muerte en nuestro país y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) poseen una función protectora en el desarrollo de esta enfermedad. Como resultado de su metabolismo intravascular, conocido como transporte reverso del colesterol (TRC), las HDL son un grupo muy heterogéneo de partículas que se pueden agrupar en 5 subclases con base en su diámetro hidrodinámico y densidad de flotación. En estudios de nuestro laboratorio y de otros grupos de investigación se ha sugerido que la función antiaterosclerosa de las HDL está muy relacionada con el tamaño y composición química de las partículas.

Debido a que la distribución de tamaños las HDL es dependiente del TRC, modificaciones en éste deben repercutir en la estructura y composición de las mismas. Diversos trabajos de investigación sugieren que el principal órgano catabólico de la apo A-I (apolipoproteína principal de las HDL) es el riñón. Considerando que la eliminación renal está limitada por el paso a través del corpúsculo renal, postulamos que las HDL de menor tamaño podrían filtrarse con menor dificultad que las grandes y por tanto, ser las partículas que el riñón depure mayoritariamente. Así, una alteración en la capacidad filtrante renal generará modificaciones de la distribución de tamaños de las HDL.

Para comprobar la posible relación entre el catabolismo renal, la composición química y las subclases de HDL, en una primera etapa desarrollamos y caracterizamos un modelo animal de disminución de la función renal inducida por una nefrectomía $\frac{3}{4}$ en conejos Nueva Zelanda. Este modelo cursó sin anemia, sin alteraciones de la permeabilidad glomerular ni de la presión arterial. Las HDL generadas en estos animales presentan un aumento moderado de la subpoblación de mayor tamaño (HDL2b) lo cual corresponde a un equilibrio ligeramente diferente al establecido en conejos con función renal normal. En una segunda etapa

realizamos los estudios de cinética metabólica de las HDL, tanto de las partículas totales como de sus subclases, por medio de marcado exógeno con isótopos radiactivos. Nuestros resultados demuestran que no existen diferencias del catabolismo de las HDL entre los grupos de conejos nefrectomizados y controles. Esto indica que el metabolismo de las HDL no se altera de manera importante a pesar de la drástica disminución de masa renal. Interesantemente, a pesar de que no existen registros sobre la influencia del riñón en el metabolismo del colesterol, la disminución de masa renal funcional se asoció con la presencia de HDL notablemente enriquecidas de ésteres de colesterol, mientras que la apo A-I y los demás componentes lípidicos de las HDL permanecieron sin cambios. Nuestros resultados muestran que existe un aumento en C-HDL de aproximadamente 50%; este incremento es de gran magnitud si se compara con los logrados con fármacos antilipídicos (fibratos, estatinas y niacina), los cuales alcanzan como máximo un 35% de aumento del C-HDL.

En resumen nuestros resultados demuestran que la disminución de la masa renal funcional tiene un impacto mínimo en la eliminación de apo A-I asociada a las HDL con un incremento en el contenido de ésteres de colesterol. En estudios posteriores se deberá buscar el mecanismo por el cual el riñón altera tan significativamente el contenido de colesterol en estas lipoproteínas.

Abstract

The coronary heart disease (CHD) is the second cause of death in our country and high-density lipoproteins (HDL) have a protective function on the development of this disease. As a result of their intravascular metabolism, known as reverse cholesterol transport (RCT), the HDL are a heterogeneous group of particles that can be grouped into 5 subclasses on the basis of their hydrodynamic diameter and flotation density. Studies from our laboratory and other groups of investigation have suggested that the antiatherosclerotic role of HDL is strongly related to their size and chemical composition.

Since HDL size distribution is dependent of the TRC, the structure and composition of the lipoproteins may be altered when this intravascular pathway is impaired. Several reports suggest that the principal catabolic site of the apo A-I (mayor HDL apolipoprotein) is the kidney. Considering that the renal clearance of HDL is limited by the filtration process at the renal corpuscle, we postulate that smaller HDL can be filtered more easily than the larger ones; therefore an impaired filtration capacity would generate modifications on the HDL size distribution.

In order to explore the possible relationship between the renal catabolism, the chemical composition and the HDL subclasses, we first developed and characterized an animal model of decreased renal function induced by a nephrectomy $\frac{3}{4}$ on New Zealand rabbits. This model was developed without glomerular permeability or blood pressure alterations. The HDL generated on these animals showed a moderated increase of the largest HDL subclass (HDL2b), suggesting a slightly different equilibrium as compared to rabbits with normal renal function. We further performed kinetic studies of HDL using total particles as well as isolated HDL subclasses, by radioactive exogeneous labeling of lipoproteins. Our results showed that there are no differences on catabolism of HDL between nephrectomized and control groups.

These results indicate that the HDL metabolism remained unchanged even after the drastic decrease of functional renal mass .Interestingly, on despite of the lack of evidence about the influence of the kidney on the cholesterol metabolism, the functional renal mass reduction was associated with a huge enrichment of HDL with cholesteryl esters, while the apo A-I and other lipidic components of the HDL remained unchanged. Our results show that there is a HDL-C increase of approximately 50%, which is significantly important because even antidyslipidemic drugs (as fibrates, statins and niacin) reach a HDL-C maximum increase of about 35%.

In summary, our results demonstrated that the functional renal mass reduction has a minor impact on the apo A-I-HDL clearance, associated to an increase on the cholesteryl esters content. Further studies are warranted to establish the mechanisms involved in the enrichment of HDL with cholesterol during renal mass reduction.

ANTECEDENTES.

Lipoproteínas.

Los lípidos son biomoléculas que se caracterizan por su baja solubilidad en agua, que se asocian con moléculas anfipáticas para generar estructuras conocidas como lipoproteínas (Figura 1); éstas son complejos macromoleculares y pseudomicelares que se componen principalmente por lípidos anfipáticos e hidrófobos. Asimismo, estas partículas integran en su estructura proteínas que presentan dominios que les permiten interactuar con los lípidos de ambas polaridades y con el medio circundante; a estas proteínas se les denomina apolipoproteínas (apo).

Los lípidos anfipáticos (colesterol libre y fosfolípidos) se sitúan en la superficie, de modo que los segmentos polares se mantienen

en contacto con el medio acuoso, mientras que los lípidos hidrófobos (triacilglicerolos o triglicéridos y ésteres de colesterol) se mantienen en el interior. Debido a que las proteínas contienen dominios de diferentes polaridades, pueden interactuar selectivamente con los componentes lipídicos y el medio, favoreciendo la estabilidad fisicoquímica de la partícula.^{1,2} Además, la posibilidad de las lipoproteínas de presentar cambios conformacionales ante diferentes situaciones fisiológicas, permite la interacción con enzimas del metabolismo intravascular de lípidos.

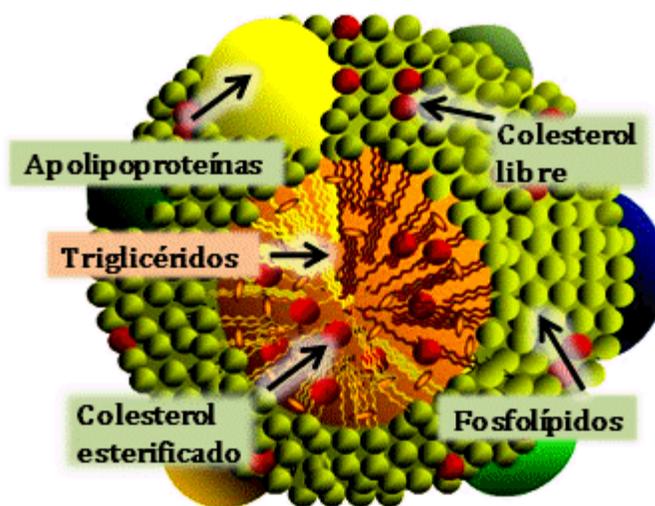


Figura 1. Esquema de la estructura de las lipoproteínas.

Clasificación de las lipoproteínas.

La composición y características de las lipoproteínas son muy variables, y dependen de su origen y metabolismo. Las diversas características bioquímicas de las lipoproteínas permiten diferenciarlas en poblaciones que suelen interactuar constantemente. La clasificación más aceptada se basa en su densidad de flotación,^{1,2} generando cinco clases de lipoproteínas, que son:

- Quilomicrones (Qm): Son las lipoproteínas de mayor tamaño, con densidad < 0.94 g/mL. En electroforesis de agarosa se mantienen en el punto de depósito. Se compone principalmente de triglicéridos y apo B-48, A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E.
- Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, "Very Low Density Lipoproteins"): 0.94 g/mL $<$ densidad < 1.006 g/mL. Se separan en la fracción pre- β del plasma en electroforesis de agarosa. Contienen principalmente triglicéridos, apo B-100, C-I, C-II, C-III y E.
- Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, "Intermedie Density Lipoproteins"): 1.006 g/mL $<$ densidad < 1.019 g/mL. Migran en la fracción pre- β del plasma. Estas partículas contienen colesterol y triglicéridos, apo B-100, C-I, C-II, C-III y E.
- Lipoproteínas de baja densidad (LDL, "Low Density Lipoproteins"): 1.019 g/mL $<$ densidad < 1.063 g/mL. En electroforesis de agarosa se separan en la fracción β del plasma. Tienen un alto contenido en colesterol y apo B-100.
- Lipoproteínas de alta densidad (HDL, "High Density Lipoproteins"): 1.063 g/mL $<$ densidad < 1.210 g/mL. Se separan en la fracción α del plasma, por lo que en la práctica clínica suelen referirse al valor de colesterol asociado a estas lipoproteínas como alfalipoproteinemia. Presentan un alto contenido en proteínas, fosfolípidos y colesterol. Su principal apolipoproteína es la A-I, además contienen A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E.

Cada tipo de lipoproteína está compuesto de varias subclases que se diferencian por su diámetro, densidad, composición y, muy posiblemente, funcionalidad biológica.

Las lipoproteínas en conjunto presentan tamaños que van desde los 5 nm hasta más de 70 nm de diámetro, de modo prácticamente continuo. Las diferentes clases de lipoproteínas también se pueden diferenciar por intervalos de diámetro así como por la proporción de cada componente lipídico y proteico. Estas características se presentan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Propiedades de las lipoproteínas plasmáticas.³

Lipoproteína	Tamaño (<i>nm</i>)	Proteína (% de masa <i>seca</i>)	Fosfolípidos (% de la fracción lipídica de las lipoproteínas)	Triglicéridos	Colesterol Libre	Éster de Colesterol
Qm	>70	1-2	3-6	90-95	1-3	2-4
VLDL	30-70	6-10	15-20	45-65	4-8	5
IDL	20-30	20	30	35		35
LDL	18-30	18-22	18-24	4-8	6-8	45-50
HDL	5-12	45-55	26-32	2-7	3-5	15-20

Cada tipo de lipoproteína está integrado por varias subclases que se diferencian por su diámetro, densidad, composición, y carga eléctrica.

Lipoproteínas de alta densidad (HDL)

La mayor parte de las HDL migran en la fracción α del plasma, por lo que algunos autores las identifican como α -lipoproteínas. Sin embargo, existe una subpoblación que migra en la fracción pre β del plasma, por lo que a este tipo de HDL se les conoce como partículas pre- β 1; estas lipoproteínas tienen forma discoidal y están compuestas esencialmente de fosfolípidos y apo A-I, y tienen una masa molecular de alrededor de 60 kDa.

Tal como se puntualizó en el cuadro 1, las HDL maduras tienen una proporción importante de colesterol, el cual tiene un hidroxilo unido al carbono 3 y que denominamos como colesterol libre (CL); el grupo hidroxilo puede ser esterificado al reaccionar con un ácido graso, y en este caso se hace referencia a un éster de colesterol (CE). La importancia de la diferenciación de ambas especies de colesterol radica en el cambio de polaridad que representa y, por consiguiente, en la localización del colesterol dentro de la lipoproteína.

Las HDL son las lipoproteínas más pequeñas, con diámetros que normalmente varían entre los 5 y 12 nm; en comparación con las otras lipoproteínas, presentan la mayor proporción proteica (45-55% de su masa seca), y son las más densas. La fracción proteica de las HDL puede estar compuesta por diversas apolipoproteínas, de las cuales se resumen algunas características en el cuadro 2. La apo A-I es la apolipoproteína más abundante de las HDL, representa hasta un 70% de su proteína constitutiva y está presente en prácticamente todas las partículas de esta población.^{4,5} La biosíntesis de las HDL inicia con la síntesis hepática y secreción de la apo A-I al sistema vascular, la cual se asocia fácilmente con fosfolípidos generando una estructura discoidal que puede captar colesterol.⁶ La apo A-I también es indispensable en el metabolismo intravascular de las HDL pues desempeña la función de coenzima de la lecitina: colesterol acil transferasa (LCAT),⁷ enzima esencial en el metabolismo y maduración de la lipoproteína.

En el Cuadro 2 se presentan las características más importantes de algunas apolipoproteínas presentes en las HDL.

Cuadro 2. Características de las apolipoproteínas.⁸

Apo	P.M. (Daltons)	pI	Localización	Sitio de síntesis	Conc. plasmática (mg/dL)	Función
A-I	29,016	5.9-5.4	HDL, Qm	Intestino Hígado	100-150	Principal componente de las HDL, activador de LCAT, estimula el eflujo del colesterol.
A-II	14,414	5.0	HDL	Intestino Hígado	30-50	Proteína componente de HDL, inhibidor de LH y de la LCAT.
A-IV	44,465	5.5	HDL, Qm	Intestino	15	Activador de LCAT, modulador de LPL y estimula el eflujo de colesterol.
C-I	6,630	7.5	HDL, VLDL, Qm	Hígado	4-6	Activador de LCAT, inhibe la captación hepática de Triglicéridos.
C-II	8,900	4.9	HDL, VLDL, Qm	Hígado	3-5	Activador LPL, inhibición de la captación hepática de Lp-apo B-100.
C-III 0,1,2	8,800	4.5-5.0	HDL, VLDL, Qm	Hígado	12-14	Inhibidor de la LPL
E2,3,4	34,145	6.0-5.7	VLDL, HDL	Hígado	3-5	Ligando de receptor de LDL y de residuos de Qm, estimula el eflujo de colesterol.

P.M: Peso molecular, pI: Punto isoeléctrico, LCAT: Lecitina:colesterol acil transferasa, LPL: Lipoproteína lipasa, LH: Lipasa hepática.

Los grupos ionizables de los aminoácidos presentes en estas proteínas anfipáticas aportan a las lipoproteínas plasmáticas una densidad de carga generalmente negativa al encontrarse en un pH superior a su punto isoeléctrico. Tales cargas interactúan con las regiones ionizables de los fosfolípidos hacia la interface lípido-agua estabilizando a la partícula.⁹ Debido a que la proporción de las apolipoproteínas presentes en las HDL es variable, el valor de carga de superficie no es estático, y su magnitud está relacionada en gran medida con la cantidad y naturaleza de los fosfolípidos.¹⁰

Las HDL pueden diferenciarse por su diámetro, composición lipídica, contenido en apolipoproteínas, densidad y carga eléctrica de superficie. La diferenciación de las HDL se presenta como una necesidad porque se ha sugerido que su actividad biológica es dependiente de su tamaño y características fisicoquímicas.^{6,8}

Una de las subclasificaciones más empleadas está basada en las diferencias en su densidad de flotación en conjunto con el diámetro hidrodinámico. Se realiza aislando a las HDL a partir de plasma o suero por ultracentrifugación secuencial y posteriormente separándolas por PAGE en condiciones nativas. Este procedimiento permite reconocer 5 subpoblaciones de HDL en humanos, las HDL2b con diámetros de 9.7-13.5 nm, HDL2a, de 8.8-9.7 nm, HDL3a 8.2-8.8 nm, HDL3b 7.8-8.2 nm y HDL3c de 7.2-7.7 nm.^{8,11} Las HDL de conejos presentan el mismo comportamiento; sin embargo, sus HDL 2b tienen un intervalo mayor donde se contempla a partículas con diámetro superior a los 13.5 nm.¹²

Enfermedad aterosclerosa coronaria

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).¹³ Por lo tanto, el diagnóstico precoz y tratamiento oportuno son prioritarios para enfrentar más eficazmente esta patología.

La EAC puede comenzar con la infiltración de LDL al espacio subendotelial en donde, al existir un ambiente de estrés oxidativo, ocurre la peroxidación de los lípidos contenidos en las LDL. Las LDL oxidadas son factores quimiotácticos para monocitos circulantes, que atraviesan el endotelio vascular y se transforman en macrófagos, capaces de fagocitar las LDL oxidadas por un reconocimiento específico. La falta de maquinaria enzimática suficiente para degradar los lípidos y lipoperóxidos tiene como consecuencia la acumulación de éstos en el citoplasma del macrófago, así se denomina al macrófago célula espumosa.¹⁴ Antes de morir, las células espumosas liberan una gran cantidad de citocinas que estimulan al endotelio vascular para que sintetice más adhesinas, exacerbando así el proceso inflamatorio. Las células espumosas constituyen las etapas tempranas de formación del ateroma.

En estudios epidemiológicos se ha observado que existe una correlación negativa entre las concentraciones de colesterol asociado a las HDL y la incidencia de EAC.¹⁵ Debido a esto se ha postulado que las HDL tienen una función protectora en el desarrollo de esta enfermedad y se han descrito distintos mecanismos para explicar este efecto, como lo es el transporte reverso del colesterol que se detalla más adelante. Además, se han realizado estudios para discernir si existe una subpoblación con mayor capacidad cardioprotectora, pero hasta el momento no se ha encontrado evidencia definitiva a este respecto.

Metabolismo de las HDL.

El metabolismo intravascular de las lipoproteínas HDL se conoce generalmente como transporte reverso del colesterol (TRC), y consiste en el intercambio dinámico de componentes lipídicos en torrente sanguíneo (Fig. 2). En este proceso el colesterol excedente, de las células periféricas regresa al hígado para su eliminación o reciclamiento. Lo anterior evita la formación de acumulaciones patológicas de colesterol en los tejidos como los ateromas.^{16,17}

Las apolipoproteínas recién sintetizadas son secretadas al torrente sanguíneo y adquieren lípidos como colesterol y fosfolípidos de los tejidos periféricos. Las HDL tipo pre β 1 captan colesterol libre principalmente por interacción con el transportador de membrana ABCA-1 que es dependiente de ATP, y está presente en hígado, macrófagos e intestino, entre otros tejidos.¹⁸ Hasta el momento se conoce poco acerca del mecanismo de acción del ABCA-1 así como el sitio donde la apo A-I adquiere lípidos. Se ha postulado que existen perturbaciones en la membrana causadas por el ABCA-1, a las cuales se une la apo A-I y como consecuencia puede captar fosfolípidos y colesterol membranales. En contraste, algunos reportes sugieren que el complejo apo A-I/ABCA-1 es endocitado y este p durante la internalización la apo A-I adquiere los lípidos que dan origen a la HDL.^{19,20} A pesar de que los detalles de este proceso son inciertos, es un hecho que el transportador ABCA-1 es esencial para la obtención de lípidos por la apo A-I y la consecuente generación de partículas esféricas y pequeñas clasificadas como HDL3.

Las HDL esféricas aumentan su tamaño con la esterificación del colesterol libre; este proceso está catalizado por la enzima lecitina: colesterol acilo transferasa (LCAT) plasmática. La LCAT cataliza la transferencia de un ácido graso proveniente de la fosfatidilcolina (lecitina) al colesterol libre presente en las HDL, lo cual se considera parte del proceso de maduración

de las HDL. Las HDL generadas por estas reacciones poseen un tamaño superior y una menor densidad con respecto a las HDL3, por lo que podemos diferenciarlas denominándolas HDL2.

Los ésteres de colesterol asociados a las HDL2 son intercambiados por triglicéridos con las diferentes lipoproteínas que contienen apo B; este intercambio es facilitado por la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP) que es una proteína plasmática sintetizada en tejido adiposo, hepático e intestino delgado. Además, para mantener una estructura estable, las apo C's y E se transfieren a los quilomicrones y VLDL. La lipasa hepática (LH) hidroliza triglicéridos y fosfolípidos de las HDL, generando una partícula remanente que puede ser remodelada por la proteína transportadora de fosfolípidos (PLTP) en partículas pre- β y HDL3, ambas con la capacidad de reiniciar el ciclo de captación de colesterol. Es así como el colesterol de los tejidos periféricos llega al hígado para ser reciclado o excretado a través de las vías biliares.¹⁶

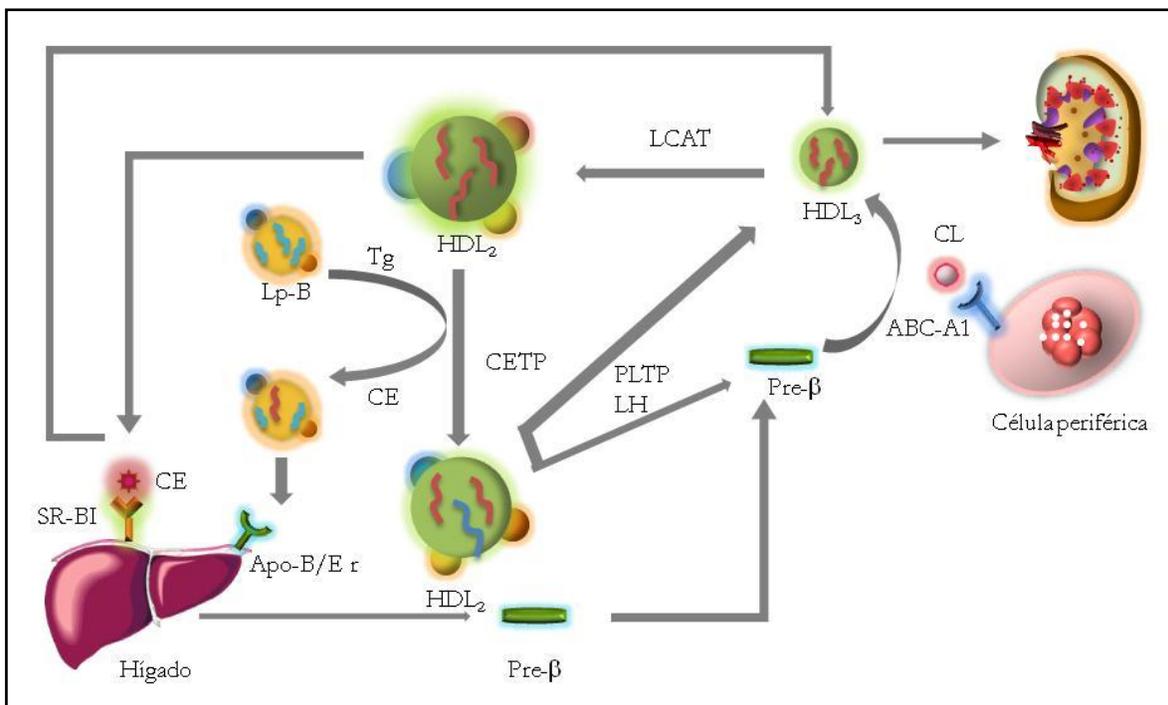


Figura 2. Transporte Reverso del Colesterol. Lp-B: Lipoproteínas que contienen apo B (VLDL, LDL y Qm). Tg: triglicéridos.

El complejo proceso de remodelación intravascular de las HDL propicia que estas partículas se encuentren en cambio constante y por tanto las lipoproteínas plasmáticas se presenten como una gama muy heterogénea de partículas en equilibrio. Se ha postulado que estas diferencias en las HDL generan comportamientos diferentes ante la misma situación fisiológica, es decir que sus capacidades dependen de su tamaño, composición lipídica, y carga.^{6,15}

Debido a que las HDL son complejos macromoleculares integrados por diferentes lípidos y apolipoproteínas, su eliminación de plasma ha sido determinada de forma independiente por el seguimiento de sus principales componentes; esto es la apo A-I por parte de la fracción proteica y el colesterol por los componentes lipídicos. Con respecto al colesterol asociado a las HDL, el hígado contribuye con aproximadamente un 65% de la eliminación total, donde el mecanismo mejor descrito hasta el momento es mediado por el receptor “scavenger” tipo BI (SR-BI), presente también en tejidos esteroideogénicos y macrófagos.²¹ El receptor de membrana SR-BI favorece la remoción selectiva del colesterol asociado a las HDL, tanto esterificado como libre, para su eliminación sin comprometer la integridad de las apolipoproteínas asociadas al complejo.²² Se ha propuesto que el receptor SR-BI permite la internalización de las HDL desde la membrana basolateral de los hepatocitos hacia vesículas de reciclaje endocítico en la cara apical de la membrana; el remanente de HDL carente de colesterol no se asocia a lisosomas y es nuevamente secretado, proceso al que generalmente se le denomina retroendocitosis.^{21,22} A causa de la pérdida de colesterol en la estructura de la HDL, las partículas liberadas al torrente sanguíneo son nuevamente pequeñas (HDL3), y capaces de continuar con el eflujo de colesterol (Fig. 2).

Adicionalmente, Martínez LO y colaboradores²³ demostraron que la apo A-I se une con gran afinidad a la subunidad β de la ATP sintasa que se expresa de manera ectópica en la

membrana del hepatocito; la incubación con ADP estimula la internalización de la apo A-I, mientras que la inhibición de dicha subunidad β impide su internalización en células hepáticas. Se considera que existe una vía de endocitosis para las HDL dependiente de ADP, y que este proceso está acoplado a la secreción o retroendocitosis de la apo A-I. Sin embargo, el paso de la apo A-I por el interior celular no parece ser indispensable para la asociación de la apolipoproteína con fosfolípidos y colesterol.^{23,24}

En cuanto a la degradación de la fracción proteica asociada a las HDL, desde hace casi tres décadas que se considera al riñón como uno de los órganos con mayor actividad catabólica, aunque los reportes experimentales a este respecto son escasos y todos datan de la misma época.²⁵ En algunos estudios se ha empleado HDL marcadas con ¹²⁵I-tiramincelobiosa- apo A-I y ³H- ésteres de colesterol tanto simultáneamente como de manera independiente; con ambos compuestos la marca radiactiva persiste en el interior de la célula una vez internalizada la partícula. Los resultados obtenidos con esta metodología pusieron de manifiesto que el riñón contribuye con más del 30% de la degradación de la apo A-I plasmática, pero menos de un 1% del colesterol.²⁶ Adicionalmente se ha demostrado que la cubilina tiene la capacidad de unir tanto HDL como LDL e internalizarlas en la célula en vesículas endocíticas, además de ser más afín por las HDL3.²⁷ Esta proteína transportadora, es intensamente expresada en las células epiteliales del túbulo renal proximal, en la membrana apical.^{28,29}

Sin embargo, debido a las pequeñas fenestraciones del endotelio glomerular y las cargas polianiónicas de la matriz de la barrera filtrante, la filtración glomerular es un proceso dependiente tanto del diámetro de partícula como de su carga. Considerando que las HDL son complejos con un diámetro variable entre los 7.2 y 13.5 nm, y una carga negativa, la posibilidad de ser filtradas por la membrana basal glomerular es pequeña y podría implicar la condición limitante de esta vía de eliminación. Estudios previos han demostrado que una

eliminación acelerada de las HDL genera una distribución con mayor proporción de lipoproteínas pequeñas y que esta eliminación es menor cuando las HDL presentan una mayor carga de superficie.^{10,30} A este respecto existen dos posibilidades: que la fracción de la apo A-I plasmática eliminada corresponda a apo A-I libre, o bien que sea la apo A-I de las subclase de HDL (HDL3) de menor diámetro que poseen una proporción 2:1 de proteína con respecto al colesterol.¹¹

Influencia del riñón en la EAC.

Los pacientes con un compromiso renal presentan un alto riesgo cardiovascular, estableciendo incluso que es posible emplear los niveles de albuminuria como marcadores de riesgo independiente para el desarrollo de EAC.³¹⁻³⁵ Estos pacientes presentan desórdenes lipídicos congruentes con un riesgo cardiovascular elevado. Dichas alteraciones consisten en niveles altos de triglicéridos y colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (C-LDL), así como bajas concentraciones plasmáticas de colesterol asociado a las HDL (C-HDL) y apo AI.³⁶ Cuando la enfermedad renal avanza a etapas terminales, la dislipidemia que predomina es la baja concentración de C-HDL y apo A-I, lo cual aparentemente indica que a una mayor falla renal corresponde un mayor catabolismo de apo A-I.^{37,38} En la medida en que se ha considerado al riñón como un órgano principal en la eliminación de la apo A-I es posible suponer que el daño renal debería alterar la eliminación de la apo A-I y modificar la concentración plasmática de la apolipoproteína. Se debe tener en consideración que la enfermedad crónica renal es un proceso degenerativo que se acompaña de una elevación en el riesgo cardiovascular asociado a factores como inflamación, estrés oxidativo, anemia, hipertensión, disfunción endotelial, calcificación vascular además de los desórdenes lipídicos.³⁹ Por sí mismos la inflamación, el estrés oxidativo y la hipertensión han sido asociados, en casos independientes de disfunción renal, a un perfil de lípidos alterado, por lo

que existe la posibilidad de que las anormalidades lipídicas observadas durante la nefropatía sean secundarias a esos procesos fisiopatológicos y no se deriven directamente de la disfunción renal.⁴⁰⁻⁴²

El análisis sobre la síntesis y catabolismo de las apolipoproteínas (apo) A-I y A-II de las HDL en situaciones de disfunción renal tampoco ha sido concluyente; mientras que las ratas con nefrotoxicidad o con nefritis pasiva reducen la tasa de catabolismo de las HDL entre 55% y 67%, los pacientes con proteinurias moderadas y agudas catabolizan rápidamente estas lipoproteínas.⁴³⁻⁴⁵ La clara contradicción entre estas observaciones resultada del poco entendimiento que existe ante la relación del riñón con las HDL, y la influencia de las características de tales lipoproteínas, por ello es fundamental la evaluación integral de la estructura y metabolismo de las HDL.

HIPÓTESIS

Si la apo A-I eliminada por vía renal corresponde a la proteína asociada a las HDL de menor tamaño, habrá un cambio en la distribución relativa de los tamaños y de la composición química de estas lipoproteínas, asociado a una disminución del catabolismo renal cuando se reduce la masa renal funcional.

OBJETIVOS.

Objetivo general

Determinar el impacto de la disminución de la masa renal funcional en el metabolismo de las HDL, así como en la distribución de tamaños y composición lipídica de las subclases de estas lipoproteínas.

Objetivos particulares.

- ◆ Caracterizar un modelo animal de función renal disminuida de un 75% en conejo Nueva Zelanda
- ◆ Determinar la tasa de catabolismo de HDL en conejos parcialmente nefrectomizados.
- ◆ Establecer si existe un cambio de la distribución relativa de las HDL en las diferentes subclases determinadas por su contenido de proteína
- ◆ Cuantificar el cambio en las subclases de HDL al determinarlas por su contenido en lípidos
- ◆ Determinar cambios en la carga de las HDL y analizar su relación con la eliminación renal.
- ◆ Cuantificar el cambio en la actividad de de la enzima LCAT como resultado de la nefrectomía parcial.
- ◆ Observar los cambios en el metabolismo dinámico de interconversión entre las subpoblaciones de HDL.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Animales.

Distribuimos a 18 conejos Nueva Zelanda (NZ) macho de 3 a 3.5 Kg en dos grupos; a uno se le realizó una nefrectomía 1 ½, que consiste en la eliminación de 1 riñón completo y la mitad del segundo por intervención quirúrgica. Con fines de comparación al grupo control se le realizaron las cirugías simuladas correspondientes.⁴⁶ La anestesia general en ambos casos se indujo empleando una combinación de xilacina 1 mg/Kg vía intramuscular e isoflurano inhalado al 2%. En una primera cirugía se realizó la reducción de masa renal infartando aproximadamente un 50% del riñón izquierdo al ligar una de las ramas de la arteria renal y asegurando que el uréter quedara libre. En una segunda intervención quirúrgica, dos semanas después, se extirpó el riñón derecho completamente. En ambos casos se administró antibiótico (enrofloxacina 10 mg/Kg) y analgésico (buprenorfina 30 µg/Kg) por vía intramuscular. Los animales consumieron alimento estándar y agua *ad libitum*.

Obtención de muestras.

Después de un ayuno de 12 horas, se obtuvieron muestras de sangre venosa recolectadas en tubos que contenían EDTA o heparina como anticoagulante. Las muestras se centrifugaron a 1000 g durante 15 minutos, al término de este tiempo se separó el plasma. En aquellos casos en que no se empleó después de la punción, el plasma se almacenó a -70 °C hasta el momento de su análisis.

Análisis de laboratorio

Las concentraciones de glucosa, triglicéridos y colesterol séricos se determinaron por métodos enzimáticos colorimétricos comerciales. Para determinar las concentraciones de lípidos asociados a HDL se ajustó la densidad de las muestras de plasma a 1.063 g/mL y se

ultracentrifugó a 436000 g durante 2.5 h a 10 °C para separar de manera selectiva las lipoproteínas que contienen apo B. En el resto del plasma se determinó la concentración de colesterol, colesterol libre, triglicéridos y fosfatidilcolina por métodos enzimáticos colorimétricos y se corrigieron los datos por la dilución. Estos parámetros se analizaron antes y después de 4 semanas de la segunda intervención quirúrgica.

Análisis de depuración y proteinuria

En un período de 4 semanas después de la segunda cirugía se recolectó, empleando una caja metabólica, la orina de los animales durante 24 horas. Se determinó la depuración considerando las concentraciones de creatinina sérica en una muestra tomada al inicio de la recolección y la cantidad de creatinina excretada. Las determinaciones se realizaron en un analizador de química clínica automatizado modelo ILab 300 Plus de Instrumentation Laboratory en el Departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

La cuantificación de proteína excretada en orina se realizó por turbidimetría como se detalla en el apéndice 1.⁴⁷ Comparamos los valores de depuración y proteinuria entre el grupo parcialmente nefrectomizado y el grupo control.

Presión arterial media y hematocrito

Las mediciones de presión arterial media se realizaron directamente por medio de un transductor modelo p23 db, (Gould San Juan, PR) instalado en la arteria de la oreja del conejo; el registro se llevó a cabo con un polígrafo (Grass Instruments Quincy MA). El hematocrito se determinó por ultracentrifugación de sangre total en capilar.

Aislamiento y análisis de subpoblaciones de HDL

Las muestras de HDL se obtuvieron por ultracentrifugación secuencial a partir de plasma, ajustando la densidad del mismo a 1.063 g/mL con KBr sólido y ultracentrifugando por 2 horas 30 minutos a 436000 g. con el fin de separar las lipoproteínas que contienen apo B. Posteriormente se ajustó nuevamente la densidad a 1.21 g/mL con KBr sólido y se ultracentrifugó por 3 horas a 436000 g para aislar a las HDL. Bajo estas condiciones se recupera de 80% a 85% de la apo A-I del plasma total.⁴⁸ Las HDL se dializaron en solución amortiguadora de Tris 0.09 M, ácido bórico 0.08 M, EDTA 3 mM, pH 8.4 (amortiguador TBE). Al final de la diálisis se realizó la cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry.⁴⁹ (Apéndice 2).

Las subpoblaciones de HDL se separaron por su tamaño en electroforesis en gradiente de 3 a 30 % de poliacrilamida en condiciones nativas, detallado en el apéndice 3. Las HDL separadas en el gel, se analizaron por su radio hidrodinámico, utilizando como referencia los marcadores de alto peso molecular (tiroglobulina de 17 nm, ferritina de 12.2 nm, catalasa de 10.4 nm, lactato deshidrogenasa de 8.2 nm y albúmina de 7.1 nm, kit Pharmacia, UK).⁵⁰ De esta manera, se determinó la proporción de cada subpoblación de HDL por su diámetro hidrodinámico conocido (HDL_{2b} 13.6-10.58 nm, HDL_{2a} 10.58-9.94nm, HDL_{3a} 9.94-8.98, HDL_{3b} 8.98-8.45nm, HDL_{3c} 8.45-7.70 nm).^{11,48} Los geles fueron teñidos inicialmente para la detección de lípidos, fueron decolorados y a continuación se tiñeron todas las apolipoproteínas asociadas a las HDL con azul de Coomassie R250 al 0.1% solubilizado en metanol 25%, ácido acético 10% y agua. La tinción de lípidos se detalla en el apéndice 4. De cada tinción se obtuvo un densitograma correspondiente a uno de los componentes (Molecular Analyst Software Versión 1.1, 1994 Bio-Rad). Para calcular el porcentaje con el que contribuye cada subclase a la población total de HDL plasmáticas se consideró que el área total bajo la curva corresponde

a la población total de HDL y que las subclases pueden dividirse empleando los diámetros hidrodinámicos previamente reportados. Para calcular la concentración plasmática de los lípidos de las subclases de HDL, el porcentaje relativo de cada subclase determinada por densitometría óptica fue relacionado con las concentraciones de cada uno de los lípidos determinadas en plasma después de precipitar las lipoproteínas que contiene apo B con una solución de sulfato de dextrán/magnesio (100 μ L/mL de plasma).^{11,51} En la figura 3 se muestra un ejemplo de la migración electroforética de las HDL teñidas con azul de Coomasie, el densitograma obtenido y los intervalos de diámetro que definan a las subclases de estas lipoproteínas.

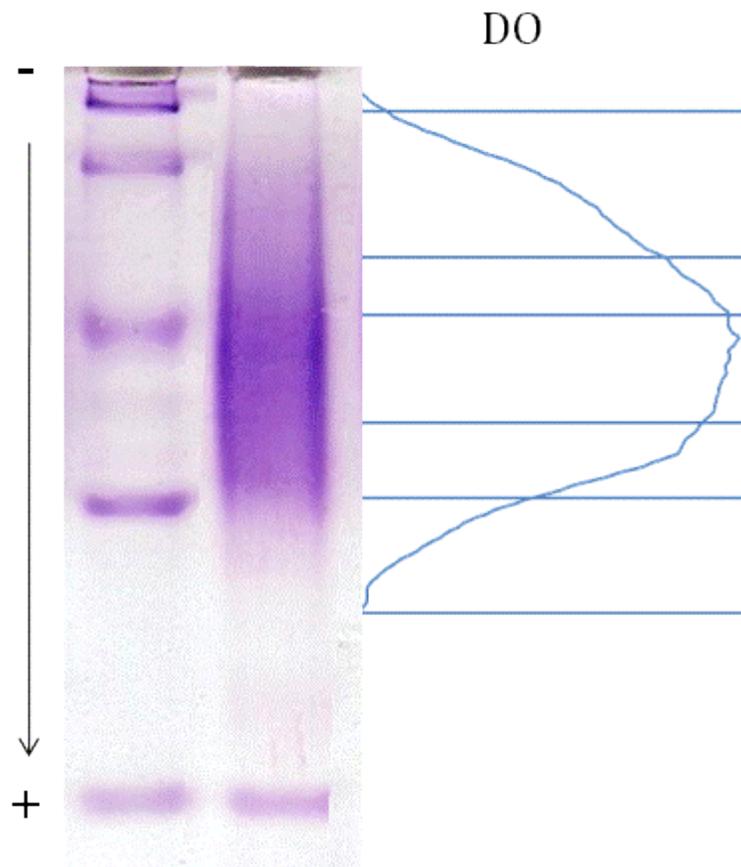


Figura 3. Imagen de la migración de una muestra de HDL en un gel PAGE nativo teñido con azul de Coomasie. En el carril A se encuentran los marcadores de peso molecular y en B la muestra de un conejo nefrectomizado. El gráfico de la sección C es el densitograma correspondiente, que presenta la DO contra la distancia migrada.

Estudios cinéticos.

En la quinta semana después de la segunda cirugía se realizaron los estudios de catabolismo de HDL de acuerdo a la metodología empleada en nuestro laboratorio.⁵² Brevemente, las HDL aisladas de conejos se dializaron y deslipidaron con una mezcla etanol-éter (2:1, v/v). La parte proteica se solubilizó en amortiguador de tris-HCl 30 mM y urea 6 M a pH=8.0, y se hizo pasar por una cromatografía de intercambio aniónico, usando una columna UNO Q1 (Bio-Rad) acoplada a un sistema de cromatografía Bio-Rad Duo Flow, eluyendo con un gradiente lineal de NaCl 0.1 M de 0 a 50% en el mismo amortiguador. Se seleccionaron las fracciones que contenían apo A-I y se dializaron contra NH_4HCO_3 10 mM. La presencia y pureza de la apo A-I se determinaron por electroforesis en gradiente de poliacrilamida 4-21% con SDS 10% y tiñendo las bandas con azul de Coomassie R250. La concentración de apo AI se estimó por espectrofotometría, considerando un valor del 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 realizó por el método de Bilheimer y colaboradores⁵³ que consiste en mezclar 1 mg de proteína con 1 mCi de Na^{125}I en una solución 10 mM de ICl. La proteína marcada se separó con una columna de Sephadex G-25 (50-150 μm) y fue reincorporada a HDL, incubando 1 h a 37 °C. La ^{125}I -apo A-I libre se separó de las HDL por ultracentrifugación y se dializaron contra una solución de NaCl 0.15 M. La solución se esterilizó por filtración usando membranas de 0.22 μm . Las HDL marcadas radiactivamente se incorporaron al flujo sanguíneo de los animales, tras un ayuno de 12 horas. Después de la administración se contabilizaron 10 minutos para permitir la distribución de las HDL y posteriormente se recolectaron muestras a diferentes tiempos. Las muestras se mantuvieron en frío hasta el momento de su análisis. Finalmente se determinó la radiactividad por unidad de volumen presente en cada muestra. Las lecturas obtenidas fueron expresadas como porcentaje de la radiactividad inicial y se ajustaron a un modelo biexponencial con el

programa computacional SAAMII para calcular la tasa de catabolismo o FCR por sus siglas en inglés. La tasa de síntesis de apo A-I fue calculada con la fórmula:

$$PR = \frac{FCR \left(\frac{1}{h}\right) \times apo\ A-I\ plasmática \left(\frac{mg}{L}\right) \times volumen\ plasmático(L)}{Peso\ corporal\ (Kg)}$$

El volumen plasmático se consideró como 3.28 % del peso corporal de los conejos.⁵²

Adicionalmente, se aislaron HDL por ultracentrifugación secuencial del plasma de cada tiempo de la cinética, las lipoproteínas se separaron por PAGE como se indica en la sección anterior. Empleando los marcadores de alto peso molecular se cortaron las secciones del gel correspondientes a las diferentes subclases de HDL y se determinó la radiactividad presente. Con las mediciones de radiactividad se determinó la modificación dinámica de la distribución de las subpoblaciones. La radiactividad de cada subpoblación por unidad de volumen se obtuvo multiplicando el porcentaje de radiactividad encontrado en cada subclase por la radiactividad obtenida en el plasma total.

Determinación de carga de superficie.

La densidad de carga de superficie se analizó de acuerdo a la metodología descrita previamente por Sparks DL y colaboradores,⁵⁴ con ligeras modificaciones realizadas por nuestro grupo de investigación y que se detalla en el Apéndice 5.

La densidad de carga de superficie (Cd) es dependiente de la movilidad electroforética y del radio de las lipoproteínas, éste último se obtuvo de la separación electroforética en PAGE con condiciones nativas. Debido a que las HDL comprenden diversos diámetros, la densidad de carga se reporta como un intervalo calculado a partir del radio mínimo de las HDL, el radio con mayor población de las HDL y el radio máximo de las mismas.

Estudios realizados empleando la teoría electrocinética han reportado que la Cd mantiene una relación directa con la carga neta o valencia (V), que a su vez puede estimarse por la movilidad electroforética (U) de las partículas bajo condiciones específicas (Ecuación 1). El valor de V representa el número de cargas negativas que tiene en exceso la lipoproteína, y se calcula considerando al complejo como una partícula esférica. Así V está relacionada por medio de la constante empírica de Henry con U, que se calcula como el cociente de la velocidad electroforética (distancia migrada/ tiempo de migración) por el potencial electroforético (diferencia de potencial aplicado/ longitud del gel). Asimismo, el cálculo de V contempla el intervalo de radio de la partícula (r) y de su contracción (ri) Na⁺. Además incluye factores fisicoquímicos como la viscosidad del medio (η), la constante de Debye-Huckel (κ) que puede inferirse por la fuerza iónica del medio, y el grosor de la bicapa de iones que circundan a la lipoproteína (f), el cual es constante para condiciones de fuerza iónica estables.

Ecuación 1.

$$V = \frac{6.25 \times 10^7 U 6 \pi r n (1 + \kappa_r + \kappa_{ri})}{f (1 + \kappa_{ri})}$$

La densidad de cargas de superficie es directamente proporcional al valor de la carga neta (V) y su cálculo está determinado por la siguiente fórmula:

Ecuación 2

$$Cd = \frac{4.8 \times 10^{-10} V}{4 \pi r^2}$$

Al final la carga de superficie (Cd) se expresa en Coulomb (C) por área en cm².

Actividad LCAT

La actividad de la LCAT fue monitoreada por la conversión del colesterol libre a esterificado empleando ³H-colesterol libre.⁴⁸ El colesterol se incorporó en proteoliposomas que contenían fosfatidilcolina, apo AI humana, colato de sodio, colesterol frío y ³H-colesterol. Los proteoliposomas fueron empleados como sustrato, incubándose con las muestras de plasma durante 1 hora a 37 °C. Para detener la reacción enzimática se agregó una mezcla de cloroformo: metanol en proporción 2:1. Los lípidos contenidos en la fase orgánica fueron recuperados, evaporando a sequedad la mezcla solvente y posteriormente se separaron por cromatografía en capa fina. El Rf del colesterol libre y esterificado se verificó empleando estándares de colesterol (SIGMA) y palmitato de colesterol (INC) eluidos junto con las muestras. Las bandas de ambas especies de colesterol fueron recolectadas y se agregó líquido de centello para medir la radiactividad presente en cada una de ellas, empleando un contador de centelleo 2200CA. Los resultados se presentan como la cantidad de colesterol esterificado por unidad de tiempo y volumen de plasma (nmol de colesterol /h/mL).

Análisis estadístico

Las comparaciones se realizaron entre los parámetros al final del tiempo de evolución de la nefrectomía y previos a la intervención quirúrgica en todos aquellos casos en los que fue posible. Para los parámetros que podrían verse afectados por la edad además del estrés quirúrgico, se empleó una comparación contra el grupo control. Igualmente la comparación de los estudios cinéticos se realizó contra el grupo control.

Las pruebas estadísticas empleadas fueron t de Student, pareada o contra control. En los de estudios cinéticos de las subpoblaciones de HDL, se realizó una prueba t de Student en las determinaciones de cada tiempo entre el grupo nefrectomizado y el grupo control.

Los resultados se presentan como el promedio más error estándar. La significancia estadística se consideró a partir de una $p < 0.05$.

RESULTADOS

Caracterización bioquímica del modelo de nefrectomía parcial

Con el interés de caracterizar a nuestro modelo de nefrectomía parcial, se analizaron las concentraciones de metabolitos de excreción, perfil de lípidos y perfil de lípidos asociados a las HDL. Los resultados se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Parámetros de evaluación bioquímica en suero.

PARÁMETRO (mg/dL)	Previo a cirugía n= 12	Después de 4 semanas n= 12
Urea	17.6 ± 0.9	32.2 ± 4.0**
Creatinina	1.11 ± 0.04	2.02 ± 0.24**
Glucosa	116.4 ± 4.2	117.9 ± 11.7
Triglicéridos	49.5 ± 10.8	39.6 ± 8.6
Colesterol	47.6 ± 6.0	51.2 ± 4.7
Triglicéridos- HDL	24.0 ± 4.7	23.1 ± 3.7
Fosfatidilcolina- HDL	62.7 ± 4.0	62.7 ± 8.9
Colesterol total- HDL	20.7 ± 2.2	30.2 ± 2.5*
Colesterol libre- HDL	7.1 ± 1.2	10.0 ± 1.0
Colesterol esterificado-HDL	22.9 ± 4.4	34.0 ± 3.3*
Colesterol no- HDL	27.0 ± 4.8	20.9 ± 4.1

Los resultados mostrados se expresan como promedio±EE. *p<0.05 **p<0.01

Los metabolitos de excreción (urea y creatinina) presentan un aumento de 57% aproximadamente; la magnitud de este cambio es similar al observado en las concentraciones de colesterol total y esterificado, que alcanza un 48%.

A continuación evaluamos la función renal en nuestro modelo experimental a través de algunos parámetros relacionados con las principales funciones del riñón. La tabla 2 presenta la comparación entre el grupo parcialmente nefrectomizado y el grupo con cirugía simulada.

Tabla 2. Evaluación de función renal.

Parámetro	Nefrectomizado (n=11)	Control (n= 8)
Depuración de creatinina (mL/min)	4.6 ± 1.6	12.8 ± 8.0*
Proteinuria (mg/24 h)	19.1 ± 4.9	22.2 ± 6.4
Hematocrito (%)	44.0 ± 1.7	44.6 ± 1.7
Presión arterial media (mmHg)	92 ± 10.0	73 ± 5.2

Los resultados mostrados se expresan como promedio±EE. *p<0.05

La depuración de creatinina en conejos nefrectomizados es prácticamente un tercio del valor obtenido en el grupo de conejos control. No se encontró ningún cambio adicional en los demás parámetros.

Cuantificación de subclases de HDL

La concentración de lípido asociado a una subclase de HDL fue determinada en muestras antes y 5 semanas después de la nefrectomía o la cirugía simulada. El cambio observado en las concentraciones de colesterol se presenta en los gráficos 4 y 5, comparando al grupo parcialmente nefrectomizado con el grupo control.

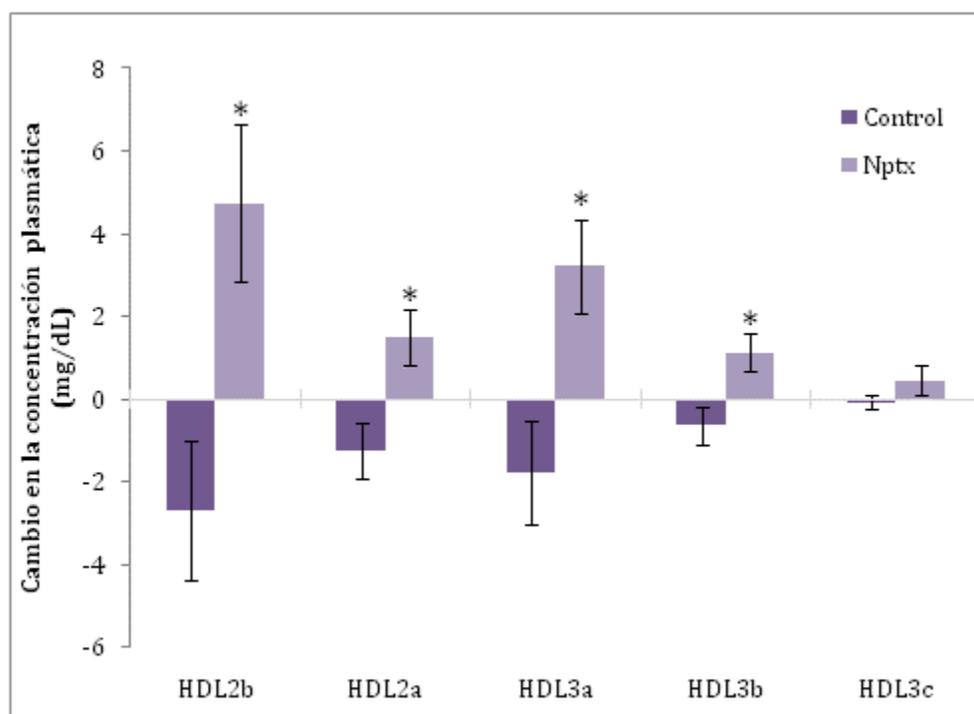


Figura 4. Cambio en la concentración plasmática de colesterol total asociado a las subclases de HDL. Determinado por método enzimático en la superficie del gel de poliacrilamida. Los resultados mostrados se expresan como promedio \pm EE. * $p < 0.05$

Existe un claro aumento del colesterol asociado a la mayoría de las subclases de HDL en el grupo parcialmente nefrectomizado, mientras que en el grupo control las variaciones son inespecíficas y no representan un cambio estadísticamente significativo. El aumento asociado a la nefrectomía representa prácticamente la mitad para las HDL de mayor tamaño, 2b y 2a (44% y 51%), mientras que alcanza hasta un 74% y 79% en las HDL 3a y 3b.

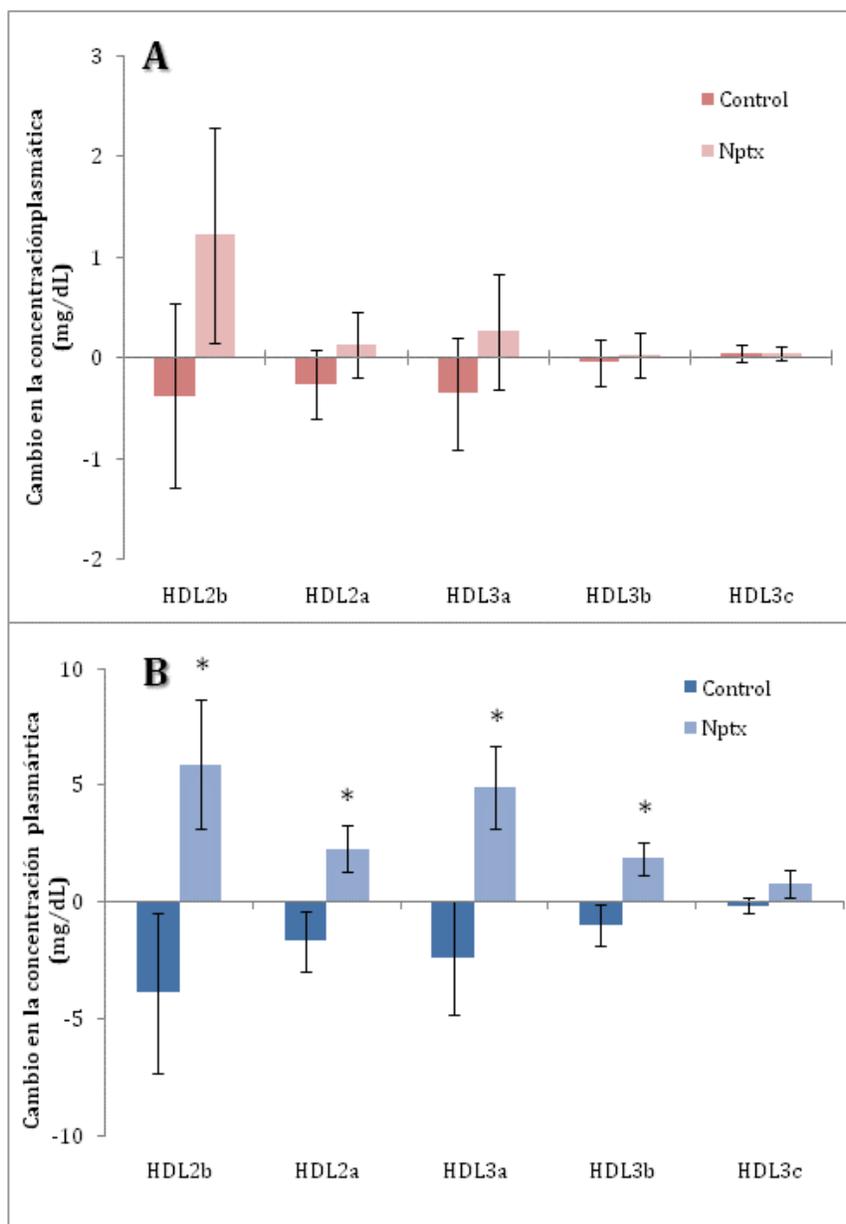


Figura 5. Cambio en la concentración plasmática de las especies de colesterol asociadas a cada subclase de HDL. A) Colesterol libre determinado enzimáticamente B) Colesterol esterificado calculado a partir del colesterol total y libre. Los resultados mostrados se expresan como promedio±EE. *p<0.05

Mientras el colesterol libre presenta fluctuaciones mínimas de concentración (<1 mg/dL) el cambio del colesterol esterificado en las HDL2 representa un 18 y 24%, y en las HDL3 el aumento es de casi la mitad del valor inicial (42% y 57%).

Tabla 3. Concentración de las diferentes especies de colesterol asociadas a las subclases de HDL antes de la intervención quirúrgica y después de 5 semanas de la segunda cirugía para los conejos nefrectomizados (Nptx) y control.

Lípido	Grupo	Tiempo	HDL2b	HDL2a	HDL3a	HDL3b	HDL3c
Colesterol total (mg/dL)	Nptx	Antes	10.7 ± 2.0	2.9 ± 0.3	4.3 ± 0.5	1.4 ± 0.3	0.4 ± 0.1
		Después	15.4 ± 1.9*	4.4 ± 1.5*	7.6 ± 0.8*	2.6 ± 0.4*	0.8 ± 0.3
	Control	Antes	13.4 ± 1.8	4.9 ± 0.7	7.7 ± 1.0	2.8 ± 0.3	0.7 ± 0.1
		Después	10.7 ± 2.2	3.6 ± 0.8	5.9 ± 1.2	2.1 ± 0.4	0.6 ± 0.1
Colesterol libre (mg/dL)	Nptx	Antes	4.2 ± 0.7	1.4 ± 0.3	2.3 ± 0.4	0.8 ± 0.1	0.2 ± 0.1
		Después	5.4 ± 0.6	1.5 ± 0.2	2.6 ± 0.4	0.8 ± 0.2	0.2 ± 0.1
	Control	Antes	4.1 ± 1.0	1.5 ± 0.4	2.3 ± 0.6	0.8 ± 0.2	0.2 ± 0.1
		Después	3.7 ± 0.7	1.2 ± 0.2	2.0 ± 0.3	0.8 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Colesterol esterificado (mg/dL)	Nptx	Antes	10.9 ± 3.0	2.5 ± 0.5	3.5 ± 0.9	1.3 ± 0.4	0.4 ± 0.2
		Después	16.8 ± 2.6*	4.8 ± 0.6*	8.4 ± 1.5*	3.1 ± 0.7*	1.2 ± 0.5
	Control	Antes	15.6 ± 2.5	5.7 ± 0.8	9.1 ± 1.2	3.3 ± 0.3	0.8 ± 0.1
		Después	11.8 ± 3.1	4.0 ± 1.2	6.7 ± 1.9	2.3 ± 0.7	0.8 ± 0.3

Los resultados mostrados se expresan como promedio ± EE. *p < 0.05 vs antes de la cirugía.

Antes de la cirugía el colesterol esterificado comprende 55 % del colesterol total presente en las HDL2 y 50% de las HDL3, mientras en la evaluación final representa entre 65 y 70 % del colesterol de cada subpoblación. Esto es indicativo de un cambio en la composición de las lipoproteínas, que tienden a enriquecerse de colesterol esterificado. La subclase de menor tamaño, HDL3c, corresponde a cerca de 2% del colesterol asociado a las HDL, y no se observa ninguna modificación significativa en su concentración.

A continuación determinamos los triglicéridos y la fosfatidilcolina de cada una de las subclases de HDL; los resultados se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Concentraciones de los lípidos asociados a las HDL antes y después de las cirugías en ambos grupos. Cociente de componentes lipídicos superficiales (colesterol libre/fosfatidilcolina) y de núcleo (colesterol esterificado/ triglicéridos).

Lípido	Grupo	Tiempo	HDL2b	HDL2a	HDL3a	HDL3b	HDL3c
Triglicéridos (mg/dL)	Nptx	Antes	10.4 ± 1.8	3.4 ± 0.8	5.7 ± 1.5	1.8 ± 0.7	0.4 ± 0.3
		Después	9.9 ± 1.2	2.8 ± 0.5	4.5 ± 0.9	1.4 ± 0.4	0.3 ± 0.2
	Control	Antes	9.4 ± 1.1	3.8 ± 0.5	6.6 ± 0.8	2.4 ± 0.4	0.6 ± 0.2
		Después	12.7 ± 3.4	4.5 ± 1.2	6.8 ± 1.6	2.3 ± 0.4	0.6 ± 0.1
Fosfatidil- colina (mg/dL)	Nptx	Antes	33.1 ± 1.4	9.4 ± 0.6	14.8 ± 0.7	4.5 ± 0.5	0.9 ± 0.2
		Después	29.1 ± 4.1	9.0 ± 1.8	14.2 ± 2.8	4.7 ± 1.0	1.1 ± 0.3
	Control	Antes	36.5 ± 4.4	11.6 ± 1.4	18.0 ± 1.9	6.5 ± 0.9	2.1 ± 0.5
		Después	31.1 ± 6.5	11.3 ± 2.3	17.8 ± 3.3	6.3 ± 1.0	2.2 ± 0.7
CE/Tg	Nptx	Antes	1.1 ± 0.3	0.8 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.8 ± 0.2	1.6 ± 0.6
		Después	2.0 ± 0.5*	2.2 ± 0.5†	2.4 ± 0.6†	3.2 ± 0.8†	9.7 ± 4.3†
	Control	Antes	1.6 ± 0.2	1.6 ± 0.3	1.5 ± 0.2	1.7 ± 0.3	5.2 ± 2.3
		Después	1.4 ± 0.3	1.4 ± 0.4	1.5 ± 0.5	1.7 ± 0.7	3.9 ± 3.0
CL/Ph	Nptx	Antes	0.13±0.02	0.15±0.03	0.16±0.04	0.24±0.09	0.27±0.10
		Después	0.23±0.05	0.27±0.09	0.33±0.12	0.48±0.24	0.47±0.19
	Control	Antes	0.11±0.02	0.12±0.03	0.12±0.03	0.13±0.03	0.13±0.04
		Después	0.15±0.03	0.13±0.03	0.14±0.04	0.18±0.07	0.95±0.77

Colesterol esterificado/triglicéridos (CE/Tg), Colesterol libre/fosfatidilcolina (CL/Ph). Todos los resultados se presentan como promedio±EE. *p<0.05 y †p<0.01 vs antes de la cirugía.

No existen cambios en las concentraciones de otros lípidos asociados a las HDL; sin embargo, la composición de las mismas se encuentra alterada en la evaluación final de los conejos nefrectomizados. Estas lipoproteínas contienen el doble de la proporción inicial de colesterol esterificado respecto a los triglicéridos.

Adicionalmente, podemos estimar la composición de las lipoproteínas por la relación de otros componentes, como el colesterol total y la fosfatidilcolina (Ct/Ph), así como triglicéridos y fosfatidilcolina (Tg/Ph). Estos cocientes pueden aportar información sobre la estructura y composición de las HDL, así como del metabolismo asociado a ellas y se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Cocientes de colesterol total por fosfolípidos y triglicéridos por fosfolípidos.

Cociente	Grupo	Tiempo	HDL2b	HDL2a	HDL3a	HDL3b	HDL3c
Ct/Ph	Nptx	Antes	0.32±0.06	0.31 ± 0.04	0.29 ± 0.03	0.32 ± 0.04	0.47 ± 0.10
		Después	0.68±0.18	0.81±0.28	1.00±0.38	1.63±0.84	1.75±0.80
	Control	Antes	0.38±0.04	0.42±0.03	0.43±0.02	0.45±0.03	0.55±0.14
		Después	0.41±0.08	0.39±0.08	0.40±0.08	0.44±0.10	1.19±0.54
Tg/Ph	Nptx	Antes	0.31±0.05	0.35±0.06	0.37±0.08	0.37±0.10	0.36±0.17
		Después	0.36±0.04	0.36±0.06	0.41±0.10	0.48±0.17	0.33±0.11
	Control	Antes	0.28±0.04	0.35±0.05	0.38±0.06	0.38±0.07	0.30±0.09
		Después	0.33±0.04	0.43±0.08	0.42±0.08	0.45±0.12	0.75±0.37

Los resultados mostrados se expresan como promedio±EE. *p<0.05 vs antes de la cirugía.

En este caso no observamos diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones entre grupos ni con la evaluación previa a la cirugía. Esto sugiere que las HDL mantienen proporciones de sus componentes, a pesar del drástico aumento del colesterol.

Las subpoblaciones de HDL pueden presentar diferentes proporciones dentro de dos muestras independientes, la medida semicuantitativa de la contribución de cada subclase se reporta como la distribución relativa y se determina en función del contenido de proteína de las HDL. En la tabla 6 presentamos esta distribución para ambos grupos, en evaluaciones previas a la cirugía y con 5 semanas después.

Tabla 6. Distribución relativa determinada por la fracción proteica de las HDL. estos datos son una estimación semicuatitativa de esta población.

		Tiempo	HDL2b	HDL2a	HDL3a	HDL3b	HDL3c
Distribución relativa de proteínas de HDL (%)	Nptx	Antes	27.1 ± 2.0	17.3 ± 0.5	35.8 ± 1.4	15.4 ± 0.9	4.4 ± 1.0
		Después	31.0 ± 1.9*	17.0 ± 0.5	33.9 ± 1.3*	14.4 ± 1.0	3.6 ± 0.6
	Control	Antes	25.2 ± 2.9	16.7 ± 0.6	35.4 ± 1.5	16.9 ± 1.3	5.9 ± 0.8
		Después	26.5 ± 2.6	16.1 ± 0.3	34.1 ± 1.4	16.9 ± 1.1	6.4 ± 0.8

Los resultados mostrados se expresan como promedio±EE. *p<0.05 vs antes de la cirugía.

Existe una mayor proporción de lipoproteínas de tamaño grande (HDL2b) a cambio de una modesta disminución en la proporción de la población intermedia (HDL3a) después de la evolución de 4 semanas en el grupo con nefrectomía parcial. Para los conejos con cirugía simulada la distribución de HDL es estable en el período de evaluación.

Actividad LCAT

La caracterización de los lípidos de las subclases de HDL demostró que existen cambios importantes en la cantidad de colesterol total asociado a las HDL, y únicamente la cantidad de colesterol esterificado está relacionada con este aumento. Debido a que la LCAT participa en la formación de ésteres de colesterol a partir de colesterol libre, determinamos la actividad de esta enzima en plasma obtenido antes y 4 semanas después de las cirugías de los conejos nefrectomizados. Nuestros resultados demostraron que el porcentaje de esterificación del sustrato antes de las cirugías fue de 0.94 ± 0.14 , nmol/mL/h y después de 4 semanas de la segunda cirugía de 0.84 ± 0.08 nmol/mL/h (n=10) sin diferencias significativas entre ambos valores.

Catabolismo de HDL.

A continuación determinamos la tasa de catabolismo y síntesis de apo AI-¹²⁵I asociada a HDL. La figura 5 representa la curva promedio de decaimiento radiactivo en plasma de los grupos de conejos nefrectomizados y control.

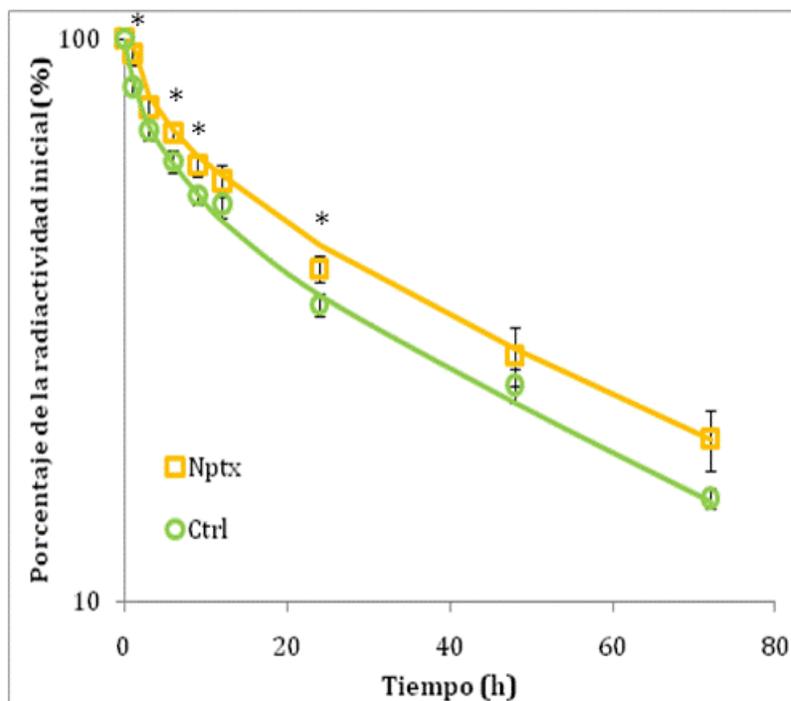


Figura 6. Radiactividad residual correspondiente a las HDL-¹²⁵I en torrente sanguíneo. Los datos de la curva representan el promedio \pm EE. * $p < 0.05$ vs grupo control.

La comparación de los grupos con la prueba t de student entre los valores de cada tiempo es un indicador del catabolismo, en este caso observamos diferencias significativas a 1, 6, 9 y 24 horas de la administración de ¹²⁵I-apo AI-HDL. El grupo de conejos nefrectomizados presenta una mayor radiactividad residual en el plasma durante estos tiempos, sugiriendo que existe un menor catabolismo debido a la disminución de masa renal.

Considerando que la concentración de apo AI se mantuvo constante a lo largo del estudio, calculamos los parámetros cinéticos como se describe en la sección de materiales y métodos;

en la Tabla 7 se presentan los datos de las tasas fraccional de catabolismo (FCR), y de síntesis (PR), así como la concentración de apo A-I plasmática. Sorprendentemente el valor calculado de la tasa de catabolismo fraccional de los conejos nefrectomizados no presenta diferencias con respecto al grupo control. Del mismo modo, debido a que la concentración de apo A-I fue similar entre los grupos, no hubo diferencia significativa en la tasa de producción absoluta.

Tabla 7. Tasas de catabolismo, síntesis y concentración plasmática de apo A-I.

Grupo	FCR (pool/h)	PR (mg/ kg . h)	Apo A-I (mg/dL)
Conejos parcialmente nefrectomizados (n=11)	0.027 ± 0.009	0.767 ± 0.113	78.4 ± 10.9
Conejos con cirugía simulada (n= 10)	0.026 ± 0.007	0.733 ± 0.270	76.9 ± 25.3

Para evaluar la posibilidad de que el riñón tenga una mayor participación en la eliminación temprana (<12h) o tardía (>12h) de la apo A-I, analizamos ambas componentes de la curva descrita. El programa de análisis genera una ecuación que describe el comportamiento de la eliminación de apo A-I, la cual puede expresarse como:

$$\text{Porcentaje de radiactividad inicial} = A1^{-a1*t} + A2^{-a2*t}$$

Los cocientes de las literales A1/a1 y A2/a2 son representativos de las componentes temprana y tardía respectivamente. Los valores de A1/a1 fueron de 208±35 para los conejos nefrectomizados y 261±52 en los controles, sin diferencia significativa; asimismo, el cociente A2/a2 de los conejos nefrectomizados fue de 4172±587 y de los conejos controles 3252±259, sin diferencias significativas entre ambos grupos.

Con base en nuestra hipótesis, el tamaño de las lipoproteínas puede ser un factor determinante en la interacción de las mismas con el riñón. Para evaluar la posible relación del tamaño en la eliminación de las HDL por vía renal evaluamos la cinética catabólica de cada subpoblación de las HDL marcadas con ^{125}I según se describe en la sección de Materiales y Métodos. Consideramos como el 100% de la marca radiactiva la cantidad de cpm registradas en la muestra de plasma tomada a los 5 minutos después de la administración. En las figuras 7 y 8 se presentan las curvas de decaimiento radiactivo para cada subclase de HDL. Debido a que las diferentes subclases de lipoproteínas son el resultado de la conversión dinámica entre ellas, su metabolismo tiene más componentes que cuando se analizan en conjunto, lo cual impide realizar un análisis cuantitativo de su catabolismo. Asimismo, las gráficas no muestran componentes definidas por lo que los resultados se presentan como el promedio obtenido en cada tiempo para los dos grupos de estudio.

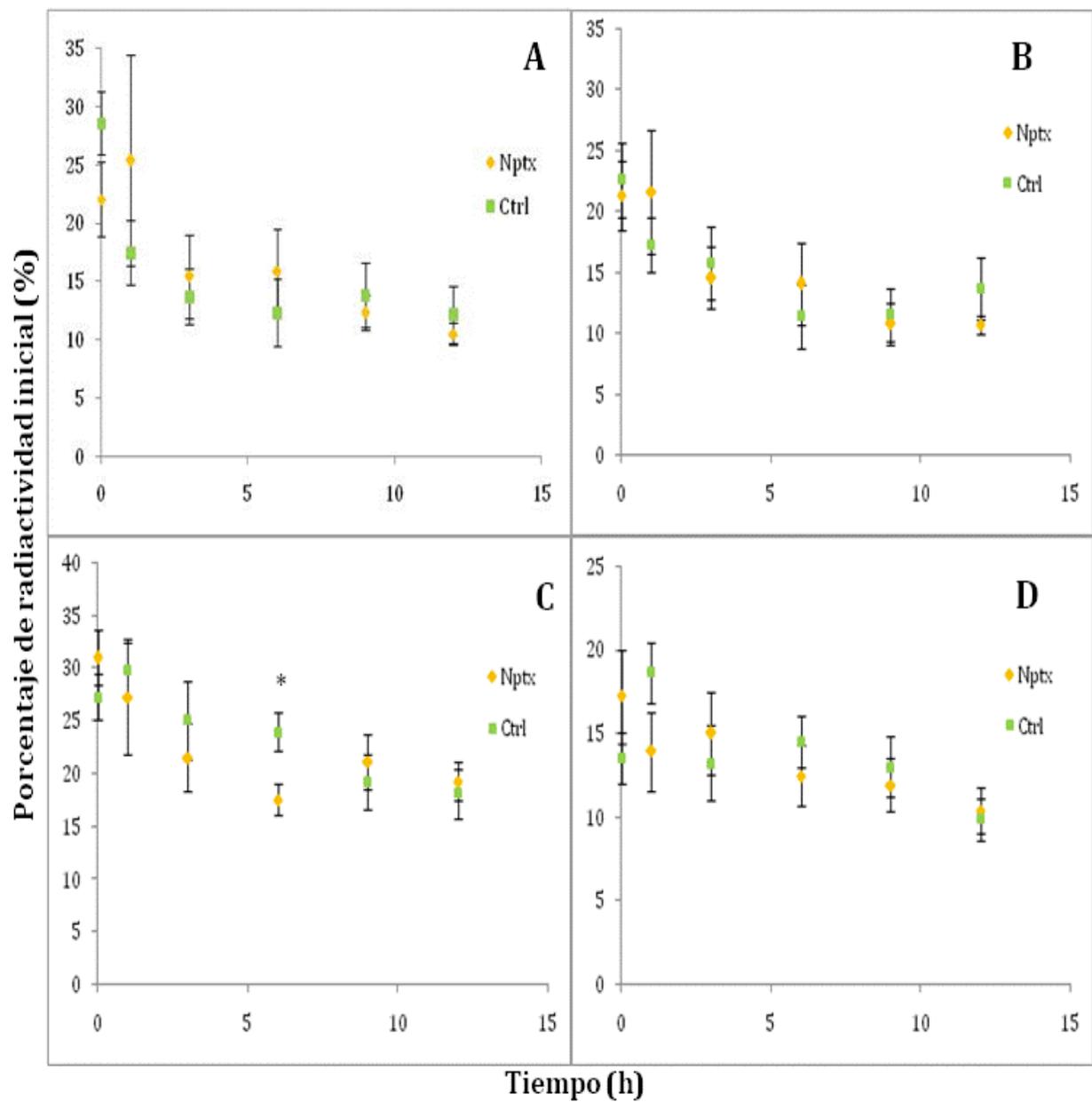


Figura 7. Curvas de decaimiento de la radiactividad asociada a las subpoblaciones A) HDL2b, B) HDL2a, C) HDL3a, y D) HDL3b. Los datos se presentan como promedio \pm EE. * $p < 0.05$ Nptx vs control.

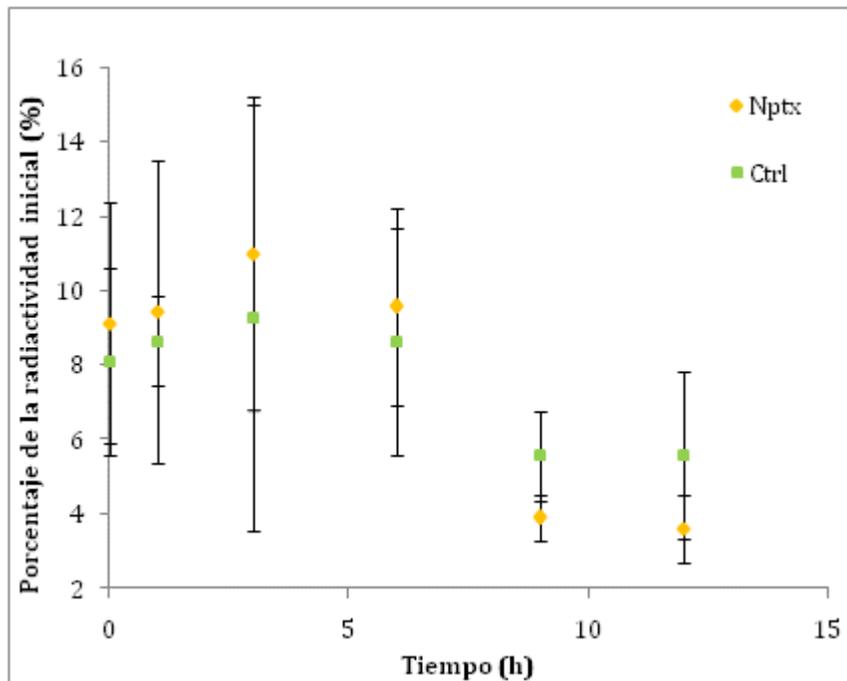


Figura 8. Curva de decaimiento de radiactividad de las HDL3c. Los datos se presentan como promedio \pm EE. * $p < 0.05$ Nptx vs control.

Se observa sólo una diferencia estadísticamente significativa al comparar el porcentaje de radiactividad perteneciente a cada subclase entre los grupos. Las gráficas muestran un comportamiento en el catabolismo muy similar entre el grupo nefrectomizado y el grupo control, sugiriendo que este proceso es independiente de la función renal y no afecta a ninguna subclase en particular.

Carga de superficie

La carga de superficie de las HDL es considerada una de las variables que pueden limitar la eliminación renal de estas lipoproteínas. Como se describe con detalle en la sección de Material y métodos, el cálculo de la carga de superficie incluye el diámetro de la partícula que se conceptualiza como una esfera. Debido a que las HDL se encuentran en un intervalo muy amplio de diámetros, se emplearon para el cálculo de la carga los diámetros mínimo, máximo y medio que corresponde al pico máximo de DO observados en la población de lipoproteínas. Los valores mínimos de carga superficial corresponden a las HDL con una mayor superficie o diámetro, los valores medios son de las HDL con mayor proporción en la muestra, y los máximos a las HDL con menor diámetro y por tanto, menor superficie. En la tabla 8 se presenta el resultado de esta evaluación.

Tabla 8. Cambio en la carga de superficie de las HDL.

Grupo	Tiempo	Valores de carga de superficie [(-) x10 ⁻⁶ (C/cm ²)]		
		mínimo	medio	máximo
Nefrectomizados	Antes	9.40 ± 1.16	13.40 ± 1.50	15.81 ± 1.63
	Después	9.14 ± 1.41	13.31 ± 1.83	15.60 ± 1.78
Controles	Antes	9.37 ± 1.07	13.32 ± 1.32	15.67 ± 1.35
	Después	9.23 ± 1.31	13.17 ± 1.61	15.77 ± 1.58

Los valores se presentan como promedio ± EE. Se realizó una prueba t de Student pareada y vs control.

Los valores de carga en ambos grupos presentan valores muy similares, sin cambios estadísticamente significativos. Estos resultados muestran que ambos grupos presentan un comportamiento igual, ya que tanto la magnitud de la carga es comparable en ambos grupos a los dos tiempos evaluados.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo caracterizamos las lipoproteínas de alta densidad en un modelo de reducción de masa renal. Una intervención similar se había descrito en un estudio previo como modelo de hipercalcemia crónica y nefrolitiasis.⁴⁶ La nefrectomía parcial que llevamos a cabo en el presente estudio resulta en una disminución de la función renal evaluada por la depuración de creatinina, la cual equivalente a sólo el 36% aproximadamente de la observada en conejos control. Como consecuencia, de la disfunción renal, la concentración en sangre de urea y creatinina de los conejos nefrectomizados fue significativamente mayor en comparación con el grupo control.

En relación a la permeabilidad renal, determinamos los niveles de proteinuria, donde encontramos que en conejos no existen diferencias entre ambos grupos. Además, debido a que el riñón es un órgano relacionado con la eritropoyesis y la síntesis de renina, evaluamos el hematocrito y la presión arterial de los conejos. No hubo diferencias significativas entre los conejos nefrectomizados y el grupo control, de modo semejante a observaciones previas realizadas por otros grupos de investigación.^{46,55} Con base en todo lo anterior, concluimos que la nefrectomía 3/4 que realizamos, es un modelo de reducción de la masa renal funcional que no afecta la permeabilidad glomerular, ni la producción de eritrocitos, ni la presión arterial a las 4 semanas de evolución.

A partir de este modelo experimental, evaluamos el impacto de la disminución de la masa renal funcional sobre el metabolismo y estructura de las HDL. Estructuralmente, las HDL de los conejos nefrectomizados presentaron una mayor cantidad de colesterol, específicamente esterificado, como lo demuestra la cuantificación de las subclases por este lípido. Además, 4 semanas después de las cirugías, los conejos con nefrectomía parcial presentaron una mayor proporción de HDL2b y menor de 3a al evaluar por su contenido de proteína, lo que

representa un equilibrio ligeramente diferente a su distribución inicial. Para establecer si los discretos cambios estructurales en las HDL de los conejos nefrectomizados se asocian con cambios en el metabolismo intravascular de estas lipoproteínas, realizamos los estudios cinético-metabólicos por medio de marcado exógeno de la apo A-I con isótopos radiactivos. Como se especificó en la sección metodológica, el ^{125}I se incorpora en los residuos de tirosina sin afectar las características de las HDL.⁵⁶ Esta marca radiactiva es estable y no altera el comportamiento de las lipoproteínas, además se emplea comúnmente en el desarrollo de estudios metabólicos. De acuerdo con reportes previos, los conejos presentan un metabolismo de apo A-I muy similar al de los humanos, donde el catabolismo de la apolipoproteína se ajusta a un modelo bicompartimental.^{18,30,52,57.}

Observamos algunas diferencias significativas en los porcentajes de radiactividad residual de algunos de los tiempos analizados de los conejos nefrectomizados con respecto a los controles. Esta comparación presentó algunas diferencias hacia las primeras 24 horas del estudio, donde los conejos nefrectomizados presentaron un mayor porcentaje de la radiactividad residual en comparación con los controles, sugiriendo un catabolismo lento de la apo AI de las HDL. Sin embargo, cuando calculamos el valor del FCR ajustando los valores a un modelo bicompartimental, no encontramos diferencia entre los grupos. Además, realizamos la comparación de las dos diferentes componentes asociadas al catabolismo de apo A-I, las cuales no muestran diferencias significativas, por tanto comprobamos que no existe una alteración en el catabolismo de la apolipoproteína A-I en nuestro modelo experimental. Estos resultados nos permiten concluir que la disminución de la masa renal funcional no afecta la depuración de apo A-I de las HDL. De modo similar, Sparks y colaboradores han reportado que conejos con una nefrectomía unilateral presentan una disminución mínima en el catabolismo de la apo A-I, sin reportes ulteriores sobre la composición de las subclases de HDL en ese modelo experimental.⁵⁸ En su conjunto, estas observaciones sugieren fuertemente

que la contribución del riñón a la depuración de las HDL plasmáticas, si es que existe alguna, es muy limitada. Nuestros resultados contrastan con observaciones previas de otros grupos de estudio^{25,26} que postulan al riñón como el principal sitio catabólico de la apo A-I. Como se mencionó previamente, se emplearon HDL reconstituidas con apo A-I, marcada con ¹²⁵I-tiramincelobiosa, para rastrear la presencia de las lipoproteínas en un modelo animal *in vivo*. Esta marca radiactiva, unida covalentemente a la apolipoproteína, persiste en el interior celular toda vez que haya sido internalizada indicando una función metabólica por parte del órgano involucrado. Los resultados mostraron que la mayor cantidad de la apo A-I se localizó preferentemente en el riñón; lo que constituye el apoyo fundamental de la hipótesis sobre la actividad catabólica del riñón ante la apo A-I. Una posible explicación a esta controversia radica en la sobreestimación de los estudios previos sobre la importancia del riñón en el catabolismo de la apo A-I;^{25,26} el riñón es un órgano fuertemente irrigado y en las determinaciones de radiactividad asociada a diferentes regiones realizadas en estos estudios no se retiró la sangre asociada al mismo. De esta manera, es posible que la radiactividad determinada en el riñón en esos estudios no estuviera asociada al túbulo renal, sino que se encontrara en la sangre acumulada en los capilares glomerulares.

Por otra parte, este trabajo presenta también una nueva metodología para detectar el catabolismo de la apo A-I asociada a cada una de las subclases de HDL por medio del aislamiento y separación de las lipoproteínas marcadas. En estudios previos enfocados a la determinación de las diferentes apolipoproteínas marcadas con ¹²⁵I, se ha observado que aún las HDL reaisladas y separadas por electroforesis permiten una detección confiable de las proteínas embebidas en el gel de poliacrilamida.⁴⁴ Como se discutió previamente, no existen cambios significativos en el catabolismo de la apo A-I entre conejos nefrectomizados y controles. Sin embargo, existen algunas diferencias, pequeñas pero significativas, en la cantidad de radiactividad remanente en algunos puntos de la cinética, particularmente a 1, 6,

9 y 12 horas tras la administración de las HDL marcadas. No podemos descartar que estas diferencias estén relacionadas con los cambios discretos en la distribución de tamaños de las HDL.⁵⁹ los cuales corresponden al aumento en la proporción de las HDL2b en la población total, y la disminución de las HDL3a al analizarlas por su contenido de proteína. Debido a que los cambios en la proporción relativa no afectan el diámetro promedio de las HDL, y que no existe una modificación significativa en su apolipoproteína más abundante, es normal que la evaluación de la carga de superficie no muestre cambios. Bajo las condiciones del presente trabajo, no es posible abundar sobre la posible relación que sostiene la carga de superficie con el catabolismo de la apo AI; están garantizados estudios futuros para establecer esta posible relación.

Sorprendentemente, aunque no existe una modificación notable en los niveles de la apo A-I o su catabolismo, las HDL cambian de composición enriqueciéndose en colesterol. Los conejos nefrectomizados aumentaron casi 50% la concentración inicial de colesterol asociado a las HDL; considerando que estas lipoproteínas contribuyen con aproximadamente 40% del colesterol total en plasma de los conejos se esperaba obtener un aumento de éste en aproximadamente un 20%.⁶⁰ Sin embargo no existe un cambio significativo del colesterol total, lo cual puede deberse a que, en compensación, el colesterol asociado a las demás lipoproteínas exhibe una tendencia moderada a disminuir. El colesterol de las HDL cambia en proporción similar en el libre y esterificado, aunque no alcanza significado estadístico para el colesterol libre debido a que representa una cantidad muy pequeña en las HDL. A causa de la hidrofobicidad del colesterol esterificado, éste se encuentra en el interior de las lipoproteínas; en consecuencia, las HDL con mayores diámetros son las partículas con mayor contenido de ésteres de colesterol.^{11,61} La cuantificación de cada una de las subclases de HDL demuestra que aproximadamente el 50% del colesterol esterificado se encuentra en las HDL2b mientras que el resto se divide en pequeñas proporciones en las otras subclases. Aún así, la elevación en la

concentración de este compuesto es significativa para todas las subclases. Esto indica que la disminución en la función renal aumenta la cantidad de colesterol transportado por las HDL de modo independiente al tamaño de las lipoproteínas. Aunque existen reportes sobre el aumento en la expresión de ABCA1 en tejido renal sano, después de una nefrectomía 5/6 en ratas⁶², es muy poco probable que sea este mecanismo el que modifique los valores de C-HDL en los conejos. Además, a nuestro conocimiento no existen reportes que indiquen que el riñón sea un sitio importante para la captación de lípidos por parte de las HDL. En todo caso, sería necesario que la expresión de ABCA1 aumentase más de 3 veces para sobrepasar a la masa renal presente antes de la cirugía.

Debido a la posibilidad de que el aumento en colesterol esterificado proviniese de una mayor generación del mismo, determinamos la actividad de la LCAT, enzima responsable de la esterificación del colesterol en plasma. Además, reportes previos indican que los niveles de la enzima se encuentran alterados en pacientes con enfermedad renal avanzada y en etapa terminal, así como en modelos animales de nefropatía.^{39,62-67} Sin embargo, nuestros resultados demuestran que la nefrectomía no afectó los niveles plasmáticos de actividad LCAT, por lo que el aumento en la cantidad de colesterol esterificado no puede deberse a una mayor tasa de esterificación del colesterol libre en plasma. No se descarta la posibilidad de que el C-HDL se vea modificado debido al establecimiento de un equilibrio diferente en la eliminación hepática de las HDL, en compensación de la alteración renal, lo cual debe ser analizado específicamente en estudios posteriores.

En cuanto a la composición de las HDL encontramos que no hay cambios en el cociente de colesterol libre y fosfatidilcolina de las subpoblaciones, así la superficie de las HDL de los conejos nefrectomizados es igual antes de la intervención quirúrgica. Además observamos que inicialmente existe un balance por partes iguales del colesterol esterificado y los

triglicéridos, salvo para las HDL3b donde el colesterol esterificado corresponde a sólo 60% de la masa de triglicéridos. Después de 5 semanas de la cirugía, la cantidad de colesterol esterificado aumenta, con respecto a los triglicéridos, al doble en las lipoproteínas de mayor tamaño (HDL2b y HDL2a) y al triple en las HDL3a y HDL3b. Además, los cocientes de colesterol total asociado a las HDL por fosfatidilcolina, y triglicéridos por fosfatidilcolina no indican algún cambio evidente en las lipoproteínas. Esta composición es relativamente constante para todas las subclases de HDL en ambos grupos y no presentan diferencias con la evaluación previa a la cirugía o con el grupo control. Esta información conjunta indica la reducción de masa renal efectiva genera un cambio en la composición nuclear de la familia de lipoproteínas de alta densidad aún en ausencia de modificaciones en la cantidad de apo A-I. A efecto de comparación podemos mencionar que las lipoproteínas generadas por la disminución de masa renal contienen una mayor proporción de la subclase más grande (HDL2b) y con un núcleo notablemente enriquecido en colesterol esterificado. A pesar de que en estudios previos se ha sugerido que el riñón es un sitio catabólico importante para la apo A-I y poco relevante para los ésteres de colesterol, este componente lipídico es el que muestra las modificaciones más importantes ante la reducción de masa renal.²⁶ Estos datos podrían indicar que el fuerte impacto observado en el colesterol asociado a las HDL no es resultado directo de la reducción de masa renal, o bien que el riñón interactúa más de lo que se ha postulado sobre el metabolismo de colesterol, en contraparte de su bajo impacto en el catabolismo de apo A-I.

A pesar de que altas concentraciones de C-HDL en plasma se asocian con un menor riesgo cardiovascular, es poco probable que el enriquecimiento de las HDL generado en nuestro modelo represente una ventaja ante la aterosclerosis. Considerando que el C-HDL ha sido uno de los principales indicadores clínicos sobre el riesgo cardiovascular es necesario plantear que existen situaciones metabólicas en las que poblaciones con valores elevados de C-HDL

presentaron un aumento en eventos cardiovasculares.⁶⁸ Además, existen sujetos con hipoalfalipoproteinemia profunda (C-HDL<15 mg/dL) que no presentan historial clínico o antecedentes familiares de EAC⁶⁹⁻⁷¹ Por tanto, es necesario evaluar en futuros estudios la capacidad antiaterogénica de estas lipoproteínas.

Aún no está claro el mecanismo molecular por el cual los conejos con una nefrectomía parcial aumentaron sus niveles de colesterol en una proporción tan importante. Existe la posibilidad de que la extracción del riñón y la presencia de tejido necrótico en los conejos genere un estímulo crónico pro-inflamatorio y sea éste el responsable de los cambios en C-HDL. En efecto, la inflamación es una respuesta fisiológica altamente relacionada con modificaciones en los valores de lípidos asociados a las lipoproteínas, aunque el efecto de la misma puede variar en cada especie.^{40,72} En conejos, la inflamación aguda ocasionada por la inyección de aceite mineral intramuscular ocasiona un enriquecimiento en triglicéridos de las HDL de alrededor de 60%, a diferencia de los ratones donde únicamente disminuye la cantidad de apo A-I en la misma proporción.⁴⁰ Reportes previos realizados por Bang y colaboradores, muestran que la uremia y una dieta enriquecida en colesterol generan HDL con un alto contenido de triglicéridos, sin alteraciones en los niveles de colesterol ni apo A-I. Estos datos sugieren que la posible inflamación crónica en conjunto con la hiperuremia inducida por la disminución de masa renal efectiva podrían ser la causa de la alteración en la composición de lípidos de HDL, lo cual se abordará en estudios posteriores.⁷³ En nuestro grupo de conejos nefrectomizados los cambios en los lípidos asociados a las HDL son diferentes al perfil generado por la inflamación, lo cual sugiere que la afección renal tiende a modificar a las lipoproteínas más por el efecto inflamatorio en conjunto con la uremia, que por una relación catabólica con la apo A-I. Los estudios de la cinética metabólica del colesterol contenido en las HDL permitirán avanzar en el conocimiento del efecto de la disminución de la masa renal funcional sobre los ésteres de colesterol.

CONCLUSIONES

En este trabajo sugerimos que aún cuando existen reportes que indican que el riñón representa un sitio de catabolismo importante para la apo A-I, la tasa catabólica de las HDL no se modifica con una disminución drástica de la función renal. Diversos trabajos sugieren que el riñón no tiene un impacto significativo en el metabolismo del colesterol; sin embargo, la nefrectomía parcial que realizamos generó un incremento importante en la cantidad de colesterol asociado a las HDL. Estas lipoproteínas muestran una composición prácticamente normal, a pesar de tener un núcleo altamente enriquecido en ésteres de colesterol.

El mecanismo de esta alteración no ha sido completamente dilucidado, por lo que es necesario considerar que algún factor de remodelación intravascular se encuentre alterado. Una de las posibles explicaciones puede ser que la inflamación crónica que posiblemente exista en los conejos nefrectomizados afecte a las lipoproteínas. Es necesario conducir otros estudios para encontrar la causa de este notable enriquecimiento de colesterol por parte de las HDL.

PERSPECTIVAS

Es necesario establecer el mecanismo de enriquecimiento en colesterol de las HDL, por medio de la evaluación de otros factores plasmáticos de remodelación de las lipoproteínas, como lo son la CETP, PLTP LPL, ya que se ha reportado que pacientes con disfunciones renales diversas presentan alteraciones en las mismas que podrían estar relacionadas con la pobre masa renal efectiva. La posible responsabilidad de la inflamación en la modificación de la composición de las HDL debe ser analizada por estudios posteriores.

Por otra parte, en este estudio demostramos que no existe una alteración en la carga de superficie de las HDL a raíz de la nefrectomía parcial; sugerimos evaluar específicamente la contribución de la carga eléctrica de superficie en la eliminación plasmática de las HDL en el modelo de menor masa renal funcional, utilizando partículas con carga modificada *in vitro*. Ambos parámetros podrían estar relacionados tal como se sugiere en la introducción del presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nelson DL, Cox MM. Principles of Biochemistry. 4a edición USA 2004. 820-827.
2. Voet D, Voet J. Biochemistry 2a. edición. USA 1995. 690-704
3. Aguilar-Salinas C, Gómez-Pérez F. Lipoproteínas y aterogénesis. 1. Metabolismo normal de las lipoproteínas. *Revist Invest Clin* 1989; 2: 22-28.
4. Pérez-Méndez O. Lipoproteínas de alta densidad (HDL). ¿Un objetivo terapéutico en la prevención de la aterosclerosis? *Arch Cardiol Mex* 2004; 74(1):53-67.
5. Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ. Res* 2005. 96:1221-1232.
6. Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high density lipoprotein. *Biochemistry* 1992, 31: 11112 - 11117.
7. Fielding CJ, Shore VG, Fielding PE. A protein co-factor of lecithin: cholesterol acyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* 1972, 46: 1493- 1498.
8. Von Eckardstein A, Huang Y, Assmann G. Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol* 1994; 5: 404-416.
9. Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Brouillette CG, Venkatachalapathi YV, Anantharamaiah GM. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J Lipid Res* 1992; 33: 141-166.
10. Pérez-Méndez O, Alvarez-Salcedo P, Carreón Torres E, Luc G, Arce Fonseca M, de la Peña A, Cruz Robles D, García JJ, Vargas-Alarcón G. Palmitic acid in HDL is associated to low apo A-I fractional catabolic rates in vivo. *Clin Chim Acta* 2007; 378: 53-58
11. Toledo-Ibelle P, García-Sánchez C, Ávila-Vazzini N, Carreón-Torres E, Posadas-Romero C, Vargas-Alarcón G, Pérez-Méndez O. Enzymatic assessment of cholesterol on

- electrophoresis gels for estimating HDL size distribution and plasma concentrations of HDL subclasses. *J Lipid Res* 2010; 51:1610-1617.
12. Carlo M. Barbagallo, Jianglin Fan, Patricia J. Blanche, Manfredi Rizzo, John M. Taylor and Ronald M. Krauss. Overexpression of Human Hepatic Lipase and ApoE in Transgenic Rabbits Attenuates Response to Dietary Cholesterol and Alters Lipoprotein Subclass Distributions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:625-632
 13. Secretaría de Salud. Sistema Nacional de Información en Salud. Estadísticas de mortalidad general. Información 2000-2008.
 14. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 223-261
 15. 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
 16. Barter PJ, Rye K. Molecular mechanism of reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol* 1996, 7: 82 -87.
 17. Sviridov D, Nestel P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2002; 161: 245-254.
 18. Brunham LR, Kruit JK, Igbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD, Coburn BA, Bissada N, Stael SB, Groen AK, Hussain MM, Parks JS, Kuipers F, Hayden MR. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest* 2006; 116:1052–1062.
 19. Knight BL. ATP-binding cassette transporter A1: regulation of cholesterol efflux. *Biochem Soc Trans.* 2004; 32: 124-127.

20. Neufeld EB, Remaley AT, Demosky SJ, Stonik JA, Cooney AM, Comly M, Dwyer NK, Zhang M, Blanchette-Mackie J, Santamarina-Fojo S, Brewer HB. Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter. *J Biol Chem* 2001; 276: 27584–27590.
21. Stangl H, Hyatt M, and Hobbs HH. Transport of Lipids from High and Low Density Lipoproteins via Scavenger Receptor-BI. *J Biol Chem*. 1999; 274: 32692-32698.
22. Silver DL, Wang N, Xiao X, Tall AR. High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion. *J Biol Chem* 2001; 276: 25287–25293.
23. Martinez LO, Jacquet S, Esteve JP, Rolland C, Cabezón E, Champagne E, Pineau T, Georgeaud V, Walker JE, Tercé F, Collet X, Perret B, Barbaras R. Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature*, 2003;421:75-79.
24. Howard AD, Verghese PB, Arrese EL, Soulages JL. The β -subunit of ATP synthase is involved in cellular uptake and resecretion of apo A-I but does not control apo A-I-induced lipid efflux in adipocytes. *Mol Cell Biochem*, 2011; 348: 155-164.
25. Glass CK, Pittman RC, Keller GA, Steinberg D. Tissue Sites of Degradation of Apoprotein A-I in the Rat *JBC* 1983; 258: 7161-7167.
26. Glass CK, Pittman RC, Civen M, Steinberg D. Uptake of High-density Lipoprotein-associated Apoprotein A-I and Cholesterol Esters by 16 Tissues of the Rat in Vivo and by Adrenal Cells and Hepatocytes in Vitro. *J Biol Chem* 1985; 260: 744-750
27. Hammad SM, Stefansson S, Twal WO, Drake CJ, Fleming P, Remaley A, Brewer HB Jr, Argraves WS. Cubilin, the endocytic receptor for intrinsic factor-vitamin B(12) complex, mediates high-density lipoprotein holoparticle endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96:10158-10163.

28. Amsellem S, Gburek J, Hamard G, Nielsen R, Willnow TE, Devuyst O, Nexo E, Verroust PJ, Christensen EI, Kozyraki R. Cubilin Is Essential for Albumin Reabsorption in the Renal Proximal Tubule. *J Am Soc Nephrol*. 2010; 21: 1859-1867
29. Moestrup SK, Verroust PJ. Megalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia. *Annu Rev Nutr* 2001; 21:407–428.
30. Carreón-Torres E, Juárez-Meavepeña M, Cardoso-Saldaña G, Gómez CH, Franco M, Fievet C, Luc G, Juárez-Oropeza MA, 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.
31. Turner RC, Millns H, Neil HA, et al. Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: UK Prospective Diabetes Study. *BMJ* 1998; 316: 823-828.
32. Zeeuw D, Remuzzi G, Parving HH, Keane WF, Zhang Z, Shahinfar S, Snapinn S, Copper ME, Mitch WE, Brenner BM. Albuminuria, a therapeutic target for cardiovascular protection in type 2 diabetic patients with nephropathy. *Circulation* 2004; 110: 921-927.
33. Wang Z, Hoy WE: Albuminuria and incident coronary heart disease in Australian Aboriginal people. *Kidney Int* 2005; 68: 1289-1293.
34. Yuyun MF, Khaw KT, Luben R, Welch A, Bingham S, Day NE, Wareham NJ. A prospective study of microalbuminuria and incident coronary heart disease and its prognostic significance in a British population: the EPIC-Norfolk study. *Am J Epidemiol* 2004; 159: 284-293.
35. Gerstein HC, Mann JF, Yi Q, Zinman B, Dinneen SF, Hoogwerf B, Hallé JP, Young J, Rashkow A, Joyce C, Nawaz S, Yusuf S, HOPE Study Investigators. Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA* 2001; 286: 421–426.

36. Krane V, Wanner C. Dyslipidaemia in chronic kidney disease. *Minerva Urol Nefrol* 2007; 59: 299-316.
37. Kaysen GA: Dyslipidemia in chronic kidney disease: Causes and consequences. *Kidney Int* 2006; 70: S55-S58.
38. Okubo K, Ikewaki K, Sakai S, Tada N, Kawaguchi Y, Mochizuki S Abnormal HDL apolipoprotein A-I and A-II kinetics in hemodialysis patients: a stable isotope study. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15:1008-1015.
39. Vaziri ND. Dyslipidemia of chronic renal failure: the nature, mechanisms, and potential consequences. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006; 290: F262–F272.
40. Cabana VG, Lukens JR, Rice KS, Hawkins TJ, Getz GS. HDL content and composition in acute phase response in three species: triglyceride enrichment of HDL a factor in its decrease. *J Lipid Res*. 1996; 37: 2662-2674.
41. Burgos Alves MI, Avilés Plaza F, Martínez-Tomás R, Sánchez-Campillo M, Larqué E, Pérez-Llamas F, Martínez Hernández P, Parra Pallarés S. Oxidized LDL and its correlation with lipid profile and oxidative stress biomarkers in young healthy Spanish subjects. *J Physiol Biochem*. 2010; 66: 221-227.
42. Espinola-Zavaleta N, Soto-López ME, Carreón-Torres E, Gamboa R, Mejía AM, Márquez-Velasco R, Bojalil R, Huesca-Gomez C, Reyes PA, Pérez-Méndez O. Altered flow-mediated vasodilatation, low paraoxonase-1 activity, and abnormal high-density lipoprotein subclass distribution in Takayasu's arteritis. *Circ J*. 2009; 73: 760-766.
43. Kaysen GA, Hoyer E, Jones H Jr. Apolipoprotein AI levels are increased in part as a consequence of reduced catabolism in nephrotic rats. *Am J Physiol*. 1995; 268: F532-540.
44. Sparks CE, Tennenberg SD, Marsh JB. Catabolism of the apolipoproteins of HDL in control and nephrotic rats. *Biochim Biophys Acta*. 1981; 665: 8-12.

45. Saku K, Mendoza SG, Laver M, Hynd BA, Gartside PS, Kashyap ML. High-density lipoprotein apolipoproteína AI and AII turnover in moderate and severe proteinuria. *Nephron* 1988; 50: 112-115.
46. Eddy AA, Falk RJ, Sibley RK, Hostetter TH. Subtotal nephrectomy in the rabbit: a model of chronic hypercalcemia, nephrolithiasis and obstructive nephropathy. *J Lab Clin Med* 1986; 107: 508-516.
47. Henry RJ, Sobel CH, Segalove M. Turbidimetric determination of proteins with sulfosalicylic and trichloroacetic acids. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956; 92: 748-751.
48. Huesca-Gómez C, Carreón-Torres E, Nepomuceno-Mejía T, Sánchez-Solorio M, Galicia-Hidalgo M, Mejía AM, Montaña LF, 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.
49. Lowry OH, Rosebrough HJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
50. Williams PT, Krauss RM, Nichols AV, Vranizan KM, Wood PD. Identifying the predominant peak diameter of high-density and low-density lipoproteins by electrophoresis. *J Lipid Res* 1990; 31: 1131-1139.
51. García-Sánchez C, Torres-Tamayo M, Juárez-Meavepeña M, López-Osorio C, Toledo-Ibelles P, Monter-Garrido M, Cruz-Robles D, Carreón-Torres E, Vargas-Alarcón G, Pérez-Méndez O. Lipid plasma concentrations of HDL subclasses determined by enzymatic staining on polyacrylamide electrophoresis gels in children with metabolic syndrome. *Clin Chim Acta*. 2011; 412: 292-298.
52. Carreón-Torres E, Rendón-Sauer K, Monter-Garrido M, Toledo-Ibelles P, Gamboa R, Menjivar M, López-Marure R, Luc G, Fievet C, Cruz D, Vargas-Alarcón G, Pérez-Méndez O.

- Rosiglitazone modifies HDL structure and increases HDL-apo AI synthesis and catabolic rates. *Clin Chim Acta* 2009; 401:37-41.
53. Bilheimer DW, Eisenberg D, Levy RI. The metabolism of very low density lipoproteins. Preliminary in vitro and in vivo observations. *Biochim Biophys Acta* 1972; 260: 212–221.
 54. Sparks DL, Phillips MC. Quantitative measurement of lipoprotein surface charge by agarose gel electrophoresis. *J Lipid Res.* 1992; 33: 123-130.
 55. Tvedegaard E. Arterial disease in chronic renal failure-an experimental study in the rabbit. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A.* 1987; 290: 1-28.
 56. Innerarity TL, Pitas RE, Mahley RW. Lipoprotein-receptor interactions. *Methods in enzymol* 1986; 129, 33: 542-565.
 57. Zech LA, Boston RC, Foster DM. The methodology of compartmental modeling as applied to the investigation of lipoprotein metabolism. *Methods in enzymol* 1986; 129, 22: 366-384.
 58. Braschi S, Neville TA, Maugeais C, Ramsamy TA, Seymour R, Sparks DL. Role of the kidney in regulating the metabolism of HDL in rabbits: evidence that iodination alters the catabolism of apolipoprotein A-I by the kidney. *Biochemistry.* 2000; 39: 5441-5449.
 59. Pérez-Méndez O, Carreón-Torres JE, Franco M, Juárez-Oropeza MA. HDL Physicochemical characteristics as determinants of their plasma concentrations: What we have learned from thiazolidinediones. Nova Science Publishers, Inc. 2009. ISBN 978-1-60741-767-5.
 60. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoprotein in human serum. *J Clin Invest.* 1955; 34:1345-1353.
 61. Gao X, Yuan S, Jayaraman S, Gursky O. Differential stability of high-density lipoprotein subclasses: effects of particle size and protein composition. *J Mol Biol.* 2009; 387:628-638.

62. Kim HJ, Moradi H, Yuan J, Norris K, Vaziri ND. Renal mass reduction results in accumulation of lipids and dysregulation of lipid regulatory proteins in the remnant kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009; 296:1297-1306.
63. Kaisen GA. Hyperlipidemia in chronic kidney disease. *Int J Artif Organs*. 2007; 30: 987-992
64. Joven J, Villabona C, Vilella E, Masana L, Albertí R, Vallés M. Abnormalities of lipoprotein metabolism in patients with the nephritic syndrome. *N Engl J Med* 1990; 323: 579–584
65. Moradi H, Yuan J, Ni Z, Norris K, Vaziri ND. Reverse Cholesterol Transport Pathway in Experimental Chronic Renal Failure. *Am J Nephrol*. 2009; 30: 147–154.
66. Pahl MV, Ni Z, Sepassi L, Moradi H, Vaziri ND Plasma phospholipid transfer protein, cholesteryl ester transfer protein and lecithin:cholesterol acyltransferase in end-stage renal disease (ESRD). *Nephrol Dial Transplant*. 2009; 24: 2541-2546.
67. Deighan CJ, Caslake MJ, McConnell M, Boulton-Jones JM, Packard CJ. The atherogenic lipoprotein phenotype: small dense LDL and lipoprotein remnants in nephrotic range proteinuria. *Atherosclerosis* 2001; 157: 211–220.
68. Barter P. Lessons learned from the Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events (ILLUMINATE) trial. *Am J Cardiol*. 2009; 104: 10E-15E.
69. Pérez-Méndez O, Bruckert E, Franceschini G, Duhal N, Lacroix B, Bonte JP, Sirtori C, Fruchart JC, Turpin G, Luc G. Metabolism of apolipoproteins AI and AII in subjects carrying similar apoAI mutations, apoAI Milano and apoAI Paris. *Atherosclerosis* 2000; 148: 317-325.
70. Elkhilil L, Majd Z, Bakir R, Perez-Mendez 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: 474-483.

71. 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 Neurol* 1995; Suppl 2: 72-77.
72. Kaysen GA. Biochemistry and biomarkers of inflamed patients: why look, what to asses. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009; Suppl 1: S56-63.
73. Bang CA, Bro S, Bartels ED, Pedersen TX, Nielsen LB. Effect of uremia on HDL composition, vascular inflammation, and atherosclerosis in wild-type mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 293: F1325-1331.

APÉNDICE 1

PROTEINURIA POR TURBIDIMETRÍA.

Soluciones.

- Solución de ácido tricloroacético 10%
- Solución NaCl 0.9%
- Solución patrón de albúmina de 1 mg/mL

	1	2	3	4	5	6
Concentración BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5

Las reacciones se incuban a temperatura ambiente por 15 minutos, después de agregar 500 μL de TCA.

Muestras

Determinación por duplicado

- A) Leer absorbancia de la muestra a 270 nm
- B) Centrifugar y leer el sobrenadante a 270 nm

APÉNDICE 2.

Determinación de proteínas por el método de Lowry.

Soluciones

- ◆ Solución de Na_2CO_3 al 20%
- ◆ Solución de tartrato de Na y K 1% con CuSO_4 0.5%
- ◆ Solución de NaOH 0.8 N
- ◆ 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

CURVA PATRÓN

	1	2	3	4	5	6	muestra
MUESTRA (μL)	0	0	0	0	0	0	10
ST (μL)	0	10	20	40	80	100	0
H_2O (μL)	100	90	80	60	20	0	90

Se agrega 1 mL de solución A y se mezclan las soluciones. Las soluciones de reacción se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos, al término de este tiempo se agregan 500 μL de reactivo de Folin previamente diluido en una proporción 1/6. Esta mezcla de reacción se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se analiza espectrofotométricamente a una longitud de onda de 750 nm.

APÉNDICE 3

Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas

Solución amortiguadora de muestra

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

A= Tris 0.09 M + ac. bórico 0.08M + EDTA 3mM pH 8.35

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

C= persulfato de amonio 10%

	3%	30%
Volumen total	5 mL	5 mL
Solución A	500 µL	500 µL
Solución B	300 µL	3 mL
H2O destilada	4.2 mL	750 µL
Glicerol	---	750 µL
Temed	4 µL	4 µL
Solución C	20 µL	20 µL

Las soluciones de acrilamida al 3% y 30% se mezclan generando un gradiente de concentración. Una vez polimerizado el gel, éste se precorre 15 min a 60 V para estabilizarlo. A continuación se cargan las muestras de la siguiente manera:

- 1) Depositar 25 µg de proteína HDL/ 4 µL de amortiguador de muestra en cada carril.
- 2) Depositar un marcador de alto peso molecular en uno de los carriles del gel.

La separación electroforética se realizó primero durante 30 min a 70 V para permitir la entrada de las muestras al gel. Al término de este período, la separación se continuó durante 22 h a 160 V. Al final del tiempo de migración, el gel se hidrata y se tiñe con una de las mezclas enzimáticas.

APÉNDICE 4

Tinción de lípidos en fase semisólida.

Reactivo	Concentración
Carboximetilcelulosa	1.2 %
Azul de tetrazolio	0.4 μM
Fenazina metasulfato	0.6 μM
Colato de sodio	3 mM
Tritón X-100	0.1%

COLESTEROL TOTAL

Colesterol esterasa 0.075 $\mu\text{U}/\text{mL}$

Colesterol oxidasa 0.05 $\mu\text{U}/\text{mL}$

Peroxidasa 0.25 $\mu\text{U}/\text{mL}$

COLESTEROL LIBRE

Colesterol oxidasa 0.05 $\mu\text{U}/\text{mL}$

Peroxidasa 0.25 $\mu\text{U}/\text{mL}$

TRIGLICÉRIDOS

Lipasa 37.5 $\mu\text{U}/\text{mL}$

Glicerol cinasa 0.1 $\mu\text{U}/\text{mL}$

Glicerol-3-fosfato oxidasa 0.4 $\mu\text{U}/\text{mL}$

Peroxidasa 0.13 $\mu\text{U}/\text{mL}$

ATP 0.25 $\mu\text{mol}/\text{L}$

FOSFOLÍPIDOS

Fosfolipasa D 0.12 $\mu\text{U}/\text{mL}$

Colina oxidasa 62 $\mu\text{U}/\text{mL}$

Peroxidasa 1.1 $\mu\text{U}/\text{mL}$

APÉNDICE 5

Determinación de carga de superficie

Agarosa 0.05 % hidratada en solución amortiguadora

Tris 89 mM

Glicina 180 mM

Solución de muestra

Sacarosa 50%

Azul de bromofenol al 0.05%

El gel de agarosa se precorre a 90V durante 30 minutos. Después de este tiempo se depositan 3 µg de proteína de HDL con 4 µL de solución de muestra en cada carril, y se dejan reposar por 10 minutos antes de aplicar el campo eléctrico.

Se aplica una diferencia de potencial de 90 V durante 80 minutos. Terminado este tiempo los geles de agarosa se colocan en una mezcla de ácido acético 10%, etanol 60%, y agua durante 15 minutos. Las muestras se tiñen con colorante Negro de Sudán IV en etanol al 70% durante una noche y posteriormente se destiñen con etanol. Los geles fueron lavados varias veces con agua desionizada y secados con aire seco a 80 °C. Finalmente se obtuvo el densitograma correspondiente (Molecular Analyst Software Versión 1.1, 1994 Bio-Rad).