



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**ESTUDIO DEL IMPACTO DE LA PROTEINURIA EN LA
CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE LAS SUBCLASES DE HDL EN UN
GRUPO DE PACIENTES DE LA CONSULTA EXTERNA DEL SERVICIO
DE NEFROLOGÍA DEL INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA
"IGNACIO CHÁVEZ".**

T E S I S

QUE PRESENTA

DR. ERNESTO SOTO MIRANDA

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN NEFROLOGÍA**

TUTOR: DR. OSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ



MÉXICO, D.F.

Agosto 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

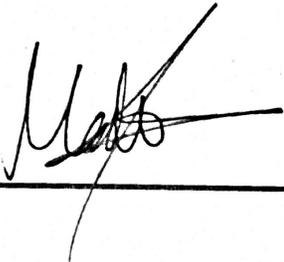
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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. José Fernando Guadalajara Boo

Director de Enseñanza



Dra. Magdalena Madero Rovalo

Jefe del Departamento de Nefrología

Dr. Oscar Armando Pérez Méndez

Investigador en Ciencias Médicas
Tutor de Tesis

Agradecimientos

- 1. Al Dr. Oscar Pérez experto en la materia del presente estudio y una persona ejemplar en todos los sentidos.**
- 2. A la Dra. Martha Franco por su apoyo en todo momento.**
- 3. Al equipo del Laboratorio de Metabolismo de Lípidos, en especial a Elizabeth Carreón.**
- 4. A mis maestros de Nefrología por sus enseñanzas: Dr. Pérez-Grovas, Dra. Magdalena Madero, Dr. Francisco Rodríguez, Dr. Armando Vázquez, Dr. Eduardo Mancilla, Dr. Sergio Hernández, Dra. Virgilia Soto.**
- 5. A mis compañeros de residencia los Doctores Rafael, Cesar, Sergio, Eduardo y Alfredo, quienes se convirtieron en mis amigos durante éstos años y para toda la vida.**
- 6. A mis pacientes.**
- 7. A Cynthia por su apoyo incondicional.**
- 8. A mi familia, el motor de mi vida.**

Índice

Tema	Página
Abreviaturas	
1. Resumen.....	7
2. Marco teórico.....	9
3. Antecedentes.....	12
3.1. Estructura y metabolismo intravascular de las HDL.....	13
3.2. Subclases de HDL.....	16
3.3. Utilidad clínica de las subclases de HDL.....	19
3.4. Relación entre el tamaño de las HDL y su catabolismo.....	22
3.5. El riñón en el metabolismo de las HDL.....	23
4. Justificación.....	28
5. Hipótesis.....	29
6. Objetivos	
6.1. Objetivo general.....	30
6.2. Objetivos específicos.....	30
7. Material y métodos	
7.1. Tipo de estudio.....	31
7.2. Definición de la población objetivo.....	31
7.2.1. Criterios de inclusión.....	31
7.2.2. Criterios de exclusión.....	31
7.2.3. Criterios de eliminación.....	31
7.3. Recolección de las muestras.....	32
7.4. Análisis de química básica.....	32

7.5. Proteinuria.....	32
7.6. Determinación de TFG.....	32
7.7. Aislamiento y análisis de subpoblaciones de HDL.....	33
8. Tabla de variables.....	35
9. Análisis estadístico	36
10. Resultados.....	37
11. Discusión.....	45
12. Conclusión.....	49
13. Bibliografía.....	50

Abreviaturas

ABC-A1 ATP binding cassette Class A type 1.

CKD-EPI Ecuación del Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration.

CrU Creatinuria.

DM Diabetes mellitus.

DR Disfunción renal.

EAC Enfermedad aterosclerosa coronaria.

HAS Hipertensión arterial sistémica.

HDL Lipoproteínas de alta densidad del inglés "*High density lipoproteins*".

IMC índice de masa corporal.

INCICH Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

LCAT Lecitina colesterol acil transferasa.

MDRD Ecuación del estudio Modification of Diet in Renal Disease.

PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida.

PrU Proteinuria.

RMN Resonancia magnética nuclear.

SRA Sistema renina angiotensina.

TAS Presión arterial sistólica.

TAD Presión arterial diastólica.

TBE Tris/Borio/EDTA.

TFG Tasa de filtración glomerular.

TRC Transporte reverso de colesterol.

1. 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, que se debe en parte a su metabolismo intravascular por la vía del transporte reverso del colesterol. En este respecto, es importante mencionar que las HDL son un grupo muy heterogéneo de partículas que se pueden agrupar en 5 subclases en base al diámetro de la partículas y a su densidad de flotación. En varios estudios de investigación se ha sugerido que la función anti-aterosclerosa de las HDL se relaciona con el tamaño y composición química de las partículas.

La distribución de tamaños de las partículas HDL depende del transporte reverso de colesterol, por lo que es posible que las alteraciones de esta vía puedan repercutir en la estructura y composición de las HDL.

Por otra parte, varios trabajos de investigación sugieren que el principal órgano catabólico de la apo A-I (apolipoproteína principal de las HDL) es el riñón; si consideramos que la eliminación renal de las lipoproteínas está determinada por el paso a través de la membrana basal del glomérulo, postulamos que en condiciones patológicas donde se altere la permeabilidad de la membrana glomerular, las HDL de menor tamaño podrían filtrarse con menor dificultad que las grandes y por tanto ser las partículas que el riñón depure preferentemente. Por lo anterior, las enfermedades renales son capaces de producir modificaciones en la distribución de tamaños de las HDL.

Para comprobar la posible relación entre la enfermedad renal, con alteraciones de la composición química y las subclases de HDL, estudiamos a un grupo de pacientes con diferentes grados de proteinuria y disminución en la tasa de filtración glomerular. Nuestros resultados sugieren que en efecto, existe una relación entre el grado de proteinuria, y el deterioro de la tasa de filtración glomerular con una distribución anormal de HDL; en efecto, observamos una disminución de las HDL pequeñas asociado a un enriquecimiento de colesterol en las subclases de las HDL, particularmente de las de menor tamaño, HDL3b y HDL3c. Éstos resultados son importantes, debido a que hasta el momento no se han documentado en forma completa las alteraciones en las subclases de HDL en pacientes con proteinuria y enfermedad renal.

2. Marco teórico

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son una población heterogénea de partículas de diversos tamaños y composición química que desempeñan diferentes funciones antiaterosclerosas; de hecho, proporciones elevadas de HDL pequeñas en plasma se ha asociado con un riesgo mayor de diabetes tipo 2 y de enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC). El sitio catabólico de las HDL es el hígado, pero también las células de túbulo renal expresan receptores funcionales para HDL, según se ha demostrado "in vitro". Por otra parte, la enfermedad renal se asocia con un incremento de la tasa de catabolismo de las HDL, hipoalfalipoproteinemia, un incremento de las HDL3 en el humano y con la presencia de EAC. En este contexto, la disfunción renal (DR) podría estar vinculada con la EAC a través de anomalías en el metabolismo y la estructura de las HDL.

Se ha propuesto que el riñón juega un papel en el metabolismo de las HDL. No obstante, el hecho de que las lipoproteínas puedan ser metabolizadas en los túbulos renales, sugiere que se filtran a través de la membrana glomerular, a pesar de que se trata de complejos macromoleculares. En este sentido, estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que situaciones fisiopatológicas o intervenciones farmacológicas que producen una proporción plasmática elevada de HDL pequeñas, se asocian con catabolismo acelerado de las HDL. Es posible entonces que las HDL de menor tamaño atraviesen la membrana de filtración del glomérulo con menor dificultad que las HDL grandes. Con base en este razonamiento se puede postular que si disminuye la superficie de filtración de los

capilares glomerulares, las HDL pequeñas se acumularían en plasma y disminuiría su tasa de catabolismo.

Los modelos animales diseñados para entender el papel del riñón en el metabolismo de las HDL “in vivo”, presentan diversas inconsistencias con las observaciones hechas en los sujetos con enfermedad renal crónica; en primer lugar este tipo de pacientes presentan una eliminación acelerada de la apo AI de las HDL, mientras que los modelos de daño renal en rata y conejo se observa lo contrario, una eliminación retardada. En segundo lugar, los pacientes con enfermedad renal presentan acumulación de HDL3 por disminución de la actividad LCAT, sin embargo en los modelos animales no se han determinado las subclases de HDL. Por último, todas las anomalías del metabolismo de las lipoproteínas en los pacientes con disfunción renal pueden ser el resultado de una resistencia a la insulina que surge como consecuencia asociada a la insuficiencia renal. Por lo tanto, el papel del riñón sobre el metabolismo y la estructura de las HDL in vivo no está bien elucidado.

Por otra parte, la composición química de las HDL puede ser un determinante importante para su catabolismo, como ha sido sugerido por algunos estudios; sin embargo, no se ha descrito la composición química de las subclases HDL en ningún modelo animal, ni en pacientes con enfermedad renal. Por lo anterior, se desconoce cuál es la participación de la composición química de las HDL en las anomalías metabólicas de estas lipoproteínas durante la disfunción renal.

El presente estudio está diseñado para investigar la manera en que se altera la composición de subclases de HDL en presencia de proteinuria y enfermedad renal crónica. Los resultados obtenidos contribuirán a establecer la relación del metabolismo renal de las HDL con la composición química y con el tamaño de estas lipoproteínas.

3. Antecedentes

La enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC) es la primera causa de mortalidad en los países desarrollados, es la segunda causa de muerte en la población adulta en nuestro país después de la diabetes mellitus (DM) [1], y se ha demostrado que la EAC tiene sus inicios desde la infancia [2]. Además, en el 3er Panel de adultos del Programa Nacional de Educación en Colesterol [3], se consideró que la DM es equivalente a la EAC. Por lo tanto, las medidas de prevención primaria basadas en el diagnóstico y tratamiento precoces de la EAC son prioritarias entre las estrategias nacionales de salud.

Se ha postulado que las lipoproteínas de alta densidad (HDL) evitan la formación de la placa de ateroma por el papel que desempeñan en el transporte reverso de colesterol (TRC) que se define como una vía en que el colesterol de las células periféricas regresa al hígado para su excreción o reciclaje. Además, en los últimos años se han descrito otros mecanismos potencialmente antiaterosclerosos de las HDL, como son: su capacidad antioxidante [4,5], que contribuye a re-establecer la función endotelial [6] y regulan la respuesta inflamatoria [7,8]. Estas propiedades antiaterosclerosas parecen estar ligadas a al tamaño y la composición química de las HDL [4,5,8]; en consecuencia, las situaciones fisiopatológicas, o de intervención farmacológica que modifican el tamaño o la composición química de estas lipoproteínas podrían alterar la función ateroprotectora de las HDL. En este contexto destaca la disfunción renal en pacientes con proteinuria y enfermedad renal crónica, como causa de hipoalfalipoproteinemia (niveles de C-HDL < 40 mg/dL), asociadas a un aumento de las HDL pequeñas tipo HDL3, y a una

eliminación acelerada de estas lipoproteínas. Estas alteraciones en conjunto con la evidencia de que las células del túbulo renal expresan receptores para la apo AI de las HDL, han sugerido que el riñón tiene un papel activo en el metabolismo de las lipoproteínas.

3.1 Estructura y metabolismo intravascular de las HDL

Las HDL son complejos macromoleculares pseudomicelares conformados por colesterol libre y fosfolípidos en su superficie, y por colesterol esterificado y triglicéridos en su núcleo (Figura 1). El complejo lipídico se estabiliza con apolipoproteínas, de las cuales, la apo AI es la más abundante y caracteriza a las HDL.

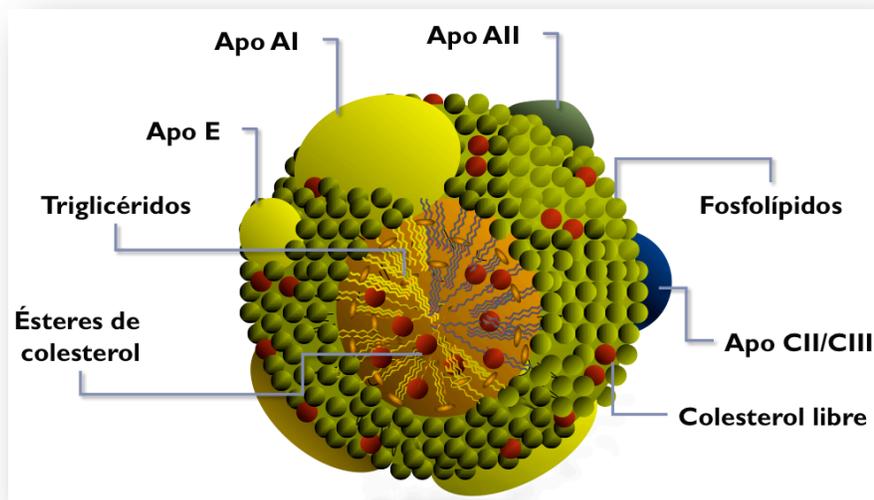


Figura 1. **Estructura y composición de las lipoproteínas.** Se esquematiza la estructura pseudomicelar de la partícula, con los lípidos anfipáticos en la superficie, los hidrófobos en el interior y las apolipoproteínas que se integran a la partícula para estabilizarla.

Uno de los mecanismos por medio del cual las HDL evitan la formación de la placa ateromatosa, es el transporte reverso de colesterol, que se define como una vía de retorno del colesterol proveniente de las células periféricas hacia el hígado para su excreción o reciclaje (Figura 2). El hepatocito secreta un tipo de HDL discoidales compuestas por apo A1 asociada con fosfolípidos, denominadas partículas pre- β 1 que captan el colesterol de las células periféricas. Este eflujo de colesterol se lleva a cabo en mayor proporción por medio de la proteína de membrana ABC-A1 (ATP binding cassette Class A type 1), que es dependiente de ATP y capta colesterol y fosfolípidos de las HDL [9]; a continuación, el colesterol es esterificado por la lecitina: colesterol acil transferasa (LCAT). Así, el colesterol pierde su carácter anfipático y migra al interior de la partícula, aumentando el tamaño de la misma. El colesterol esterificado puede ser intercambiado por triglicéridos provenientes de lipoproteínas que contienen apo B, intercambio facilitado por la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP). Otra alternativa para la eliminación del colesterol esterificado de las HDL es el receptor SR-BI (scavenger receptor class B type I). Este receptor, capta e internaliza a las HDL, eliminando así los ésteres de colesterol y reciclando al exterior del hepatocito una partícula más pequeña. A continuación, los triglicéridos presentes en las HDL son hidrolizados por la lipasa hepática (LH). Esta hidrólisis, en sinergia con la actividad de la proteína de transporte de fosfolípidos (PLTP), disminuye el tamaño de las HDL2 remodelándolas en HDL3 y en partículas pre- β 1 que pueden reiniciar el ciclo de captación de colesterol.

3.2 Subclases de HDL

Las HDL son continuamente remodeladas por enzimas y proteínas de transporte que se encuentran en el plasma, así como por receptores de membrana (Figura 2). En consecuencia, las HDL aisladas de plasma constituyen un grupo heterogéneo de partículas. Se han descrito varias subclases de HDL en función de ciertas características fisicoquímicas y se ha sugerido que las propiedades antiaterosclerosas de estas partículas dependen de su estructura y composición [4,5,8,12-15]. Se ha postulado que la concentración de las subclases de HDL es más importante como marcador de riesgo cardiovascular que las concentraciones plasmáticas de colesterol-HDL [13, 16].

Una clasificación con base en la densidad de flotación (ρ), las distingue a las HDL en HDL2 ($1.063 < \rho < 1.12$ g/mL) y HDL3 ($1.12 < \rho < 1.21$ g/mL) [16,17]. Las HDL2 son ricas en lípidos hidrofóbicos mientras que las HDL3 están formadas principalmente por fosfolípidos y proteínas. Las HDL migran en su mayoría dentro de la fracción α del plasma, por lo que algunos autores las identifican como α -lipoproteínas. También por su movilidad electroforética en combinación con su tamaño, se han descrito otras subfracciones de HDL entre las que destacan las partículas pre- β 1. Estas partículas están compuestas esencialmente de fosfolípidos y apo A1, desempeñan un papel muy importante en la captación de colesterol de las células periféricas. Se han utilizado otros métodos de separación para dividir a las HDL en subgrupos como la cromatografía de exclusión de talla y la electroforesis en gradiente de poliacrilamida en condiciones nativas de las lipoproteínas previamente aisladas por ultracentrifugación [17,18]. Este último método permite

subclasificar a las HDL en HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL3b, HDL3c en orden decreciente de tamaño (Figura 3).

Entre los métodos que se han utilizado para el análisis de la distribución de tamaños de las HDL, se incluyen la resonancia magnética nuclear (RMN) de los protones de los lípidos HDL [19,20]. La RMN permite subclasificar a las HDL en pequeñas, medianas y grandes [20,21]. El tamaño de las HDL obtenido por RMN correlaciona con la electroforesis en gradiente de poliacrilamida, la cual ha servido de estándar de calibración [19,20].

El desarrollo de varios métodos para subclasificar a las HDL responde a dos circunstancias: a) los diferentes métodos de clasificación en general arrojan resultados no comparables unos con otros y, b) a pesar de carecer de un método de referencia, existe un consenso de que las subclases de HDL tienen una utilidad potencial en la evaluación del riesgo cardiovascular y de enfermedades relacionadas como la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus tipo 2 (DM2).

Sin embargo no existe un consenso acerca de cuál es la fracción más protectora de las HDL; la mayoría de los estudios epidemiológicos sugieren que la fracción protectora corresponde a las HDL grandes [13-15], pero los estudios in vitro han demostrado lo contrario: las HDL pequeñas promueven más el eflujo de colesterol, tienen mayor poder antioxidante y su proporción aumenta en ciertas circunstancias de bajo riesgo cardiovascular [4,5,8-12, 22-25]. Dentro de las explicaciones a esta aparente paradoja, se encuentra el método para cuantificar las subclases de HDL;

los estudios epidemiológicos han utilizado resonancia magnética nuclear, y los estudios in vitro han empleado la electroforesis en gradiente de poliacrilamida con tinción para proteínas.

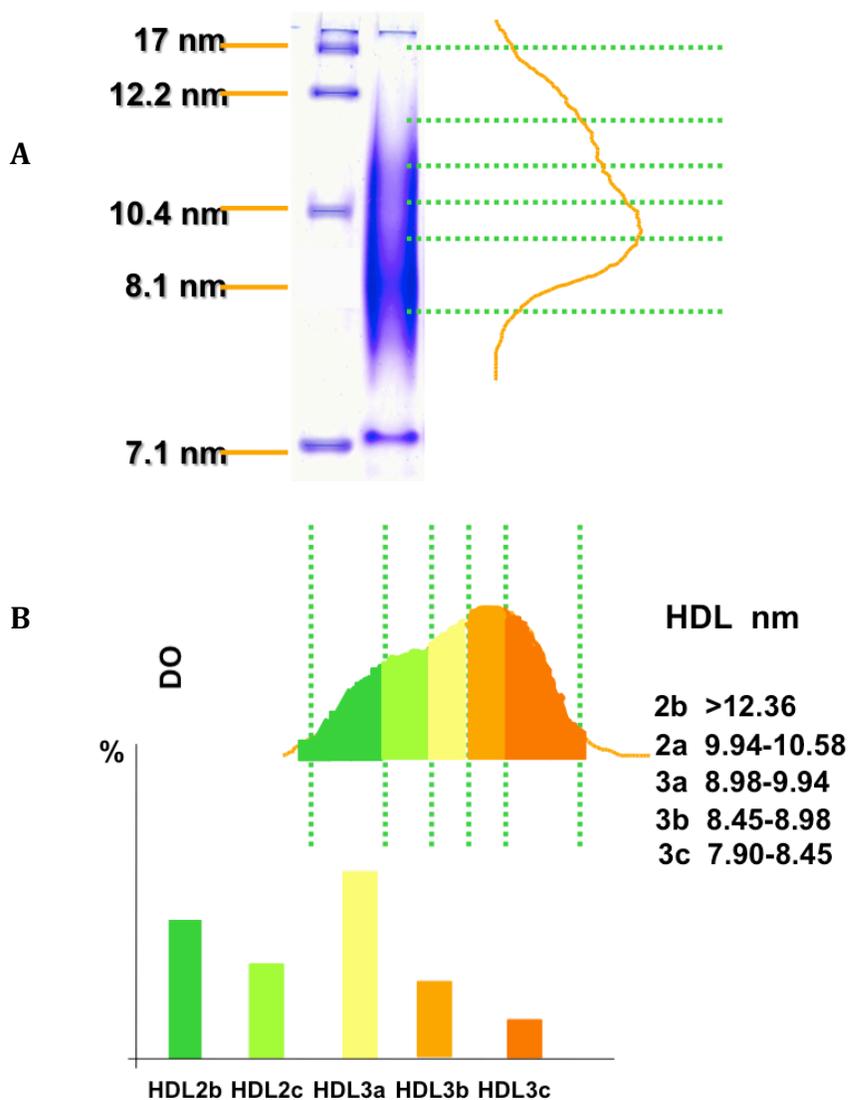


Figura 3. **Separación y análisis de las subclases de HDL por electroforesis en gradiente de poliacrilamida (PAGE) en condiciones nativas.** Las HDL se separan por PAGE y los barridos se revelan con azul de Coomassie (Panel A).

Se construyen intervalos de tamaño correspondientes a las 5 subclases de HDL con base en marcadores de diámetro conocido. El análisis densitométrico e integración parcial en cada uno de los intervalos permite la estimación de la proporción relativa de cada una de las subclases de HDL expresadas como % de la proteína HDL total (Panel B).

3.3 Utilidad clínica de las subclases de HDL

El transporte reverso de colesterol concilia la mayor parte de los hallazgos en lo que concierne al metabolismo de lípidos y los resultados epidemiológicos. Adicionalmente, las HDL poseen además otras propiedades que pueden contribuir a su potencial antiateroscleroso; entre otras, las HDL evitan la propagación de radicales libres en la LDL por acción de la enzima paraoxonasa-1 (PON1). Existe una correlación positiva entre la concentración de apo A1 y la actividad PON1, debido a que la cantidad de partículas HDL determina el número de moléculas de la enzima presente en plasma. La paraoxonasa tiene la capacidad de captar a las HDL en membrana del hepatocito, esto depende también del contenido de colesterol libre presente en la lipoproteína [4], indicando que la tensión de superficie y la fluidez de la capa de fosfolípidos de las HDL son fundamentales para su asociación con la enzima. Esta información apoya el concepto de que no todas las partículas HDL tienen el mismo potencial antiaterogénico; solo algunas tienen las características estructurales para, transportar en plasma [4,5,15] y movilizar a la paraoxonasa hacia el espacio subendotelial en donde desempeña su papel antiateroscleroso.

En los humanos, las subclases de HDL pueden ser modificadas por diferencias étnicas [21], niveles plasmáticos de triglicéridos [26], tratamiento con antidiabéticos o para la dislipidemia [22,23,25] así como situaciones fisiopatológicas como la intolerancia a la glucosa o DM2 [13,14,27] y la enfermedad aterosclerosa coronaria entre otras [18,28]. La determinación de los tamaños de HDL puede ser de un gran apoyo diagnóstico en la evaluación del

riesgo cardiovascular y de enfermedades relacionadas [13-15,28]. Esta determinación también puede ser útil en la de evaluación del impacto metabólico de fármacos antiaterosclerosos como se ha mencionado previamente [22,23,25].

En este sentido, las subclases HDL grandes correlacionaron de manera negativa con progresión de la enfermedad coronaria independientemente del C-HDL y de otros lípidos plasmáticos [27] y las HDL pequeñas predijeron la enfermedad cardiovascular recurrente [28]. Paradójicamente, en un metaanálisis reciente se demostró que a más colesterol-HDL, acompañado de partículas HDL grandes, mayor el riesgo cardiovascular [29]. Estas observaciones son similares a los hallazgos hechos con el fármaco experimental torcetrapib, un inhibidor de la CETP que aumenta los niveles plasmáticos de colesterol-HDL pero que se asoció a un incremento de mortalidad y morbilidad cardiovasculares [30,31]. Estos estudios demuestran que la determinación del tamaño de las HDL permiten evaluar mejor el riesgo cardiovascular que las concentraciones de colesterol-HDL plasmático.

La distribución de los tamaños de las HDL también es útil en la evaluación de la resistencia a la insulina, particularmente en los pacientes pediátricos con sobrepeso [14]; los pacientes con diabetes tipo 2 presentan una mayor proporción de HDL pequeñas tipo HDL3c al igual que los pacientes con resistencia a la insulina. En consecuencia, la determinación de tamaños de HDL en pacientes obesos puede apoyar el diagnóstico de resistencia a la insulina incluso desde edades pediátricas [14]. Además, la distribución de tamaños de HDL también puede ser de utilidad para diagnosticar la disfunción endotelial [15].

A pesar del gran potencial clínico que tiene la determinación de tamaños de las HDL, su uso no se ha generalizado porque existe gran controversia acerca de cuál es la fracción más protectora; los estudios epidemiológicos en general demuestran que los pacientes con EAC o DM2 tienen niveles plasmáticos bajos de HDL grandes [13,29,32], sugiriendo que esta es la fracción de las HDL más protectora. En contraste, los estudio “in vitro” o con un número limitado de pacientes demuestran consistentemente que las HDL con mayor potencial antiaterogénico son las partículas pequeñas [5,12,22,24,17,33-35]. Esta aparente paradoja puede tener una respuesta en la metodología empleada para cuantificar las subpoblaciones de HDL; mientras que los estudios epidemiológicos generalmente han empleado RMN o precipitación selectiva para cuantificar a las subclases de HDL, los otros estudios han utilizado electroforesis en gradiente de poliacrilamida con tinción específica para proteínas. Cabe enfatizar que este método es semicuantitativo y en consecuencia no es totalmente comparable a la RMN, la cual sí es cuantitativa.

Surgió entonces la necesidad de crear un método que de manera cuantitativa determinara la fracción lipídica y proteica de cada una de las subclases de HDL. Estudios previos llevados a cabo en el Departamento de Biología Molecular del INCICH han logrado desarrollar una técnica que a partir de una sola muestra en gel de PAGE, que determina cuantitativamente las fracciones lipídica y proteica de las subclases de HDL [57].

3.4 Relación entre el tamaño de las HDL y su catabolismo

Previamente se ha demostrado que intervenciones farmacológicas o estados patológicos que se caracterizan por la generación de HDL pequeñas, se asocian con un hipercatabolismo de estas lipoproteínas [22,23,25,33,35]. En contraste, la acumulación de HDL grandes en plasma se asocia con tasas de catabolismo bajas de la apo A1 [11,24]. Estos resultados sugieren, aunque no lo demuestran directamente, que el tamaño de las HDL es indicativo de la tasa de recambio de estas lipoproteínas [10]; a menor el diámetro de la lipoproteína, mayor la tasa de catabolismo.

Como se mencionó previamente, la resistencia a la insulina y la DM2 se caracterizan por una distribución de tamaños de las HDL desplazada hacia partículas de menor tamaño [13,14,27]. Además, se ha demostrado que la resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa y DM2 se caracteriza por un hipercatabolismo de la apo A1 de las HDL [36,37]. Todos estos estudios en su conjunto, aportan más evidencias a la noción de que las HDL pequeñas se catabolizan más rápidamente con respecto a las partículas de mayor tamaño.

Hasta el momento, en una búsqueda en las fuentes bibliográficas más recientes se ha podido constatar, que no hay estudios que hayan establecido una relación causa efecto entre el tamaño de las HDL y su catabolismo; las evidencias que sugieren una relación inversa entre el tamaño de las HDL y su tasa de catabolismo, son todas ellas indirectas. Se requieren por lo tanto de evidencias

directas que permitan afirmar la relación inversa entre el tamaño y el catabolismo de las HDL en las patologías antes mencionadas.

3.5 El riñón en el metabolismo de las HDL

El riñón no había sido considerado como un órgano importante en el metabolismo de los lípidos porque se asumía que la barrera glomerular debería impedir que las moléculas grandes, como las lipoproteínas, se filtraran hacia el espacio de Bowman. Sin embargo, el epitelio del túbulo proximal expresa una gran cantidad de receptores para un amplio espectro de ligandos, incluyendo varias apolipoproteínas, albúmina y otras proteínas de unión a sustancias lipofílicas.

La megalina y la cubilina son dos receptores tubulares que reconocen a diferentes apolipoproteínas como ligandos. A pesar de que la megalina tiene una distribución muy amplia en diversos tejidos, la membrana luminal de las células epiteliales del túbulo proximal es el sitio de mayor expresión de este receptor. La megalina es una proteína de 600 kD que pertenece a la familia del receptor LDL [38] y en coincidencia con su estructura, la megalina reconoce como ligandos a la apo B y a la apo E [39,40], ambas proteínas características de las VLDL y LDL.

En el caso particular de las HDL, el complejo cubilina/AMN reconoce a la apo AI [41], e induce su internalización al citoplasma de la célula del epitelio tubular. La relevancia fisiológica de la interacción cubilina- apo AI se ha enfatizado por la pérdida urinaria de la apo AI en sujetos con deficiencia de cubilina [41,41]. La cubilina es una proteína de 460 kD, contiene 27 dominios ricos en cisteína y tiene

analogía con el receptor para LDL. La proteína AMN (por su denominación en inglés “amnioless”) es una proteína transmembranal de 45kD que contiene en su región intracitoplasmica secuencias consenso del motivo NPXP/F característico de las proteínas endocíticas [43]. La AMN forma un complejo de gran tamaño con la cubilina en donde esta última hace la funciones de reconocimiento del ligando y la AMN participa en el transporte y expresión de la cubilina en la membrana externa de la célula. En concordancia con su función endocítica, el complejo cubilina/AMN se concentra en el espacio entre dos microvellosidades lo que equivale a la región de “pozos recubiertos” activos de las células tubulares proximales [44].

A pesar de que los receptores de las principales proteínas de las LDL (apo B) y de las HDL (apo AI) son la megalina y la cubilina, respectivamente, la depuración renal de estas proteínas está probablemente limitada debido al tamaño grande de las lipoproteínas en relación a la permeabilidad de la barrera de filtración glomerular [42,45]. Esta barrera no tiene realmente un límite de exclusión específico, pero el coeficiente de tamizaje para proteínas con un tamaño comprendido entre los 60 y los 100 kD es muy bajo [46].

El papel “in vivo” que desempeña el riñón en el metabolismo de las HDL se ha deducido de modelos de nefrosis y nefrectomía en animales, así como de las observaciones hechas en pacientes con enfermedad renal, ya sea síndrome nefrótico, o insuficiencia renal crónica. Las primeras evidencias del papel activo del riñón en el catabolismo de las HDL in vivo fueron aportadas por Kaysen y cols., quienes demostraron en un modelo de ratas nefróticas que la mayor proporción de

la apo AI se elimina por los túbulos renales [47]. Estos resultados son consistentes con un aumento del colesterol HDL en este modelo de ratas nefróticas [47], y también con la disminución del catabolismo de las HDL en conejos con nefrectomía de un riñón [48]. Sin embargo, en este último modelo la reducción de la tasa de catabolismo fue muy discreta (10%) [48].

En contraste en el modelo de ratas nefróticas y conejos con nefrectomía parcial, el síndrome nefrótico y la insuficiencia renal crónica en el humano se asocian con un aumento de la eliminación renal de la apo AI lo que explica los niveles bajos de colesterol HDL en este tipo de pacientes [42,49]. Asimismo, en los pacientes con insuficiencia renal crónica se observa un incremento en la proporción de HDL3 y una disminución en la concentración de ésteres de colesterol [50]. Estas anomalías se han atribuido a que la actividad LCAT disminuye en los sujetos con enfermedad renal crónica [50]; como consecuencia se presenta una menor tasa de esterificación del colesterol-HDL. Así las HDL3 no estarían transformándose a HDL2 a con una velocidad normal (ver Figura 2), provocando la acumulación de las primeras en plasma. El hecho que se acumulen las HDL3 (pequeñas) podría estar favoreciendo el catabolismo de las mismas, según se ha planteado previamente en este estudio. En resumen, las observaciones hechas en los pacientes con enfermedad renal soportan el papel catabólico del riñón, y aportan argumentos al paradigma de que las HDL pequeñas se eliminan más rápidamente del plasma en comparación con las grandes.

Existen algunas limitaciones a las conclusiones que se derivan de las observaciones hechas en los modelos de nefrosis y de pacientes con enfermedad renal. En primer lugar, los modelos de nefrosis en rata no mimetizan el metabolismo de las HDL del humano con falla renal [47,49,50], posiblemente a las diferencias tan marcadas que la rata no expresa CETP [51], proteína que juega un papel central en el metabolismo de lipoproteínas en el humano. Además, la enfermedad renal crónica en el humano se asocia por sí misma con un aumento de la resistencia a la insulina conforme avanza la disfunción renal [52,53]. Este hecho es altamente relevante en la comprensión del papel del riñón en el metabolismo de las HDL, debido a que la resistencia a la insulina tiene un efecto directo sobre estas lipoproteínas; los pacientes con resistencia a la insulina tienen proporciones elevadas de HDL pequeñas tipo 3c en plasma [14], bajos niveles de colesterol-HDL y un catabolismo acelerado de las HDL [13,14,32,36,37]; estas anomalías de las HDL coinciden con las observadas en la insuficiencia renal crónica en el humano. Por lo tanto, el papel del riñón en el metabolismo de las HDL no se puede inferir con precisión a partir de la patología renal en el humano. Por esta razón, se requieren nuevos modelos que permitan establecer con más claridad el papel del riñón en el metabolismo y estructura de las HDL.

Por último, se ha postulado que el colesterol y la proteína de las HDL se eliminan de manera independiente en distintos sitios catabólicos [22,25,54,55]; sin embargo, si las HDL se filtran completas hacia el espacio de Bowman en la nefrona, el riñón jugaría también un papel en el metabolismo del colesterol de estas lipoproteínas. Este aspecto también es de especial interés porque los

niveles de colesterol-HDL plasmático se utilizan para evaluar el riesgo cardiovascular y el síndrome metabólico [3]. Por lo anterior, si la eliminación renal de las HDL disminuye, los ésteres de colesterol se acumularían en estas lipoproteínas. Considerando que los ésteres de colesterol y los triglicéridos son ambos componentes del núcleo de las HDL (ver Figura 1), el enriquecimiento con ésteres de colesterol, produciría un desplazamiento concomitante de los triglicéridos de las HDL provocando un cambio de la composición lipídica de las diferentes subclases de HDL. Esta propuesta implica que la composición de las HDL sería un reflejo de su metabolismo, la que podría aprovecharse para el diagnóstico clínico.

4. Justificación

Hasta el momento no se tiene información acerca de la participación de la proteinuria y el daño renal en la composición de subclases de HDL en humanos. Se requieren estudios en pacientes con enfermedad renal dado que éste es un grupo creciente de pacientes en nuestro país. El estudio de las alteraciones lipídicas en este tipo de pacientes nos permitirá determinar la composición química de las subclases de HDL y aportar así nuevos conceptos acerca de la relación entre el metabolismo, la composición química y el tamaño de estas lipoproteínas con las enfermedades renales.

5. Hipótesis

Los pacientes con daño renal tendrán una distribución anormal de subtipos de HDL y el grado de proteinuria se asociará inversamente con los niveles plasmáticos de subclases de HDL pequeñas tipo 3b y 3c.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

- Determinar la distribución de las subclases de HDL en pacientes con diferentes tipos de enfermedad renal asociadas con proteinuria.

6.2 Objetivos específicos

- Documentar distribución de subtipos de lipoproteínas HDL por ultracentrifugación secuencial y electroforesis en gradiente de poliacrilamida en pacientes con enfermedad renal y compararla con un grupo de sujetos control.
- Determinar el nivel sérico de colesterol total, triglicéridos y fosfolípidos de HDL en ambos grupos.
- Documentar la concentración plasmática de colesterol de las subclases de HDL en los pacientes con enfermedad renal y compararla con un grupo de sujetos control.
- Buscar la correlación entre los parámetros de función renal y subclases de HDL en los grupos estudiados.

7. Material y métodos

7.1 Tipo de estudio.

Estudio observacional, descriptivo, transversal.

7.2 Definición de la población objetivo.

Se estudiaron pacientes de la Consulta Externa del Servicio de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología que cumplieron los siguientes criterios de inclusión.

7.2.1 Criterios de inclusión:

- ▶ Pacientes adultos edades de 18 años a 60 años.
- ▶ Proteinuria confirmada en recolección de orina de 24h.
- ▶ Aceptación de participar en estudio

Se consideraron como criterios de exclusión y eliminación:

7.2.2 Criterios de exclusión:

- ▶ Tratamiento con hipolipemiantes (estatina o fibrato).
- ▶ Tratamiento con esteroides.
- ▶ Enfermedades crónicas hepáticas.
- ▶ Trastornos tiroideos.
- ▶ Deseo de no participar en el estudio.

7.2.3 Criterio de eliminación:

- ▶ Muestra insuficiente o hemolizada.

7.3 Recolección de muestras

Las muestras de sangre de los pacientes se obtuvieron por punción de la vena basílica o cefálica braquiales, después de un ayuno de 12 h, en tubos con heparina. El plasma se separó centrifugando a 2500 rpm durante 15 min. Las HDL y el perfil de lípidos se analizaron a partir de plasma fresco, mientras que el resto de las muestras de plasma se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

7.4 Análisis de química básica

Las concentraciones de colesterol total, triglicéridos, glucosa, y fosfolípidos, se determinaron mediante métodos enzimático colorimétricos comerciales. El colesterol de HDL se determinó en el sobrenadante, después de precipitar de manera selectiva las lipoproteínas que contienen apo B con una solución de sulfato de dextrán/magnesio (100 µL/mL de plasma).

7.5 Proteinuria

Se tomó como base la proteinuria documentada en el expediente clínico de una recolección de orina de 24h, en la misma muestra que se determinó creatinuria, ambas en el laboratorio central del INCICH y a partir de ambas determinaciones se calculó el índice PrU/CrU.

7.6 Determinación de TFG

Para determinar la TFG se emplearon las ecuaciones del estudio MDRD y del Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration a partir de la una determinación de creatinina sérica llevada a cabo por el laboratorio del Instituto y

documentada el día previo a la fecha de toma de las muestras sanguíneas en los pacientes estudiados [62, 63].

7.7 Aislamiento y análisis de subpoblaciones de HDL

Las HDL fueron separadas por ultracentrifugación secuencial en tubos de policarbonato. Se aislaron en primer lugar las lipoproteínas que contienen apo B a una densidad < 1.063 g/mL, ajustando con KBr sólido, a 100000 rpm durante 2 h 30 min. Posteriormente se aislaron las HDL ajustando con KBr sólido a una densidad = 1.25 g/mL, y nuevamente centrifugando a 100,000 rpm durante 3 h; en estas condiciones del 80% a 85% de la apo A-I total del plasma se recupera en las fracciones de las HDL. Las HDL aisladas se dializaron en una solución amortiguadora de Tris 0.09 M, ácido bórico 0.08M, EDTA 3mM, pH 8.4 (Amortiguador TBE). La determinación de proteína se realizó por el método de Lowry [60].

Para determinar la estructura, homogeneidad y diámetro de las HDL, se realizó una electroforesis en condiciones nativas en gradiente de poliacrilamida 3-30%, utilizando como referencia marcadores de proteínas de alto peso molecular (tiroglobulina, 17 nm; ferritina, 12.2 nm; catalasa, 10.4 nm; lactato deshidrogenasa, 8.2 nm; y albúmina, 7.1 nm) [57]. De ésta manera, se determinó la proporción de cada subpoblación de HDL por su diámetro hidrodinámico conocido (HDL2b 10.58-13.6 nm, HDL2a 9.94-10.58 nm, HDL3a 8.98-9.94 nm, HDL3b 8.45-8.98 nm, HDL3c 7.70-8.45 nm). Los geles se tiñeron inicialmente para detección de colesterol total, fueron decolorados y a continuación se tiñeron todas las

apolipoproteína asociadas a las HDL con azul de Coomassie R250 al 0.1% solubilizado en metanol 25%, ácido acético 10% y agua. De cada tinción se obtuvo un densitograma correspondiente a cada uno de los componentes (Molecular Analyst Software Version 1.1, 1994 Bio-Rad) (Figura 4). Para calcular el porcentaje con el que contribuye cada subclase a la población total de HDL plasmática 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 determinados en el plasma después de precipitar las lipoproteínas que contiene apo B con una solución de sulfato de dextrán/magnesio (100 μ L/mL de plasma) [57, 64].

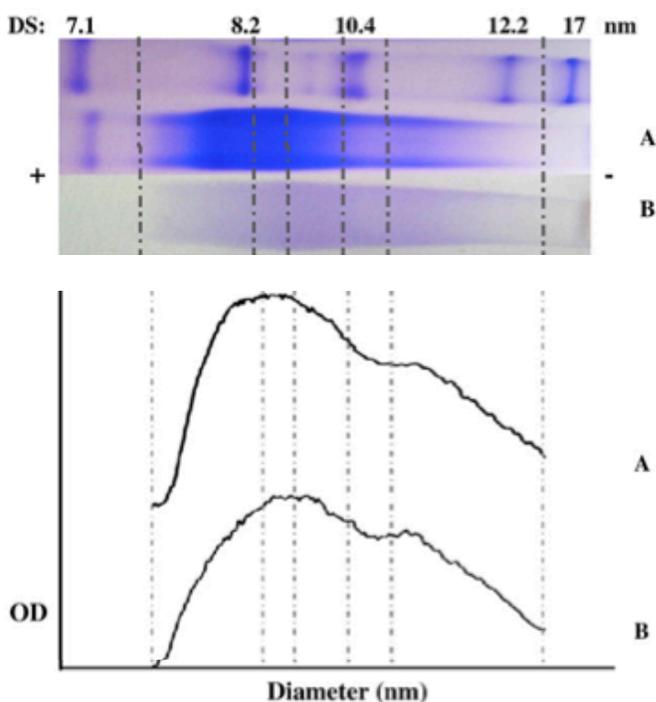


Figura 4. **Imagen de electroforesis (arriba) y de sus densitogramas (abajo) de una muestra de sangre de un paciente con proteinuria.** Las muestras procesadas se tiñeron con azul de Coomassie para medir proteína de partículas HDL (A) y para detección de colesterol de partículas HDL (B). Las líneas punteadas indican los intervalos del diámetro correspondiente a las diferentes subclases de HDL. La densidad óptica (OD) se ajustó con propósito de comparación. El eje de las abscisas se representa en escala logarítmica.

8 Tabla de variables					
VARIABLE	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INSTRUMENTO DE MEDICIÓN	UNIDAD DE MEDIDA	VALORES O CATEGORÍA	ESCALAS DE MEDIDAS
IMC	Índice para valorar obesidad	Fórmula: Peso/Talla ²	Kg/m ²	18-25= normal, 25.1-29.9= sobrepeso, >30=obesidad	Ordinal
Presión arterial	Presión arterial registrada durante la exploración física	Baumanómetro	mmHg	Normal=120-80 Pre-hipertension	Ordinal
Glucosa	Nivel sérico de glucosa luego de ayuno de 12h.	Enzimático colorimétrico comercial	mg/dL	70-100 mg/dL	Ordinal
Ácido úrico	Nivel sérico de ácido úrico luego de ayuno de 12h.	Enzimático colorimétrico comercial	mg/dL	H: 3.0-7.5 M: 3.0-6.5	Ordinal
Triglicéridos	Nivel sérico de triglicéridos luego de ayuno de 12h.	Enzimático colorimétrico comercial	mg/dL	Normal <150 Límite alto 150-199 Alto 200-499 mg/dL Muy alto ≥500 mg/dL	Ordinal
Colesterol total	Nivel sérico de colesterol luego de ayuno de 12h.	Enzimático colorimétrico comercial	mg/dL	Normal <200 Limite alto 200-239 Alto ≥240	Ordinal
Colesterol HDL	Complejos macromoleculares pseudomicelares conformados por colesterol libre y fosfolípidos en su superficie, y por colesterol esterificado y triglicéridos en su núcleo.	Enzimático colorimétrico comercial	mg/dL	Normal H: >40 M: >50 Bajo H: <40 M: <50	Ordinal
Subclases de HDL	Partículas de HDL con diferente composición relativa de lípido y proteína	PAGE	nm	2b>12.36nm 2a 9.94-10.58 3a 8.98-9.94nm 3b 8.45-8.98nm 3c 7.90-8.45nm	Ordinal
Tasa de filtración glomerular	Función renal calculada a partir de formula matemática de acuerdo a nivel de Creatinina sérica.	Formula MDRD y CKD-EPI [62,63]	mL/min/1.73m ²	Normal >90ml/min Insuficiencia renal <60ml/min	Ordinal
Proteinuria	Cuantificación de microproteína total en orina de 24.	Enzimático colorimétrico comercial	mg/24	>300mg/24h	Ordinal

9 Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva para cada uno de los grupos para definir mediante media y desviación estándar las variables continuas y porcentajes a las variables categóricas. Para buscar diferencias entre grupos se aplicó la prueba T para igualdad de medias y para documentar una correlación entre proteinuria, MDRD y CKD-EPI se utilizó la correlación de Pearson. El Software que se utilizó fue SPSS versión 18.

10 Resultados

Se revisaron expedientes de pacientes de la Consulta Externa del Servicio de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología que acudieron de Septiembre de 2010 a Junio de 2011 a cita subsecuente, primera vez o pre-consulta. Se llevó a cabo la pre-selección de la población de estudio por la presencia de proteinuria y mediante un interrogatorio dirigido se investigó la ausencia de prescripción de medicamentos que excluyera su participación en el presente estudio (tratamiento con fibrato, estatina, esteroide). Se identificaron 32 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión durante el período mencionado y luego de recibir el consentimiento informado para al estudio se realizó la toma de muestra con ayuno de 12h en el Departamento de Nefrología del Instituto. Asimismo, se reunió a un grupo control de 40 sujetos sin proteinuria a quienes también se les realizó la medición de las variables de la presente investigación.

Los características de la población estudiada se muestran en la Tabla 1. Se observa una edad media de 35.1 ± 13.0 años en el grupo de estudio y 57.0 ± 8.7 años en el grupo control con una diferencia estadísticamente significativa. La proporción de mujeres/hombre no mostró diferencias. Hubo una notable diferencia entre el índice de masa corporal (IMC) del grupo de estudio y el del grupo control que fue estadísticamente significativa siendo mayor para la población control. De la población estudiada, tres pacientes cumplieron criterio de obesidad de acuerdo a OMS [61] y otros 14 cumplieron criterio de sobrepeso; en el grupo control, 14 sujetos cumplieron criterio de obesidad y 18 sujetos criterio de sobrepeso de acuerdo a OMS. Otros datos que no mostraron diferencia en los grupos

estudiados fueron presión arterial sistólica, glucemia, colesterol total, colesterol HDL y triglicéridos.

Tabla 1. Datos antropométricos y química básica.

	Grupo Estudio N= 32	Grupo Control N= 40	Prueba T (p)
Edad	35.1 ± 13.0	57.0 ± 8.7	0.000
Sexo M/H	17/15	20/20	NS
IMC	25.21 ± 4.8	28.53 ± 3.9	0.003
TAS	123.8 ± 22	123.11 ± 19	0.889
TAD	79.63 ± 13	74.22 ± 8	0.056
Glucosa (mg/dL)	90.1 ± 29	104.4 ± 35	0.102
Ácido úrico (mg/dL)	7.2 ± 1.6	5.5 ± 1.3	0.000
Colesterol total (mg/dL)	186.90± 45	195.10 ± 36	0.467
Colesterol HDL (mg/dL)	44.0 ± 13	46.9 ± 13	0.404
Triglicéridos (mg/dL)	167.61 ± 75	175.65 ± 81	0.704
MDRD ml/min/1.73m²	51.7 ± 8*	86.8 ± 3.8*	0.000
CKD-EPI ml/min/1.73m²	50.5 ± 6.9*	85.5± 3.2*	0.000
Proteinuria de 24h mg	2986.6 ± 0.38**		
PrU/CrU g/g	1.6 ± 0.3		

M: mujer, H: hombre, IMC: índice de masa corporal, TAS: presión arterial sistólica, TAD: presión arterial diastólica, MDRD: ecuación del estudio Modification of Diet in Renal Disease, CKD-EPI: ecuación de Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration, NS: Chi cuadrada sin significancia estadística. * Error estándar. ** Escala log 10.

La función renal en ambos grupos se estimó de acuerdo a las formulas MDRD y CKD-EPI [62, 63]. Se observó que el grupo de estudio tuvo una diferencia estadísticamente significativa en la tasa de filtración glomerular (TFG) calculada respecto del grupo control siendo mayor para éste último con una media de 51.7±8 vs 86.8±3.8 ml/min/1.73m² respectivamente de acuerdo a MDRD y de 50.5± 6.9 vs 85.5± 3.2 ml/min/1.73m² de acuerdo a CKD-EPI respectivamente.

El grupo de estudio mostró heterogeneidad en cuanto a los diagnósticos de enfermedades de base, las enfermedades más frecuentemente asociadas a proteinuria en la población estudiada fueron las que se describen en la Tabla 2. La hipertensión arterial sistémica fue un diagnóstico frecuente estando presente en 8 pacientes correspondiendo a un 25% de las muestras en el grupo de estudio.

Tabla 2. Diagnósticos de los sujetos del grupo de estudio.

Característica	N (%)
Enfermedad de base conocida	
Lupus eritematoso sistémico	3 (9)
SAAF	1 (3)
HAS	8 (25)
DM2	3 (9)
Malformación Congénita cardíaca	4 (12.5)
EPRAD	1 (3)
Amiloidosis	1 (3)
Nefropatía membranosa	2 (6)
GMN post-infecciosa	1(3)
Pacientes con diagnóstico por biopsia	15 (46)
GMN lúpica	3
GEFyS	3
GEGyS	3
GMN Membranosa	2
Amiloidosis	1
Esclerosis nodular	1
GMN post-infecciosa	1

SAAF: síndrome de anticuerpos antifosfolípido; HAS: hipertensión arterial sistémica; DM2 diabetes mellitus tipo 2; EPRAD: enfermedad poliquística autosómica dominante; GMN: glomerulonefritis; GEFyS glomeruloesclerosis global y segmentaria; GEGyS: glomeruloesclerosis global y segmentaria.

Tabla 3. Tratamiento de sujetos del grupo de estudio.

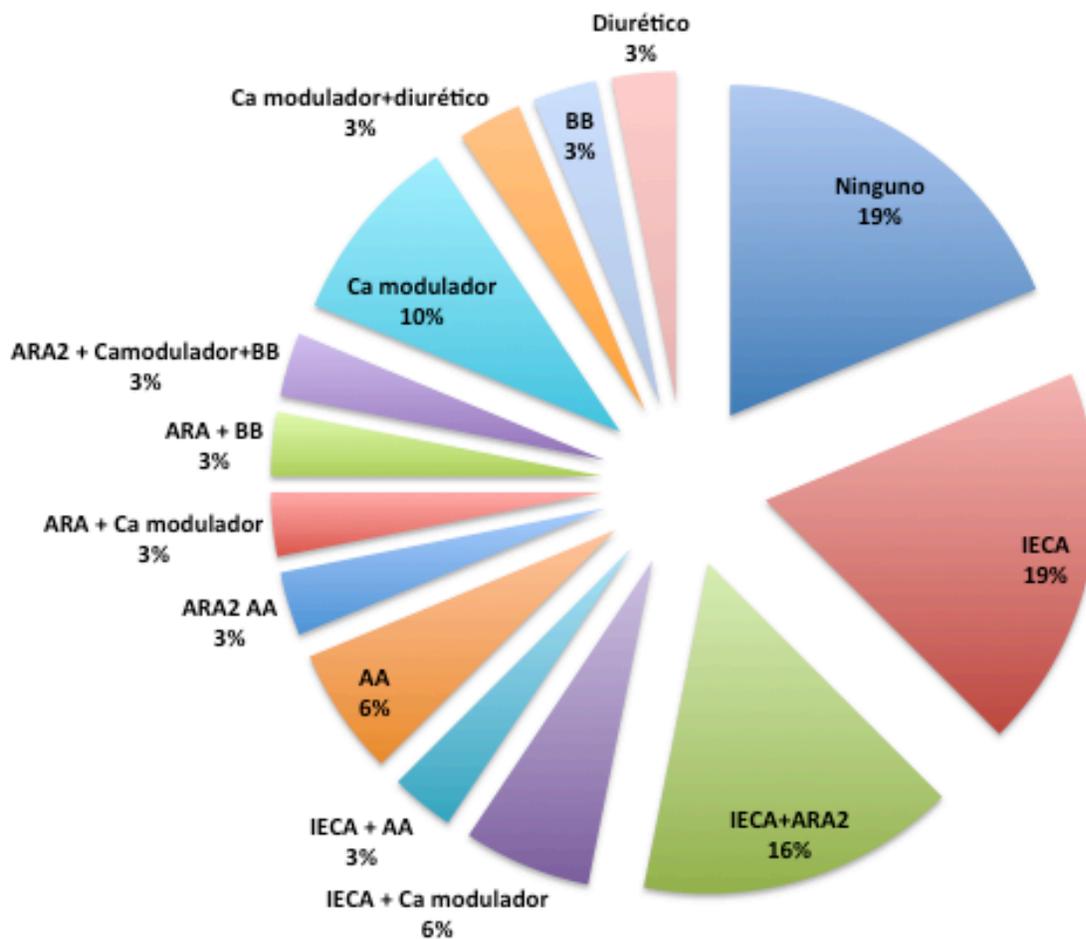
Tratamiento	N (%)
Antihipertensivos	
IECA	15 (46%)
ARA2	9 (28%)
Ca Modulador	7 (21%)
BB	3 (9%)
AA	3 (9%)
Ninguno	6(19%)
Otros	
Alopurinol	7(21%)
Aspirina	5(15%)
Diurético	6 (18%)
Acenocumarina	3(9%)
Insulina	2(6%)
Glibenclamida/metformina	1(3%)
Azatioprina	1(3%)
Digoxina	1(3%)

IECA: inhibidor de enzima convertidora de angiotensina, ARA2: antagonista de receptores de angiotensina, BB: betabloqueador; AA antagonista de receptores de aldosterona.

El tratamiento farmacológico se muestra en la Tabla 3, se observa un predominio de medicamentos que interfieren con el sistema renina angiotensina (SRA) y de éstos medicamentos el IECA forma parte del tratamiento de casi de la mitad de los pacientes. De los medicamentos no antihipertensivos, casi una quinta parte de los pacientes estaba siendo tratado con alopurinol, el resto de los medicamentos no antihipertensivos que se anotan en la tabla no excedieron en frecuencia al 20% en los pacientes estudiados. Una quinta parte de los sujetos no tenía tratamiento

antihipertensivo, una quinta parte IECA solo y el 16% tuvo doble bloqueo del SRA. El resto de las combinaciones de tratamientos antihipertensivos se muestran en la Grafica 1.

Grafica 1. Tratamiento antihipertensivo en el grupo control.



BB: Beta-bloqueador, IECA: Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, ARA2: bloqueador de receptor de angiotensina 2; AA: antagonista de receptor de aldosterona, Ca modulador: calcio modulador.

Tabla 4. Parámetros HDL

	Grupo Estudio	Grupo Control	Prueba T (p)
	Valor ± DS	Valor ± DS	
Lípidos de HDL.			
COL-HDL (mg/dL)	44.0 ± 13.1	46.9 ± 13.4	0.404
TG-HDL (mg/dL)	21.7 ± 9.9	36.0 ± 17.5	0.000
Ph-HDL (mg/dL)	72.0 ± 26.5	131.4 ± 31.7	0.000
Subclases de HDL			
CT-HDL 2b (mg/dL)	13.2 ± 4.7	6.4 ± 4.1	0.000
CT-HDL2a (mg/dL)	4.9 ± 1.4	3.0 ± 1.7	0.000
CT-HDL 3a (mg/dL)	8.8 ± 2.8	6.2 ± 3.2	0.003
CT HDL 3b (mg/dL)	5.6 ± 2.7	4.0 ± 1.74	0.024
CT HDL 3c (mg/dL)	11.7 ± 5.5	5.4 ± 2.3	0.000
Proteína HDL 2b (%)	21.6 ± 8.5	15.3 ± 5.6	0.002
Proteína HDL 2a (%)	10.7 ± 3.6	8.7 ± 1.8	0.018
Proteína HDL 3a (%)	22.6 ± 7.0	24.0 ± 2.7	0.352
Proteína HDL 3b (%)	14.4 ± 4.8	20.6 ± 2.9	0.000
Proteína HDL 3c (%)	22.8 ± 8.6	31.8 ± 7.3	0.000

COL-HDL: colesterol de HDL, TG-HDL: triglicéridos de HDL, Ph-HDL: fosfolípido de HDL, CT-HDL: colesterol total de HDL.

Los resultados de las determinaciones de la composición de subclases de HDL se muestran en la Tabla 4. Se observa que no existieron diferencias estadísticamente significativas en el colesterol-HDL entre ambos grupos. Tampoco se observó diferencia entre grupos en la proporción relativa de las subclases HDL 3a determinada por proteína. El resto de los parámetros de las subclases de HDL

determinados en este estudio fueron diferentes entre el grupo de pacientes y los controles. La determinación de colesterol total de la subclase HDL 3b alcanzó significancia estadística en el grupo de paciente. De la misma forma, el porcentaje de proteína HDL 2a alcanzó significancia estadística con un valor de $p=0.018$ con un porcentaje de proteína mayor en el grupo de estudio (10.7 ± 3.6 mg/dL) que en el grupo control 8.7 ± 1.8 mg/dL.

En la Tabla 4 observamos de forma interesante que la concentración del colesterol de las HDL3c en el grupo de pacientes es más del doble de la observada en los controles. Por otra parte, también se observa, que la proporción relativa de la subclase HDL3c determinada por proteína es un 28% mas baja que los controles.

Para establecer la posible correlación entre la proteinuria y función renal con la distribución de tamaños HDL y la concentración plasmática de las subclases de estas lipoproteínas, realizamos un análisis de correlación simple. Los resultados se presentan en la Tabla 5. Se encontró una asociación lineal inversamente proporcional entre los porcentajes de proteína de las HDL más pequeñas (3a, 3b y 3c) y el grado de proteinuria que fue estadísticamente significativa. De la misma forma, se estableció una relación directamente proporcional de las mismas subclases con la tasa de filtración glomerular con significancia estadística.

Tabla 5. Correlación de Pearson.

	PrU 24h R/P	MDRD R/P	CKD-EPI R/P
Lípidos de HDL totales.			
COL-HDL (mg/dL)	-0.140/ 0.505	0.051/0.695	0.076/0.559
TG-HDL (mg/dL)	-0.045/0.821	0.328** /0.008	0.361**/ 0.003
Ph-HDL (mg/dL)	0.056/0.778	0.311*/ 0.012	0.356**/ 0.004
Subclases de HDL			
CT-HDL 2b (mg/dL)	0.046/0.838	-0.211/0.132	-0.240/0.087
CT-HDL 2a (mg/dL)	-0.048/0.831	-0.169/ 0.231	-0.173/ 0.219
CT-HDL 3a (mg/dL)	-0.088/0.696	-0.153/ 0.280	-0.131/ 0.356
CT HDL 3b (mg/dL)	-0.272/0.220	-0.220/ 0.118	-0.191/ 0.176
CT HDL 3c (mg/dL)	-0.298/0.178	-0.394**/ 0.004	-0.373**/0.006
Proteína HDL 2b (%)	-0.333/ 0.097	-0.039 /0.769	-0.061/ 0.648
Proteína HDL 2a (%)	-0.373/ 0.060	0.082/ 0.541	0.097/ 0.468
Proteína HDL 3a (%)	-0.482*/ 0.013	0.313*/ 0.017	0.373**/ 0.004
Proteína HDL 3b (%)	-0.533**/ 0.005	0.390**/ 0.002	0.443**/ 0.000
Proteína HDL 3c (%)	-0.543**/ 0.004	0.307*/ 0.019	0.334*/ 0.010

** . La correlación es significativa al nivel de 0.01 (2-colas). * . La correlación es significativa al nivel de 0.05 (2-colas).

11 Discusión

En este trabajo se logró documentar la composición de subclases de HDL en pacientes con diferentes grados de proteinuria. Cabe mencionar que hasta el momento no existen estudios respecto a la forma en que se alteran las subclases de HDL en presencia de diferentes grados de proteinuria en pacientes.

Se observó que enfermedades inflamatorias, malformaciones cardiovasculares congénitas, defectos genéticos congénitos y eventos infecciosos previos fueron causa de proteinuria en el grupo estudiado (Tabla 2). Del grupo de pacientes que acuden regularmente a nuestro centro con enfermedades nefrológicas con algún grado de proteinuria, las intervenciones antiproteinúricas suelen ser tempranas, dentro de las estrategias que se emplean de acuerdo a la enfermedad que cause proteinuria se encuentran el empleo de esteroides, estatinas, antihipertensivos y en algunas ocasiones citotóxicos e inmunosupresores.

Dado que la intención en éste proyecto era reunir a un grupo de pacientes que no tuvieran tratamientos farmacológicos que intervinieran con las vías metabólicas de las lipoproteínas previamente en éste trabajo [4, 5, 8, 9, 12-15], así como a que el propósito del estudio no estaba relacionado con la etiología de la proteinuria, se logró tener un grupo de pacientes con proteinuria de que osciló de un grado subnefrótico a un grado nefrótico.

Al comparar ambos grupos, observamos que la diferencia de edades tiene un valor estadísticamente significativo. A éste respecto debe mencionarse que la

edad avanzada es un factor riesgo por sí solo de deterioro e la función renal, lo que se observó en el grupo control. Podemos considerar por lo tanto que esto fue una ventaja a favor de nuestro estudio.

11.1 Hipertensión

Se sabe que uno de principales factores que contribuye a incrementar el grado de proteinuria es hipertensión arterial sistémica (HAS), múltiples estudios han demostrado que el control de HAS tanto mediante medias farmacológicas como no farmacológicas disminuyen el grado de proteinuria. En nuestro grupo estudiado tanto la presión arterial sistólica como la diastólica no mostró diferencias estadísticamente significativas, en el análisis se observó una tendencia de la presión arterial diastólica mayor en el grupo de estudio que en el grupo control.

11.2 Bloqueo del SRAA

Uno de los mecanismos antiproteinuricos más potentes que ha mostrado eficacia clínica en múltiples estudios es el empleo de medicamentos inhibidores del SRAA. Es importante mencionar que en nuestro grupo de pacientes la inhibición de tal sistema tuvo lugar con diferentes combinaciones de como se observa en la Grafica 1.

Dado que nuestro estudio tuvo como objetivo únicamente identificar la composición de subclases de HDL en presencia de proteinuria sin tomar en cuenta la intensidad y la eficacia de bloqueo de tal sistema, no se llevó a cabo un análisis estadístico para ajustar el impacto de tal bloqueo en la composición de subclases

de HDL. Por otra parte, se propone la realización de ulteriores estudios encaminados a investigar tal efecto incluyendo pacientes con diferentes esquemas antihipertensivos en poblaciones determinadas.

11.3 Proteinuria y subclases de HDL

Los resultados de los estudios llevados a cabo en el grupo de pacientes muestran datos de sumo interés. Como puede observarse en la Tabla 4 titulada Parámetros de HDL, donde se muestra la comparación de los resultados de la población estudiada, llama la atención la alteración de los componentes de las subclases de las lipoproteínas en el grupo de pacientes con proteinuria.

Al inicio de este estudio, planteamos la posibilidad de que las HDL de menor tamaño se eliminaran más rápido del compartimiento plasmático por aumento de la permeabilidad de la membrana glomerular. En efecto, la distribución de tamaños de las HDL determinada por proteína se desplaza hacia las partículas de mayor diámetro tipo 2b y 2a, y las subclases de menor tamaño son menos abundantes en comparación con los controles. Este resultado sugiere que las partículas HDL más pequeñas se eliminan con mayor facilidad por filtración glomerular que las grandes. El análisis de correlación refuerza esta observación; el porcentaje relativo de las partículas más pequeñas correlaciona fuertemente y de manera inversa con la proteinuria.

En contraste con lo observado con el contenido de proteína de las partículas HDL (Tabla 4), el colesterol de las subclases de HDL tiene un comportamiento diferente; la concentración de colesterol de todas las subclases es mayor que en el grupo control. Destaca particularmente el valor del colesterol de las HDL3c que es más del doble en comparación con el grupo control. Esta observación asociada al hecho de que la proteína HDL3c está disminuida en los pacientes con enfermedad renal, indica claramente que las HDL pequeñas son poco abundantes probablemente por una mayor eliminación renal pero están más enriquecidas en colesterol. Este hecho se puede interpretar a la luz de la función de las HDL pequeñas en el transporte reverso de colesterol; estas partículas tienen mayor afinidad por el colesterol excedente de las células periféricas, y debido a su alta tasa de eliminación, las partículas HDL3c remanentes son menos abundantes. De esta manera, a menor número de partículas para realizar la remoción del colesterol excedente, las HDL se saturan con este lípido, explicando así el enriquecimiento que observamos en el grupo de pacientes con daño renal. Si esta interpretación es correcta, el eflujo de colesterol en este tipo de pacientes sería insuficiente, favoreciendo la formación de la placa aterosclerosa. Estudios posteriores orientados a demostrar la posibilidad que el eflujo de colesterol pudiera ser ineficiente en los pacientes con enfermedad renal asociada a proteinuria sería el siguiente paso de la presente investigación.

12 Conclusión

En las enfermedades renales que se asocian con proteinuria existe una distribución anormal de tamaños de HDL sesgada hacia partículas de mayor diámetro, y a un enriquecimiento con colesterol de todas las subclases de lipoproteínas HDL, particularmente de las de menor tamaño como son la HDL3b y la HDL3c.

13 Bibliografía

1. Secretaría de Salud información epidemiológica de morbilidad 2000. Dirección general de epidemiología.
2. González Chávez A. Consenso Mexicano de resistencia a la insulina y síndrome metabólico. *Rev Mex Cardiol* 1999; 10: 3-19.
3. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002, 106, 3143-3421.
4. Deakin S, Leviev I, Gomaraschi M, Calabresi L, Franceschini G, James RW. Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. *J Biol Chem* 2002; 277: 4301-4308.
5. Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1881-1888.
6. Li XP, Zhao SP, Zhang XY, Liu L, Gao M, Zhou QC. Protective effect of high-density lipoprotein on endothelium-dependent vasodilatation. *Int J Cardiol* 2000; 73: 231-236.
7. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High density lipoproteins inhibit cytokine- induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1987- 1994.

8. Calabresi L, Franceschini G, Sirtori CR, de Palma A, Saresella M, Ferrante P, Taramelli D.. Inhibition of VCAM-1 expression in endothelial cells by reconstituted high-density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 238: 61-65.
9. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouelette BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJ, Genest J Jr, Hayden MR.. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 1999; 22: 336-345
10. Pérez-Méndez O, J Carreón-Torres E, Franco M, Juárez-Oropeza MA. HDL physicochemical characteristics as determinants of their plasma concentrations: what we have learned from thiazolidinediones. En "HDL Cholesterol: Roles, Effects, and Elevation." Frank Columbus, Editor. Nova Science Publishers, Inc. 2009, ISBN: 978-1-60741-767-5
11. Pérez-Méndez O, Álvarez-Salcedo P, Carreón Torres E, Luc G, Arce Fonseca M, de la Peña A, Cruz Robles D, García JJ, Vargas-Alarcón G. Palmitic acid reduces the fractional catabolic rates of HDL apo A-I in vivo: contribution of the surface negative charge. *Clin Chim Acta* 2007; 378: 53-58.
12. Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre- β -migrating high density lipoprotein pathway. *Biochemistry* 1988; 27:25-29.

13. Festa A, Williams K, Hanley AJ, Otvos JD, Goff DC, Wagenknecht LE, Haffner SM.. Nuclear magnetic resonance lipoprotein abnormalities in prediabetic subjects in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Circulation* 2005; 111: 3465-3472.
14. Pérez-Méndez O, Torres-Tamayo M, Posadas-Romero C, Vidaure Garcé V, Carreón-Torres E, Mendoza- Pérez E, Medina Urrutia A, Huesca-Gómez C, Zamora-González J, Aguilar-Herrera B.. Abnormal HDL subclasses distribution in overweight children with insulin resistance or type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 2007; 376: 17-22.
15. Pérez-Méndez O, Espinola-Zavaleta N, Soto-López ME, Carreón Torres E. Gamboa R, Huesca- Gomez C, Reyes PA. Altered flow mediated vasodilatation, low paraoxonase-1 activities, and abnormal high-density lipoprotein subclasses distribution in Takayasu's arteritis. *Circ J.* 2009;73:760-766.
16. Eckardstein A, Huang Y, Assmann G. Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol* 1994; 5: 404–416.
17. Blanche PJ, Gong EL, Forte TM, Nichols AV. Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta*, 1981; 665: 408–419.
18. Warnick GR, McNamara JR, Boggess CN, Clendenen F, Williams PT, Landolt CC. Polyacrylamide gradient gel electrophoresis of lipoprotein subclasses. *Clin Lab Med* 2006; 26: 803-846

19. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Bennett DW. Quantification of plasma lipoproteins by Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Chem* 1991; 37: 377-386.
20. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Bennett DW, Krauss RM. Development of a proton nuclear magnetic resonance spectroscopic method for determining plasma lipoprotein concentrations and subspecies distributions from a single, rapid measurement. *Clin Chem* 1992; 38: 1632–1638.
21. Jeyarajah EJ, Cromwell WC, Otvos JD. Lipoprotein particle analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Lab Med* 2006; 26: 847–70.
22. Carreón-Torres E, Juárez-Meavepeña M, Cardoso-Saldaña G, Gómez CH, Franco M, Fievet C, Luc G, 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.
23. Huesca C, Luc G, Duhal N, Lacroix B, Fruchart J, Pérez-Méndez O. Ciprofibrate increases synthesis and catabolism of HDL apo AI and AII in patients with hypertriglyceridemia (Abstract). *Atherosclerosis suppl* 2004; 5: 64.
24. Huesca-Gómez C, Franco M, Luc G, Montaña LF, Massó F, Posadas-Romero C, Pérez-Méndez O. Chronic hypothyroidism induces abnormal structure of high-density lipoproteins and impaired kinetics of apolipoprotein A-I in the rat. *Metabolism* 2002; 51: 443-450
25. Carreón-Torres E, Rendón-Sauer K, Monter Garrido M, Toledo-Ibelle 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 catabolism. *Clin Chim Acta* 2009; 401: 37-41.
26. Lane JT, Subbaiah PV, Otto ME, Bagdade JD. Lipoprotein composition and HDL particle size distribution in women with non-insulin-dependent diabetes mellitus and the effects of probucol treatment. *J Lab Clin Med* 1991; 118: 120–128.
27. MacLean PS, Bower JF, Vadlamudi S, Green T, Barakat HA. Lipoprotein subpopulation distributions in lean, obese, and type 2 diabetic women: a comparison of African and white Americans. *Obes Res* 2000; 8: 62-70.
28. Otvos JD, Collins D, Freedman DS, Shalurova I, Schaefer EJ, McNamara JR, Bloomfield HE, Robins SJ. Low-density lipoprotein and high-density lipoprotein particle subclasses predict coronary events and are favorably changed by gemfibrozil therapy in the Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial. *Circulation* 2006; 113: 155 –1563
29. Van der Steeg WA, Holme I, Boekholdt SM, Larsen ML, Lindahl C, Stroes ES, Tikkanen MJ, Wareham NJ, Faergeman O, Olsson AG, Pedersen TR, Khaw KT, Kastelein JJ. High-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein particle size, and apolipoprotein A-I: significance for CV risk: the IDEAL and EPICNorfolk studies. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51: 634–642
30. Brousseau ME, Schaefer EJ, Wolfe ML, Bloedon LT, Digenio AG, Clark RW, Mancuso JP, Rader DJ. Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol. *N Engl J Med* 2004; 350:1505- 1515
31. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJ, Komajda M, Lopez-Sendon J, Mosca L, Tardif JC, Waters DD, Shear CL, Revkin JH,

- Buhr KA, Fisher MR, Tall AR, Brewer B; ILLUMINATE Investigators. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med* 2007; 357:2109-2122
32. Garvey WT, Kwon S, Zheng D, Shaughnessy S, Wallace P, Hutto A, Pugh K, Jenkins AJ, Klein RL, Liao Y. Effects of insulin resistance and type 2 diabetes on lipoprotein subclass particle size and concentration determined by nuclear magnetic resonance. *Diabetes*, 2003; 52: 453-642
33. Pérez-Méndez O, Castro G, Fruchart J-C, Luc G: Kinetic and metabolic studies of apo A-I and apo A-II in an hypoalphalipoproteinemic patient. *Eur J Neurology* 1995 Suppl 2; 2: 77.
34. 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.
35. El Khalil L, Majd Z, Bakir R, Pérez-Méndez 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
36. Pietzsch J, Julius U, Nitzsche S, Hanefeld M. In vivo evidence for increased apolipoprotein A-I catabolism in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetes* 1998; 47: 1928-1934.
37. Frénais R, Ouguerram K, Maugeais C, Mahot P, Maugère P, Krempf M, Magot T. High density lipoprotein apolipoprotein AI kinetics in NIDDM: a stable isotope study. *Diabetologia* 1997; 40: 578–583.

38. Saito A, Pietromonaco S, Loo AKC, Farquhar MG. Complete cloning and sequencing of rat Gp330 megalin, a distinctive member of the low density-lipoprotein receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:9725–9729.
39. Rudenko G, Henry L, Henderson K, Ichtchenko K, Brown MS, Goldstein JL, Deisenhofer J. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science* 2002; 298:2353–2358
40. Mikhailenko I, Considine W, Argraves KM, Loukinov D, Hyman BT, Strickland DK. Functional domains of the very low density lipoprotein receptor: molecular analysis of ligand binding and acid-dependent ligand dissociation mechanisms. *J Cell Sci* 1999; 112:3269-3281
41. Kozyraki R, Fyfe J, Kristiansen M, Gerdes C, Jacobsen C, Cui S, Christensen EI, Aminoff M, de la Chapelle A, Krahe R, Verroust PJ, Moestrup SK. The intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, is a high-affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein. *Nat Med.* 1999; 5:656- 661.
42. Graversen JH, Castro G, Kandoussi A, Nielsen H, Christensen EI, Norden A, Moestrup SK. A pivotal role of the human kidney in catabolism of HDL protein components apolipoprotein A-I and A-IV but not of A-II. *Lipids* 200; 43:467-470.
43. Fyfe JC, Madsen M, Højrup P, Christensen EI, Tanner SM, de la Chapelle A, He Q, Moestrup SK. The functional cobalamin (vitamin B-12) intrinsic factor receptor is a novel complex of cubilin and amnionless. *Blood* 2004; 103:1573–1579.

44. Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:258A–268A
45. Moestrup SK, Nielsen LB. The role of the kidney in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16: 301-306.
46. Norden AG, Lapsley M, Lee PJ, Pusey CD, Scheinman SJ, Tam FW, Thakker RV, Unwin RJ, Wrong O. Glomerular protein sieving and implications for renal failure in Fanconi syndrome. *Kidney Int* 2001;60:1885–1892
47. 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-F540.
48. 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.
49. Kaysen GA. Lipid and lipoprotein metabolism in chronic kidney disease. *J Ren Nutr* 2009; 19: 73-77
50. Kaysen GA, de Sain-van der Velden MG. New insights into lipid metabolism in the nephrotic syndrome. *Kidney Int Suppl*. 1999 Jul;71:S18-21.
51. Oschry Y, Eisenberg S. Rat plasma lipoproteins: re-evaluation of a lipoprotein system in an animal devoid of cholesteryl ester transfer activity. *J Lipid Res*. 1982 Nov;23(8):1099-106
52. Kaysen GA. Metabolic syndrome and renal failure: similarities and differences. *Panminerva Med*. 2006; 48:151-164.

53. Kaysen GA. Hyperlipidemia in chronic kidney disease. *Int J Artif Organs* 2007; 30:987-992
54. Woollett LA, Spady DK. Kinetic parameters for high density lipoprotein apoprotein AI and cholesteryl ester transport in the hamster. *J Clin Invest.* 1997; 99:1704-1713
55. Monter Garrido M, Carreón-Torres E, Gamboa R, Pérez-Méndez O. Differential effects of pioglitazone and rosiglitazone on the catabolism of HDL-cholesteryl esters in vivo. *J Diabetes* 2009; 1:A257-A258
56. Huesca-Gómez C, Carreón-Torres E, Nepomuceno-Mejía T, Sánchez-Solorio M, Galicia-Hidalgo M, Mejía AM, Montañó LF, Franco M, Posadas-Romero C, Pérez-Méndez O. Contribution of cholesteryl ester transfer protein and lecithin: cholesterol acyl transferase to HDL size distribution. *Endocrin Res* 2004;30:403- 415
57. 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
58. Franco M, Bautista R, Pérez-Méndez O, González L, Pacheco U, Sánchez-Lozada LG, Santamaría J, Tapia E, Monreal R, Martínez F. Renal interstitial adenosine is increased in angiotensin II-induced hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008; 294:F84-F92.
59. Kee P, Caiazza D, Rye KA, Barrett PH, Morehouse LA, Barter PJ. Effect of inhibiting cholesteryl ester transfer protein on the kinetics of high-density

- lipoprotein cholesteryl ester transport in plasma: in vivo studies in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 884-890.
60. Lowry OH, Rosebrough HJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
61. WHO. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 854. Geneva: World Health Organization, 1995.
62. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med.* 1999; 130:461-70.
63. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Greene T, Coresh J; CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2009 May 5; 150(9): 604-12.
64. 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 Jan 30; 412(3-4):292-8.