



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE LA DISMINUCIÓN DE LA MASA RENAL FUNCIONAL SOBRE EL
TRANSPORTE REVERSO DEL COLESTEROL *IN VIVO*”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

PRESENTA

María de Jesús Luna Luna



México, D.F.

2012



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.

Agradecimientos

No tengo palabras para expresar cuanto te amo Señor pero si una vida entera para demostrártelo.

Señor, haz de mí un instrumento de tu paz:

donde haya odio, ponga yo amor,
donde haya ofensa, ponga yo perdón,
donde haya discordia, ponga yo unión,
donde haya error, ponga yo verdad,
donde haya duda, ponga yo la fe,
donde haya desesperación, ponga yo esperanza,
donde haya tinieblas, ponga yo luz,
donde haya tristeza, ponga yo alegría.
Oh, Maestro, que yo no busque tanto
ser consolado como consolar,
ser comprendido como comprender,
ser amado como amar.
Porque dando se recibe,
olvidando se encuentra,
perdonando se es perdonado,
y muriendo se resucita a la vida eterna.

A mis padres que me han enseñado el sentido de la vida y el valor de una familia.

A mis hermanos que son mi gran tesoro.

Gracias Óscar por el apoyo que me has dado pues gracias a ti he podido ver un mañana.

Con todo mi corazón, te digo: Gracias Eli, por todo lo enseñado y las experiencias compartidas, porque hoy puedo llamarte Amiga.

Gracias Luis por los consejos dados, por escucharme, impulsarme y creer en mí, pero sobre todo gracias por recordarme en cada momento la presencia de un Dios amoroso.

A todos mis amigos y personas que han estado presentes a lo largo de este caminar, pues sin ustedes no lo hubiera logrado.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Castellanos Román Luz del Carmen

VOCAL: Profesor: Pedraza Chaverri José

SECRETARIO: Profesor: Pérez Méndez Óscar Armando

1er. SUPLENTE: Profesor: García Escamilla Natividad

2° SUPLENTE: Profesor: Bustamante García Ruth

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA “IGNACIO CHÁVEZ”

ASESOR DEL TEMA: DR. ÓSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ

SUPERVISOR TÉCNICO: M. EN C. JUANA ELIZABETH CARREÓN TORRES

SUSTENTANTE: MARÍA DE JESÚS LUNA LUNA

Índice

Tema	Página
1. Resumen	1
2. Antecedentes	
Lipoproteínas	4
Clasificación de las lipoproteínas	4
Lipoproteínas de alta densidad (HDL)	6
HDL y enfermedad aterosclerosa coronaria	9
Metabolismo de las lipoproteínas	11
Vía Endógena	12
Transporte Reverso del Colesterol: Metabolismo de las HDL	13
Papel del riñón en el metabolismo de las HDL	14
3. Hipótesis	18
4. Objetivos	19
5. Materiales y métodos	
Animales	20
Obtención de muestra	20
Análisis de laboratorio	20
Análisis de urea, depuración y proteinuria	21
Aislamiento y marcado de las HDL con 3H-Colesterol	21
Purificación de las HDL marcadas con ésteres de 3H-colesterol	22
Cinética metabólica de los ésteres de colesterol	22
Análisis estadístico	25
6. Resultados	26
7. Discusión	33
8. Conclusión	40
9. Perspectivas	40
10. Bibliografía	41

ABREVIATURAS

ABCA-1	Transportador de membrana dependiente de ATP
Apo	Apolipoproteína
CETP	Proteína de transferencia de ésteres de colesterol
CE	Colesterol esterificado
C-HDL	Colesterol de HDL
CL	Colesterol libre
CT	Colesterol total
DC	Depuración de creatinina
DM	Diabetes mellitus
EAC	Enfermedad aterosclerosa coronaria
FCR	Tasa fraccional de catabolismo
G	Glucosa
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
KBr	Bromuro de potasio
LCAT	Lecitin colestrol acil transferasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LH	Lipasa hepática
LP	Lipoproteína
LpB	Lipoproteínas que contienen apo B
LPL	Lipasa lipoproteica

PBS-SSI	Solución amortiguadora de fosfatos
pI	Punto isoeléctrico
PLTP	Proteína de transferencia de fosfolípidos
PM	Peso molecular
PR	Tasa de síntesis
Prot	Proteína
Plp	Fosfolípidos
Qm	Quilomicrones
SR-BI	Receptor scavenger clase B tipo I
TG	Triglicéridos
TRC	Transporte reverso del colesterol
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

RESUMEN

La enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC) es la segunda causa de muerte en nuestro país; su incidencia es cada vez mayor a edades más tempranas debido a diversos factores de riesgo de tipo genético, obesidad, sedentarismo y hábitos alimenticios, entre otros. Es por ello, que el diagnóstico precoz y tratamiento de la EAC son indispensables para enfrentar este problema de salud.

En estudios epidemiológicos se ha demostrado una correlación inversa entre la incidencia de desarrollar EAC y la concentración plasmática de colesterol de HDL (C-HDL). Uno de los mecanismos más importantes que explican la función ateroprotectora de las HDL es su metabolismo intravascular, mejor conocido como Transporte Reverso del Colesterol (TRC). El TRC se puede resumir como el retorno del colesterol excedente de las células periféricas hacia el hígado para su excreción o reciclaje. El TRC es un proceso dinámico en el cual las partículas de HDL sufren una remodelación continua, modificando de esta manera su estructura y composición. El TRC es un ciclo de captación de colesterol que se ve interrumpido por la eliminación de las HDL del compartimento plasmático. El sitio catabólico principal de las HDL se encuentra en el hígado; sin embargo, diversos estudios han postulado que otro sitio catabólico de las HDL está en el riñón, pero el papel de este órgano en el TRC es aún motivo de debate.

En estudios previos de nuestro laboratorio se ha demostrado que la disminución de la masa renal funcional, no altera la tasa de catabolismo de la apo A-I de las HDL, poniendo en controversia el papel del riñón en el catabolismo de estas lipoproteínas. Sin embargo, la disminución de la masa renal funcional se asoció con un incremento de ésteres de colesterol de las HDL.

Para establecer si el riñón es el responsable directo del enriquecimiento de las HDL con ésteres de colesterol, desarrollamos y caracterizamos un modelo animal con disminución de la masa renal funcional al 75% en conejos Nueva Zelanda. En este modelo se demostró un incremento de aproximadamente 40% en la concentración tanto de urea como de creatinina así como una disminución del 60% en la depuración de esta última. A pesar de estos cambios, la permeabilidad glomerular se mantuvo sin cambios en nuestro modelo animal.

En cuanto a la composición de las HDL, se presentó un enriquecimiento de ésteres de colesterol. Para establecer la relación causal entre la disfunción renal y la composición química de las HDL, realizamos el estudio cinético metabólico de los ésteres de colesterol; utilizamos HDL aisladas del plasma de los animales marcadas con ^3H -Colesterol permitiendo su incorporación a las HDL y dando lugar a su esterificación por la lecitina colesterol acil transferasa (LCAT).

Siguiendo el porcentaje de desaparición de la marca radiactiva de los ésteres de colesterol con respecto al tiempo y construyendo el modelo bicompartimental correspondiente, encontramos una disminución en la tasa fraccional de catabolismo de este lípido, mientras que la tasa de síntesis no presentó ninguna alteración. En consecuencia, el balance final de este comportamiento metabólico es una acumulación de ésteres de colesterol en plasma.

Adicionalmente, construimos un modelo multicompartimental que nos permitió determinar los flujos de masa asociados a los ésteres de colesterol en las HDL y en las lipoproteínas que contienen apo B.

No encontramos diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los flujos calculados, sin embargo, el flujo correspondiente a la eliminación de los ésteres de colesterol directamente de las HDL hacia fuera del compartimento plasmático (en donde englobamos al riñón) tiende a incrementar en el grupo de conejos nefrectomizados.

En base a los flujos de masa, calculamos el flujo neto de eliminación de los ésteres de colesterol asociado a las HDL y lipoproteínas que contienen apo B. Nuestros resultados sugieren que existe una disminución del flujo neto de eliminación de ésteres de colesterol de las HDL y un incremento en la eliminación de las lipoproteínas que contienen apo B. Sin embargo, las diferencias numéricas entre los grupos no alcanzaron significado estadístico.

En resumen, nuestro modelo de disminución de masa renal funcional tiene como efecto una reducción de casi el 50% de la tasa fraccional de catabolismo de los ésteres de colesterol en plasma, sin modificaciones en la tasa de síntesis, provocando la acumulación de este lípido en plasma. Nuestros resultados no alcanzan a explicar la acumulación de este lípido en las HDL pues no encontramos una disminución estadísticamente significativa de la salida de los ésteres de colesterol de las HDL vía directa (que comprende al SR-BI, ATPasa ectópica,

receptor Apo B/E y en donde estaría ubicado el riñón). Por lo anterior, la perspectiva inmediata que genera el presente estudio es incrementar el número de animales de experimentación con la finalidad de establecer con certitud la etiología metabólica del incremento de este lípido en las HDL.

ANTECEDENTES

Lipoproteínas

Los lípidos son biomoléculas relativamente insolubles en medios acuosos, debido a esto, para ser transportados en la sangre, desde su lugar de síntesis hasta su destino final en donde llevarán a cabo su función, se asocian con otras moléculas de carácter anfipático generando estructuras conocidas como lipoproteínas (Figura 1).

Las lipoproteínas son complejos macromoleculares pseudomicelares, constituidos en la superficie por fosfolípidos y colesterol libre (lípidos anfipáticos), y por colesterol esterificado y triglicéridos (lípidos hidrófobos) en su núcleo. Este complejo lipídico es estabilizado por la presencia de proteínas conocidas como apolipoproteínas, que se unen por interacciones hidrofóbicas a los lípidos, debido a que las proteínas poseen dominios de diferentes polaridades, pueden interactuar selectivamente con los lípidos que conforman las lipoproteínas, favoreciendo la estabilidad fisicoquímica de la partícula^{1,2}. La función de estas apolipoproteínas es de tipo estructural, actuando como ligandos de receptores y como cofactores de enzimas del metabolismo de los lípidos.

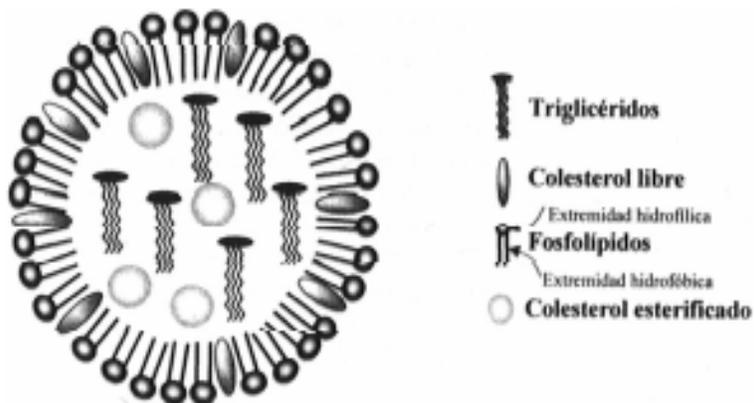


Figura 1.- Representación esquemática de los lípidos de una lipoproteína. Las apolipoproteínas (no ilustradas) se unen por interacciones hidrofóbicas a los lípidos más externos y por atracciones electrostáticas a los fosfolípidos para estabilizar a la pseudo-micela lipídica.

Clasificación de las lipoproteínas

La composición y características de las lipoproteínas son muy variables ya que dependen de su origen y metabolismo. De esta manera, se han clasificado de acuerdo a su densidad de flotación (clasificación más aceptada)^{1,2}, y a su movilidad electroforética (Cuadro 1). En

función de su contenido en apolipoproteínas, se conocen dos poblaciones: las lipoproteínas que contienen apo A-I, dentro de las cuales se encuentran las HDL, y las lipoproteínas que contienen apo B, en donde ubicamos a las VLDL (Very Low Density Lipoproteins), IDL (Intermedie Density Lipoproteins), LDL (Low Density Lipoproteins) y Qm (Quilomicrones).

Cuadro 1. Clasificación de las lipoproteínas en base a su densidad de flotación y movilidad electroforética

Lipoproteína (Lp)	Densidad de flotación (g/mL)	Composición	Movilidad electroforética	Tamaño (nm)
Quilomicrones (Qm)	< 0.94	Alto contenido en Tg Apo: B-48, A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E. Son las Lp de mayor tamaño y las menos densas	Origen	> 70
Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) “Very Low Density Lipoproteins”	0.94 < d < 1.006	Principalmente Tg Apo: B-100, C-I, C-II, C-III y E.	Pre-beta	30-70
Lp de densidad intermedia (IDL) “Intermedie Density Lipoproteins”	1.006 < d < 1.019	Colesterol y Tg Apo: B-100, C-I, C-II, C-III y E.	Pre-beta	20-30
Lipoproteínas de baja densidad (LDL) “Low Density Lipoproteins”	1.019 < d < 1.063	Alto contenido en colesterol y apo B-100.	Beta	18-30

Lipoproteínas de alta densidad (HDL) “High Density Lipoproteins”	$1.063 < d < 1.210$ (HDL ₂ : $1.063 < d < 1.120$) (HDL ₃ : $1.120 < d < 1.210$)	Alto contenido en proteínas y fosfolípidos, contienen colesterol. Apo: A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E.	Alfa	5-12
--	---	--	------	------

Apo:Apolipoproteína, Tg:Triglicéridos

Las lipoproteínas se pueden diferenciar con base a su tamaño así como por la proporción de cada componente lipídico y proteico (Cuadro 2), incluso se habla de una posible diferenciación en base a su funcionalidad biológica.

Cuadro 2. Propiedades de las lipoproteínas plasmáticas³

Lp	Tamaño (nm)	Contenido de Prot (%)	Contenido de Plp (%)	Contenido de Tg (%)	Contenido de CL (%)	Contenido de CE (%)
Qm	> 70	1 - 2	3 - 6	90 - 95	1 - 3	2 - 4
VLDL	30-70	6 - 10	15 - 20	46 - 65	4 - 8	5
IDL	20-30	20	30	35	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

Lp: Lipoproteína, Prot: Proteína, Plp:Fosfolípidos, Tg:Triglicéridos, CL: Colesterol Libre, CE: Colesterol Esterificado

Lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Las HDL son las lipoproteínas más pequeñas su diámetro varía entre 5 y 12 nm y son las lipoproteínas más densas (Cuadro 1). Como puede observarse en el cuadro 2 presentan dos especies de colesterol: el colesterol libre (CL) y el colesterol esterificado (CE). Denominamos colesterol libre (CL) al colesterol no esterificado pues el hidroxilo en posición 3 del colesterol puede ser esterificado al reaccionar con un ácido graso, haciendo entonces referencia a un éster de colesterol (CE). La importancia de la identificación de

ambas especies radica en el cambio de polaridad que representa en la HDL, y por consiguiente, en la localización del colesterol dentro de la lipoproteína (Figura 2).

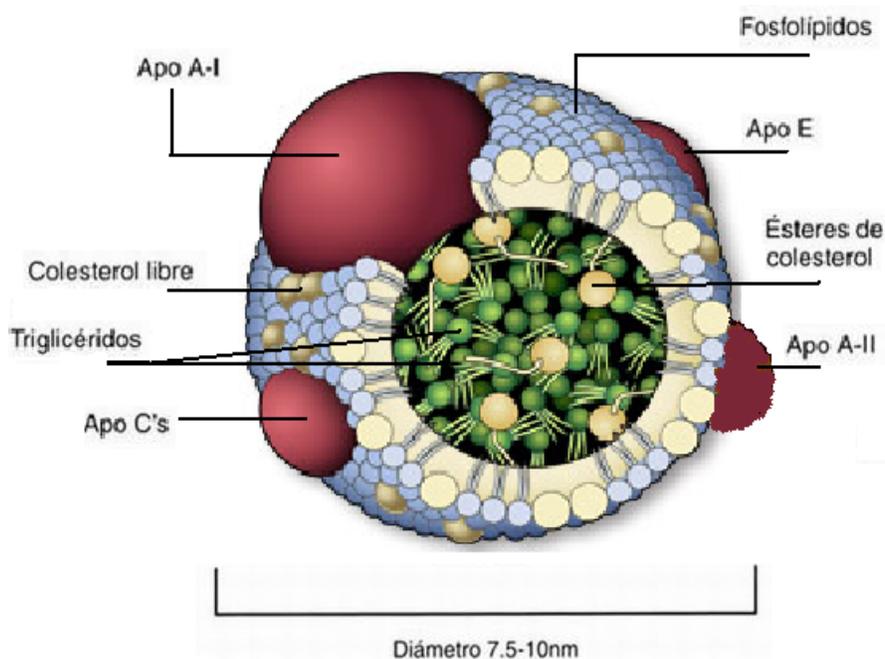


Figura 2 .- Representación esquemática de la estructura de las HDL

Las HDL tienen un contenido proteico que va del 45-55% de su masa seca, siendo de esta manera, las lipoproteínas con mayor proporción proteica. La apo A-I es característica de las HDL y representa hasta un 70% del total de su proteína constitutiva^{4,5}. Otras proteínas de las HDL son las apo A-II, C-I, C-II, C-III y E, cuyas características se presentan en el Cuadro 3. Los grupos ionizables de los aminoácidos presentes en estas apolipoproteínas aportan a las lipoproteínas plasmáticas una carga generalmente negativa a pH fisiológico, lo que les permite interactuar con las regiones ionizables de los fosfolípidos hacia la interface lípido-agua estabilizando la partícula⁶. El valor de carga de superficie no es estático, pues la proporción de las apolipoproteínas presentes en las HDL es variable y dependerá de la cantidad y naturaleza de los fosfolípidos⁷.

Cuadro 3.- Características de las apolipoproteínas⁸

Apo	P.M.	pI	Localización	Sitio de síntesis	Función
A-I	29,016	5.9-5.4	HDL, Qm	Intestino Hígado	Principal componente de las HDL, activador de LCAT, estimula el eflujo del colesterol.
A-II	14,414	5.0	HDL	Intestino Hígado	Proteína componente de HDL, inhibidor de LH y de la LCAT.
A-IV	44,465	5.5	HDL, Qm	Intestino	Activador de LCAT, modulador de LPL y estimula el eflujo del colesterol.
B-100	512,723	-	VLDL, LDL	Hígado	Ligando para receptor de LDL
B-48	240,800	6.8	Qm	Intestino	Proteína estructural de los Qm.
C-I	6,630	7.5	HDL, VLDL, Qm	Hígado	Activador de LCAT, inhibe la captación hepática de Tg.
C-II	8,900	4.9	HDL, VLDL, Qm	Hígado	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	Inhibidor de la LPL
E _{2,3,4}	34,145	6.0-5.7	VLDL, HDL	Hígado	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

En electroforesis, las HDL generalmente migran en la fracción α del plasma, pero existe una subpoblación que migra en la fracción pre- β , conocida como partículas pre- β ⁹: estas lipoproteínas tienen forma discoidal y están compuestas principalmente de fosfolípidos y apo A-I, tienen una masa molecular de alrededor de 60 kDa y flotan a la densidad de las HDL₃, entre 1.12 y 1.21 g/mL.

Las partículas de HDL pueden subclasificarse con base en su densidad de flotación y en su diámetro hidrodinámico. Esta diferenciación está basada en el aislamiento de las HDL del plasma o suero por ultracentrifugación secuencial y separándolas posteriormente por PAGE en condiciones nativas. Mediante este procedimiento se pueden reconocer 5 subpoblaciones de HDL en humanos, las HDL_{2b} con diámetro de 10.58-12.36 nm, HDL_{2a} de 9.94-10.58 nm, HDL_{3a} de 8.98-9.94, HDL_{3b} de 8.45-8.98 nm y las HDL_{3c} de 7.90-8.45 nm. Las HDL₂ son ricas en lípidos hidrofóbicos mientras que las HDL₃ están formadas por fosfolípidos y proteínas principalmente. 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 nm¹¹.

Se ha sugerido que la actividad biológica de estas lipoproteínas es dependiente de su tamaño y características fisicoquímicas^{8,9}.

HDL y enfermedad aterosclerosa coronaria

La enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC) es la primera causa de mortalidad en los países desarrollados, la segunda causa de muerte en la población adulta en nuestro país después de la diabetes mellitus (DM)¹², y se ha demostrado que la EAC tiene sus inicios desde la infancia¹³. 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 para enfrentar acertadamente esta patología.

La EAC se caracteriza por el desarrollo de aterosclerosis que es definida como la infiltración de la íntima con macrófagos cargados de grasa, proliferación de células musculares con fibrosis y reducción de la luz del vaso sanguíneo. Algunas placas pueden llegar a calcificarse. Existe daño endotelial y predisposición para la formación de trombos intravasculares¹⁴.

La EAC puede comenzar como el desarrollo de la placa ateromatosa que comienza con la infiltración de LDL al espacio subendotelial como resultado de una lesión en el endotelio, en donde encuentran un ambiente de estrés oxidativo, dando lugar a la peroxidación de sus lípidos. Las LDL oxidadas son factores quimiotácticos¹⁵ y por lo tanto desencadenan una

respuesta inflamatoria que atrae principalmente monocitos desde el torrente sanguíneo, que atraviesan el endotelio vascular y se diferencian en macrófagos, capaces de fagocitar a las LDL oxidadas. La falta de maquinaria enzimática suficiente para degradar los lípidos y lipoperóxidos tiene como consecuencia la acumulación de éstos en el citoplasma del macrófago, denominándose célula espumosa¹⁶. 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^{17,18}. Las células espumosas constituyen las etapas tempranas de formación del ateroma.

La importancia de la formación del ateroma radica en el estrechamiento del lumen del vaso y, por tanto, la reducción del aporte sanguíneo a órganos como el corazón o el cerebro. La placa aterosclerótica puede presentar una rotura y causar un coágulo sanguíneo que ocluye la circulación, y provocar un episodio vascular isquémico agudo, es decir, infarto o evento vascular cerebral.

Existen varios factores de riesgo asociados al desarrollo de EAC, entre los que destacan la edad, sexo, factores genéticos, hipertensión, obesidad, dislipidemias, resistencia a la insulina y diabetes¹⁹.

Entre las dislipidemias que se asocian a esta enfermedad encontramos a la hipoalfalipoproteinemia (C-HDL < 40 mg/dL). La fuerte correlación negativa entre la concentración C-HDL en plasma y el riesgo de desarrollar EAC observada en los estudios epidemiológicos, afirma la asociación de estos dos parámetros^{20,21}, sin embargo, existen algunas hipoalfalipoproteinemias que no están asociadas al desarrollo de aterosclerosis.

Se ha postulado que las HDL tienen una función protectora en el desarrollo de esta enfermedad, evitando la formación del ateroma por el papel que desempeñan en el transporte reverso de colesterol (TRC). Además, en los últimos años se han descrito otros mecanismos potencialmente antiaterosclerosos para las HDL, como su capacidad antioxidante^{22,23}, el mejoramiento de la función endotelial²⁴ y la regulación de la respuesta inflamatoria^{25,26}.

Metabolismo de las lipoproteínas

La composición de las lipoproteínas plasmáticas se modifica continuamente como resultado del intercambio y la transferencia de lípidos que existe entre ellas durante su metabolismo intravascular. Una gran variedad de enzimas y proteínas de transporte como la lecitina: colesterol acil transferasa (LCAT), la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), la lipasa hepática (LH), la lipasa lipoproteica (LPL), y algunos receptores de membrana como el receptor scavenger clase B tipo I (SR-BI), el transportador de membrana dependiente de ATP (ABC-A1), y el receptor para apolipoproteínas B/E (apo B/E-R), están involucradas en dicho metabolismo. En el cuadro 4 se presentan las características principales de las enzimas y proteínas que intervienen en el metabolismo de las lipoproteínas.

Cuadro 4. Enzimas y proteínas involucradas en el metabolismo de las lipoproteínas^{8,27}

Enzimas		
Nombre	Función	Origen
LCAT	Cataliza la transferencia de un ácido graso proveniente de la lecitina o fosfatidilcolina, al colesterol libre que se encuentra presente en las HDL y en las LDL. Contribuye a la maduración de HDL.	Hepático
LH	Hidroliza los triglicéridos y fosfolípidos de HDL, IDL y LDL. Es cofactor de SR-BI para una captación selectiva, así como la generación de apo A-I libre de lípidos.	Hepático
LPL	Hidroliza los triglicéridos de VLDL y Qm utilizando C-II como cofactor. Favorece la generación de precursores de HDL.	Tejido adiposo y muscular, pared endotelial, pulmón.
CETP	Intercambia ésteres de colesterol por triglicéridos entre las HDL ₂ y lipoproteínas que contienen apo B	Tejido adiposo, hepático, intestino delgado

Receptores y proteínas de membrana		
SR-BI	Receptor para las HDL para intercambiar colesterol entre los hepatocitos y las células	Hepatocito, tejido esteroideogénico
ABC-A1	Modulación del eflujo de colesterol y fosfolípidos. Favorece la maduración de HDL.	Hígado, macrófagos e intestino.
Apo-B/E	Receptor para lipoproteínas que contienen apo B y E. Incrementa el eflujo de colesterol vía hepatocitos.	Hígado

LCAT: Lecitin colesterol acil-transferasa; LH: Lipasa hepática; LPL: Lipasa lipoproteica; CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol; SR-BI: Receptor scavenger clase B tipo I; ABCA-1: Transportador de membrana dependiente de ATP clase A, tipo 1; Qm: Quilomicrones; VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad; IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia; LDL: Lipoproteínas de baja densidad; HDL: Lipoproteínas de alta densidad.

Se conocen tres mecanismos por los cuales se modula el tráfico intracelular de los lípidos de las lipoproteínas: la vía exógena, a partir de los lípidos aportados por la dieta, en donde son los quilomicrones los que juegan un papel esencial. La vía endógena, a partir de la síntesis hepática de VLDL y el transporte reverso del colesterol, donde participan las HDL.

Vía endógena

Las VLDL son sintetizadas en el aparato de Golgi de los hepatocitos a partir del ensamblaje de ácidos grasos, glicerol, y una baja cantidad de colesterol, proveniente de la lipólisis del tejido adiposo. Éstas son liberadas hacia la circulación, donde maduran al captar ésteres de colesterol, apo B100, C-II, C-III y E, cedidas por las HDL. Las partículas VLDL posteriormente interactúan con la lipasa lipoproteica (LPL) del endotelio vascular, que utiliza apo C-II como cofactor para hidrolizar esta lipoproteína. La interacción de las VLDL con la LPL genera ácidos grasos libres a partir de triglicéridos y a su vez se transfiere apo C y apo E a las HDL. El remanente de la VLDL después de la hidrólisis corresponde a una IDL que pueden seguir tres caminos: a) pueden ser captadas por el hígado a través del receptor apo B/E; b) pueden seguir disminuyendo su tamaño, ya que sufren hidrólisis de sus triglicéridos restantes hasta convertirse en LDL o, c) pueden ser fagocitadas por macrófagos y monocitos.

Transporte reverso del colesterol: metabolismo de las HDL

El transporte reverso del colesterol (TRC) se define como el regreso del colesterol de las células periféricas al hígado para su excreción o reciclaje, consiste en un intercambio dinámico de componentes lipídicos en torrente sanguíneo (Figura 3). En este proceso el hepatocito secreta partículas pre- β 1 que captan el colesterol excedente de las células periféricas, este eflujo de colesterol se lleva a cabo en mayor proporción por medio de la proteína de membrana ABC-A1 presente en el hígado, macrófago e intestino, que utiliza ATP para bombear colesterol y fosfolípidos de manera activa hacia las HDL²⁸.

Una vez que las partículas pre- β 1 captan el colesterol libre se convierten en partículas HDL₃, que son partículas pequeñas, ricas en apolipoproteínas y con pocos lípidos. El colesterol presente en las HDL₃ es esterificado por la enzima plasmática lecitina: colesterol acil transferasa (LCAT). Esta enzima cataliza la transferencia de un ácido graso proveniente de la fosfatidilcolina (lecitina) al colesterol libre presente en las HDL₃. De esta manera, el colesterol pierde su carácter anfipático y como consecuencia, los ésteres de colesterol migran hacia el interior de la HDL, dando lugar a una partícula de mayor tamaño y una menor densidad, denominada HDL₂.

Estos ésteres de colesterol tienen dos vías de eliminación conocidas; la primera es a través de las lipoproteínas que contienen apo B, principalmente VLDL e IDL. En esta vía, los ésteres de colesterol de las HDL₂ son intercambiados por triglicéridos provenientes de las lipoproteínas que contienen apo B mediante la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP). Los triglicéridos contenidos en las HDL₂ son hidrolizados por la lipasa hepática (LH), que en sinergia con la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP), remodelan a las HDL₂ en HDL₃ y en partículas pre- β 1, las cuales pueden incorporarse nuevamente al ciclo de captación de colesterol. La segunda vía de eliminación de los ésteres de colesterol, es a través del receptor hepático SR-BI, el cual, capta e internaliza a las HDL₂, eliminando los ésteres de colesterol y reciclando al exterior del hepatocito una partícula de menor tamaño (HDL₃) que se incorpora una vez más al ciclo.

De esta manera, el colesterol de los tejidos periféricos llega al hígado para ser reciclado o excretado mediante las vías biliares²⁹.

enfermedades renales se encuentran entre las causas de muerte e incapacidad más importantes de muchos países de todo el mundo. La enfermedad renal crónica y el síndrome nefrótico son dos de las afecciones más frecuentes del riñón.

La insuficiencia renal crónica es consecuencia de la pérdida irreversible de un gran número de nefronas funcionales. En general, hasta que el número de nefronas funcionales no disminuye por debajo de un 70%, no aparecen los síntomas clínicos graves. Entre las causas más importantes de insuficiencia renal crónica están los trastornos metabólicos (diabetes mellitus), trastornos vasculares renales (aterosclerosis, hipertensión) y trastornos inmunológicos (glomerulonefritis, lupus eritematoso), entre otros.

Muchos pacientes con enfermedades renales desarrollan síndrome nefrótico, que se caracteriza por la pérdida de grandes cantidades de proteínas plasmáticas en la orina. La causa de la pérdida de proteínas por la orina es el aumento de la permeabilidad de la membrana glomerular. Por tanto, cualquier enfermedad que aumente la permeabilidad de esta membrana puede dar lugar a un síndrome nefrótico.

Diversos estudios han demostrado que los pacientes con un compromiso renal presentan un elevado riesgo cardiovascular, estableciendo que es posible emplear los niveles de albuminuria como marcadores de riesgo independiente para el desarrollo de EAC³¹⁻³⁵. La enfermedad renal está asociada con una aterosclerosis acelerada y por consecuencia, con una muerte prematura por enfermedad cardiovascular. Estos efectos se deben a que el síndrome nefrótico y la enfermedad renal crónica se asocian con desórdenes en el metabolismo de las HDL y de las lipoproteínas ricas en triglicéridos, así como con modificaciones oxidativas de las LDL. Entre las anomalías lipoproteicas observadas, destaca la disminución significativa de las concentraciones plasmáticas de apo A-I y apo A-II en pacientes con falla renal crónica^{36,37}. En vista de que la apo A-I es la proteína principal de las HDL, su deficiencia contribuye a la reducción plasmática de estas lipoproteínas.

Por otra parte, la concentración y actividad de la LCAT se encuentra marcadamente disminuida, alterando la tasa de esterificación del colesterol presente en las HDL. Además del SR-BI se ha descrito otro receptor hepático, endocítico de HDL; se trata de la subunidad

β de la ATP5a que se ubica de manera ectópica en la membrana del hepatocito³⁸ y contribuye a la depuración plasmática de las HDL.

La participación del riñón en el metabolismo de las HDL también se ha deducido de estudios realizados con células en cultivo, modelos de nefrosis y nefrectomía en animales. La megalina y la cubilina son dos receptores tubulares que reconocen a diferentes apolipoproteínas como ligandos. La megalina es una glicoproteína de aproximadamente 500 kD, pertenece a la familia del receptor LDL³⁹, es expresada en el pulmón, el saco vitelino y en mayor proporción en la membrana de células epiteliales del glomérulo y en el túbulo proximal. En estudios *in vitro*, la megalina se une a múltiples ligandos, entre ellos, a las VLDL enriquecidas con apo E^{40,41}, de igual manera tiene afinidad por la apo B.

Por otra parte, la cubilina es una proteína de 460 kDa, tiene analogía con el receptor de las LDL y en unión con la proteína AMN reconoce a la apo A-I e induce su internalización al citoplasma de la célula del epitelio tubular. La proteína AMN (por su denominación en inglés “amnioless”) es una proteína transmembranal de 45 kDa, que forma un complejo de gran tamaño con la cubilina en donde esta última reconoce a los ligandos y la AMN participa en el transporte y expresión de la cubilina en la membrana externa de la célula.

A pesar de la presencia de megalina y cubilina en túbulo renal, no se ha podido establecer con claridad el papel del riñón en el metabolismo de las HDL a partir de la patología renal en el humano. Por esta razón, se han desarrollado modelos animales que han permitido mejorar la comprensión acerca del papel del riñón en el metabolismo y estructura de las HDL.

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 túbulos renales⁴². Estos resultados son consistentes con un aumento del colesterol HDL en este modelo de ratas nefróticas, y también con la disminución del catabolismo de las HDL en conejos con nefrectomía de un riñón⁴³. Cabe señalar, que existen algunas limitaciones a las conclusiones que se derivan de las observaciones hechas en los modelos de nefrosis; una de éstas es que los modelos de nefrosis en rata no mimetizan el metabolismo de las HDL del humano con falla renal^{42,44,45},

debido que la rata no expresa CETP⁴⁶, proteína que juega un papel central en el metabolismo de las HDL. En este sentido, un modelo animal que es más parecido al humano en cuanto al metabolismo intravascular de lipoproteínas es el conejo. Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que la disminución de la masa renal funcional en conejos tiene un impacto mínimo en la eliminación de apo A-I de las HDL. Sin embargo, en este modelo animal se observó un enriquecimiento en el contenido de ésteres de colesterol de estas partículas. Dicho enriquecimiento no tuvo relación con la actividad LCAT ya que no se encontraron diferencias significativas entre los conejos nefrectomizados y los controles. Con base en estos hallazgos, se puede postular una posible alteración de la vía directa de eliminación de los ésteres de colesterol-HDL que involucraría al receptor SR-BI y al receptor apo B/E principalmente como consecuencia de la disminución de masa renal funcional.

HIPÓTESIS

Si el riñón tiene un papel importante en el catabolismo de los ésteres de colesterol de las HDL, entonces una reducción de la masa renal ocasionará un decremento de su eliminación del compartimento plasmático incrementando su concentración..

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto que tiene la disminución de la masa renal funcional sobre el catabolismo de los ésteres de colesterol de las HDL en un modelo de conejo parcialmente nefrectomizado.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar un modelo animal con nefrectomía parcial al 75% en conejos macho Nueva Zelanda
- Determinar el efecto de la disminución de la masa renal funcional sobre la cinética metabólica de los ésteres de colesterol asociados a las HDL, utilizando un isótopo radiactivo como marcador de dichos ésteres

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron conejos macho Nueva Zelanda de 3-3.5 kg, formando dos grupos de estudio, el grupo nefrectomizado (n=6) y el grupo control (n=6).

Al grupo nefrectomizado, se le practicó una nefrectomía al 75%, que consiste en la eliminación de un riñón completo y la mitad del otro por intervención quirúrgica. Con la finalidad de poder comparar ambos grupos, el grupo control fue sometido a las cirugías simuladas correspondientes⁴⁷. Para ambos grupos se indujo la anestesia general con una combinación de xilacina, 1 mg/kg vía intramuscular e isoflurano inhalado al 2%. En la primera cirugía se redujo la masa renal funcional infartando aproximadamente un 50% del riñón izquierdo mediante el ligamiento de una de las ramas de la arteria renal, asegurando que el uréter quedara libre. En la segunda cirugía, realizada dos semanas después, se extirpó el riñón derecho completamente. En ambos grupos se utilizó como analgésico buprenorfina 30 µg/kg y como antibiótico enrofloxacin 10 mg/kg, ambos por vía intramuscular.

Ambos grupos consumieron alimento estándar y agua *ad libitum*.

Obtención de muestras

Las muestras sanguíneas se obtuvieron por punción arterial de las orejas (o punción venosa para el estudio cinético metabólico), después de un ayuno de 4 horas, en tubos con heparina como anticoagulante. Las muestras se centrifugaron a 1715 g durante 15 minutos, al término de este tiempo se separó el plasma. Las HDL se aislaron de plasma fresco. En los casos en los que no se empleó plasma fresco, éste fue almacenado a -20°C hasta el momento de su análisis.

Análisis de laboratorio

Las concentraciones plasmáticas de colesterol total, colesterol libre, triglicéridos y glucosa se cuantificaron mediante métodos enzimáticos colorimétricos comerciales. Las concentraciones de lípidos asociados a las HDL se determinaron ajustando la densidad de

las muestras de plasma a 1.063 g/mL y ultracentrifugando a 435 680 g durante 2.5 h a 10°C con la finalidad de separar a las lipoproteínas que contienen apo B y cuantificar su concentración de las diferentes especies de colesterol. Se cuantificó la concentración de colesterol total, colesterol libre, triglicéridos y fosfatidilcolina por métodos enzimáticos colorimétricos en el resto del plasma que contiene a las HDL, corrigiendo los datos obtenidos por las diluciones realizadas. La concentración de ésteres de colesterol se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Colesterol Esterificado} = (\text{Colesterol total} - \text{Colesterol libre}) \times 1.68$$

Análisis de urea, depuración de creatinina y proteinuria

Se recolectó la orina de 24 horas de ambos grupos de estudio empleando una caja metabólica en diversas ocasiones durante las 6 semanas posteriores a la segunda intervención quirúrgica. Se determinó la concentración de urea y creatinina en plasma y orina, mediante métodos enzimáticos colorimétricos comerciales. La depuración se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Depuración} = \frac{\text{Concentración creatinina en orina (mg/dL)} \times \text{vol orina (mL)}}{\text{Concentración de creatinina plasmática (mg/dL)} \times 1440}$$

En donde el volumen (vol) de orina corresponde al recolectado durante 24 horas y el factor 1440, es el correspondiente a los minutos equivalentes a un día.

La concentración de proteína fue determinada en orina con ayuda de un kit enzimático colorimétrico comercial.

Aislamiento y marcado de las HDL con ³H-Colesterol

En la sexta semana después de la segunda cirugía, se extrajo una muestra sanguínea, se separó el plasma y se ajustó a una densidad de 1.063 g/mL, se ultracentrifugó a 435 680 g por 2.5 h a 10°C y se eliminó la porción correspondiente a las lipoproteínas que contienen apo B, el sobrenadante se dializó en solución amortiguadora de fosfatos (PBS-SSI) pH=7.4. Una vez dializado, al sobrenadante se le adicionó ³H-Colesterol en solución etanólica (12.5 µCi) y se incubó durante 16 h a 37°C para permitir la incorporación y esterificación del colesterol HDL. Al término de la incubación, se separaron las HDL por ultracentrifugación

a una $\rho=1.25$ g/mL según se describió previamente. Se extrajeron las HDL y se dializaron en solución amortiguadora de fosfatos (PBS-SSI) pH=7.4.

Purificación de las HDL marcadas con ésteres de ^3H -colesterol

Después de la diálisis, el colesterol no incorporado a las HDL se separó mediante una columna de Sephadex G-25, recolectando fracciones de 50 μL . A cada una de las fracciones se le determinó la cantidad de colesterol total y proteína para identificar a las HDL marcadas. Las fracciones que presentaron una mayor concentración de ambos parámetros se recolectaron y concentraron por medio de membranas ultrafiltrantes (Amicon Ultra. Ultracel-30K. Millipore. Irlanda). De esta solución se separaron 50 μL para determinar la intensidad de la marca radiactiva en las HDL. El resto de la solución se esterilizó por filtración utilizando un dispositivo con filtro, y la muestra se conservó a 4°C hasta el momento de su uso.

Cinética metabólica de los ésteres de colesterol

El estudio cinético de los ésteres de colesterol se llevó a cabo en la sexta semana después de la segunda intervención quirúrgica por el método descrito por Kee et al, modificado en nuestro laboratorio^{48,49}. Brevemente, después de un ayuno de 4 h, se administró por vía intravenosa la solución de HDL marcadas con ésteres de ^3H -colesterol en la vena marginal de la oreja derecha, enseguida, se obtuvo 1 mL de sangre de la vena marginal de la oreja izquierda a diferentes tiempos correspondientes a los 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240 y 300 min después de la administración, manteniéndolas en frío hasta el momento de su uso. Se tomaron 300 μL de plasma de cada fracción y se ajustaron con KBr sólido a una densidad de 1.063 g/mL, ultracentrifugando a 435 680 g por 2.5 h a 10°C. Posteriormente, se aisló el sobrenadante correspondiente a las lipoproteínas que contienen apo B (VLDL, IDL y LDL), y se determinó su radiactividad, se separaron del infranadante las HDL por ultracentrifugación a $\rho=1.25$ g/mL por 3 horas a 435 680 g y a 10°C, se determinó su radiactividad, utilizando un contador de centelleo

Se construyeron las curvas de decaimiento de la marca radiactiva como porcentaje de radiactividad contra el tiempo, asumiendo como el 100% de radiactividad la suma de las cuentas obtenidas en la fracción correspondiente a las lipoproteínas que contienen apo B y

la fracción de las HDL tomada a los 5 minutos. Con ayuda del programa computacional SAAMII, los datos cinéticos experimentales se ajustaron a un modelo bicompartimental, para determinar la tasa fraccional de catabolismo (FCR) y la tasa de síntesis (PR) (figura 4).

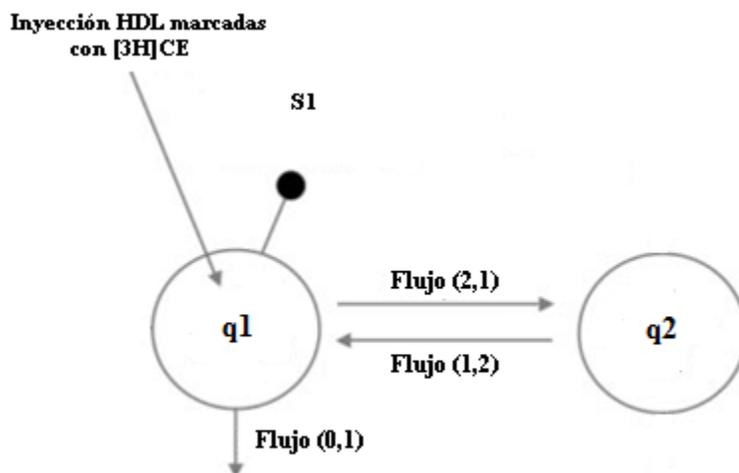


Figura 4.- Modelo bicompartimental para el metabolismo de los ésteres de colesterol plasmáticos. Los círculos representan los compartimentos estándar, y las flechas indican las vías de transporte (flujos). El círculo negro indica la toma de muestra a partir del compartimento central.

A partir de este modelo se calculó la tasa fraccional de catabolismo (FCR) utilizando la siguiente ecuación:

$$y(t) = A1e^{-a1*t} + A2e^{-a2*t}$$

en donde $y(t)$ corresponde a las cuentas presentes en plasma (cpm) como función del tiempo, $a1$ y $a2$ corresponden a las constantes de distribución y eliminación del compartimento central ($q1$) respectivamente, t corresponde al tiempo de muestreo y $A1$ y $A2$ corresponden a la cantidad de cuentas presentes en la fase de distribución y eliminación al tiempo cero.

La tasa fraccional de catabolismo (FCR) se calcula de la siguiente manera:

$$FCR = \frac{y(0) * a1 * a2}{a2A1 + a1A2}$$

La tasa de síntesis de ésteres de colesterol totales en plasma (VLDL/IDL/HDL) se calculó con la siguiente fórmula:

$$PR = \frac{FCR \text{ (pool/h)} * \text{colesterol esterificado plasmático (mg/pool)} * \text{volumen plasmático (L)}}{\text{peso corporal (kg)}}$$

donde “pool” significa la masa total de ésteres de colesterol circulantes en plasma, y el volumen plasmático se consideró como el 3.28% del peso corporal expresado en L⁵⁰.

Se determinaron a continuación los flujos fraccionales a partir del modelo presentado en la figura 5 y se multiplicaron por las concentraciones plasmáticas de ésteres de colesterol de cada fracción para establecer los flujos parciales de masa de los diferentes compartimentos.

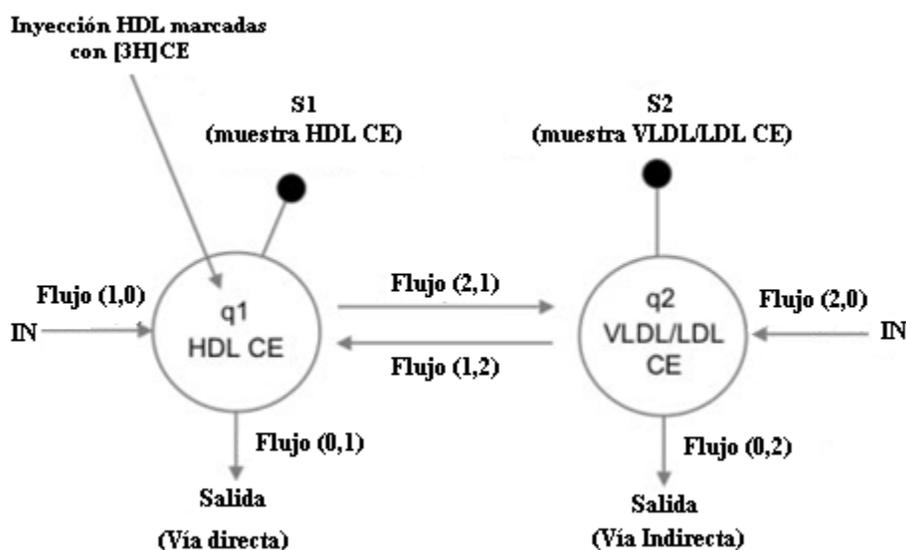


Figura 5.- Modelo multicompartmental para el metabolismo de los ésteres de colesterol(CE) de las HDL en conejos. Los círculos representan los compartimentos estándar, cada uno está identificado por un número. Las flechas representan las vías de transporte (flujos). Los círculos negros representan las muestras de plasma tomadas de cada compartimento.

El flujo neto de eliminación de los ésteres de colesterol por parte de las HDL se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Flujo neto de eliminación de los CE - HDL} = k(0,1) + k(2,1) - k(1,2)$$

donde CE-HDL representa los ésteres de colesterol contenidos en las HDL; k(0,1) es la constante de flujo de ésteres de colesterol desde el compartimento HDL hacia fuera del

plasma (ruta de eliminación directa HDL); $k(2,1)$ indica el flujo del compartimento HDL hacia las VLDL/IDL (ruta de eliminación indirecta VLDL) y $k(1,2)$ indica el flujo del compartimento VLDL al HDL.

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media \pm error estándar. La significancia estadística se consideró a partir de una $p < 0.05$.

La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba estadística t de student. En el estudio cinético se compararon las determinaciones de cada tiempo entre el grupo nefrectomizado y el grupo control. Se utilizó una t de student pareada para comparar la respuesta del animal antes y después de la cirugía.

RESULTADOS

Con la finalidad de caracterizar nuestro modelo de nefrectomía al 75%, se determinaron las concentraciones de urea y creatinina plasmáticas del grupo control y del grupo nefrectomizado. Se utilizaron las muestras sanguíneas antes de las cirugías y 6 semanas después de la segunda intervención. Los resultados de esta caracterización se presentan en la tabla 1.

Tabla 1.- Pruebas de funcionamiento renal en plasma

Metabolito		Antes	Después
Urea (mg/dL)	Ctrl	44.22 ± 3.68	40.40 ± 2.17
	Nx	45.85 ± 2.98	64.07 ± 3.16*
Creatinina (mg/dL)	Ctrl	2.09 ± 0.02	2.03 ± 0.05
	Nx	2.09 ± 0.05	2.99 ± 0.18*

Promedio ± EE. t student pareada *p<0.05 Ctrl: Conejos control Nx: Conejos nefrectomizados

Se presentó un incremento del 40% aproximadamente en la concentración plasmática de urea y creatinina en el grupo nefrectomizado después de la segunda intervención quirúrgica; en el grupo control no se observaron cambios significativos.

Para evaluar la función y posible daño renal, se evaluó la concentración de proteínas en orina y la depuración de creatinina en ambos grupos (tabla 2).

Tabla 2.- Pruebas de funcionamiento renal

Metabolito	Control	Nefrectomizado
Proteínas en orina (g/L)	0.2 ± 0.5	0.2 ± 0.3
DC (mL/min)	5.30 ± 1.05	2.10 ± 0.35*

Promedio ± EE. t student *p<0.05 DC: Depuración de creatinina

Con base en los resultados anteriores, afirmamos que nuestro modelo no cursa con proteinuria. En contraste, la depuración de creatinina en el grupo nefrectomizado disminuye en un 60% con respecto al grupo control, indicando claramente la disminución de la masa renal funcional.

A continuación, se determinaron los niveles plasmáticos de colesterol total, triglicéridos y glucosa con la finalidad de establecer la existencia de posibles cambios en estos parámetros asociados a la disminución de la masa renal, presentándose cambio significativo en el colesterol total en el grupo nefrectomizado (tabla 3).

Tabla 3.- Perfil de lípidos y glucosa en plasma

	Ct (mg/dL)	Tg (mg/dL)	G (mg/dL)
Control	43.78. ± 5.99	49.50 ± 10.80	131.69 ± 3.56
Nefrectomizado	73.04 ± 8.42*	39.60 ± 8.60	124.85 ± 3.01

Promedio ± EE Ct: Colesterol total, Tg: Triglicéridos, G: Glucosa

El efecto de la nefrectomía parcial sobre la estructura de las HDL se estableció a través de la determinación de la composición lipídica de estas lipoproteínas. Los resultados se presentan en la tabla 4. Observamos un incremento del colesterol total en el grupo nefrectomizado; en particular, la fracción afectada fue el colesterol esterificado, con un aumento correspondiente a un 70%, mientras que el colesterol libre no sufrió cambios significativos. Por otra parte, en el grupo control no observamos ningún cambio significativo. En cuanto a las lipoproteínas que contienen apo B, éstas también presentaron un incremento significativo en el colesterol total y esterificado.

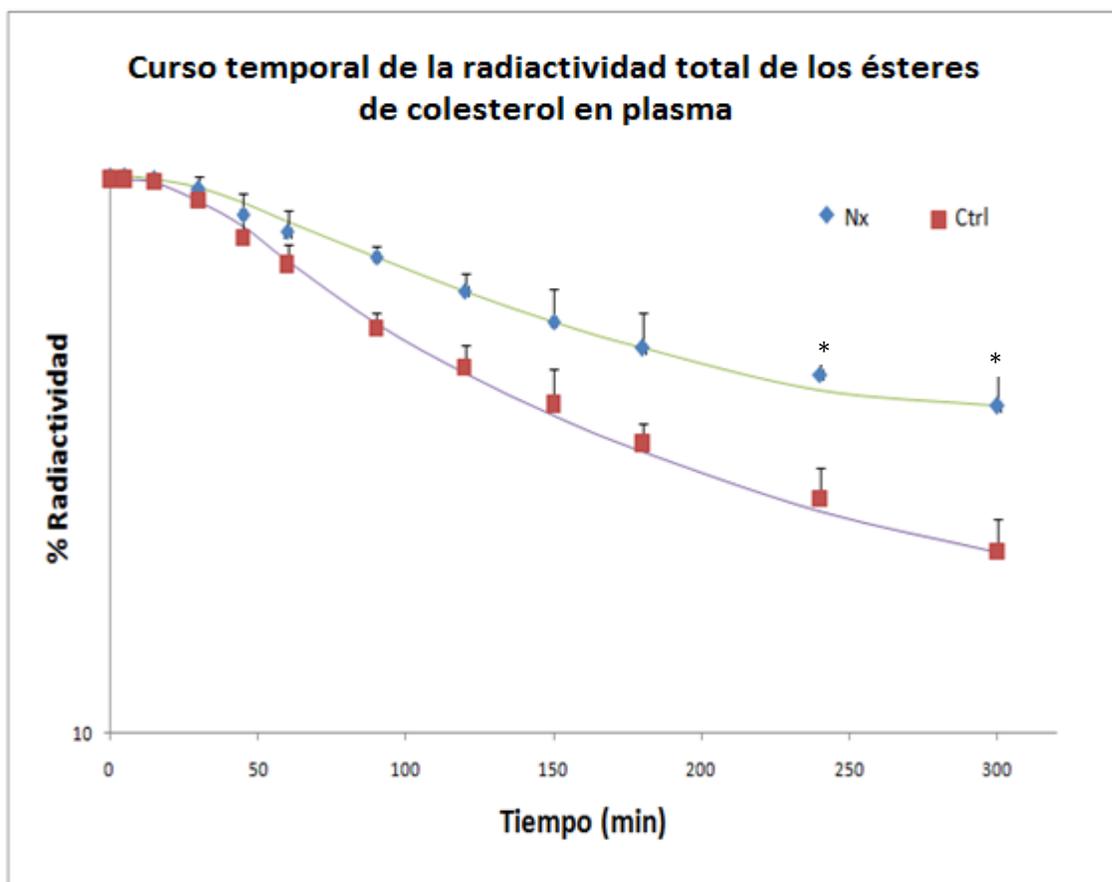
Tabla 4.- Concentraciones plasmáticas de los lípidos de las HDL

Parámetro (mg/dL)	Previo a cirugía (n=6)	Después de 6 semanas (n=6)
Colesterol total-HDL	26.27 ± 3.60	46.04 ± 4.26*
Colesterol libre-HDL	5.25 ± 0.72	8.81 ± 0.86
Colesterol esterificado-HDL	35.30 ± 4.83	60.01 ± 5.74*
Triglicéridos-HDL	24.0 ± 4.7	23.1 ± 3.7
Fosfatidilcolina-HDL	62.7 ± 4.0	62.7 ± 8.9
Colesterol total-LpB	17.50 ± 2.40	29.40 ± 5.69*
Colesterol libre-LpB	2.50 ± 0.34	4.19 ± 0.81
Colesterol esterificado-LpB	25.22 ± 3.45	42.28 ± 8.20*

Promedio ± EE. t student pareada *p<0.05 LpB: Lipoproteínas que contienen apo B

Para determinar la contribución del riñón en el metabolismo de las HDL enriquecidas con ésteres de colesterol, se llevó a cabo la cinética metabólica descrita en materiales y métodos, tomando como el 100% de marca radiactiva, la radiactividad registrada en cuentas por minuto (cpm) en la muestra de plasma obtenida a los 5 minutos después de la administración. En la figura 6 se presenta el decaimiento de la marca radiactiva total del plasma con respecto al tiempo; la desaparición de la marca radiactiva en el grupo nefrectomizado es menor con respecto a los controles, siendo significativos los 240 y 300 minutos después de la administración.

Figura 6.- Decaimiento de la radiactividad total con respecto al tiempo



Promedio \pm EE. t student * $p < 0.05$ Nx= nefrectomizado Ctrl= control

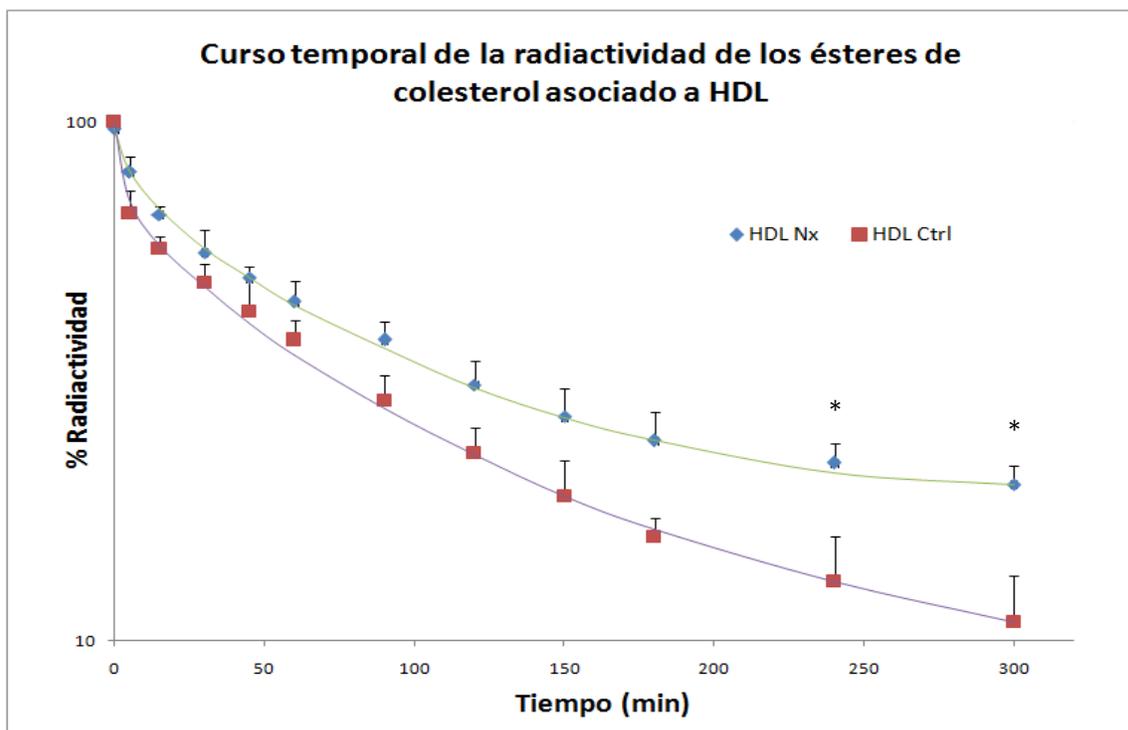
A partir del decaimiento radiactivo se calculó la tasa fraccional de catabolismo (FCR) de los ésteres de colesterol mediante el modelo bicompartimental que se describe en la sección de métodos (figura 4). Por este procedimiento, pusimos de manifiesto una disminución del 48% en la tasa fraccional de catabolismo (FCR). En cuanto a la tasa de síntesis (PR), no existió diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (Tabla 5).

Tabla 5.- Tasas de catabolismo y síntesis de los ésteres de colesterol

	Ctrl	Nx
FCR (pool/h)	0.31 \pm 0.04	0.16 \pm 0.05*
PR (mg/kg/h)	6.14 \pm 0.94	4.74 \pm 0.80
Promedio \pm EE * $p < 0.05$	Ctrl: Control	Nx: Nefrectomizado

Para profundizar en los mecanismos cinéticos que explican el incremento de ésteres de colesterol de las HDL, construimos las curvas de decaimiento radiactivo y analizamos los flujos de masa de ésteres de colesterol en las HDL y lipoproteínas que contienen apo B por medio del modelo multicompartimental descrito en la sección de métodos (figura 5). En la figura 7 se presenta el curso temporal de la radiactividad asociada a las HDL en ambos grupos de experimentación. La eliminación de los ésteres de colesterol de las HDL del compartimiento plasmático disminuyó en el grupo nefrectomizado con respecto al grupo control. Observamos una diferencia significativa a los 240 y 300 minutos después de la administración de las HDL marcadas.

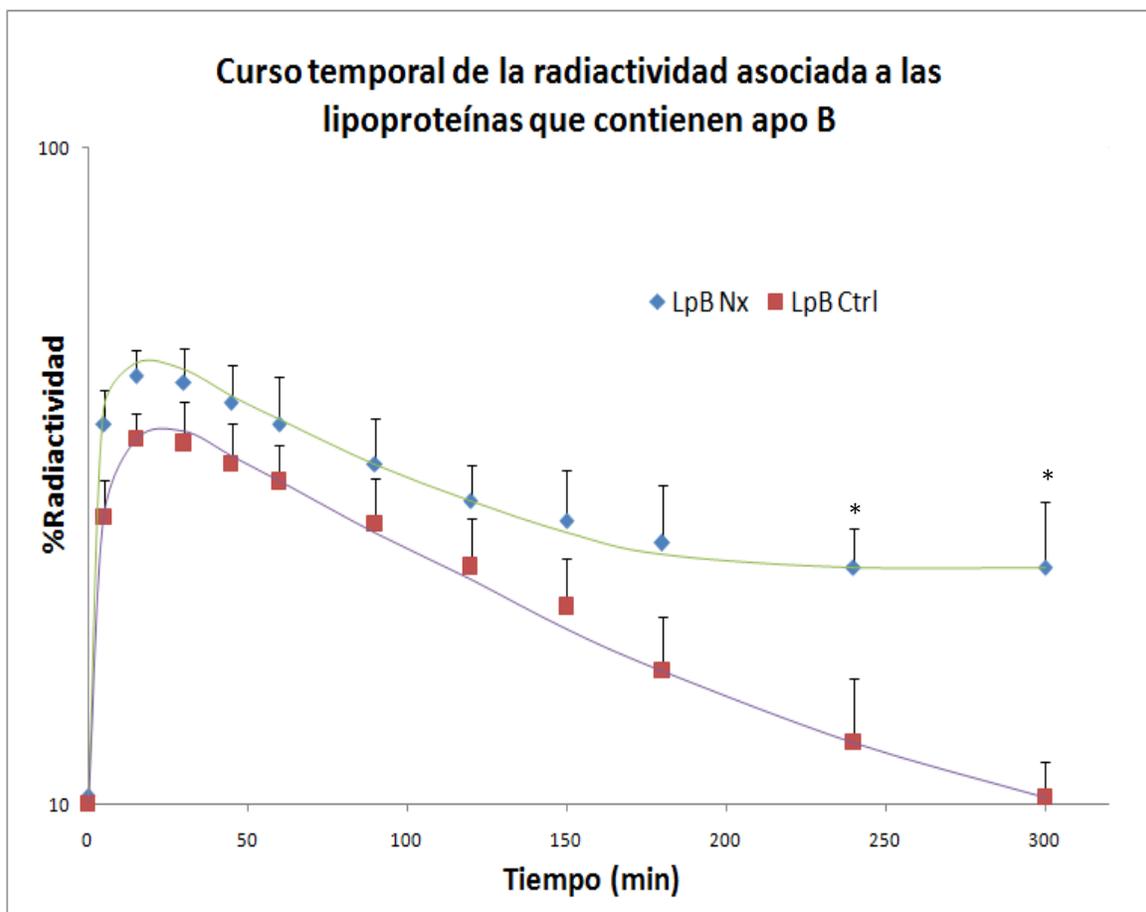
Figura 7.- Curso temporal de la radiactividad asociada a las HDL



Promedio \pm EE. t student * $p < 0.05$

El curso temporal de los ésteres de colesterol de las lipoproteínas que contienen apo B del grupo nefrectomizado también alcanza una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control a los 240 y 300 minutos después de la administración (Figura 8).

Figura 8.- Curso temporal de la radiactividad de los ésteres de colesterol de las lipoproteínas que contienen apo B



Promedio \pm EE. t student *p<0.05 LpB: Lipoproteínas que contienen apo B

A continuación resolvimos el modelo descrito en materiales y métodos para establecer los flujos de masa desde el compartimiento HDL hacia fuera del plasma y de los intercambios que existen entre las mismas HDL y las LpB. Los flujos de eliminación de los ésteres de colesterol se presentan en la tabla 6; se observó que los flujos de masa de los ésteres de colesterol provenientes de las HDL hacia las lipoproteínas que contienen apo B ($k(2,1)$) y viceversa ($k(1,2)$) tienden a ser mayores en el grupo nefrectomizado pero los valores no alcanzan diferencias estadísticamente significativas. En cuanto a las salidas directas de las HDL ($k(0,1)$) y de las lipoproteínas que contienen apo B ($k(0,2)$) se observa que ambos también tienden a incrementar pero sin alcanzar significado estadístico.

Como se estableció en la sección de métodos, estos flujos los utilizamos para determinar el flujo total de eliminación, el cual fue calculado como una suma algebraica considerando los flujos de ésteres de colesterol hacia el exterior del compartimiento HDL (compartimiento 1) como positivos y los flujos hacia el interior del mismo como negativos. Estos resultados se presentan en la tabla 7. A pesar de que no hay significado estadístico entre ambos grupos, la tendencia del flujo neto de eliminación de los ésteres de colesterol de las HDL en el grupo nefrectomizado tiende a ser menor que en el grupo control, mientras que en el flujo neto de eliminación de las lipoproteínas que contienen apo B tiende a ser mayor.

En cuanto al flujo de eliminación directa desde el compartimiento de las lipoproteínas que contienen apo B ($k(0,2)$), el valor calculado para este parámetro no alcanzó diferencia estadística a pesar de que es 5 veces mayor en el grupo de conejos nefrectomizados con respecto a los controles (Tabla 6).

Tabla 6.- Flujos parciales de eliminación de los ésteres de colesterol derivados del modelo multicompartimental

Constante	Flujo de masa de colesterol (mg/dL por min)	
	Control	Nefrectomizado
k(0,1)	0.23 ± 0.10	0.40 ± 0.14
k(0,2)	0.09 ± 0.04	0.45 ± 0.37
k(1,2)	7.40 ± 3.96	18.61 ± 6.55
k(2,1)	9.72 ± 3.36	12.57 ± 4.92

Promedio ± EE. n=6

Tabla 7.-Flujo neto de eliminación de los ésteres de colesterol de las partículas HDL

	Control	Nefrectomizado
Flujo neto de eliminación de CE de las HDL (mg/dL por min)	2.55 ± 1.65	-5.44 ± 3.47
Flujo neto de eliminación de CE de las VLDL (mg/dL por min)	-2.23 ± 1.62	6.02 ± 3.32

Promedio ± EE. n=6

DISCUSIÓN

En este trabajo, caracterizamos un modelo de nefrectomía parcial, que consistió en la reducción de la masa renal funcional, en conejos macho Nueva Zelanda con la intención de establecer el papel del riñón en la cinética metabólica del colesterol-HDL.

La disminución renal 75% en conejo se caracterizó desde el punto de vista histopatológico en un estudio previo como modelo de hipercalcemia crónica y nefrolitiasis⁴⁷. En nuestro estudio nos enfocamos a la caracterización desde el punto de vista de la función renal y su efecto sobre las lipoproteínas de alta densidad. La nefrectomía parcial que llevamos a cabo resultó en una disminución del 60% de la función renal, evaluada por la depuración de creatinina con respecto al grupo control. Como consecuencia de la disfunción renal, la concentración de urea y creatinina en plasma incrementó en un 55% con respecto al grupo control; los cambios anteriores son similares a los que se presentan en los pacientes con disfunción renal. Sin embargo, a diferencia de nuestro modelo, los pacientes cursan adicionalmente con proteinuria; la falta de eliminación de proteínas por vía renal indica que no existe daño en la permeabilidad de la membrana glomerular y por lo tanto nuestro modelo debe ser considerado como de reducción de masa renal funcional y no como un modelo de daño renal.

Al caracterizar nuestro modelo de nefrectomía parcial, se evaluó el metabolismo y la estructura de las HDL; observamos un incremento del 75% en el colesterol total de HDL en el grupo nefrectomizado. Al determinar específicamente la concentración de colesterol libre y esterificado presente en las partículas HDL, observamos un incremento específicamente en el colesterol esterificado, siendo éste el responsable del incremento del colesterol total de la partícula. Por otro lado, las lipoproteínas que contienen apo B, como las VLDL y LDL, también presentaron cambios significativos en su contenido de colesterol total y esterificado. Por tanto, la disminución de la masa renal funcional, modifica no sólo la estructura de las HDL enriqueciéndolas de ésteres de colesterol, sino también afecta a las lipoproteínas que contienen apo B. A pesar de que en el estudio de Kim y colaboradores⁵¹ la expresión del ABCA1 se encontró aumentada en tejido renal sano de ratas con nefrectomía 5/6, es poco probable que ésta sea la explicación del incremento de ésteres de

colesterol en conejos, ya que a nuestro conocimiento no existen reportes de que el riñón sea un sitio importante de captación de colesterol de las HDL.

El enriquecimiento en ésteres de colesterol de las HDL, podría deberse a un incremento en la generación intravascular del mismo. En este contexto, alteraciones de la actividad LCAT se pueden descartar como la etiología de dichas anomalías metabólicas; estudios previos de nuestro laboratorio, en los cuales se realizó una nefrectomía al 75% en conejos cuyo objetivo era determinar la influencia del riñón en el catabolismo de la apo AI, mostró que no existen cambios en la actividad de esta proteína como resultado de la intervención quirúrgica⁵². Estas observaciones difieren de lo que ocurre en los pacientes con enfermedad renal crónica, pues éstos presentan disminución de la LCAT^{37,45}. En este sentido, establecer el papel del riñón a partir de los pacientes con falla renal, resulta complicado debido a las diferentes comorbilidades con las que cursan este tipo de pacientes. Dichas comorbilidades pueden asociarse a alteraciones del metabolismo de lípidos. Sin embargo, en los modelos animales se trata de minimizar el mayor número de variables confusoras. En nuestro caso, a pesar de que los conejos presentan una gran similitud en cuanto al metabolismo intravascular de las HDL con el humano, no podemos sugerir que los resultados sean extrapolables a los pacientes.

En el mismo estudio mencionado anteriormente⁵² a pesar de que el riñón no tiene una contribución importante en la eliminación de la apo AI de las HDL ni afecta la actividad LCAT, la disminución de la masa renal funcional ocasionó un incremento en el colesterol esterificado asociado a las HDL.

Por todo lo anterior, al inicio de este estudio postulamos que el riñón participa en el manejo del colesterol de las HDL. Para establecer la validez de nuestra hipótesis, llevamos a cabo cinéticas metabólicas de ésteres de colesterol marcados con ³H incorporados en las HDL. Como se describió anteriormente en materiales y métodos, el ³H-colesterol se incorpora a la partícula de HDL sin alterar significativamente sus características.

A lo largo del estudio cinético se mostró un mayor porcentaje de radiactividad residual en el grupo nefrectomizado en comparación con los controles, sugiriendo una disminución del catabolismo de los ésteres de colesterol. Al determinar la tasa de catabolismo de este lípido

en plasma, observamos efectivamente una disminución del 48%. A partir del FCR calculamos la tasa de producción absoluta (PR) asumiendo que nuestro modelo está en estado estacionario^{53,54}; en esta condición, se asume que la concentración de los ésteres de colesterol es constante a lo largo de todo el experimento y para mantener dicha concentración constante, la síntesis y el catabolismo de ésteres de colesterol deben ser iguales. A partir de este supuesto, no observamos ningún cambio significativo en la tasa de producción. Por lo tanto, una primera conclusión que surge de nuestro estudio es que la disminución de la masa renal funcional resulta en un decremento aproximadamente del 50% en la tasa de catabolismo de los ésteres de colesterol, sin alteraciones significativas en su tasa de producción. Dicho balance cinético explica la acumulación de ésteres de colesterol en plasma. Estas observaciones dan gran relevancia a los estudios cinéticos que, a diferencia de una determinación puntual de la concentración de cualquier analito en plasma, pueden demostrar modificaciones muy importantes en el metabolismo que no son detectables con la sola determinación de la concentración plasmática.

Para establecer cuál es la fracción lipoproteica que contribuye a las bajas tasas de catabolismo asociada a la disminución de masa renal, aplicamos el modelo multicompartimental descrito en la sección de métodos. Este modelo nos permitió calcular los flujos parciales de ésteres de colesterol provenientes de las HDL y de las lipoproteínas que contienen apo B (VLDL/LDL). La eliminación de las HDL del compartimiento plasmático en forma directa (flujo (0,1)) en el modelo multicompartimental, es aproximadamente 2 veces mayor en el grupo Nx con respecto al control, pero la diferencia no alcanza significado estadístico. Esta vía de eliminación en el conejo implica al receptor SR-BI y la captación hepática de las HDL completas vía el receptor apo B/E, principalmente; no obstante, incluye también otras rutas alternativas como la subunidad beta de la ATPsa ectópica en la membrana del hepatocito³⁸ que se ha descrito como un receptor HDL. Además, esta ruta de salida de los ésteres de colesterol-HDL del compartimiento plasmático, implicaría también la posible contribución del riñón a la eliminación de estas lipoproteínas completas propuesta por algunos autores⁵⁵. Nuestros resultados no permiten discernir si existen alteraciones en cualquiera de las 4 vías potenciales antes mencionadas, pues la disminución de la eliminación por alguna de ellas puede ser compensada por un incremento en una o las dos restantes. Sin embargo, sí

podemos afirmar que estos resultados no son consistentes con una contribución directa e importante del riñón a la eliminación de los ésteres de colesterol de las HDL; en un contexto de disminución de la masa renal se esperaría que el CE de estas lipoproteínas se eliminara más lentamente (flujo (0,1) del modelo cinético), hecho que no se observa. Además, si los ésteres de colesterol-HDL siguieran un catabolismo renal, éste implicaría la eliminación de las partículas HDL completas, debido a que el colesterol siempre se encuentra asociado a las lipoproteínas en el compartimiento plasmático y no hay evidencias de que se disgregue de las HDL a nivel de glomérulos. Sin embargo, la eliminación de la partícula HDL por vía renal, es incompatible con nuestros resultados previos en donde tanto la síntesis como el catabolismo de la apo AI permanecen sin cambios después de la nefrectomía 75% ⁵². En resumen, el catabolismo de ésteres de colesterol-HDL por vía directa, es decir por SR-BI, receptor apoB/E, o vía renal, no resulta afectada en el contexto de la disminución de la masa renal funcional. Tomando en cuenta todos estos resultados, podemos afirmar que el riñón tiene una contribución directa muy limitada, si es que tiene alguna, en la depuración plasmática de las HDL.

Independientemente de que la vía directa de eliminación de los ésteres de colesterol-HDL no está afectada en la disminución de la masa renal, el flujo de este lípido entre las lipoproteínas que contienen apo B y las HDL, presentó diferencias en ambas direcciones en los conejos Nx con respecto a los controles sin alcanzar significado estadístico. El flujo desde las lipoproteínas que contienen apo B hacia las HDL (flujo (1,2) en el modelo multicompartimental) fue casi 3 veces mayor en el grupo Nx que en el control. Adicionalmente, el flujo inverso (flujo (2,1)) calculado fue casi un 30% mayor en el grupo Nx. Los flujos (1,2) y (2,1) están determinados en gran medida por la CETP y es posible que el desbalance observado sea consecuencia de un incremento de la actividad de esta proteína, pues un incremento se manifestaría por actividades mayores a la normal en ambos sentidos ($k(1,2)$ y $k(2,1)$), como observamos en el presente estudio. Es importante enfatizar que esta diferencia y el resto de los parámetros derivados del modelo multicompartimental no alcanzaron significado estadístico, probablemente por el número de observaciones incluidas en el estudio ($n=6$), asociado a dispersiones de datos muy importantes. De esta manera, es necesario incrementar el número de animales de experimentación para establecer con certitud las constantes del modelo multicompartimental. Una segunda

perspectiva del presente estudio es, determinar la actividad CETP. Esta actividad podría ser fundamental si se confirma que los flujos (1,2) y (2,1) están incrementados en los conejos nefrectomizados.

Otro de los parámetros cinéticos que se alteró en el modelo de conejo con disminución de masa renal funcional, fue el flujo de CE desde las lipoproteínas que contienen apoB hacia fuera del compartimiento plasmático (0,2); el incremento de este parámetro fue de 5 veces respecto a los conejos control. Una sobreexpresión del receptor apo B/E en la membrana del hepatocito podría ser la base molecular de este incremento; sin embargo, el presente estudio está diseñado para analizar los flujos de ésteres de colesterol desde las HDL y carece de solidez para obtener conclusiones sobre el comportamiento de otras lipoproteínas. Se requieren estudios específicamente diseñados para analizar esta posibilidad.

Los resultados de los flujos parciales de CE calculados a partir del modelo multicompartimental, los sumamos algebraicamente para estimar el balance neto del catabolismo de los ésteres de colesterol. Es importante destacar que los flujos hacia fuera de los compartimentos HDL o lipoproteínas que contienen apo B, los consideramos positivos, mientras que los flujos en dirección del interior de estos compartimentos los consideramos negativos. De esta manera, bajo las condiciones y duración del estudio, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en el flujo neto de eliminación de los ésteres de colesterol de las HDL ni de las lipoproteínas que contienen apo B entre ambos grupos. A pesar de que no existe cambio significativo, existe una tendencia en los flujos netos de eliminación; de acuerdo al flujo neto de eliminación de ésteres de colesterol de las HDL en el grupo nefrectomizado la cantidad de ésteres de colesterol que abandona a las HDL es menor. Este comportamiento cinético sugiere que los ésteres de colesterol se acumulan en las HDL, lo que explicaría el incremento del colesterol-HDL observado en nuestro modelo experimental.

Por otro lado, el flujo neto de las VLDL indica que una mayor cantidad de ésteres de colesterol abandona a estas lipoproteínas. Estas tendencias tienen dos implicaciones importantes de confirmarse al aumentar el número de observaciones. Por una parte, dicho comportamiento sugiere que los conejos nefrectomizados deberían presentar una menor concentración de colesterol total y esterificado en las lipoproteínas que contienen apo B.

No obstante, nuestros resultados muestran lo contrario, los conejos con nefrectomía parcial tienen un incremento significativo de su colesterol. Por lo tanto, la única explicación compatible con el comportamiento cinético observado del colesterol esterificado de las lipoproteínas que contienen apo B, es un aumento en la síntesis hepática de este lípido. Esta hipótesis tendrá que ser abordada específicamente en estudios ulteriores.

Por último, los niveles de urea y ácido úrico son factores importantes que se deben considerar al interpretar nuestros resultados; estudios recientes de nuestro equipo y de otros grupos de investigación han sugerido que ambos metabolitos de desecho se relacionan con la estructura de las HDL^{56,57}. En los estudios que hemos llevado a cabo en pacientes con puntaje de calcio coronario elevado, encontramos una correlación negativa entre el incremento de la concentración plasmática de ácido úrico y la composición lipídica de las HDL⁵⁶; en estas circunstancias, las subpoblaciones HDL presentan modificación en el contenido de colesterol. La idea de que la uremia altera la composición y función de las HDL ha sido apoyado por Halzer y colaboradores⁵⁷. Este grupo determinó que la composición de las HDL en pacientes hiperuricémicos en hemodiálisis presentan también modificaciones estructurales de las HDL; destacan un enriquecimiento en triglicéridos, una disminución de la apo AI, apo AII, fosfolípidos y colesterol libre entre otros, alterando la capacidad de las HDL para promover el eflujo de colesterol. Estos estudios muestran una relación entre los niveles de uremia y la composición y función de las HDL. De esta manera, es factible que el incremento de urea no sólo provoque alteraciones en la estructura de las HDL sino también que pueda alterar las vías de eliminación directa de los ésteres de colesterol, hecho que contribuiría a explicar los hallazgos de nuestro estudio.

En resumen, nuestros resultados demuestran que los ésteres de colesterol se acumulan en plasma por una eliminación disminuida de los mismos en conejos con nefrectomía del 75%. No obstante, la relación directa entre la disminución de la masa renal con tal disminución del catabolismo de los ésteres de colesterol no puede ser demostrada con el diseño del estudio que utilizamos y por otros parámetros que se alteran simultáneamente en nuestro modelo, como la uremia. La tendencia de nuestros datos sugiere que el flujo de masa de los ésteres de colesterol entre las HDL y las lipoproteínas que contienen apo B, está incrementado probablemente por modificaciones de la actividad CETP. Aumentar el

número de animales de experimentación, así como determinar la CETP son las dos perspectivas inmediatas que surgen del presente trabajo de investigación. .

CONCLUSIÓN

- La disminución de la masa renal funcional provoca una acumulación de ésteres de colesterol plasmático debido a una reducción en la eliminación de este lípido fuera del compartimento plasmático.

PERSPECTIVAS

Nuestros resultados abren camino a nuevas interrogantes y por ende, a estudios posteriores, tales como:

- Incrementar el número de animales de experimentación
- Determinar la actividad CETP en nuestro modelo
- Establecer el efecto en la expresión y funcionalidad de los receptores hepáticos (SR-BI y receptor apo B/E) en el modelo de disminución de la masa renal funcional
- Determinar el efecto de la uremia en la vía de eliminación directa de los ésteres de colesterol, a través de un modelo que nos permita disminuir el mayor número de variables que puedan interferir con el objetivo de nuestro estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nelson DL, Cox MM. Principles of Biochemistry. 4ta edición USA 2004. 820-827.
2. Voet D, Voet J. Biochemistry 2da edición USA 1995. 690-704.
3. Aguilar-Salinas C, Gómez-Pérez F. Lipoproteínas y aterogénesis. Metabolismo normal de las lipoproteínas. Rev Invest Clin 1989; 2: 22-28.
4. Pérez Méndez O. Lipoproteínas de alta densidad (HDL). ¿Un objetivo terapéutico en la prevención de la atherosclerosis? 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. 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.
7. 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 in HDL is associated to low apo AI fractional catabolic rates in vivo. Clin Chim Acta 2007; 378: 53-58.
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. Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-b-migrating high density lipoprotein pathway. Biochemistry 1988; 27: 25-29.
10. 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.
11. Carlo M. Barbagallo, Jianglin Fan, Patricia J. Blanche, Manfredi Rizo, John M. Taylor, Ronald M. Krauss. Overexpression of Human Hepatic Lipase and Apo E in Transgenic Rabbits Attenuates Response to Dietary Cholesterol and Alters Lipoprotein Subclass Distributions. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 625-632.

12. Secretaría de Salud información epidemiológica de morbilidad 2000. Dirección general de epidemiología.
13. González Chávez A. Consenso Mexicano de resistencia a la insulina y síndrome metabólico. *Rev Mex Cardiol* 1999; 10: 3-19.
14. Secretaría de salud Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2002, Para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias.
15. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, et al: Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein (MCP-1) in human endothelial and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 5134-5138.
16. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 223-261.
17. Seifert PS, Kazatchine MD: Generation of complement anaphylatoxins and C5b-9 by crystalline cholesterol oxidation derivatives depends on hydroxyl group number and position. *Mol Immunol* 1987; 24: 1303-1308.
18. Torzewiski J, Oldroyd R, Lachman P, Fitzimmons C, Proufoot D, Bowyer D: Complement-induced release of lesion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 673-677.
19. Aguilar Salinas CA, Vázquez Chávez C, Gamboa Marrufo R, García Soto N, de Jesús Ríos González J, Holguín R, Vela S, Ruiz Álvarez F, Mayagoitia S. Obesity, diabetes, hypertension and tobacco consumption in an urban adult Mexican population. *Arch Med Res* 2001; 32: 446-453.
20. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, and 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.
21. Prediman KS, Sanjay K, Jan N, and Bojan C. Exploiting the vascular protective effects of high density lipoprotein and its apolipoproteins and idea whose time for testing is coming, parte I. *Circulation* 2001; 104: 2376-2386.
22. Deakin S, Leviev I, Gomaschi 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.
23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
 26. 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.
 27. Von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. HDL and atherosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21: 13-27
 28. 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
 29. Barter PJ, Rye K. Molecular mechanism of reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol* 1996, 7: 82-87.
 30. 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

31. Turner RC, Millns H, Neil HA, et al. Risk factors for coronary disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: UK Prospective Diabetes Study. *BMJ* 1998; 316: 823-828.
32. Zeeuw D, Remuzzi G, Parving HH, Keane WT, 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, Khawn 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. Vaziri ND. Causes of dysregulation of lipid metabolism in chronic renal failure. *Semin Dial* 2009; 22: 644-651.
37. Krikken JA, Gansevoort RT, Dullaart RP. Lower HDL-C and apolipoprotein A-I are related to higher glomerular filtration rate in subjects without kidney disease. *J Lipid Res* 2010; 51: 1982-1990.
38. 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 (6918): 75-9.
39. 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.

40. 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
41. 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
42. Kaysen GA, Hoye 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.
43. 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.
44. Kaysen GA. Lipid and lipoprotein metabolism in chronic kidney disease. *J Ren Nutr* 2009; 19: 73-77
45. 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.
46. 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 ;23:1099-106
47. Eddy AA, Falk RJ, Sibley RK, Hostetter TH. Subtotal nephrectomy in the rabbits: a model of chronic hypercalcemia, nephrolithiasis and obstructive nephropathy. *J Lab Clin Med* 1986; 107: 508-516
48. 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.
49. 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

50. Brousseau ME, Santamarina-Fojo S, Zech LA, et al. Hyperalphalipoproteinemia in human lecithin cholesterol acyltransferase transgenic rabbits. In vivo apolipoprotein A-I catabolism is delayed in a gene dose-dependent manner. *J Clin Invest* 1996; 97: 1844-1851.
51. 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.
52. Tolledo Ibelles P. (2011). Influencia de la nefropatía en el catabolismo de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Maestría, Ciencias Biológicas- (Facultad de Medicina) UNAM.
53. Inewaki K, Nishiwaki M, Sakamoto T, Ishikawa T, Fairwell T, Zech L, Nagano M, Nakamura H, Brewer B, Rader D. Increased catabolic rate of low density lipoprotein in humans with cholesteryl ester transfer protein deficiency. *J Clin Invest* 1995; 96: 1573-1581.
54. Inewahi K, Schaefer J, Frischmann M, Okubo K, Hosoya T, Mochizuki S, Dieplinger B, Trenkwalder E, Schweer H, Kronenberg F, Koenig P, Dieplinger H. Delayed in vivo catabolism of intermediate-density lipoprotein and low-density lipoprotein in hemodialysis patients as potential cause of premature atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25: 2615-2622.
55. 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 B12 complex, mediates high-density lipoprotein holoparticle endocytosis. *Proc Natl Acad Sci*. 1999; 96:10158-10163.
56. Quiroz Aguilar A. (2011). Cuantificación de la concentración plasmática de lípidos de las subclases de HDL en sujetos con enfermedad aterosclerosa subclínica. (Licenciatura, Química Farmacéutica Biológica)- UNAM. (Facultad de Química).
57. Halzer M, Birner-Gruenberger R, Stojakovic T, El-Gamal D, Binder V, Wadsack C, Heinemann A, Marsche G. Uremia alters HDL composition and Function. *J Am Soc Nephrol* 22; 2011: 1-10.