



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DE HIPERURICEMIA A LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LAS
LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL) EN UN MODELO ANIMAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MIRIAM MARLENE MARTÍNEZ RAMÍREZ

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**

**DRA. MARTHA FRANCO GUEVARA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**TUTOR INVITADO: DR. ÓSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2014



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

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 28 de abril de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **MARTÍNEZ RAMÍREZ MIRIAM MARLENE** con número de cuenta **302253902**, con la tesis titulada **"EFECTO DE HIPERURICEMIA A LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL) EN UN MODELO ANIMAL"**, realizada bajo la dirección del **DR. MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA**:

Presidente: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
Vocal: DR. CARLOS A. AGUILAR SALINAS
Secretario: DRA. MARTHA FRANCO GUEVARA
Suplente: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE
Suplente: DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 03 de junio de 2014

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM. Por darme la oportunidad de seguir preparándome y desarrollarme en la investigación científica, por todas las oportunidades y apoyo recibido durante mi estancia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca No. 270039, otorgada durante la realización de mis estudios, que me ha permitido dedicarme exclusivamente a la investigación y ha favorecido mi desarrollo personal y académico.

Este estudio fue financiado en su totalidad por el CONACYT. Número de proyecto 132473.

A mi Tutor, los miembros del Comité Tutor y el Tutor Invitado, por sus valiosos consejos, paciencia, disposición e ideas que aportaron a este proyecto.

Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza

Dra. Rocío Salceda Sacanelles

Dra. Martha Franco Guevara

Dr. Óscar Armando Pérez Méndez

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	5
ANTECEDENTES	7
Enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC)	7
Importancia de la predicción del riesgo cardiovascular: factores de riesgo	8
El colesterol de HDL es un buen predictor del riesgo cardiovascular	9
Lipoproteínas de alta densidad (HDL)	10
Figura 1. Composición de las HDL	10
Cuadro 1. Características de las apolipoproteínas que se encuentran en las HDL	11
Metabolismo de las HDL (Transporte reverso del colesterol)	12
Cuadro 2. Enzimas y proteínas involucradas en el metabolismo de las lipoproteínas	12
Figura 2. Transporte reverso del colesterol	14
Clasificación de las HDL	15
Importancia de la determinación de los lípidos de las subclases de HDL	18
Hiperuricemia y riesgo cardiovascular	21
Hiperuricemia (definición)	21

Metabolismo del ácido úrico	22
Figura 4. Metabolismo del ácido úrico	23
Ácido úrico y HDL	26
Hiperuricemia y función endotelial	27
HDL y función endotelial	27
JUSTIFICACIÓN	29
HIPÓTESIS	31
OBJETIVOS	32
MATERIALES Y MÉTODOS	33
Animales	33
Obtención de muestras	33
Análisis de laboratorio	34
Análisis de los lípidos HDL	34
Análisis de depuración de creatinina	35
Aislamiento de HDL	36
Análisis de subclases de HDL	37
Estudios cinéticos	40
Aislamiento y marcaje de la apo A-I de conejo	40
Cinética metabólica de la apo A-I	41
Evaluación de la función endotelial: anillos de aorta	44

Análisis estadístico	45
RESULTADOS	46
Caracterización bioquímica del modelo de hiperuricemia inducida con ácido oxónico	46
Cuadro 3. Parámetros bioquímicos en suero (en mg/dL)	46
Cuadro 4 Parámetros renales antes y después del tratamiento con ácido oxónico	47
Distribución de las subpoblaciones de HDL por su contenido proteínico y lipídico	48
Cuadro 5.- Distribución relativa de las subpoblaciones de HDL determinada por su contenido de proteína antes y después del tratamiento con ácido oxónico	48
Lípidos de las subclases de HDL	49
Gráfico 1 y 2.- Comparación de las distribuciones relativas de HDL cuantificadas por su contenido en triacilgliceroles y fosfolípidos	49
Cuadro 6.- Concentración de las diferentes especies de colesterol asociadas a las subclases de HDL antes y después del tratamiento con ácido oxónico	51
Relación de los lípidos de la partícula HDL	53
Cuadro 7. Cocientes de los principales lípidos de HDL	53
Cinética metabólica de la apo A-I de las HDL	54
Gráfico 3.- Radiactividad residual correspondiente a las HDL- ¹²⁵ I en torrente sanguíneo	55

Cuadro 8. Tasa de catabolismo fraccional (FCR) de apo A-I marcadas con ¹²⁵ I de los grupos tratado y control	56
Evaluación de la función endotelial: anillos de aorta	56
Gráfico 4.- Evaluación de la función endotelial (vasorelajación) en respuesta a acetilcolina	57
DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES	64
PERSPECTIVAS	65
BIBLIOGRAFÍA	66
ANEXO 1. Determinación de colesterol libre en microplaca	71
ANEXO 2. Determinación de proteínas por el método de Lowry	73
ANEXO 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas	75
ANEXO 4. Tinción para la determinación de la distribución de lípidos de las subclases de HDL en fase semisólida (sobre el gel de poliacrilamida)	77
ANEXO 5. Yodación de proteínas por el método de cloramina T	80

ABREVIATURAS

ABC-A1:	Transportador de membrana dependiente de ATP clase A, tipo 1.
Ach:	Acetilcolina
AMP:	Monofosfato de adenosina
Apo:	Apolipoproteína
ATP:	Adenosin trifosfato
AU:	Ácido úrico
CE:	Colesterol esterificado
CETP:	Proteína de transferencia de ésteres de colesterol
C-HDL:	Colesterol de HDL
CL:	Colesterol libre (colesterol no esterificado)
C-LDL:	Colesterol de las lipoproteínas de baja densidad
Cp:	Concentración plasmática
Cpm:	Cuentas por minuto
Creat:	Creatinina
CT:	Colesterol total
EAC:	Enfermedad aterosclerosa coronaria
ECV:	Enfermedades cardiovasculares
EE:	Error estándar
EFD:	Eye fish disease (Enfermedad del ojo de pez)
eNOS:	Óxido nítrico sintasa endotelial
FCR:	Tasa de catabolismo fraccional
FMS:	Fenazín metasulfato
Glu:	Glucosa

GMP:	Monofosfato de guanosina
HDL:	Lipoproteínas de alta densidad
LCAT:	Lecitina: colesterol acil transferasa
LDL:	Lipoproteínas de baja densidad
LDL-ox:	LDL oxidadas
LH:	Lipasa hepática
Lp:	Lipoproteína
Lp-B:	Lipoproteínas que contienen apo B
LPL:	Lipoproteína lipasa
MADC IV:	Modelo abierto de dos compartimentos, administración intravenosa
MTT:	Azul de tetrazolium
NO:	Óxido nítrico
P.M.:	Peso molecular
Pip-HDL:	Fosfolípidos de HDL
PON1:	Paraoxonasa
PLTP:	Proteína de transferencia de fosfolípidos
Qm:	Quilomicrones
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
SR-BI:	Receptor scavenger clase B tipo I
Tg:	Triacilgliceroles
Tg-HDL:	Triacilgliceroles de HDL
TRC:	Transporte reverso de colesterol
VLDL:	Lipoproteínas de muy baja densidad

RESUMEN

Antecedentes: La cuantificación de las subclases de HDL tiene una aplicación potencial para evaluar el riesgo cardiovascular. Sin embargo, esta determinación es aun controversial porque diversos factores metabólicos pueden alterar su distribución. En estudios recientes de nuestro grupo se ha demostrado que los niveles de uricemia correlacionan con las subclases de HDL en diferentes modelos de estudio, sugiriendo que existe una relación causal entre ambos parámetros. De esta manera, es probable que la hiperuricemia pueda provocar alteraciones en la estructura, metabolismo y funcionalidad de las HDL.

Objetivo: Establecer el efecto de la hiperuricemia inducida por ácido oxónico sobre la estructura de las subclases de HDL, sobre su cinética metabólica de las HDL, y sobre la función de las mismas a nivel endotelial en conejos Nueva Zelanda.

Materiales y Métodos: Siete conejos macho Nueva Zelanda de 2.5 kg recibieron diariamente 750 mg/kg/día de ácido oxónico en suspensión acuosa vía oral, durante 21 días. La tasa de catabolismo de las HDL se determinó por marcado exógeno con ^{125}I y ajuste de las curvas de depuración de la radiactividad a un modelo bicompartimental. Las subclases de HDL se determinaron por ultracentrifugación secuencial y electroforesis en gradiente de poliacrilamida. Los corrimientos electroforéticos se revelaron enzimáticamente por cada lípido constituyente de las HDL o por proteína y el análisis de los mismos se llevó a cabo por densitometría óptica. La función endotelial se determinó como el porcentaje de relajación de anillos de aorta en una cámara de tejido aislado, estimulados con fenilefrina y acetilcolina.

Resultados: El ácido oxónico indujo un aumento de la uricemia con respecto a su valor basal (0.84 ± 0.06 vs. 5.24 ± 0.12 mg/dL, $n=7$, $P<0.001$) y una disminución de los triacilgliceroles-HDL y fosfolípidos-HDL (27.8 ± 1.6 vs. 21.0 ± 1.7 , y $95.7 \pm$

7.4 vs. 69.3 ± 2.8 mg/dL, respectivamente, $P < 0.05$ para ambos). No se observaron alteraciones de la distribución de tamaños de HDL determinada por su composición proteica ni por su contenido de colesterol. En contraste, la concentración plasmática de los fosfolípidos de las 5 subclases de HDL fue significativamente menor con respecto a los valores iniciales ($P < 0.05$), sugiriendo una disminución del número de partículas circulantes y ricas en colesterol asociada a la hiperuricemia. Estos cambios estructurales y de cantidad de las HDL aparecen concomitantemente a un incremento de su tasa de catabolismo (0.02605 ± 0.0017 vs. 0.03697 ± 0.0038 h⁻¹ para los conejos control y tratados, respectivamente $P < 0.05$). Finalmente, la relajación de anillos de aorta dependiente de endotelio (inducida por acetilcolina) de los conejos tratados fue un 20% inferior a la de las aortas de conejos control ($P < 0.001$) mediante un mecanismo no conocido; sin embargo, una posibilidad es que las alteraciones en la estructura y metabolismo de las HDL podrían disminuir la actividad estimuladora del endotelio que poseen estas lipoproteínas.

Conclusión: La hiperuricemia induce un enriquecimiento de las HDL con colesterol, y disminución del número de partículas en plasma debida a un hipercatabolismo de estas lipoproteínas. Además, las alteraciones metabólico-estructurales aparecen de manera concomitante con una disfunción endotelial. Estos resultados contribuyen a explicar, al menos de manera parcial, el papel deletéreo que tiene el ácido úrico sobre el riesgo cardiovascular.

ABSTRACT

Background: Previous studies have suggested that HDL subclasses determination may be helpful to assess the risk of coronary artery disease. However, the usefulness of such determination is still controversial since there are several factors that may alter the HDL size distribution. Recent studies from our group have demonstrated that the plasma levels of uric acid correlate with HDL subclasses in patients with proteinuria and in other experimental models, thus suggesting a causal relationship between uremia and HDL size distribution. Therefore, we hypothesized that hyperurecemia disturbs HDL structure, metabolism, and their functionality.

Aim: To establish the effect of oxonic acid-induced hyperuricemia on the lipid content of HDL subclasses, HDL-apo AI turnover, and endothelial function.

Materials and Methods: Male New Zealand white rabbits of 2.5 kg received oxonic acid 750 mg/kg/day in aqueous suspension by gavage during 21 days. The HDL-apo AI fractional catabolic rate (FCR) was determined by exogenous labeling with ¹²⁵I and adjustment of experimental data to a bicompartimental model. HDL subclasses were determined by sequential ultracentrifugation and PAGE in native conditions. Gels were enzymatically stained for lipids and for protein with Coomassie blue R250. The relative proportion of HDL subclasses was estimated by optical densitometry. The acetylcholine endothelial-dependent vasodilation was assessed using epinephrine pre-contracted aorta rings of the treated animals in isolated organ chambers.

Results: Compared to basal levels, oxonic acid induced an increase of uremia (0.84 ± 0.06 vs. 5.24 ± 0.12 mg/dL, $n=7$, $P<0.001$), and a significant decrease of HDL-triacylglycerols and α -phospholipids (27.8 ± 1.6 vs. 21.0 ± 1.7 , y 95.7 ± 7.4 vs. 69.3 ± 2.8 mg/dL, respectively, $P<0.05$ for both). There was not any change on HDL size distribution. In contrast, plasma concentrations of the 5 HDL subclasses were significantly diminished. These data suggested cholesterol-enriched HDL and a decreased number of circulating particles. HDL-apo AI FCR was significantly higher than that observed in control group (0.03697 ± 0.0038 vs. 0.02605 ± 0.0017 h⁻¹ respectively, $P<0.05$). Finally, vasodilation of aorta rings from treated animals was 20% lower ($P<0.001$) than that observed in control group.

Conclusion: Hyperuricemia is associated with a cholesterol enrichment of HDL subclasses and a decrease of the number of these particles due to an enhanced catabolism. Moreover, the structural and metabolic modifications are concurrent with an endothelial dysfunction. These results add some explanations about the deleterious role of uric acid on the cardiovascular risk.

ANTECEDENTES

Efecto de la hiperuricemia en la composición lipídica de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en un modelo animal

En la década de los años 30 se observaron cambios en las causas de mortalidad a nivel mundial. En la primera mitad del siglo pasado las principales epidemias eran brotes de enfermedades infecciosas; sin embargo, con el descubrimiento de los antibióticos (1) y la aplicación de medidas de salud pública para controlar la diseminación de esas enfermedades (2), la mortalidad debida a las infecciones disminuyó y se produjo un aumento de la esperanza de vida. Como consecuencia de estos cambios, un grupo de enfermedades no infecciosas pasó a ser la principal causa de mortalidad: las enfermedades cardiovasculares (ECV) (3).

Existen muchas formas distintas de la enfermedad cardiovascular, entre ellas la forma más común es la enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC). Esta es la causa más frecuente por la cual las personas sufren infartos (4).

Enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC)

La enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC) es la enfermedad con más morbimortalidad en países desarrollados. En México es la segunda causa de muerte en la población adulta, después de la Diabetes Mellitus. En la Ciudad de México, la EAC es la tercera causa de mortalidad en personas en edad productiva (5). Además, es una enfermedad incapacitante, que representa una pérdida de gran importancia económica. Por otra parte, el conocimiento de los mecanismos patogénicos de la aterosclerosis, así como las medidas para prevenir sus complicaciones son importantes para combatir este problema de salud pública (6).

La aterosclerosis se caracteriza por el engrosamiento de la pared arterial de vasos grandes y medianos debido a la formación de la placa de ateroma. La formación de la placa provoca 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 ruptura y causar un coágulo sanguíneo que ocluye la circulación, provocando un infarto.

Importancia de la predicción del riesgo cardiovascular: factores de riesgo

La predicción del riesgo cardiovascular ha cobrado gran importancia en los últimos años, ya que ha sido la base en las guías clínicas de prevención cardiovascular (7).

Se define factor de riesgo como un elemento o una característica mensurable que tiene una relación causal con un aumento de frecuencia de una enfermedad y constituye un *factor predictivo independiente y significativo del riesgo de presentar la enfermedad de interés* (3).

Dentro de los factores de riesgo más relevantes respecto a las causas de la enfermedad cardiovascular, derivados del Framingham Heart Study y que ahora se consideran tradicionales, se encuentran la hipertensión, altas concentraciones plasmáticas de colesterol y bajas concentraciones de colesterol de las HDL (C-HDL), tabaquismo, diabetes y obesidad. Estos factores de riesgo tradicionales explican sólo el 75% de la incidencia de enfermedad cardiovascular, por lo que es importante considerar todos los factores restantes, que a su vez, pueden ser un objetivo terapéutico (8, 9).

El colesterol de HDL es un buen predictor del riesgo cardiovascular

Con respecto al papel de los lípidos en la EAC, en varios estudios se ha demostrado que el colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las principales lipoproteínas de transporte de colesterol en la sangre, presenta también una asociación directa con la ECV (10, 11). Además, la concentración de colesterol de las LDL (C-LDL) en los adultos jóvenes predice la aparición de ECV en una fase posterior de la vida (12, 13). Por otra parte, en varios estudios se ha demostrado que existe una relación inversa entre la EAC y el C-HDL. Estudios epidemiológicos indican que los valores elevados de C-HDL en plasma correlacionan estrechamente con una baja incidencia de enfermedad cardiovascular (14).

Actualmente, el C-HDL es aceptado como un factor importante relacionado con la aterosclerosis. Se calcula que un aumento de 1 mg/dL en la concentración de C-HDL se asocia a una disminución del riesgo coronario en un 2-3% (15).

Las HDL poseen múltiples propiedades antiaterogénicas que incluyen el transporte reverso de colesterol, protección a las LDL contra la oxidación, preservación de la función del endotelio vascular, regulación de la expresión de moléculas de adhesión y de los procesos de coagulación y fibrinolíticos que participan en el proceso ateroscleroso (16).

Lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Las HDL son partículas esféricas o discoidales de alta densidad (1.063-1.21 g/mL). Esta característica se debe a su alto contenido de proteínas, ya que en comparación con las otras lipoproteínas, presentan la mayor proporción proteica (45-55% de su masa seca). La fracción proteica de las HDL está compuesta por diversas apolipoproteínas: la apo A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E, cuyas características se presentan en el cuadro 1.

La apo A-I es la apolipoproteína más abundante de las HDL (17). En el interior de las HDL se encuentran los lípidos hidrofóbicos (triacilglicerolos y ésteres de colesterol). En el exterior se encuentran los lípidos anfipáticos (colesterol libre y fosfolípidos) que forman una pseudomicela lipídica, la cual es estabilizada por las apolipoproteínas (ver figura 1). Su tamaño es de 7.2-12 nm.

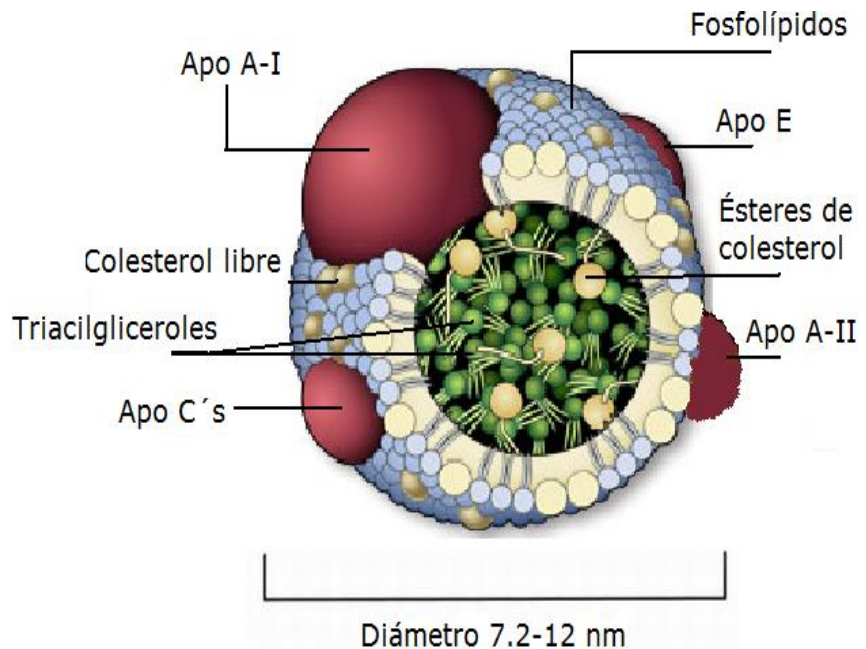


Figura 1. Representación esquemática de la estructura de las HDL.

La biosíntesis de las HDL inicia con la síntesis hepática y secreción de la apo A-I al sistema vascular, la cual se asocia fácilmente con fosfolípidos generando una estructura discoidal que puede captar colesterol llamada partícula pre β (18). La apo A-I además de su función estructural, es indispensable para la salida de colesterol de las células periféricas, la primera etapa del transporte reverso de colesterol (TRC) que se detalla posteriormente. La apo A-I también

desempeña la función de activador de la lecitina: colesterol acil transferasa (LCAT), enzima clave en el TRC.

Cuadro 1. Características de las apolipoproteínas que se encuentran en las HDL (19).

Apo	P.M.	Localización	Sitio de síntesis	Función
A-I	29,016	HDL, Qm	Intestino Hígado	Principal componente de las HDL, activador de LCAT, estimula la salida del colesterol. Ligando de sitios de unión a HDL (p.ej. SR-BI, ABCA1).
A-II	14,414	HDL	Intestino Hígado	Principal proteína componente de las HDL, inhibidor de LH, ligando de sitios de unión a HDL.
A-IV	44,465	HDL, Qm	Intestino	Activador de LCAT, modulador de la LPL y estimula la salida de colesterol.
C-I	6,630	HDL, VLDL, Qm	Hígado	Activador de LCAT, inhibe la captación hepática de Tg.
C-II	8,900	HDL, VLDL, Qm	Hígado	Activador LPL, inhibición de la captación hepática de Tg.
C-III _{0,1,2}	8,800	HDL, VLDL, Qm	Hígado	Inhibidor de la LPL, inhibición de la captación hepática de Tg.
E _{2,3,4}	34,145	VLDL, HDL	Hígado	Ligando de receptores apoE, movilización del colesterol presente en el citoplasma de macrófagos, estimula la salida de colesterol.

Apo: Apolipoproteína, P.M.: Peso molecular, Lp: Lipoproteína, Tg: Triacilgliceroles, HDL: Lipoproteínas de alta densidad, Qm: Quilomicrones, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, LCAT: Lecitina colesterol acil transferasa, LPL: Lipoproteína lipasa, LH: Lipasa hepática.

Metabolismo de las HDL (Transporte Reverso del Colesterol)

El metabolismo intravascular de las HDL se conoce también como transporte reverso del colesterol (TRC). En este proceso el colesterol excedente, tanto sintetizado como depositado en las células periféricas, regresa al hígado para su eliminación o uso. Lo anterior evita la formación de cúmulos patológicos como en los ateromas (19, 20).

La estructura, composición y distribución de las HDL resultan del intercambio dinámico de lípidos entre las lipoproteínas, y de éstas con el organismo. Esta interacción es posible por la presencia de una gran variedad de enzimas, proteínas plasmáticas y de membrana, involucradas en el transporte, hidrólisis y transferencia de los componentes de las lipoproteínas. Algunas de las características de estas proteínas se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Enzimas y proteínas involucradas en el metabolismo de las lipoproteínas (21).

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 al formar ésteres de colesterol.	Hepático
LH	Hidroliza los triacilgliceroles 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 triacilgliceroles de VLDL y Qm utilizando C-II como activador. Favorece la generación de precursores de HDL.	Tejido adiposo y muscular, pared endotelial, pulmón.
CETP	Intercambia ésteres de colesterol por triacilgliceroles 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 las HDL y las células.	Hepatocito, tejido esteroideogénico.
ABCA-1	Transportador de la salida de colesterol y fosfolípidos. Favorece la maduración de HDL.	Hígado, macrófagos e intestino.
Apo-B/E r	Receptor para lipoproteínas que contienen apo B y E. Incrementa la salida de colesterol vía biliar.	Hígado

LCAT: Lecitina:colesterol acil transferasa; LH: Lipasa hepática; LPL: Lipasa lipoprotéica; CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol. PLTP: Proteína de transferencia de fosfolípidos, SR-BI: Receptor scavenger clase B tipo I, ABCA-1: Transportador de membrana dependiente de ATP clase A, tipo 1; Apo-B/E r: Receptor para lipoproteínas que contienen apo B y E. Qm: Quilomicrones, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia, LDL: Lipoproteínas de baja densidad, HDL: Lipoproteínas de alta densidad.

Las apolipoproteínas recién sintetizadas por el hígado son secretadas al torrente sanguíneo y adquieren lípidos como colesterol y fosfolípidos de los tejidos periféricos. Las HDL tipo pre β captan colesterol libre de las células periféricas principalmente por interacción con el transportador de membrana ABCA-1 dependiente de ATP presente en el hígado, macrófago e intestino (22).

Cuando las HDL pre β captan el colesterol libre se transforman en partículas HDL₃, que son partículas esféricas, pequeñas, ricas en apolipoproteínas y con pocos lípidos. Las HDL₃ se convierten posteriormente en partículas más grandes, pues aumentan su tamaño con la esterificación e internalización del colesterol libre. Este proceso está catalizado por la enzima lecitina: colesterol acil transferasa (LCAT).

La interacción con el SR-BI en hepatocitos es el mediador de la remoción selectiva de ésteres de colesterol de las HDL para su eliminación. Esta interacción no afecta a la proteína, ya que la HDL cambia su estructura y regenera partículas HDL₃, que pueden continuar con el eflujo de colesterol.

Por otro lado, los ésteres de colesterol asociados a las HDL₂ son intercambiados por triacilgliceroles con las diferentes lipoproteínas que contienen apo B, generando partículas HDL₂ enriquecidas en triacilgliceroles. Este intercambio es facilitado por la CETP. Para que las HDL mantengan una estructura estable, las apo C y E se transfieren a los quilomicrones y VLDL. Por otra parte, la lipasa hepática (LH) hidroliza triacilgliceroles y fosfolípidos de las HDL, generando una partícula remanente que puede ser remodelada por la proteína transportadora de fosfolípidos (PLTP) en partículas pre-β y HDL₃, ambas con capacidad de reiniciar el ciclo de captación de colesterol. Es así como el colesterol de los tejidos periféricos llega al hígado para ser reciclado o excretado a través de las vías biliares (23).

Clasificación de las HDL

El resultado de este intercambio dinámico de colesterol, resulta en la generación de una gama heterogénea de partículas HDL, que pueden diferenciarse por su diámetro, composición lipídica, contenido en apolipoproteínas y densidad.

La clasificación de las HDL comienza a ser una necesidad ya que se ha postulado que las subclases de HDL tienen diferentes funciones fisiológicas, ya que son grupos de partículas estructural y funcionalmente diferentes (18, 24). Se ha propuesto que no todas las subpoblaciones tienen las mismas propiedades antiaterogénicas, como se discutirá más adelante (16).

Existen diversos métodos de aislamiento y separación de las HDL. Estos métodos se basan esencialmente en la determinación de alguno de los componentes estructurales de las lipoproteínas. En este trabajo, la clasificación utilizada se basa en la densidad de flotación de las HDL en conjunto con su radio hidrodinámico, como se presenta a continuación.

Densidad de flotación.- Cuando las HDL son fraccionadas por ultracentrifugación, se separan típicamente en dos partes con base en la densidad de flotación (r): HDL₂ ($1.063 < r < 1.12$ g/mL) y las HDL₃ ($1.12 < r < 1.21$ g/mL). Las HDL₂ son grandes, ricas en colesterol esterificado y triacilgliceroles, mientras que las HDL₃ son pequeñas y están formadas principalmente por fosfolípidos y proteínas (25).

Densidad de flotación en conjunto con el diámetro hidrodinámico.- Las HDL son aisladas a partir de plasma por ultracentrifugación secuencial con base en su densidad de flotación. Posteriormente, las HDL se separan con base en su diámetro hidrodinámico^a (26) por electroforesis en gel de gradiente de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes. Posteriormente, se tiñen las proteínas en el gel con el colorante azul de Coomassie R250. Por último se cuantifica el área bajo la curva en los intervalos de diámetro correspondiente a las diferentes subclases de HDL por densitometría óptica. Las HDL separadas por este método pueden subdividirse en HDL_{2b}, HDL_{2a}, HDL_{3a}, HDL_{3b} y HDL_{3c} (ver figura 3).

^a **Diámetro hidrodinámico.-** es el diámetro que incluye la medida de la partícula en estudio más la medida de la capa eléctrica dipolar adherida a la superficie. El grosor de la capa depende en parte de la conductividad eléctrica del líquido. Esta capa influye en el movimiento de la partícula. En este caso, las partículas son las HDL y el medio es el amortiguador que se utiliza en la electroforesis para separar a estas proteínas.

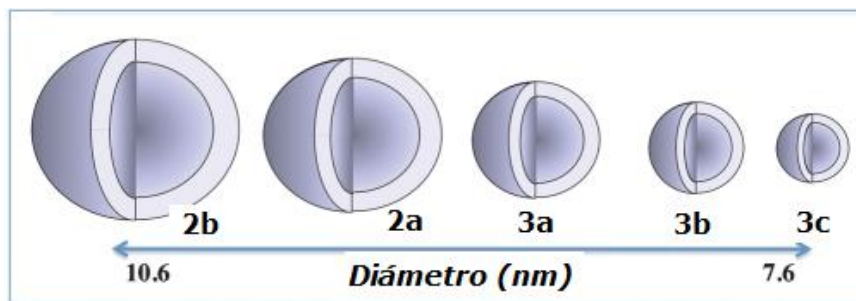
También se han diseñado técnicas que permiten cuantificar los componentes lipídicos en cada una de las subclases de HDL (colesterol, triacilgliceroles y fosfolípidos). Estas técnicas consisten en separar a las subclases de HDL con base en su densidad de flotación y diámetro hidrodinámico. Posteriormente, sobre el gel se realiza una tinción enzimática (específica para cada lípido) cuyo producto de reacción precipita sobre el gel y es analizable por densitometría óptica. El producto de reacción es directamente proporcional a la cantidad de lípido presente en la muestra (28, 29).

Estos métodos son cuantitativos ya que se determina el contenido del lípido en cada una de las subclases de HDL y éste se relaciona con la concentración del lípido-HDL en plasma. De esta forma se puede realizar la caracterización de la composición química (proteica y lipídica) de las HDL.

Importancia de la determinación de los lípidos de las subclases de HDL

Se ha propuesto en estudios recientes que las subclases de HDL tienen diferente actividad ateroprotectora, por lo que su análisis, así como la caracterización de su composición química pueden mejorar la capacidad de evaluar el riesgo de presentar EAC (19). Existen numerosos estudios clínicos y epidemiológicos que sugieren que la concentración del C-HDL no es suficiente para explicar el efecto protector de las HDL, como veremos a continuación.

Desde que el aumento de las concentraciones de C-HDL pasó a ser un objetivo terapéutico para reducir la tasa de incidencia de ECV(3), se diseñaron diferentes estrategias. La más avanzada de ellas fue el diseño de un fármaco capaz de aumentar eficazmente el C-HDL. El fármaco, llamado torcetrapib (un inhibidor de la CETP) aumentaba significativamente el C-HDL, incrementando la proporción de HDL₂ pero paradójicamente también aumentaba el riesgo de morbimortalidad mediante el aumento de la presión arterial en los pacientes (30-32).



Característica	HDL _{2b}	HDL _{2a}	HDL _{3a}	HDL _{3b}	HDL _{3c}
Diámetro (nm)	9.7-12	8.8-9.7	8.2-8.8	7.8-8.2	7.2-7.8
Densidad(g/mL)	1.099	1.107	1.123	1.155	1.186
Lípidos de superficie mol lípido/mol HDL					
Fosfolípidos	130	140	120		
Colesterol libre	70	40	25	45	25
				15	10
Lípidos del "núcleo" mol lípido/mol HDL					
Colesterol esterificado	180				
Triacilgliceroles	30	160	140	70	40
		20	15	10	5
Contenido (%)					
Proteína total	35	40	45	55	65
Lípidos totales	65	60	55	45	35

Figura 3. Heterogeneidad en las propiedades fisicoquímicas de HDL en sujetos sanos normolipémicos. Se presenta la clasificación de las HDL por su densidad de flotación en conjunto con su radio hidrodinámico. Imagen modificada de Rye et al. 2009 (24) y cuadro modificado de Kontush y Chapman, 2006 (27).

Esta fue la primera evidencia de que, por sí mismo, las altas concentraciones plasmáticas de C-HDL, asociado a un aumento del tamaño de estas lipoproteínas no siempre es cardioprotector. Asimismo, se demostró en un meta-análisis que, paradójicamente, a concentraciones plasmáticas más altas de C-HDL, acompañado de partículas HDL grandes, mayor era el riesgo cardiovascular (33). Por otro lado, individuos con niveles muy bajos de C-HDL (10-15 mg/dL, valor de referencia > 40 mg/dL), como los individuos apo A-I^{Milano}, apo A-I^{Paris} o pacientes con Eye Fish Disease (EFD)^b, no presentaban algún evento cardiovascular adverso, ni historial clínico o antecedentes familiares de EAC (34-36).

Una explicación a estas evidencias es, para el caso del torcetapib, que éste genera partículas HDL₂ o grandes, ricas en colesterol, ya que su mecanismo de acción es inhibir la CETP (figura 2). Una consecuencia de inhibir la CETP es bloquear una de las vías de salida del colesterol (intercambio de colesterol por triacilglicerol de las HDL con las lipoproteínas que contienen apo B). Por tanto, aunque los niveles de C-HDL son altos, la partícula HDL está alterada en su composición (enriquecida con colesterol esterificado), en consecuencia, su funcionalidad también está alterada, impactando, probablemente, en una menor tasa de salida del colesterol, abatiendo una de las principales funciones antiaterosclerosas de las HDL.

En el segundo caso, la apo A-I Milano es una variante de la apo A-I humana caracterizada por una sustitución en la posición 173 de cisteína por arginina en la secuencia de aminoácidos, asociada fuertemente con niveles bajos de colesterol-HDL y mayor longevidad (37). Aunque la partícula HDL no es rica en colesterol, ésta era muy eficiente al captarlo y eliminarlo (34, 38).

^b Eye fish disease (enfermedad del ojo de pez).- es una forma genética del déficit parcial de LCAT. Se caracteriza por opacidades de la córnea, y la reducción significativa del colesterol HDL. El deterioro de la función de la LCAT da lugar a la deposición de lípidos en la córnea que generan opacidades progresivas. Aunque los pacientes tienen niveles bajos de colesterol HDL, en muy pocos casos se presentan signos de aterosclerosis.

Podríamos resumir estos resultados controversiales en que lo importante no son sólo los niveles de C-HDL, sino la funcionalidad de la partícula, es decir, su capacidad para captar y eliminar el colesterol. La funcionalidad de la partícula depende de su estructura, y ésta depende a su vez de la composición lipídica y proteica.

Actualmente se han diseñado en nuestro laboratorio técnicas que permiten evaluar cada uno de los componentes de las HDL para describir con detalle la composición lipídica de la partícula. Como habíamos mencionado previamente, en estudios recientes se ha propuesto que las subclases de HDL tienen diferente actividad ateroprotectora, por lo que su análisis, así como la caracterización de su composición química puede mejorar la capacidad de evaluar el riesgo de EAC (19).

Algunos de los problemas de salud en los que se ha visto modificación en las subclases de HDL son las alteraciones renales, asociadas o no a nefropatía diabética (39).

Se conoce muy bien que los pacientes con un compromiso renal presentan un alto riesgo cardiovascular, estableciendo incluso que es posible emplear los niveles de microalbuminuria como marcadores de riesgo independiente para el desarrollo de EAC (39-43).

Estos pacientes presentan desórdenes lipídicos congruentes con un riesgo cardiovascular elevado (43), como disminución del C-HDL concomitante al aumento de las concentraciones plasmáticas de ácido úrico (44, 45).

Hiperuricemia y riesgo cardiovascular

La relación entre la hiperuricemia y la enfermedad cardiovascular descrita por diversos autores puede ser de tipo causal. Varios estudios epidemiológicos han tratado de demostrar la independencia de la hiperuricemia como factor de riesgo cardiovascular mediante el análisis multivariante (46-49). Aunque la mayoría de estos estudios apoyan esta idea, algunos estudios, entre ellos el “Framingham Heart Study” (50), no hallan una relación directa de la hiperuricemia en la incidencia de EAC al ajustar el análisis mediante variables potenciales de confusión (51).

Hiperuricemia

La hiperuricemia se define como el aumento de la concentración de ácido úrico en la sangre a partir del cual se excede su límite de solubilidad. En el ser humano (a 37°C) ocurre a una concentración superior a 7.0 mg/dL en hombres y 6.0 mg/dL en las mujeres (51). A partir de estos valores se aumenta el riesgo de artritis y nefrolitiasis. Sin embargo, concentraciones mayores a 5.2 mg/dL (hiperuricemia asintomática) se han asociado con enfermedad cardiovascular (52).

Existen dos causas por las cuales se ha dificultado que se pueda determinar el papel de la hiperuricemia en la fisiopatología de la enfermedad cardiovascular y renal: primero, los límites que tienen los estudios epidemiológicos para establecer una relación causa-efecto entre los factores estudiados y segundo, la complejidad del metabolismo del ácido úrico.

Los estudios epidemiológicos dependen de la metodología empleada y el número de covariables utilizadas en el análisis multivariante. Por ejemplo, el uso de una covariable puede ser apropiado si ésta es un factor de confusión, pero es un error metodológico si la covariable es un mediador patogénico entre el factor de

riesgo y la enfermedad cardiovascular (51). A continuación, revisaremos brevemente el metabolismo del ácido úrico (AU).

Metabolismo del ácido úrico

El AU en el hombre es el producto final del catabolismo de las purinas (adenina y guanina) que forman parte de los nucleótidos monofosfato de adenosina (AMP) y monofosfato de guanosina (GMP) y los de los ácidos nucleicos. Las purinas tienen un origen endógeno (síntesis de purinas y catabolismo de los ácidos nucleicos) de producción constante, y un origen exógeno, dependiente de la dieta.

El paso final en el metabolismo de las purinas lo lleva a cabo la enzima xantina óxido-reductasa (inhibida por el alopurinol y el febuxostat), que transforma la hipoxantina en xantina y finalmente en AU (figura 4) (46, 47). Esta enzima genera especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo, lo que podría contribuir a la disfunción endotelial propia de la enfermedad cardiovascular por un descenso del óxido nítrico (NO) (48, 49).

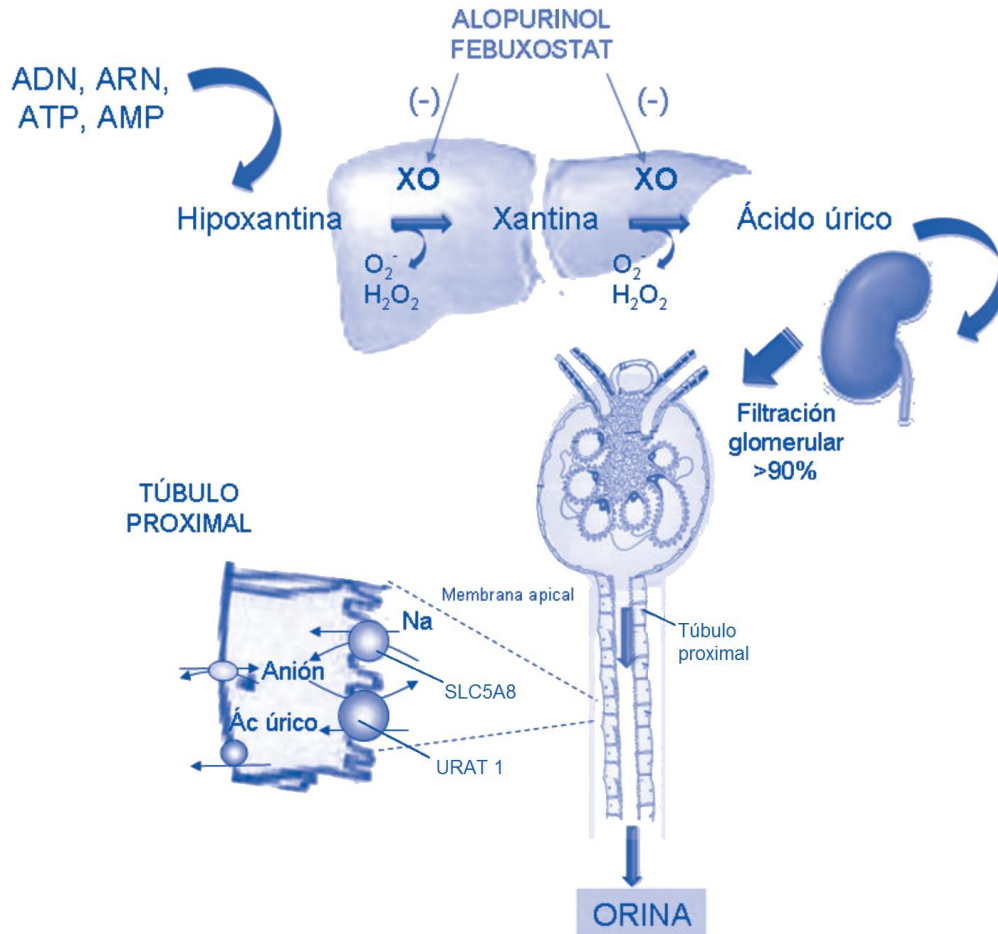


Figura 4.- Metabolismo del ácido úrico. Modificado de Molina et al, 2011 [51].

En la mayoría de los mamíferos, excepto en el hombre, otros primates y perros, el AU es metabolizado por la enzima uricasa en alantoína, un metabolito 10 veces más soluble en la orina que el AU. En los humanos, el gen que codifica la uricasa no se expresa, lo que hace que los niveles de urato en plasma humano sean 10 veces mayores que en el resto de las especies, lo que se acompaña de un mayor riesgo de gota y nefrolitiasis.

La uricasa se puede inhibir con ácido oxónico, incrementando los niveles plasmáticos de AU. Este modelo de hiperuricemia está descrito en ratas. El ácido oxónico es prácticamente insoluble en agua y existen pocos datos de su farmacocinética y farmacodinamia (ver figura 5).

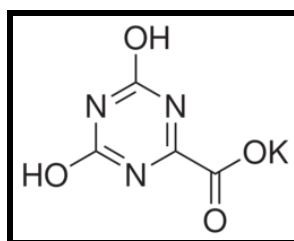


Figura 5.- Sal potásica de ácido oxónico, inhibidor de la uricasa.

El 75% del AU formado se elimina por el riñón y el 25% por el aparato digestivo, donde las bacterias intestinales lo degradan a alantoína. La mayoría del AU plasmático es filtrado por el riñón, ya que menos de un 5% se encuentra unido a proteínas, y el 90% del AU filtrado sufre reabsorción tubular (53).

Aunque no se conocen del todo los mecanismos responsables del manejo renal del AU, se acepta que el transporte renal está regulado por un sistema constituido por cuatro mecanismos: filtración glomerular, reabsorción tubular presecretora, secreción tubular y reabsorción tubular post secretora (figura 4).

Dentro de los principales transportadores de urato, se encuentra el URAT 1, responsable de la reabsorción en el túbulo proximal del urato filtrado, mediante el intercambio por aniones orgánicos, cuya concentración intracelular depende a su vez, de su absorción previa del ultrafiltrado a través de un cotransportador dependiente de sodio y del cual el urato no es sustrato (51), llamado SLC5A8 (54, 55).

Este mecanismo de reabsorción tubular de urato implicado con la reabsorción de Na^+ podría explicar la hiperuricemia inducida por los cetoácidos en la cetoacidosis diabética (56), intoxicación por etanol (57), o el síndrome metabólico (58).

La complejidad del metabolismo del AU y el hecho de compartir mecanismos patogénicos con otros factores de riesgo han hecho difícil determinar

si la hiperuricemia es un factor independiente de riesgo cardiovascular y de progresión de enfermedad renal (51).

Aproximación al conocimiento del ácido úrico y su relación con la enfermedad cardiovascular

Algunos estudios recientes pueden ayudar a establecer si existe una relación causa-efecto entre la hiperuricemia y la enfermedad renal y cardiovascular.

Existen pocos estudios en modelos animales, sin embargo, hay trabajos en modelos murinos (59, 60) donde se generó hiperuricemia mediante la administración de ácido oxónico, un inhibidor de la uricasa, concomitante a nefrectomía. Los animales generaron hipertensión arterial, hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia, así como vasoconstricción renal, hipertensión intraglomerular y estrechamiento de la arteriolar aferente, siendo reversible el aumento de la presión arterial tras la administración de febuxostat. Sin embargo, estos estudios están enfocados a demostrar el efecto de la hiperuricemia en la progresión de la enfermedad renal, por lo que el diseño mismo de estos experimentos no puede evidenciar el efecto del AU sobre los factores de riesgo cardiovascular clásicos (hipertensión, dislipidemias) en un modelo libre de factores confusores tales como la enfermedad renal. Adicionalmente, el metabolismo del colesterol en la rata no es semejante al del humano, ya que éstas carecen de la enzima CETP, es decir, no tienen una de las vías de salida del colesterol.

Es importante generar más modelos animales que permitan esclarecer la relación que existe entre la hiperuricemia y la enfermedad cardiovascular, tomando en cuenta factores de riesgo tradicionales como el C-HDL. El modelo animal debe tener un metabolismo del colesterol parecido lo más posible al humano, tal como el conejo (*Oryctolagus cuniculus*).

Ácido úrico y HDL

Algunas evidencias revelan que existe una relación entre las concentraciones plasmáticas de AU con la EAC. El AU correlaciona inversamente con las subclases de HDL en pacientes con EAC subclínica (61). También se ha visto en pacientes con tratamiento de hemodiálisis que existe alteración en la composición de las HDL y esta se relaciona estadísticamente con los niveles plasmáticos de AU (62). Adicionalmente, en un estudio realizado en pacientes con proteinuria e hiperuricemia se observó un aumento en la cantidad de HDL grandes o 2b (63). Estas observaciones se han obtenido mediante el análisis multivariante, el cual evidenció un vínculo entre las subclases de HDL y la ECV. Por tanto, surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Existe una asociación causal fisiopatológica entre la hiperuricemia y la modificación de la composición de las subclases de HDL?

Para responderla, es necesario realizar estudios funcionales en modelos experimentales. Hasta donde sabemos no hay un estudio con un modelo animal libre de comorbilidades que muestre el efecto de la hiperuricemia sobre el metabolismo y composición de las HDL.

Hiperuricemia y función endotelial

Como ya habíamos mencionado anteriormente, el paso final en el metabolismo de las purinas lo lleva a cabo la enzima xantina óxido-reductasa, que transforma la hipoxantina en xantina y finalmente en AU (ver figura 4) (46, 47). Esta enzima genera especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo, lo que podría contribuir a la disfunción endotelial propia de la enfermedad cardiovascular con descenso del NO (48, 49).

El NO es sintetizado en respuesta a una multitud de estímulos fisiológicos. A través de la acción del NO, el endotelio induce relajación de los vasos sanguíneos, atenúa la adhesión de plaquetas y su agregación inhibe la progresión de las células de músculo liso y disminuye la adhesión y migración de leucocitos a la pared vascular (64).

La disfunción endotelial se define como la alteración de la homeostasis vascular. Este desequilibrio hace que ante estímulos vasodilatadores exista una respuesta de vasoconstricción paradójica o con vasodilatación insuficiente, además de una predisposición a la adherencia leucocitaria, activación plaquetaria, trombosis, mitogénesis, inflamación vascular y finalmente aterosclerosis (65-67).

HDL y función endotelial

Se conoce muy bien que una de las funciones antiaterosclerosas de las HDL es preservar la función endotelial (68), por tanto, modificaciones en la composición de las HDL podrían modificar indirectamente la función endotelial.

Se ha postulado que los mecanismos responsables de la preservación de la función endotelial mediada por las HDL, están relacionados con la capacidad de estas últimas de inactivar los efectos nocivos de las LDL oxidadas (LDL-ox) a nivel de producción de NO. De hecho, la gran cantidad de LDL-oxidadas aumenta la

producción de la proteína caveolina-1 que inactiva la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) disminuyendo así la síntesis de NO (69).

Las HDL inactivan a las LDL-ox a través de una enzima asociada físicamente a las HDL plasmáticas con actividad antioxidante llamada paraoxonasa (PON1) (70). Otro mecanismo por el cual las HDL pueden inactivar a las LDL-ox es mediante la captación de lisofosfatidilcolina, uno de los productos derivados del proceso oxidativo de las LDL (16).

Otro efecto de las HDL que participa en la protección del endotelio vascular, es la inactivación del sistema del complemento. Cuando el proceso inflamatorio inicial se instala en las primeras etapas de la formación del ateroma, el complemento produce daño en las células endoteliales que culmina con la necrosis del tejido. Las HDL, a través de su apo A-I, se une al factor C9 del complemento, inhibiendo así la formación del complejo C5a-C9, y en consecuencia, anulando los efectos nocivos del complemento sobre el endotelio vascular en el proceso ateroscleroso (71).

Como se puede observar, son varias las evidencias que relacionan a las HDL con la preservación de la homeostasis del endotelio vascular. De acuerdo a nuestra hipótesis, la hiperuricemia producirá cambios en la composición lipídica de las HDL. Estos cambios en la composición pueden alterar el metabolismo y la funcionalidad de estas lipoproteínas, incluyendo la función endotelial.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la hiperuricemia no ha sido considerada en las guías clínicas como un factor de riesgo para desarrollar EAC. Los factores de riesgo tradicionales (tabaquismo, hipertensión, hipercolesterolemia, entre otros) explican aproximadamente sólo el 75% de la incidencia de ECV (8) lo cual resalta la importancia de tener en cuenta todos los factores de riesgo, con el fin de dilucidar nuevas vías relacionadas con la aterosclerosis (9), sin olvidar analizar su capacidad predictiva y su potencial aplicación clínica.

Por otra parte, en varios estudios epidemiológicos se ha demostrado que concentraciones elevadas de C-HDL en plasma correlacionan estrechamente con una baja incidencia de enfermedad cardiovascular (14). Sin embargo, numerosos estudios sugieren que la concentración de C-HDL no es suficiente para explicar el efecto cardioprotector de las HDL. No obstante, el análisis de la composición lipídica de las subclases de HDL tiene una aplicación potencial para evaluar el riesgo cardiovascular y ésta es probablemente más descriptiva que los valores de C-HDL (16). Sin embargo, esta determinación es aun controversial porque diversos factores metabólicos pueden alterar esta distribución.

Uno de los factores que modifican la composición lipídica de las HDL son las alteraciones renales, que van acompañadas de valores elevados de ácido úrico. En estudios recientes de nuestro grupo se ha demostrado que la hiperuricemia correlaciona con las subclases de HDL en diferentes modelos de estudio, sugiriendo que existe una relación causal entre ambos parámetros (61, 63, 72).

Nosotros creemos que la hiperuricemia puede ser un factor que modifica la composición de las HDL. Los cambios en la composición lipídica de las HDL tendrían un impacto directo sobre el metabolismo de estas partículas, así como en

su funcionalidad (promover el eflujo de colesterol y la función endotelial), siendo esta última un vínculo directo entre hiperuricemia y enfermedad cardiovascular. Por tanto, la pregunta de investigación es: ¿existe una asociación causal entre la hiperuricemia y la alteración de la composición, metabolismo y funcionalidad de las HDL?

Los estudios que han descrito las anomalías estructurales de las HDL y que tienen correlación con la hiperuricemia se han realizado mediante análisis multivariante en pacientes con falla renal, hemodiálisis, síndrome metabólico y diabetes. Sin embargo, debido a las comorbilidades que acompañan a estos padecimientos, no se ha podido establecer una asociación causal entre la hiperuricemia y la alteración de la composición de las HDL. Por tanto, surge la necesidad de establecer un modelo de hiperuricemia que carezca de las comorbilidades que habitualmente acompañan a la disfunción renal, diabetes mellitus o síndrome metabólico, que por sí mismas afectan la estructura y el metabolismo de las HDL. Además, es necesario contar con evidencia sólida para establecer si la hiperuricemia puede ser, además de un factor de riesgo cardiovascular y renal, un objetivo terapéutico. Aunque este no es el propósito de este estudio, puede ayudar a establecer la relación que hay entre la hiperuricemia y factores de riesgo clásico como el C-HDL.

HIPÓTESIS

Si la hiperuricemia produce cambios en la composición lipídica de las HDL, entonces provocará cambios en su metabolismo, estructura, y su capacidad de favorecer la vasodilatación arterial.

Objetivo general

Determinar el efecto de la hiperuricemia sobre la distribución de tamaños y la composición, metabolismo y funcionalidad de las subclases de HDL en un modelo animal.

Objetivos particulares

- Establecer y caracterizar un modelo animal de hiperuricemia en conejo Nueva Zelanda inducido con la administración de ácido oxónico.
- Determinar el efecto de la hiperuricemia sobre la distribución de tamaños y la composición (lipídica y proteínica) de las HDL en este modelo.
- Determinar la tasa de catabolismo de la apolipoproteína Apo-AI (tasa de catabolismo de HDL) en conejos hiperuricémicos.
- Evaluar la función endotelial de las aortas de conejos hiperuricémicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron siete conejos raza Nueva Zelanda, machos, de aproximadamente 2.5 kg para generar el modelo de hiperuricemia. Este grupo recibió tratamiento diariamente con ácido oxónico (inhibidor de la uricasa) en suspensión acuosa por vía oral a razón de 750 mg/kg/día durante 21 días (dosis diaria única). Se tomaron muestras de sangre al inicio y al final del tratamiento, de tal modo que cada sujeto es su propio control. Este diseño experimental se realizó para el análisis del tamaño y composición de las HDL y para la descripción bioquímica del modelo de hiperuricemia.

Para los estudios cinéticos y de función endotelial, se utilizó el grupo control (n=7) como referencia. El grupo control recibió vehículo (agua) a lo largo del estudio.

Los animales consumieron alimento estándar (Lab rabbit diet, purina) y agua *ad libitum*.

Obtención de muestras

Las muestras sanguíneas se obtuvieron por punción de la vena marginal de la oreja (para el estudio cinético-metabólico) o por punción arterial, después de un ayuno de 12 horas, en tubos que contenían heparina como anticoagulante (Sol. Inyectable, 1000 UI/mL, PISA, 10 µL/mL). Las muestras se centrifugaron a 1000 g durante 15 minutos. Posteriormente se separó el plasma, el cual se utilizó de inmediato para las determinaciones bioquímicas. Para otras determinaciones, las muestras de plasma se mantuvieron almacenadas a -70°C hasta el momento de su análisis.

Análisis de laboratorio

La determinación de la concentración plasmática de glucosa (Glu), colesterol total (CT) y triacilgliceroles (Tg), urea y creatinina (creat), se determinaron por métodos enzimáticos colorimétricos comerciales (Randox®, Reino Unido).

Los valores plasmáticos de ácido úrico se determinaron por el método de fluorescencia Amplex Red ®.

La concentración de ésteres de colesterol se calculó con la siguiente fórmula (73):

$$CE_{mg/dL} = CT_{mg/dL} - CL_{mg/dL} \times 1.68$$

Donde

CE: Colesterol esterificado

CT: Colesterol total

CL: Colesterol libre^c (no esterificado)

El factor de conversión entre el peso molecular del colesterol y el colesterol esterificado es 1.68

Análisis de los lípidos de HDL

Para la determinación de la concentración plasmática de los lípidos asociados a HDL, se precipitaron a partir de plasma de manera selectiva, las lipoproteínas que contienen apo B (VLDL, IDL, LDL) con el reactivo comercial de Randox® (sulfato de dextran/magnesio, 100 µL de plasma/250 µL de reactivo precipitante). Posteriormente se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos. El sobrenadante contiene a las HDL totales.

^c Colesterol libre.- colesterol asociado a la partícula HDL que no está esterificado, y por tanto, se encuentra en la parte externa de la lipoproteína.

En el sobrenadante se determinó la concentración plasmática de los lípidos asociados a HDL: colesterol (C-HDL), triacilgliceroles (Tg-HDL) y fosfatidilcolina (Plp-HDL) por métodos enzimáticos colorimétricos comerciales (Randox®, Reino Unido). Los datos se corrigieron tomando en cuenta las diluciones realizadas.

El análisis de la concentración plasmática de colesterol libre (CL-HDL) se realizó en el sobrenadante de acuerdo a la técnica descrita en el anexo 1.

Estos parámetros se analizaron antes y después del tratamiento con ácido oxónico.

Análisis de depuración de creatinina.

Antes y después del tratamiento con ácido oxónico se recolectó la orina de los animales durante 24 horas mediante el uso de una caja metabólica. Se determinaron las concentraciones de creatinina (plasmáticas y de orina) mediante el método Jafee sin desproteización utilizando el kit comercial de Randox®.

Para el cálculo de la depuración de creatinina, se utilizó la siguiente fórmula:

$$D_{Creat} = \frac{[Creat]_{Orina} \cdot Vol_{Orina}^{24h}}{[Creat]_{Plasma} \cdot 1440}$$

Donde

D_{Creat}	Depuración de creatinina
$[Creat]_{Orina}$	Concentración de creatinina en orina (mg/dL)
$Vol_{Orina}^{24 hrs}$	Volumen de orina (mL) recolectada en 24 horas
$[Creat]_{Plasma}$	Concentración de creatinina en plasma (mg/dL), y
1440:	Son los minutos equivalentes a 24 horas.

Las unidades en las que se reporta la depuración de creatinina son mL/min.

Aislamiento de HDL

Las HDL se separaron por ultracentrifugación secuencial (Beckman Optima TLX) a partir de plasma, de acuerdo al siguiente esquema de separación:

1. Ajuste de densidad del plasma a 1.063 g/mL con KBr sólido y ultracentrifugación durante 2 h 30 min a 436 000 g. En este paso se separan por flotación las lipoproteínas que contienen apo B (VLDL, LDL, IDL). En la fase inferior se recuperan las HDL con otras proteínas plasmáticas.
2. Ajuste de densidad a 1.21 g/mL con KBr sólido. Ultracentrifugación por 3 h a 436 000 g. En estas condiciones se recupera cerca del 80% a 85% de la apo A-I del total del plasma por flotación.
3. Ajuste del sobrenadante con solución de KBr a densidad 1.25 g/mL y ultracentrifugación por 3 h a 436 000 g. En este paso se disminuye la cantidad de albúmina residual que está presente con las HDL.

Posterior al aislamiento, las HDL se dializaron en solución amortiguadora de Tris 0.09 M, ácido bórico 0.08 M, EDTA 3 mM, pH= 8.4 (amortiguador TBE).

La determinación de proteínas totales se realizó por el método de Lowry (74) (ver anexo 2).

Análisis de las subclases de HDL

Se realizó el análisis de las subclases de HDL con el fin de conocer su composición lipídica y proteínica antes y después del tratamiento con ácido oxónico.

Una vez aisladas las HDL mediante ultracentrifugación secuencial, las HDL se separaron en cinco subclases (HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL3b y HDL3c) de acuerdo a su radio hidrodinámico mediante la técnica de electroforesis en gradiente de 3 a 30% de poliacrilamida en condiciones nativas (ver anexo 3).

Las HDL separadas en gel se analizaron por su radio hidrodinámico, utilizando como referencia los marcadores proteínicos de alto peso molecular (tiroglobulina, 17nm; ferritina, 12.2 nm; catalasa, 10.4 nm; lactato deshidrogenasa, 8.2 nm y albúmina de 7.1 nm, kit Pharmacia, UK) (75).

Se construyeron cinco intervalos correspondientes a las subclases de HDL con base en su diámetro hidrodinámico conocido (HDL2b 13.6-10.58 nm, HDL2a 10.58-9.94 nm, HDL3a 9.94-8.98 nm, HDL3b 8.98-8.45 nm, HDL3c 8.45-7.70 nm) (28, 76).

Se realizaron cuatro réplicas de cada gel realizado en este estudio. Las réplicas se tiñeron con los reactivos reveladores de los diversos lípidos que constituyen a las HDL: colesterol total, colesterol libre, triacilgliceroles y fosfolípidos (fosfatidilcolina), una réplica por cada tinción. La composición de los reactivos se describe en el anexo 4.

Para conocer la distribución relativa de proteína en las subclases de HDL, los geles previamente teñidos con los reactivos reveladores de lípidos se decoloraron con una mezcla de metanol (25%), ácido acético (10%) y agua. Posteriormente se tiñeron todas las apolipoproteínas asociadas a las HDL con azul de Coomassie R250 al 0.1% solubilizado en metanol 25%, ácido acético 10% y agua.

De cada gel se obtuvo un densitograma correspondiente a las bandas de lípidos y proteínas asociadas a las HDL. Los densitogramas se analizaron en el programa de cómputo Molecular Analyst Software Versión 1.1, 1994 Bio-Rad.

Para calcular el porcentaje con el que contribuye cada subclase a la población total de HDL plasmáticas se consideró que el área total bajo la curva del densitograma corresponde a la población total de HDL y que las subclases pueden dividirse empleando los diámetros hidrodinámicos previamente reportados.

Para estimar la concentración plasmática de los lípidos de las subclases de HDL, el porcentaje relativo de cada subclase determinado por densitometría óptica fue relacionado con las concentraciones de cada uno de los lípidos-HDL (ver la sección “análisis de los lípidos HDL”).

En la figura 6 se presenta un ejemplo de la migración electroforética de las HDL teñidas con azul de Coomassie, el densitograma obtenido y los intervalos de diámetro que definen a las subclases de estas lipoproteínas.

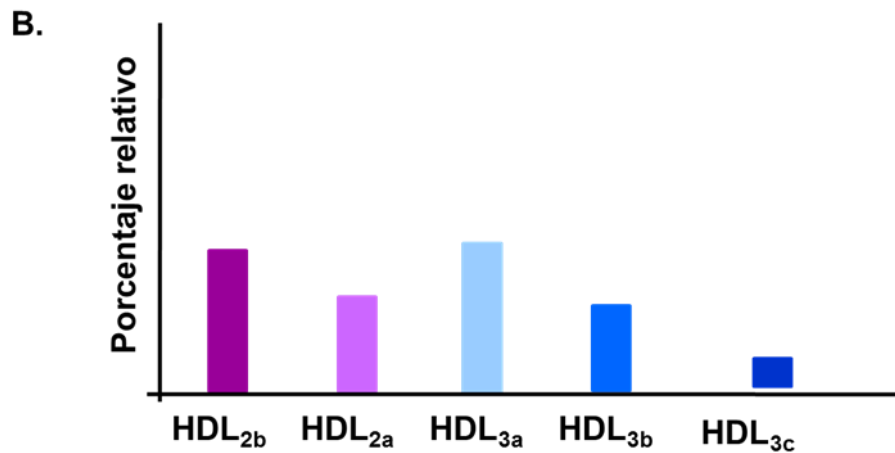
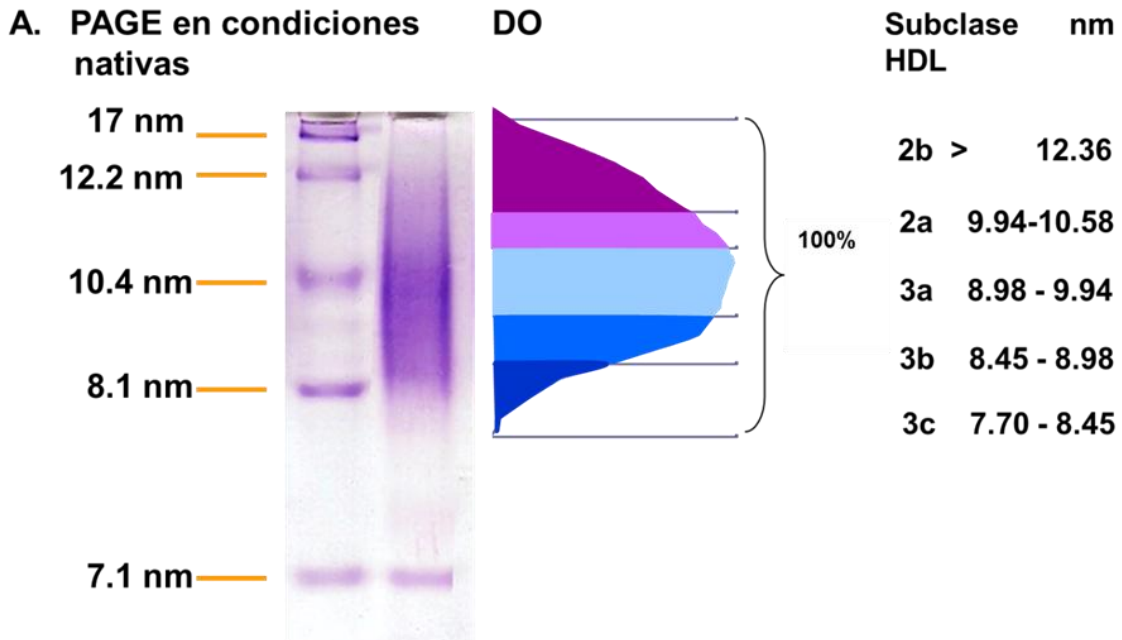


Figura 6.- A) Migración de una muestra de HDL en un gel PAGE nativo teñido con azul de Coomassie. En el primer carril se observa el corrimiento de los marcadores de proteína de alto peso molecular mientras que en el segundo se observa el corrimiento de una muestra de HDL. A la derecha de la imagen del gel se presenta el densitograma correspondiente que presenta la densidad óptica (DO) contra la distancia migrada. El área bajo la curva se considera como el 100% de las HDL. B) El análisis densitométrico y la integración parcial de cada uno de los intervalos permite la estimación de la proporción relativa (%) de cada una de las subclases de HDL.

Estudios cinéticos

Aislamiento y Marcaje de Apo A-I de conejo.

A partir del plasma obtenido de conejos donadores se aislaron HDL por centrifugación secuencial, ajustando el plasma a una densidad de 1.21 g/mL con KBr sólido. Posteriormente se dializaron con bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3 5 mM, 3 días).

El marcado de la apo A-I se llevó a cabo por el método de yodación con cloramina T (77, 78) (ver anexo 5). El método consiste en mezclar 1 mg de proteína con 1 mCi de Na^{125}I (Amersham Biosciences) en presencia de cloramina T como agente oxidante. La proteína marcada se separó del yodo libre pasando la mezcla a través de una columna de Sephadex G-25 1.0 x 10.0 cm (Pharmacia Fine Chemicals, 50-150 μ).

La solución se esterilizó usando filtros de 0.22 μm (Millipore, Bedford, MA) y se almacenó hasta su uso a 4°C.

Cinética metabólica de apo A-I

El análisis cinético se realizó en el grupo de conejos tratados y control, previo ayuno de 12 horas. El estudio cinético se llevó a cabo después de los 21 días de tratamiento con ácido oxónico, el cual siguió siendo administrado a los animales los días que duró la cinética con el fin de mantener la inhibición de la uricasa para posteriormente, extraer la aorta post mortem y realizar los estudios de función endotelial.

La cinética metabólica consistió en administrar un bolo intravenoso de ^{125}I -HDL, conteniendo 1.75 mg de proteína equivalente a 7.0×10^7 cpm de ^{125}I en la vena marginal de la oreja. Posteriormente se obtuvieron muestras de sangre de 1 mL de la vena marginal opuesta, a diferentes tiempos: 10 min, 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 h, después de la aplicación de las ^{125}I -HDL. De cada una de estas muestras se separó una alícuota de 100 μL de plasma y se analizaron en un contador de radiación gamma durante 1 min.

Las curvas de decaimiento del ^{125}I (% de la radiactividad inicial vs. tiempo), fueron construidas considerando como 100% de radiactividad, a las cuentas obtenidas en la muestra tomada a los 10 min.

Con ayuda del programa computacional SAAMII, se ajustó un modelo bicompartimental (modelo abierto de dos compartimentos, administración intravenosa (MADC IV) a los resultados experimentales. Uno de los parámetros resultantes del modelado es la tasa de catabolismo fraccional (FCR, pool/h). En la figura 7 se presenta el diseño del modelo bicompartimental.

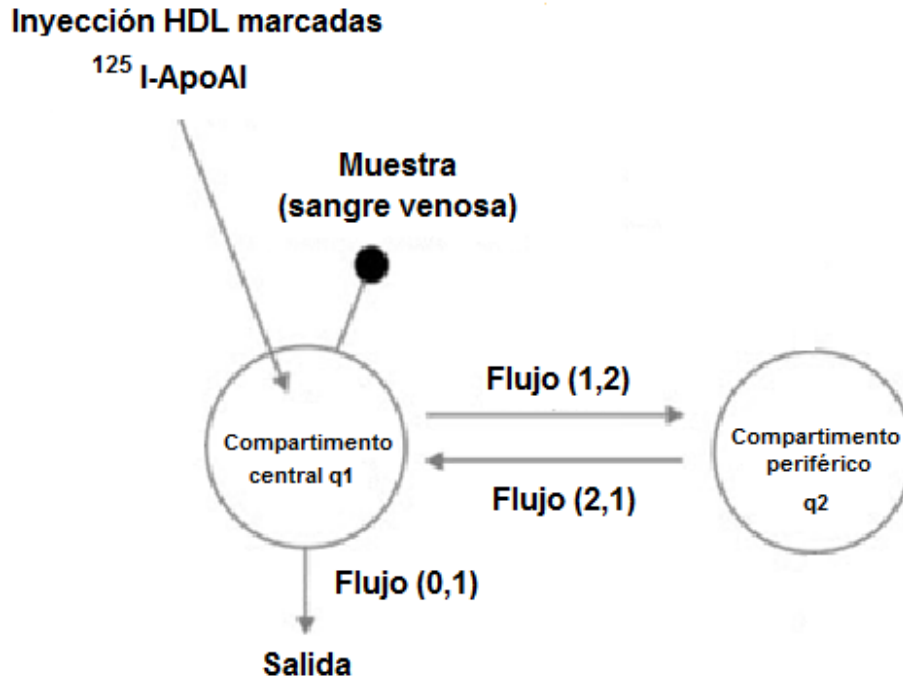


Figura 7.- Representación esquemática del modelo bicompartimental para el metabolismo de la apo A-I de las HDL en conejos, administración intravenosa en dosis única. Los círculos representan los compartimentos. Las flechas representan las vías de transporte (flujos). El flujo (1,2) y (2,1) representan la cinética intercompartimental. El flujo (0,1) representa la eliminación del fármaco del compartimento central. El círculo negro representa la muestra de plasma tomada en ese compartimento. Se considera el compartimento central el plasma y el compartimento periférico los órganos con los cuales el plasma tiene contacto.

La ecuación que describe el MADC se basa en la premisa de que las HDL se eliminan solamente del compartimento central, considerando que los órganos excretores altamente perfundidos (hígado y riñón), son fácilmente accesibles para las lipoproteínas.

La ecuación que describe este comportamiento se establece a partir de un balance de materia y de las leyes de difusión (79). La forma integrada de la ecuación se muestra a continuación:

$$C_p = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$$

Donde

C_p : concentración plasmática

A: intersección con las ordenadas de la pendiente de la distribución

B: intersección con las ordenadas de la pendiente de la eliminación

t: tiempo

α : pendiente del proceso de distribución

β : pendiente del proceso de eliminación

En la figura 8 se puede observar el curso temporal de las concentraciones, característico de un modelo bicompartimental para administración intravenosa.

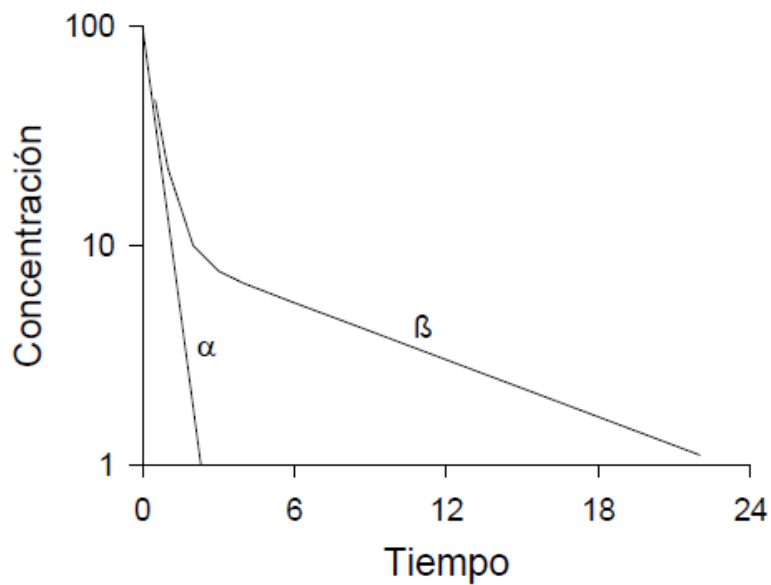


Figura 8. Representación gráfica linealizada del MADC después de una administración intravenosa.

Para el cálculo de la tasa de catabolismo fraccional (FCR), se utiliza la siguiente ecuación:

$$FCR = \frac{y(0) \cdot a \cdot b}{bA + aB}$$

donde

FCR: Tasa de catabolismo fraccional (hora⁻¹)

y (0): ordenada de origen

α: pendiente del proceso de distribución

β: pendiente del proceso de eliminación

A: intersección con las ordenadas de la pendiente de la distribución

B: intersección con las ordenadas de la pendiente de la eliminación

Evaluación de la función endotelial: anillos de aorta.

El día del experimento, se sacrificó a los conejos por dislocación cervical. Inmediatamente se cortaron las arterias renales con el fin de desangrar al animal. Posteriormente, se disecó la aorta torácica y se removió el tejido conectivo circundante. Se cortaron dos anillos de 3 mm de longitud y se colocaron en una cámara para órgano aislado con 10 ml de solución de Krebs (NaCl 118.1 mM, NaHCO₃ 25 mM, KCl 4.7 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 2.5, d-glucosa 11.1 mM, pH 7.4), con burbujeo continuo de una mezcla de O₂-CO₂ (95%,5%) a 37°C.

Cada anillo aórtico se montó entre 2 ganchos de acero inoxidable. Uno de los ganchos se colocó en el fondo de la cámara y el otro se colocó a un transductor de tensión, para producir una tensión de 1.5 g.

Después de un periodo de equilibrio de 2 h, se realizó la curva dosis-respuesta a acetilcolina (10^{-8} a 10^{-6} M) en anillos aórticos precontraídos con 3×10^{-6} M de fenilefrina. La vasorelajación se expresó como el porcentaje de la precontracción con fenilefrina.

Las contracciones se midieron isométricamente con un transductor de tensión FT-03 acoplado a un polígrafo modelo 7D (Grass Medical Instruments, Quincy, MA, USA)(80).

Análisis estadístico

El análisis de resultados se realizó con el paquete estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc, versión 18.0 para Windows. Chicago, Illinois).

Las comparaciones entre los parámetros de bioquímica clínica, lípidos HDL y lípidos asociados a las subclases de HDL, se realizaron comparando los resultados al inicio y al final del tratamiento con ácido oxónico. En estos experimentos, cada sujeto es su propio control. La prueba estadística utilizada fue t de Student pareada.

Para los casos donde los sujetos no pueden ser su propio control (cinética metabólica de apo A-I y experimentos de función endotelial en aorta) se comparó contra grupo control mediante una prueba de t de Student no pareada para muestras con varianzas diferentes.

Todos los resultados se presentan como el promedio \pm error estándar. En todos los casos los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Caracterización renal y bioquímica del modelo de hiperuricemia inducida con ácido oxónico (750 mg/kg/día, 21 días, oral).

Con el objetivo de caracterizar nuestro modelo de hiperuricemia, se analizaron las concentraciones plasmáticas de ácido úrico, glucosa, colesterol, triacilgliceroles y lípidos asociados a las HDL. También se analizaron los metabolitos de excreción urea, creatinina y depuración de creatinina.

El incremento significativo en la concentración plasmática de ácido úrico es el indicativo de que el modelo de hiperuricemia quedó establecido. Los resultados se presentan en el cuadro 3.

Cuadro 3.- *Parámetros bioquímicos en suero (mg/dL)*

Parámetro	Antes del tratamiento n=7	Después del tratamiento n=7
Ácido úrico	0.84 ± 0.06	5.24 ± 0.12**
Glucosa	108.3 ± 1.9	117 ± 4.7
Colesterol	70.5 ± 6.4	68.0 ± 5.5
Triacilgliceroles	60.7 ± 4.4	56.7 ± 9.5
Colesterol total-HDL	37.7 ± 3.9	34.6 ± 2.8
Colesterol libre-HDL	3.8 ± 1.0	2.06 ± 0.4*
Colesterol no HDL	32.8 ± 3.2	33.1 ± 6.4
Triacilgliceroles-HDL	27.8 ± 1.6	21.0 ± 1.7*
Fosfolípidos-HDL	95.7 ± 7.4	69.3 ± 2.8**

*Los resultados mostrados se expresan como promedio ± EE. Prueba t de student pareada
*p<0.05 **p<0.01*

La concentración plasmática de ácido úrico se incrementan más de 6 veces después del tratamiento, quedando claramente establecido el modelo de hiperuricemia inducida con la administración de ácido oxónico (750 mg/kg/día, 21 días, oral).

De acuerdo al cuadro 3, se observa que las concentraciones plasmáticas de glucosa, colesterol, colesterol-HDL y triacilgliceroles, no se modifican por la hiperuricemia, por lo que podemos decir que la hiperuricemia no produce dislipidemia en este modelo animal.

En relación a la concentración plasmática de los lípidos asociados a HDL, el colesterol libre-HDL y los fosfolípidos-HDL disminuyen en un 50% y 30%, respectivamente. Por otro lado, la concentración plasmática de triacilgliceroles-HDL disminuye alrededor del 25%. Con respecto a colesterol total-HDL no hay cambio significativo.

Los parámetros bioquímicos indicadores de función renal antes y después del tratamiento se presentan en el cuadro 4.

Cuadro 4.- Parámetros de función renal antes y después del tratamiento con ácido oxónico.

Parámetro	Antes del tratamiento n=7	Después del Tratamiento n=7
Urea (mg/dL)	38.8 ± 6.0	39.2 ± 3.4
Creatinina (mg/dL)	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1
Depuración (mL/min)	5.1 ± 1.3	6.5 ± 0.9

Los resultados mostrados se expresan como promedio ± EE.

Con base en los resultados del cuadro 4, se deduce que la función renal no se alteran significativamente en nuestro modelo.

Distribución de las subpoblaciones de HDL por su contenido proteínico y lipídico.

Se ha postulado que las subclases de HDL son grupos de partículas estructural y funcionalmente diferentes (24, 81) y esto depende de su composición lipídica y proteínica (16).

La suma del porcentaje de proteína con el que contribuye cada subpoblación de HDL a la población total de HDL plasmáticas, se conoce como la distribución relativa de proteína de HDL. Ésta se determina semi-cuantitativamente en función del contenido de proteína de las HDL. Este tipo de análisis también se puede realizar para los componentes lipídicos (colesterol total, colesterol libre, triacilgliceroles y fosfatidilcolina) como se observa más adelante. En el cuadro 5 se presenta la distribución relativa de las subpoblaciones de HDL antes y después del tratamiento con ácido oxónico determinada por su contenido en proteína.

Cuadro 5.- Distribución relativa de las subpoblaciones de HDL determinada por su contenido de proteína antes y después del tratamiento con ácido oxónico.

	Tiempo	HDL 2b	HDL 2a	HDL 3a	HDL 3b	HDL 3c
Distribución relativa de proteína de HDL (% relativo)	Pre	22.1 ± 1.7	16.3 ± 0.6	38.3 ± 1.4	17.8 ± 0.9	5.6 ± 0.3
	Tratamiento					
	Post	22.7 ± 2.4	16.9 ± 0.6	38.8 ± 1.7	17.0 ± 0.9	4.9 ± 0.8
	Tratamiento					

Los resultados se expresan como promedio ± EE. Prueba t de Student pareada, n=7.

No se observan diferencias estadísticamente significativas en la distribución relativa de proteína en las subclases de HDL después del tratamiento.

Lípidos de las subclases de HDL.

También se realizó el análisis de la distribución relativa de los lípidos de las subclases de HDL (colesterol total (CT), colesterol libre (CL), triacilgliceroles (Tg) y fosfolípidos (Plp)). La distribución relativa de los triacilgliceroles y fosfolípidos de HDL pre y post tratamiento se presentan en los gráficos 1 y 2.

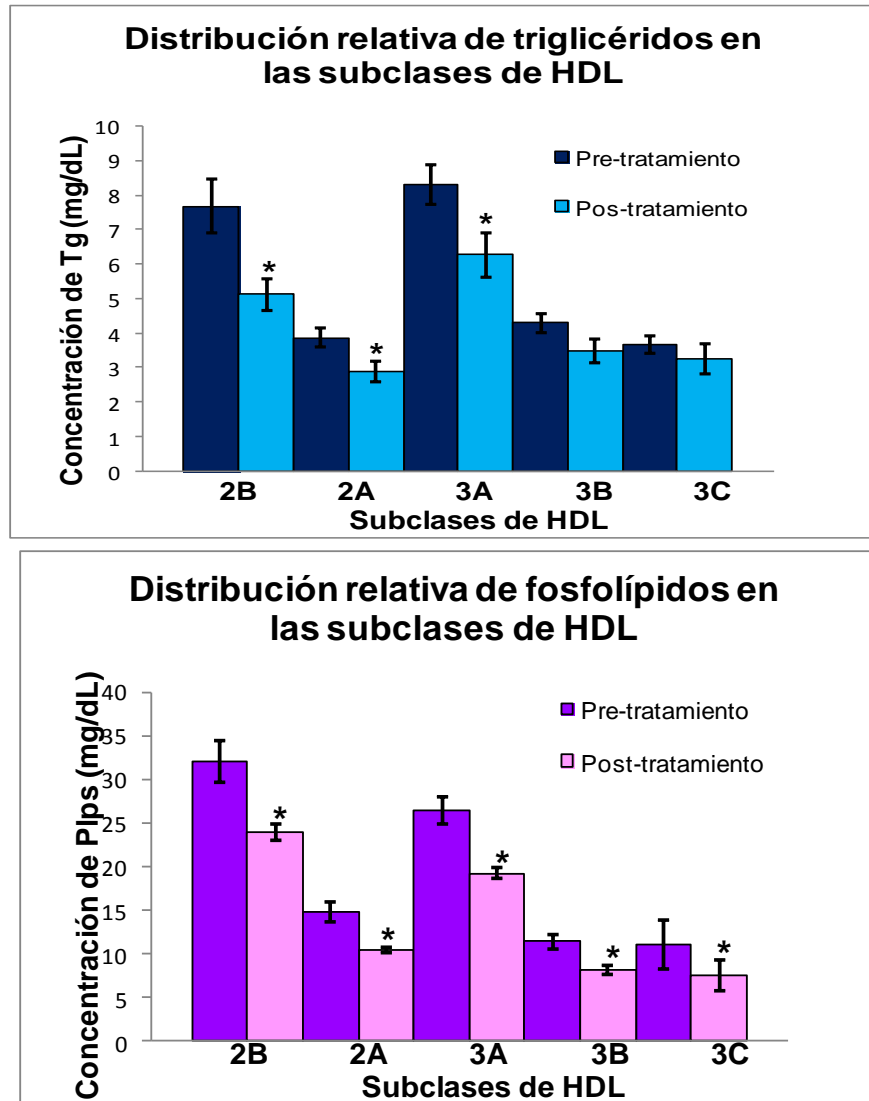


Gráfico 1 y 2.- Comparación de las distribuciones relativas de HDL cuantificadas por su contenido en triacilgliceroles y fosfolípidos (fosfatidilcolina) pre y post tratamiento con ácido oxónico. Los valores están expresados como la media \pm EE; $n=7$. Prueba t de Student pareada $*p<0.05$

De acuerdo al gráfico 2, la concentración de fosfolípidos asociados a HDL disminuye significativamente en todas las subclases y esto es congruente con la disminución de fosfolípidos-HDL plasmáticos (ver cuadro 3).

La cantidad de fosfolípidos en las HDL determina la cantidad de partículas HDL existentes (29, 82), por lo que este decremento indica que se tienen cantidades menores de partículas, aunque éstas son del mismo tamaño, ya que no hay cambios en la distribución proteínica (ver cuadro 5).

También observamos en el gráfico 1, una disminución en los triacilglicérols de las subclases HDL 2b, HDL 2a y HDL 3a (grandes y medianas).

Los resultados de la distribución relativa de las subclases de HDL de las diferentes especies de colesterol [colesterol total (CT), colesterol libre (CL) y colesterol esterificado (CE)] se encuentran en el cuadro 6. El colesterol total y libre se determinaron enzimáticamente. La concentración plasmática de colesterol esterificado fue estimado a partir del colesterol total y libre (ver en la sección de materiales y métodos).

Cuadro 6.- Concentración de las diferentes especies de colesterol asociadas a las subclases de HDL antes y después del tratamiento con ácido oxónico.

Lípido	Tiempo	HDL2b	HDL2a	HDL3a	HDL3b	HDL3c
Colesterol total (mg/dL)	Pre tratamiento	12.0 ± 1.6	6.1 ± 0.8	11.0 ± 1.4	4.5 ± 0.4	4.1 ± 0.9
	Post tratamiento	10.6 ± 1.4	5.4 ± 0.6	10.1 ± 0.9	4.4 ± 0.4	3.9 ± 0.8
Colesterol libre (mg/dL)	Pre tratamiento	1.1 ± 0.3	0.6 ± 0.2	1.2 ± 0.3	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.05
	Post tratamiento	0.6 ± 0.1	0.3 ± 0.07*	0.6 ± 0.1*	0.3 ± 0.06*	0.2 ± 0.04
Colesterol esterificado (mg/dL)	Pre tratamiento	18.2 ± 2.3	9.1 ± 1.1	16.5 ± 1.9	6.7 ± 0.5	6.4 ± 1.6
	Post tratamiento	16.9 ± 2.3	8.6 ± 0.9	16 ± 1.3	6.8 ± 0.5	6.3 ± 1.4

Los resultados se expresan como promedio ± EE. *p<0.05, n=7.

Los resultados muestran que hay una disminución en aproximadamente el 50% del colesterol libre asociado a HDL grandes y medianas (HDL 2a, HDL 3a y HDL 3b). Aunque este cambio es estadísticamente significativo, las concentraciones de colesterol libre asociado a las subclases de HDL presenta fluctuaciones mínimas (<1 mg/dL). Se considera significativo un cambio en este lípido si éste tiene repercusión en la concentración de colesterol esterificado.

Como se puede observar en el cuadro 6, la distribución relativa de colesterol esterificado no cambia en las subpoblaciones de HDL, por lo que los cambios de colesterol libre no son significativos para la composición de la partícula.

Por otra parte, se observa que no hay cambios en el colesterol total asociado a HDL. Previamente habíamos demostrado que las HDL tienen el mismo tamaño después del tratamiento, pero hay menor número de partículas HDL. Estas evidencias sugieren que las partículas HDL se están enriqueciendo en colesterol en respuesta a la hiperuricemia.

Relación de los lípidos de la partícula HDL

Para tener información más clara sobre la composición de las partículas HDL y el efecto que la hiperuricemia tiene sobre la misma, se realizó el cociente de los lípidos CT/Plp y Tg/Plp por subclase de HDL con el fin de “normalizar” la concentración de lípidos por número de partículas HDL. Estos resultados se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Cocientes de los principales lípidos de HDL.

	Tiempo	HDL 2b	HDL 2a	HDL 3a	HDL 3b	HDL 3c
Cociente CT/Plp	Pre					
	Tratamiento	0.37 ± 0.04	0.4 ± 0.05	0.4 ± 0.03	0.4 ± 0.02	0.55 ± 0.15
	Post Tratamiento	0.45 ± 0.07	0.5 ± 0.07*	0.53 ± 0.05*	0.5 ± 0.01*	0.72 ± 0.15
Cociente Tg/Plp	Pre	0.24 ± 0.22	0.27 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.38 ± 0.02	0.47 ± 0.11
	Tratamiento					
	Post Tratamiento	0.22 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.42 ± 0.03	0.57 ± 0.11

Colesterol Total/Fosfolípidos (CT/Plp). Triacilgliceroles/Fosfolípidos (Tg/Plp). Todos los resultados se presentan como promedio ± EE. *p<0.05, n=7.

De acuerdo al cuadro 7, se observa que el cociente CT/Plp aumenta significativamente en las subclases HDL2a, 3a y 3b. Esto confirma la hipótesis de que las partículas HDL se están enriqueciendo en colesterol después del tratamiento, especialmente las HDL de tamaño mediano. Por otro lado, al realizar el cociente Tg/Plp observamos que la diferencia de los cocientes no alcanza significancia estadística, por lo que podemos decir que la disminución de los triacilgliceroles de las subclases de HDL (ver gráfico 1) se debe únicamente a la disminución en el número de partículas.

Cinética metabólica de la apo A-I de las HDL.

El objetivo central de este trabajo es determinar la influencia que tiene la hiperuricemia sobre la composición y el metabolismo de las HDL.

Para evaluar el metabolismo de las HDL, se realizó la cinética metabólica de Apo A-I. A través de este estudio, podemos explicar los resultados experimentales mediante un modelo matemático (modelo abierto de dos compartimentos, administración intravenosa). El modelo permite evaluar parámetros como el FCR (fractional catabolic rate, h^{-1}). Este parámetro es indicador del catabolismo de la apo A-I asociada a HDL.

En el gráfico 3 se presenta la curva promedio de decaimiento radiactivo de las HDL marcadas con ^{125}I en plasma de los grupos de conejos hiperuricémicos (tratados con ácido oxónico) y control. Se tomó como el 100% de marca radiactiva, la radiactividad cuantificada en la muestra de plasma a los 10 minutos de la administración intravenosa.

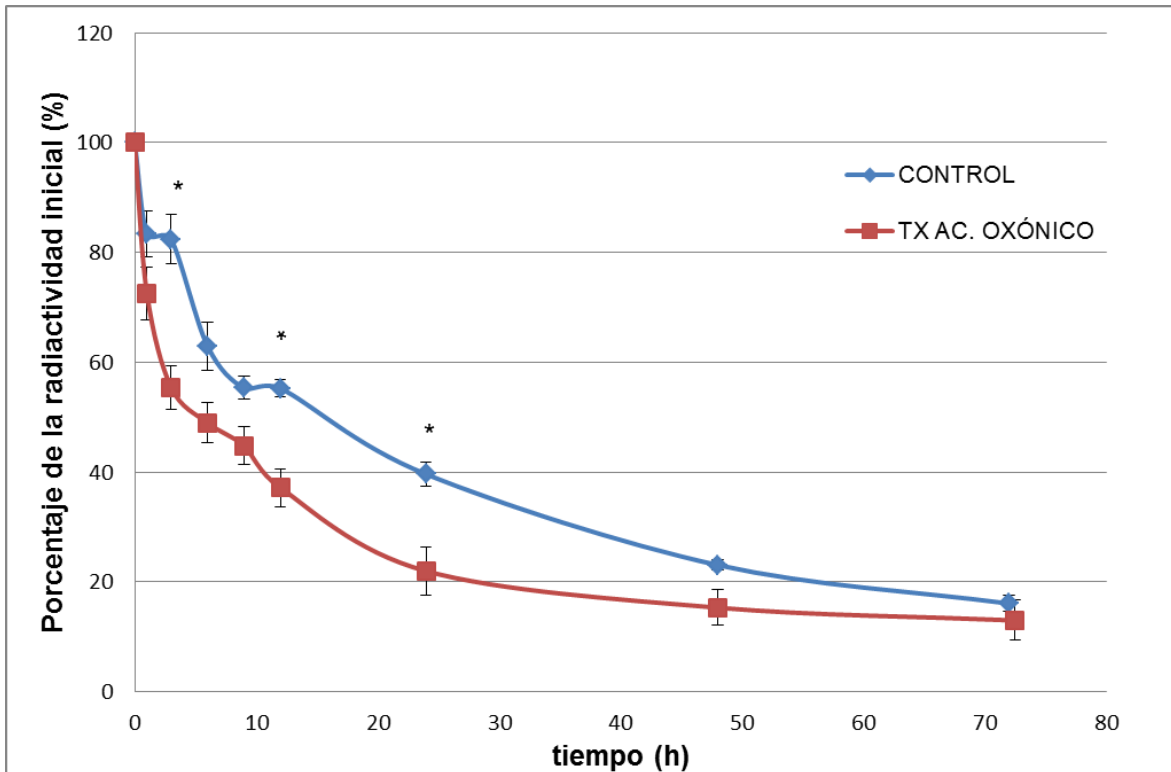


Gráfico 3.- Radiactividad residual correspondiente a las HDL-¹²⁵I en torrente sanguíneo. Los valores son expresados como el promedio \pm EE. * $p < 0.05$ vs grupo control. La radiactividad fue normalizada en función del resultado al tiempo de 10 minutos, $n=7$ para ambos grupos.

La comparación de los grupos con la prueba t de student entre los valores de cada tiempo es un indicador del catabolismo, en este caso observamos diferencias significativas a 3, 12 y 24 horas de la administración de ¹²⁵I- apo A-I. El grupo de conejos hiperuricémicos (tratamiento con ácido oxónico, AOX) presenta una menor radiactividad residual de las HDL-¹²⁵I en el plasma durante estos tiempos, sugiriendo que existe un mayor catabolismo debido al tratamiento.

Se realizó el ajuste del modelo farmacocinético a los datos experimentales (modelo abierto de dos compartimentos administración intravenosa), tal como se describe en la sección de materiales y métodos. Posteriormente se calculó el parámetro cinético FCR (tasa fraccional de catabolismo). La comparación del FCR del grupo control y el grupo tratado se presenta en el cuadro 8.

Cuadro 8. FCR de apo A-I ¹²⁵I de las HDL de los grupos tratado y control.

	Control n=7	Tratamiento AOX 750 mg/kg/día n=7
FCR (h ⁻¹)	0.02605 ± 0.0017	0.03697 ± 0.0038*

*FCR = Tasa de catabolismo. Prueba t de Student. Los valores están expresados como media ± EE.
p<0.05 vs grupo control.

De acuerdo al cuadro 8, la FCR de los animales tratados es mayor con respecto al grupo control. Esto es congruente con lo observado en el gráfico 3, sugiriendo que los conejos hiperuricémicos tienen un catabolismo más rápido de las HDL.

Función endotelial

Es conocido que las HDL promueven la función endotelial (68). Por esta razón, cambios en la estructura y el metabolismo de las HDL pueden favorecer la función endotelial.

En este trabajo se evaluó la función endotelial de forma directa en la aorta del conejo. Primeramente se realizó una pre-contracción de la aorta utilizando fenilefrina como vasoconstrictor. Posteriormente se realizó una curva dosis-respuesta a acetilcolina para evaluar la vasorelajación de las aortas, tal como se describe en la sección de materiales y métodos.

En el gráfico 4 se presenta el porcentaje de relajación del promedio de las aortas del grupo tratado con respecto al control en respuesta a dosis crecientes de acetilcolina.

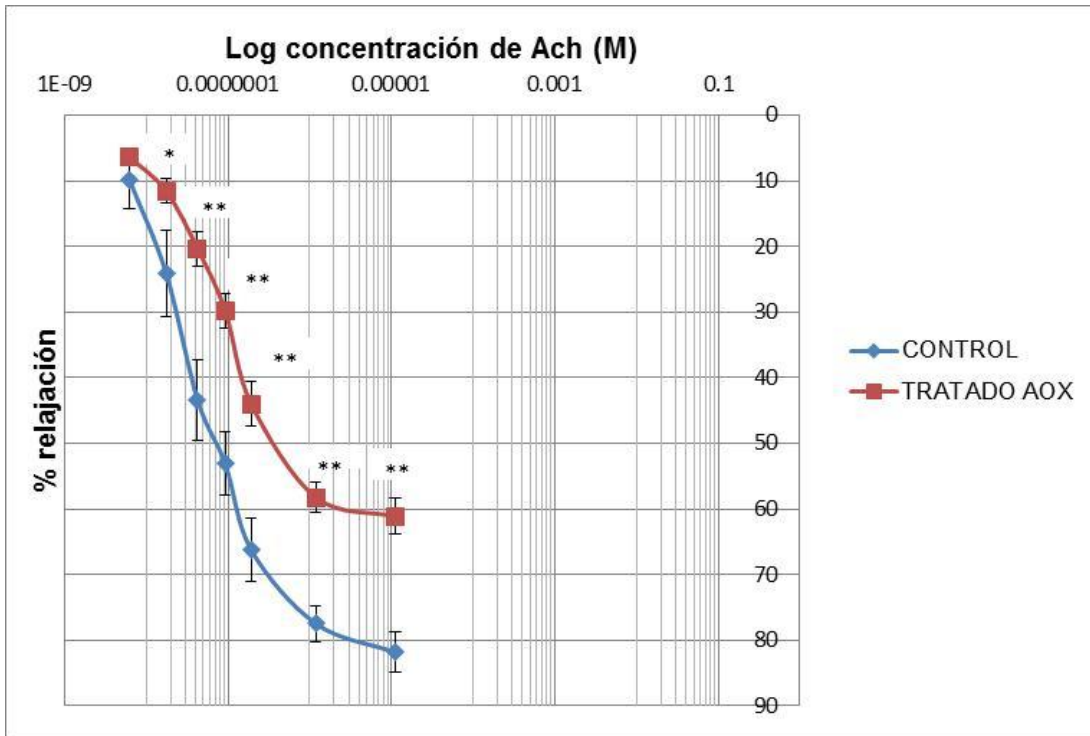


Gráfico 4.- Evaluación de la función endotelial (vasorelajación) en respuesta a acetilcolina (ACh). Los resultados se presentan como promedio \pm EE. Prueba t $*p < 0.05$, $**p < 0.001$ vs grupo control, $n=7$.

Como se puede observar en el gráfico 4, el porcentaje de relajación en respuesta a acetilcolina fue menor en un 25% en los conejos hiperuricémicos con respecto a los controles.

DISCUSIÓN

El presente estudio se diseñó a partir de la hipótesis de que el ácido úrico (AU) puede afectar la composición de las HDL, y por ende, su metabolismo y funcionalidad. Esta hipótesis surgió de las observaciones realizadas en estudios previos, en pacientes con enfermedad aterosclerosa coronaria subclínica (61) y pacientes con falla renal (63), en los cuales se demostró que existía una correlación entre el colesterol de las subclases de HDL con el incremento de la concentración plasmática de AU. Sin embargo, en esos estudios la relación causal entre los cambios en la composición de las HDL y el AU no pudo demostrarse por las comorbilidades existentes en los pacientes de estudio. Por tanto, un propósito de este trabajo fue generar un modelo de hiperuricemia libre de otros factores confusores con el fin de conocer si el AU por sí mismo es capaz de generar cambios en la composición, metabolismo y capacidad de las HDL de favorecer la función endotelial. A nuestro conocimiento, no hay informes de investigaciones al respecto.

En la primera etapa del presente trabajo, establecimos las condiciones para inducir hiperuricemia por medio de la administración de ácido oxónico en conejos. En la mayoría de los mamíferos, excepto en el hombre, en otros primates y en perros, el ácido úrico es metabolizado por la enzima uricasa en alantoína. La uricasa se puede inhibir con ácido oxónico, incrementando los niveles plasmáticos de AU (51). A pesar de que existen modelos de hiperuricemia en ratas (60, 83), esta especie, a diferencia del conejo, no es buen modelo para la investigación en lipoproteínas porque no expresa CETP (84). La CETP es una proteína necesaria para eliminar el colesterol excedente de la célula mediante el intercambio de colesterol por triacilglicérolos de las HDL con las lipoproteínas que contienen apo B, respectivamente. Existen otros modelos murinos de hiperuricemia en los cuales se simuló una falla renal mediante nefrectomías, concomitante a la administración de ácido oxónico (59, 60). Sin embargo, la nefrectomía introduce factores

confusores derivados de la disminución de la masa renal que afecta el metabolismo de las HDL (72). Por lo anterior, nuestra elección fue el modelo de conejo hiperuricémico por efecto del ácido oxónico.

Para establecer este modelo de hiperuricemia, se cuantificaron las concentraciones plasmáticas de AU al inicio y al final del tratamiento con ácido oxónico. Después del tratamiento, la concentración plasmática de AU se incrementa más de 6 veces. Además, con base en la depuración de creatinina, el ácido oxónico no produjo insuficiencia renal durante el periodo de tratamiento en los conejos. También se observó que las concentraciones plasmáticas de glucosa, colesterol, colesterol-HDL y triacilgliceroles no se modifican durante el tratamiento, sugiriendo que la hiperuricemia no produce dislipidemia, ni afecta el metabolismo de glucosa en este modelo animal.

A pesar de que no existen modificaciones en la concentración plasmática del colesterol-HDL, pueden existir modificaciones muy importantes de la estructura y el metabolismo de estas lipoproteínas según hemos demostrado previamente en conejos tratados con pioglitazona (85). Por lo tanto, evaluamos el efecto de la hiperuricemia sobre la concentración plasmática de los lípidos asociados a las HDL (perfil de lípidos-HDL en plasma). Observamos una disminución en las concentraciones plasmáticas de triacilgliceroles-HDL y fosfolípidos-HDL después del tratamiento con ácido oxónico, sugiriendo que la composición lipídica de estas lipoproteínas se altera y posiblemente, también se afecta en su distribución y funcionalidad. Por tanto, se realizó el análisis detallado de la composición de las subclases de HDL. Se cuantificó su contenido proteínico y de cada uno de sus lípidos constituyentes (de superficie: fosfolípidos y colesterol libre, y de núcleo: colesterol esterificado y triacilgliceroles). No observamos alteraciones en la distribución relativa de tamaños (determinada por proteína), ni cambios en la concentración de colesterol después del tratamiento con respecto al estado basal. En contraste, la concentración de los fosfolípidos de las 5 subclases de HDL fue significativamente menor con respecto a los valores basales.

En estudios previos se ha sugerido que la cantidad de fosfolípidos en las subclases de HDL es una medida de la cantidad de partículas existentes (29, 82). Por tanto, la disminución de la concentración de fosfolípidos en las subclases de HDL indica que el tratamiento con ácido oxónico induce una disminución de número de partículas HDL en plasma. Es importante enfatizar que el colesterol-HDL en plasma no se modificó durante la hiperuricemia. En este contexto, el menor número de partículas y valores plasmáticos de colesterol-HDL sin cambios, sugiere que las partículas están enriquecidas en colesterol. Por esta razón determinamos el cociente colesterol/fosfolípidos (CT/Plp), que es un indicador del contenido de colesterol por partícula HDL (29). Efectivamente, nuestros resultados demuestran que el cociente CT/Plp es significativamente mayor en las HDL medianas, confirmando que existe un enriquecimiento selectivo con colesterol de estas subclases.

En resumen de la caracterización de las subclases de HDL, la hiperuricemia inducida por ácido oxónico se asoció a un cambio estructural de las HDL que consiste en una disminución del número de partículas y el enriquecimiento con colesterol de las subclases HDL_{2a}, HDL_{3a} y HDL_{3b}. Este cambio estructural sugiere un papel activo del AU sobre la remodelación de las HDL; sin embargo, reconocemos como una limitante del estudio que su diseño no permite establecer si existe una relación causa-efecto entre la hiperuricemia y las alteraciones estructurales de las HDL observadas. Estudios posteriores *in vitro* con células hepáticas cultivadas en presencia de AU permitirán establecer si efectivamente existe esta relación causa-efecto.

Estudios previos sugieren que la composición de las HDL está relacionada con su metabolismo y con sus funciones antiaterosclerosas (16, 24, 29, 86).

Para establecer si los cambios estructurales observados en las HDL de los conejos hiperuricémicos tienen un impacto sobre el metabolismo intravascular de estas lipoproteínas, realizamos los estudios cinético-metabólicos por medio de un marcado exógeno con el isótopo radiactivo ¹²⁵I de la apo A-I según se describe en

la sección de metodología. El ^{125}I se incorpora en los residuos de tirosina de las HDL. La marca radiactiva es estable y no altera el comportamiento de las lipoproteínas (87). Nuestros resultados demuestran que el catabolismo de la apo A-I es más rápido en los conejos hiperuricémicos. Estudios previos han puesto en evidencia que los cambios estructurales de las HDL se asocian con alteraciones en la tasa de depuración plasmática de estas lipoproteínas; de esta manera, la disminución de tamaño de las HDL se asocia con un hipercatabolismo de las apo A-I de las HDL (34, 88). En contraste, cuando las HDL se enriquecen con fosfolípidos su tasa de catabolismo disminuye (89). No obstante, en nuestro modelo experimental la distribución de tamaños de las HDL no se modificó, de tal manera que el tamaño de las partículas HDL no explica el hipercatabolismo de la apo A-I de estas lipoproteínas.

Otro factor que se ha asociado con modificaciones del catabolismo de la apo A-I es la composición de las HDL, sobre todo la cantidad de fosfolípidos (85). Una mayor cantidad de fosfolípidos en las subclases de HDL correlaciona con un menor catabolismo. En nuestro modelo, demostramos que después del tratamiento existe una menor cantidad de fosfolípidos en las subclases de HDL. Por lo tanto, el hipercatabolismo de la apo A-I que observamos en nuestro modelo de hiperuricemia no se puede explicar a partir del contenido de fosfolípidos de las HDL.

Otro factor descrito previamente que puede modificar el catabolismo de estas lipoproteínas es el aumento de la permeabilidad vascular a nivel de riñón (90, 91). En nuestro estudio, aunque se observa que no hay insuficiencia renal (no hay modificación en la depuración de creatinina posterior al tratamiento), desconocemos los niveles de proteína en orina, por lo que no podemos descartar que un aumento de la permeabilidad glomerular sea la causa del incremento en el catabolismo de las HDL. Estudios futuros permitirán definir si el modelo de conejo hiperuricémico por ácido oxónico cursa con proteinuria y que ésta se asocie directamente con el aumento del catabolismo de las HDL.

La última parte de este trabajo fue evaluar el efecto de la hiperuricemia sobre una de las funciones antiaterosclerosas más importantes de las HDL: promover la función endotelial (68).

En este trabajo planteamos que los cambios en la composición y el metabolismo de las HDL (inducidos por la hiperuricemia) pueden impactar de forma indirecta la función endotelial. Para averiguarlo, evaluamos la vasodilatación en aortas de conejos hiperuricémicos en cámara de órgano aislado (ver materiales y métodos) estimulando al endotelio con acetilcolina. Es importante recordar que el óxido nítrico es el mediador de la acción vasorelajante de la acetilcolina (92). Cuando existe disfunción endotelial, ante estímulos vasodilatadores (como la adición de acetilcolina al endotelio), éste responde con vasodilatación insuficiente (65-67). Los resultados revelan que el porcentaje de relajación de anillos de aorta dependiente de endotelio (estimada por acetilcolina) de los conejos tratados fue menor en un 25% en los conejos hiperuricémicos con respecto a los controles.

Se sabe que las HDL inactivan los efectos nocivos de las LDL oxidadas (LDL-ox) a nivel de producción de óxido nítrico. Las LDL-ox aumentan la producción de la caveolina-1 que inactiva la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) disminuyendo así la síntesis de óxido nítrico (69). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren una posible pérdida de función de las HDL al enriquecerse con colesterol. Sin embargo, nuestro estudio no demuestra de forma directa la relación entre los cambios estructurales de las HDL y la disfunción endotelial.

Otra posible causa de la disfunción endotelial observada en los conejos hiperuricémicos puede ser vía activación de la xantina oxidasa. Como ya habíamos mencionado anteriormente, el paso final en el metabolismo de las purinas lo lleva a cabo la enzima xantina oxidasa, que transforma la hipoxantina en xantina y finalmente en AU (46, 47). Esta enzima genera especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo, lo que podría contribuir a la disfunción endotelial por descenso de la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO) (48, 49).

Además, en estudios recientes se ha sugerido que el AU es una sustancia biológicamente activa, y que tiene una relación con la disfunción endotelial, inflamación y vasoconstricción (93); sin embargo, hasta el momento no hay trabajos experimentales que así lo demuestren. Por lo tanto, no se puede descartar que las alteraciones en la estructura de las HDL inducidas por la hiperuricemia, resulte en modificaciones de la funcionalidad de estas lipoproteínas generando la disfunción endotelial, pero tampoco que los efectos del AU sean directos sobre el endotelio vascular. Se requieren estudios adicionales para establecer el posible impacto de la estructura de las HDL sobre la función endotelial.

CONCLUSIONES

Este modelo animal de conejo hiperuricémico inducido por la administración de ácido oxónico, se caracteriza por un enriquecimiento de las HDL con colesterol, disminución del número de partículas HDL sin alteraciones de la distribución de tamaños, un hipercatabolismo de estas lipoproteínas y disfunción endotelial.

PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto directo del AU y de las HDL modificadas por efecto de la hiperuricemia sobre la función endotelial mediante los siguientes experimentos:
 1. Retar a aortas de conejos sanos en cámara de órgano aislado, con ácido úrico (7 y 9 mg/dL). Posteriormente realizar los estudios de función endotelial (precontracción con fenilefrina y curva dosis respuesta con acetilcolina).
 2. Retar a aortas de conejos sanos en cámara de órgano aislado, con ácido oxónico y realizar los estudios de función endotelial, para descartar que el fármaco per se induzca modificaciones en este parámetro.
 3. Retar a aortas de conejos sanos en cámara de órgano aislado, con HDL aisladas de conejos hiperuricémicos, con el fin de conocer si estas HDL modificadas pueden alterar la función endotelial.
- Evaluar en conejos hiperuricémicos otros parámetros como presión arterial, y proteinuria, con el fin de descartar que el incremento en el catabolismo de las HDL sea por el incremento de la permeabilidad vascular del riñón.
- Realizar la prueba de oxidación de las LDL en el suero de conejos hiperuricemicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Last J. A dictionary of epidemiology. 3a ed. New York: Oxford University Press; 1995.
2. N P. Assessing the contributions of John Snow to epidemiology: 150 years after removal of the broad street pump handle. *Epidemiology*. 2004;15:514-6.
3. O'Donnell CJ ER. Cardiovascular risk factors. Insights from Framingham Heart Study. *Rev Esp Cardiol*. 2008;61(3):299-310.
4. Enfermedad cardiovascular. [cited julio 2013]; Available from: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/heartdiseases.html>.
5. Secretaría-de-Salud. Proyecciones de la Población de México 2005 - 2050 y proyección retrospectiva 1990-2004. Elaborado a partir de la base de datos de defunciones 1979-2008 INEGI/SS. CONAPO 2006.
6. Trejo-Gutiérrez J. Estrategias en la prevención primaria de la enfermedad aterosclerosa coronaria. *Archivos de Cardiología de México*. Enero-Marzo 2001;71 Supl. 1:S168-S70.
7. Vega-Abascal J, Guimara-Mosqueda, Vega-Absacal, L. Riesgo cardiovascular, una herramienta útil para la prevención de las enfermedades cardiovasculares *Rev Cubana Med Gen Integr* 2011;27 n.1:91-7.
8. Magnus P BR. The real contribution of the major risk factors to the coronary epidemics: Time to end the "only- 50%" myth. *Arch Intern Med*. 2001;161:2657-60.
9. Hackam DG AS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. *JAMA*. 2003 290:932-40.
10. Gofman JW YW, Tandy R Ischemic heart disease, atherosclerosis and longevity. *Circulation*. 1966;34:679-97.
11. Kannel WB CW, Gordon T Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. New perspectives based on the Framingham Study. *Ann Intern Med*. 1979;90:85-91.
12. Klag MJ FD, Mead LA, He J, Whelton PK, et al Serum cholesterol in young men and subsequent cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 1993;328:313-8.
13. Stamler J DM, Garside DB, Dyer AR, Greenland P, Neaton JD Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to long-term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity. *JAMA*. 2000;284:311-8.
14. Assmann G SH, Von Eckardstein A, et al. 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.
15. Gordon DJ PJ, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP et al High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: four prospective American studies. *Circulation*. 1989;79:8-15.
16. Pérez-Méndez. O. Lipoproteínas de alta densidad (HDL). ¿Un objetivo terapéutico en la prevención de la aterosclerosis? *Arch Cardiol Méx*. 2004;74 n.1:53-67.
17. Asztalos BS, EJ. HDL in atherosclerosis: actor or bystander? *Atherosclerosis Suppl* 2003; 4:21-9.
18. Castro GR FC. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high density lipoprotein. *Biochemistry*. 1992;31:11112 – 7.
19. Von Eckardstein A NJ, Assmann G HDL and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:13-27.
20. Barter P KJ, Nunn A, y Hobbs R High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions. *Atherosclerosis*. 2003;168:195-211.

21. Aguilar-Salinas C G-PF. Lipoproteínas y aterogénesis. *Metabolismo normal de las lipoproteínas. Revista del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.* 1989;2:22-8.
22. Brunham LR KJ, Igbal J, Fievet C, Timmins JM, et al Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest.* 2006;116:1052-62.
23. Barter PJ RK. Molecular mechanism of reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol* 1996;7:82 -7.
24. Rye KA BC, Lambert G, Tabet F, Barter PJ The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl:S195-2009.
25. Chapman MJ GSLD, y Laplaud PM. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J Lipid Res.* 1981;22:339-58.
26. Radio hidrodinámico. [cited julio 2013]; Available from: <http://www.fritsch-sizing.es/index.php?id=990795&L=5>.
27. Kontush A C, MJ. Functionally Defective High-Density Lipoprotein: A New Therapeutic Target at the Crossroads of Dyslipidemia, Inflammation, and Atherosclerosis. *Pharmacol Rev* 2006;58:342-74.
28. Toledo-Ibelles PG-S, C; Ávila-Vazzini, N; et al. Enzymatic assessment of cholesterol on electrophoresis gels for estimating HDL size distribution and plasma concentrations of HDL subclasses. *J Lipid Res* 2010;51:1610-7.
29. García-Sánchez C T-TM, Juárez-Meavepeña M, López-Osorio C, Toledo-Ibelles P, et al Lipid plasma concentrations of HDL subclasses determined by enzymatic staining on polyacrylamide electrophoresis gels in children with metabolic syndrome. *Clin Chim Acta.* 2011;412:292-8.
30. Birjmohun RS HB, Kastelein JJ, Stroes ES Efficacy and safety of high-density lipoprotein cholesterol-increasing compounds: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:185-97.
31. Brousseau ME SE, Wolfe ML, Bloedon LT, Digenio AG, et al Effects of an inhibitor of cholesterol ester transfer protein on HDL cholesterol. *N Engl J Med.* 2004;350:1505-15.
32. Barter PJ CM, Ericsson M, Grundy SM, Kastelein JJ, et al Illuminate Investigators. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med.* 2007;357:2109-22.
33. Van der Steeg WA HI, Boekholdt SM, Larsen ML, Lindahl C, et al High-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein particle size, and apolipoprotein A-I: significance for CV risk: the ideal and epic norfolk studies. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51:634–42.
34. Perez-Mendez O BE, Franceschini G, Duhal N, Lacroix B, et al Metabolism of apolipoproteins AI and AII in subjects carrying similar apoAI mutations, apoAI Milano and apoAI Paris. *Atherosclerosis.* 2000 148(2):317-25.
35. Elkhalil L MZ, Bakir R, Perez-Mendez O, Castro G, et al Fish-eye disease: structural and in vivo metabolic abnormalities of high-density lipoproteins. *Metabolism.* 1997;46:474-83.
36. Eye Fish Disease. [cited 2013]; Available from: http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Ing=ES&Expert=79292.
37. Calabresi L SC, Paoletti R, Franceschini G. . Recombinant apolipoprotein A-I Milano for the treatment of cardiovascular diseases. *Curr Atheroscler Rep* 2006;8:163-7.
38. Ibanez B GC, Cimmino G, Santos-Gallego CG, Alique M, et al Recombinant HDL(Milano) exerts greater anti-inflammatory and plaque stabilizing properties than HDL(wild-type). *Atherosclerosis.* 2012;220(1):72-7.
39. Gerstein HC MJ, Yi Q, Zinman B, Dinneen SF, et al Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA.* 2001 286(4):421-6.
40. Turner RC MH, Neil HA, et al Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: UK Prospective Diabetes Study. *BMJ.* 1998;316:823-8.

41. Zeeuw D RG, Parving HH, Keane WF, Zhang Z, et al Albuminuria, a therapeutic target for cardiovascular protection in type 2 diabetic patients with nephropathy. *Circulation*. 2004; 110: 921-7.
42. Wang Z HW. Albuminuria and incident coronary heart disease in Australian Aboriginal people. *Kidney Int* 2005;68:1289-93.
43. Yuyun MF KK, Luben R, Welch A, Bingham S, et al 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;159:284-93.
44. Krane V WC. Dyslipidaemia in chronic kidney disease. *Minerva Urol Nefrol*. 2007;59(3):299-316.
45. Cimpoeşu D PO, Costache I Uric acid, cardiovascular events and renal dysfunction: a circumstantial connection? . *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2012;116(2):407-12.
46. Firestein GS BR, Harris ED, McInnes IB, Ruddy S, Sargent JS, eds. Gout and hyperuricemia. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. 8th ed. Philadelphia : Saunders 2009. p. 1481-506.
47. NL E. The role of hyperuricemia in vascular disorders. *Curr Opin Rheumatol*. 2009;21(2):132-7.
48. Alderman M AK. Uric acid: role in cardiovascular disease and effects of losartan. . *Curr Med Res Opin*. 2004; 20(3):369-79.
49. Ho WJ TW, Yu KH, Tsay PK, Wang CL, et al Association between endothelial dysfunction and hyperuricaemia. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49(10):1929-34.
50. Culleton BF LM, Kannel WB, Levy D Serum uric acid and risk for cardiovascular disease and death: the Framingham Heart Study. *Ann Intern Med*. 1999;131(1):7-13.
51. Molina P BS, Ávila A, Escudero V, Górriz JL, et al ¿Es el ácido úrico un factor de riesgo cardiovascular? ¿Cuál es su implicación en la progresión de la enfermedad renal crónica? . *Nefrología Sup Ext*. 2011;285: 131-9.
52. Feig DI KD, Johnson RJ Uric acid and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2008 359(17) 1811-21.
53. Feig DI KD, Johnson RJ Uric Acid and Cardiovascular Risk *N Engl J Med*. 2008;359(17):1811-21.
54. Coady MJ CM, Charron FM, Plata C, Wallendorff B, Sah JF, et al. The human tumour suppressor gene SLC5A8 expresses a Na-monocarboxylate cotransporter. *J Physiol* 2004; 557: 719-31.
55. Gopal E FY, Miyauchi S, Zhuang L, Prasad PD, Ganapathy V. Sodium-coupled and electrogenic transport of B-complex vitamin nicotinic acid by SLC5A8, a member of the Na/glucose co-transporter gene family *Biochem J* 2005;388:309-16.
56. Padova J BG. Hyperuricemia in diabetic ketoacidosis. *N Engl J Med* 1962;267:530-4.
57. Lieber CS JD, Losowsky MS, Davidson CS. . Interrelation of uric acid and ethanol metabolism in man. . *J Clin Invest* 1962;41:1863-70.
58. Cappuccio FP SP, Farinano E, Trevisan M. Uric acid metabolism and tubular sodium handling. Results from a population-based study. *JAMA* 1993;270:354-9.
59. Sánchez-Lozada LG TE, Santamaría J, Ávila-Casado C, Soto V, et al. Mild hyperuricemia induces vasoconstriction and maintains glomerular hypertension in normal and remnant kidney rats. *Kidney Int* 2005;67(1):237-47.
60. Sánchez-Lozada LG TE, Soto V Effect of febuxostat on the progression of renal disease in 5/6 nephrectomy rats with and without hyperuricemia. *Nephron Physiol*. 2008;108(4):69-78.

61. Quiróz-Aguilar A. Cuantificación de la concentración plasmática de lípidos de las subclases de HDL en sujetos con enfermedad aterosclerosa subclínica [Licenciatura, Químico Farmacéutico Biólogo, en línea <http://132.248.9.195/ptd2012/febrero/0677356/index.html>]: UNAM; 2011.
62. Holzer M B-GR, Stojakovic T, El-Gamal D, Binder V, et al Uremia alters HDL composition and function. *J Am Soc Nephrol.* 2011 22(9): 1631-41.
63. Soto-Miranda E C-TE, Lorenzo K, Bazán-Salinas B, García-Sánchez C, et al Shift of high-density lipoprotein size distribution toward large particles in patients with proteinuria. *Clin Chim Acta.* 2012;414:241–5.
64. Función endotelial: Fisiología, Disfunción, Estrés Oxidativo. Parte I. Disponible en internet en <http://med.unne.edu.ar/catedras/anafisio/fisio/033.pdf>
- Fecha de acceso: 11 Julio 2012.
65. González-Maqueda I. Hipertensión arterial, diabetes y arteriosclerosis. La encrucijada del endotelio (I). *Hipertensión.* 1997;14:163-72.
66. Maqueda IG. Hipertensión arterial, diabetes y arteriosclerosis. La encrucijada del endotelio (II) *Hipertensión.* 1997;14:173-84.
67. Brunner H CJ, Deanfield J, Donald A, Ferranini E, et al Endotelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension *Journal of Hypertension* 2005 23:233-46.
68. Tran-Dinh A ea. HDL and endothelial protection *Br J Pharmacol.* 2013.
69. Quyyumi AA MD, Andrews NP, Husain P, Panza JA, Cannon RO Coronary vascular nitric oxide activity in hypertension and hypercholesterolemia. Comparison of acetylcholine and substance P *Circulation* 1997;95:104-10.
70. Aviram M RM, Bisgaier CL, Newton RS,Primo-Parmo SL, Ladu B. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase *J Clin Invest* 1998;101 1581-90.
71. Rosenfeld SI PC, Leddy JP. Inhibition of the lytic action of cell-bound terminal complement components by human high density lipoproteins and apoproteins. *J Clin Invest* 1983 71(4):795-808.
72. Toledo-Ibelles P FM, Carreón-Torres E, Luc G, Tailleux A, et al Normal HDL-apo AI turnover and cholesterol enrichment of HDL subclasses in New Zealand rabbits with partial nephrectomy. *Metabolism.* 2013;62(4):492-8.
73. Tailleux A TG, Caron B, Fruchart JC, Fievet C Immunological properties of apo B-containing lipoprotein particles in atherosclerotic arteries. *J Lipid Res.* 1993;34:719-28.
74. Lowry OH RH, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.
75. Williams PK, RM; Nichols, AV; Vranizan, KM; Wood, PD. Identifying the predominant peak diameter of high-density and low-density lipoproteins by electrophoresis. *J LipidRes* 1990;31:1131-9.
76. Huesca-Gómez C C-TE, Nepomuceno-Mejía T, Sánchez-Solorio M, Galicia-Hidalgo M, *et al.* Contribution of cholesteryl ester transfer protein and lecithin: cholesterol acyltransferase to HDL size distribution. *Endocrin Res* 2004;30:403-15.
77. Hunter WyG, FC Preparation of iodine-131 labelled human growth of high specific activity. *Nature.* 1962;194:495-6.
78. Moss AJ DG, Boyd CM. Radioinmunoensayo práctico. Barcelona, España1982.

79. Marsh RE RT, McQuarrie SA. Use of a simulated annealing algorithm to fit compartmental models with an application to fractal pharmacokinetics *J Pharm Sci.* 2007;10:168-79.
80. Sharabi FM DT, El-Metwally MA, Senbel AM Effect of sildenafil on the isolated rat aortic rings. *Fundamental & Clinical Pharmacology.* 2005;19:449–56.
81. Von Eckardstein A HY, Assmann G. Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol.* 1994;5:404-16.
82. Juaréz-Meavepeña M C-TE, López-Osorio C, García-Sanchez C, Gamboa R, et al The Srb1+1050T Allele Is Associated with Metabolic Syndrome in Children but Not with Cholesteryl Ester Plasma Concentrations of High-Density Lipoprotein Subclasses. *Metab Syndr Relat Disrd.* 2012;10(2):110-6.
83. Erarantaa A KV, Tahvanainenb AM, Vehmas TI, Koobid P, et al. Oxonic acid-induced hyperuricemia elevates plasma aldosterone in experimental renal insufficiency. *J Hypertens.* 2008; 26:1661–8.
84. Oschry Y ES. Rat plasma lipoproteins: reevaluation of a lipoprotein system in an animal devoid of cholesteryl ester transfer activity *J Lipid Res* 1982 23:1099–106.
85. Carreón-Torres E J-MM, Cardoso-Saldaña G, Gómez CH, Franco M, et al. Pioglitazone increases the fractional catabolic and production rates of high-density lipoproteins apo AI in the New Zealand White Rabbit. *Atherosclerosis .* 2005 A181(2) 233-40.
86. C A-S, MA M-H. Análisis de la composición y de la función de las HDL, ¿un estudio para el clínico del futuro? . *Revista de Endocrinología y Nutrición* 2011 19(3):113-22.
87. Innerarity TL PR, Mahley RW. Lipoprotein-receptor interactions. *Methods in enzymol* 1986 129(33): 542-65.
88. Carreón-Torres E R-SK, Monter-Garrido M, Toledo-Ibelles P, Gamboa R, et al. Rosiglitazone modifies HDL structure and increases HDL-apo AI synthesis and catabolic rates. *Clin Chim Acta* 2009; 401:37-41.
89. Huesca-Gómez C FM, Luc G, Montañó LF, Massó F, et al. Chronic hypothyroidism induces abnormal structure of high-density lipoproteins and impaired kinetics of apolipoprotein A-I in the rat. *Metabolism.* 2002 51(4):443-50.
90. Eddy AA FR, Sibley RK, Hostetter TH. Subtotal nephrectomy in the rabbit: a model of chronic hypercalcemia, nephrolithiasis and obstructive nephropathy. *J Lab Clin Med* 1986 107:508-16.
91. E T. Arterial disease in chronic renal failure-an experimental study in the rabbit. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A.* 1987;290: 1-28.
92. Palmer RM FA, Mocada S. Nitric oxide release acconts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327(524-6).
93. Kanbay M SM, Afsar B, Kang DH, Rodriguez-Iturbe B, Johnson RJ. The role of uric acid in the pathogenesis of human cardiovascular disease. *Heart.* 2013;99(11):759-66.

ANEXO 1

Determinación de colesterol libre en microplaca

Solución A (reactivo de color)

Reactivo	Cantidad
4-aminoantipirina	0.088 g
Fenol	0.040 g
Colato	0.126 g
Tritón	100 μ L

**Llevar a 10 mL con amortiguador PBS 10X
(100 mM) pH=7.4**

- Tomar un mililitro de la solución A y mezclarlo con 9 mL de Solución Salina Isotónica

Posteriormente adicionar las siguientes enzimas:

Enzima	Cantidad
Colesterol peroxidasa (0.25 μ U/mL)	15 μ L
Colesterol oxidasa (0.05 μ U/mL)	30 μ L

- Mezclar las enzimas con la solución A diluida. El reactivo de color está listo para usarse

En un pozo de microplaca depositar 50 μ L de muestra + 150 μ L de reactivo de color. Hacer la determinación por duplicado.

- **Curva patrón**

	Concentración
Estándar I	2.5 mg/dL
Estándar II	5 mg/dL
Estándar III	10 mg/dL
Estándar IV	15 mg/dL
Estándar V	20 mg/dL

Depositar 50 μ L de cada estándar en un pozo de microplaca por duplicado. Finalmente se adiciona 150 μ L de reactivo de color con enzimas. La curva patrón se realiza por duplicado.

- Incubar muestras y curva patrón durante una hora a 37°C. Leer a una longitud de onda de 499 nm.

ANEXO 2

Determinación de proteínas por el método de Lowry (74)

(Lowry OH *et al*, 1951)

FUNDAMENTO.

En medio alcalino los aminoácidos de las proteínas se unen a los iones de cobre (Cu^{2+}), formando un complejo azul, que absorbe a 750 nm. La sensibilidad de esta coloración incrementa al adicionar el reactivo de Folin Ciocalteu. El uso de SDS como detergente permite exponer las zonas hidrófobas de las proteínas.

Soluciones

Solución de Na_2CO_3 :	al 20 % en H_2O
Solución de tartrato de sodio y potasio:	1 g + 0.5 g CuSO_4
Solución de NaOH 0.8 M:	16 g en 500 mL H_2O
Solución de SDS	al 10% en H_2O
Solución patrón de albúmina:	1 mg/mL
Solución A. Preparar al momento	
1 volumen de tartrato de Na y K	1 volumen de Na_2CO_3
2 volúmenes de NaOH	2 volúmenes de SDS
2 volúmenes de H_2O	

TÉCNICA

CURVA PATRÓN

Tubo	1	2	3	4	5	6	muestra
muestra (µL)	0	0	0	0	0	0	20
estándar (µL)	0	10	20	40	80	100	0
H₂O (µL)	100	90	80	60	20	0	80

Agregar 1 mL de solución A y se mezclar las soluciones, incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Al término de este tiempo agregar 500 µL de reactivo de Folin previamente diluido en una proporción 1/6. Incubar esta mezcla de reacción durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se analiza espectrofotométricamente a una longitud de onda de 750 nm.

DETERMINACIÓN DE LOS RESULTADOS

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

ANEXO 3

Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas

Soluciones

Solución amortiguadora de muestra

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

Solución A: Tris 0.09 M, ácido bórico 0.08M, EDTA 3 mM (TBE 1X) pH 8.35

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

Solución C: persulfato de amonio 10%

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

Las soluciones de acrilamida al 3% y 30% se colocan por separado en los compartimentos de la cámara generadora de gradiente y se mezclan lenta y progresivamente con agitación constante mientras se va vertiendo entre las placas para formar el gel en presencia de los catalizadores (TEMED y persulfato de amonio, solución C).

Una vez polimerizado el gel, éste se precorre 15 min a 60 V para estabilizarlo. A continuación se cargan las muestras de la siguiente manera:

- 1) Depositar 25 μg de proteína HDL con 3 μL de amortiguador de muestra en cada carril.
- 2) Depositar un marcador de alto peso molecular en uno de los carriles del gel.

La separación electroforética se realizó primero durante 30 min a 90 V para permitir la entrada de las muestras al gel. Al término de este periodo, la separación se continuó durante 22 h a 180 V. Al final del tiempo de migración, el gel se desmolda y se tiñe según el método seleccionado (proteína o lípidos).

ANEXO 4

Tinción para la determinación de la distribución de lípidos de las subclases de HDL en fase semisólida (sobre el gel de poliacrilamida) (29).

- Preparación de reactivo para **colesterol total y colesterol esterificado**

Reactivo	Concentración	
	<i>Colesterol total</i>	<i>Colesterol libre</i>
Solución Salina Isotónica (0.9%)	7456 µL	7474 µL
Buffer PBS 10X (100mM) pH=7.4	1000 µL	1000 µL
Solución Stock		
(Colato de sodio 3 mM y tritón de sodio al 0.1%)	500 µL	500 µL
Carboximetilcelulosa*	120 mg	120 mg
Peroxidasa (0.25 µU/mL)	12 µL	12 µL
Colesterol esterasa (0.075 µU/mL)	10 µL	—
Colesterol oxidasa (0.05 µU/mL)	13 µL	13 µL
*Mezclar hasta homogenizar sin dejar grumos (Añadir aprox. 15 min. Antes de aplicar la mezcla en el gel).		

**Azul de Tetrazolium (MTT) 0.04 mM	400 µL	400 µL
**Fenazin metasulfato (FMS) 0.04 mM	600 µL	600 µL
**Agregar hasta el momento del uso del reactivo, homogeneizando vigorosamente.		

- Preparación del reactivo para **triacilgliceroles y fosfolípidos**

Reactivo	Concentración	
	<i>Triacilgliceroles</i>	<i>Fosfolípidos</i>
Solución salina isotónica (0.9%)	5500 µL	5500 µL
Buffer PBS 10X (100 mM) pH=7.4	1000 µL	1000 µL
Carboximetilcelulosa*	120 mg	120 mg
Lipasa (37.5 µU/mL)		
Glicerol cinasa (0.1µU/mL)	Reactivo comercial	—
Glicerol -3-fosfato oxidasa (0.4 µU/mL)	2500 µL	
Peroxidasa (0.13 µU/mL)		
ATP (0.25 µmol/L)		

Fosfolipasa D (0.12 μU/MI)		
Colina Oxidasa (62 μU/mL)	—	Reactivo Comercial
Peroxidasa (1.1 μU/mL)		2500 μ L
Aminopiridina (0.24 mmol/mL)		
N-etil-N-DAOS (0.77 mmol/mL)		
* Mezclar hasta homogenizar sin dejar grumos (Añadir aprox. 15 min. Antes de aplicar la mezcla en el gel)		
**Azul de Tetrazolium (MTT) 0.04 mM	400 μ L	400 μ L
**Fenazin metasulfato (FMS) 0.04 mM	600 μ L	600 μ L
**Agregar hasta el momento del uso del reactivo, homogeneizando vigorosamente.		

- Colocar reactivo sobre gel de poliacrilamida homogéneamente. Incubar durante 1 hora a 37° C protegido de la luz.

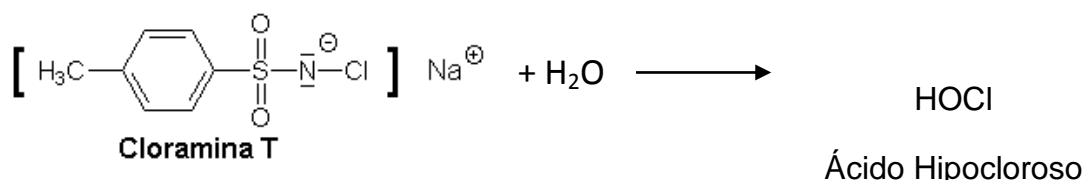
Anexo 5

Yodación de proteínas por el método de cloramina T (77, 78)

(Hunter y Greenwood, 1962)

La yodación de proteínas por el método de cloramina T es el procedimiento más ampliamente utilizado para la radioiodación. La cloramina T es la sal sódica de la N-monocloro-p-toluensulfonamida. En disolución acuosa, la cloramina T genera lentamente ácido hipocloroso (HOCl), que es un agente oxidante suave (ver reacción 1).

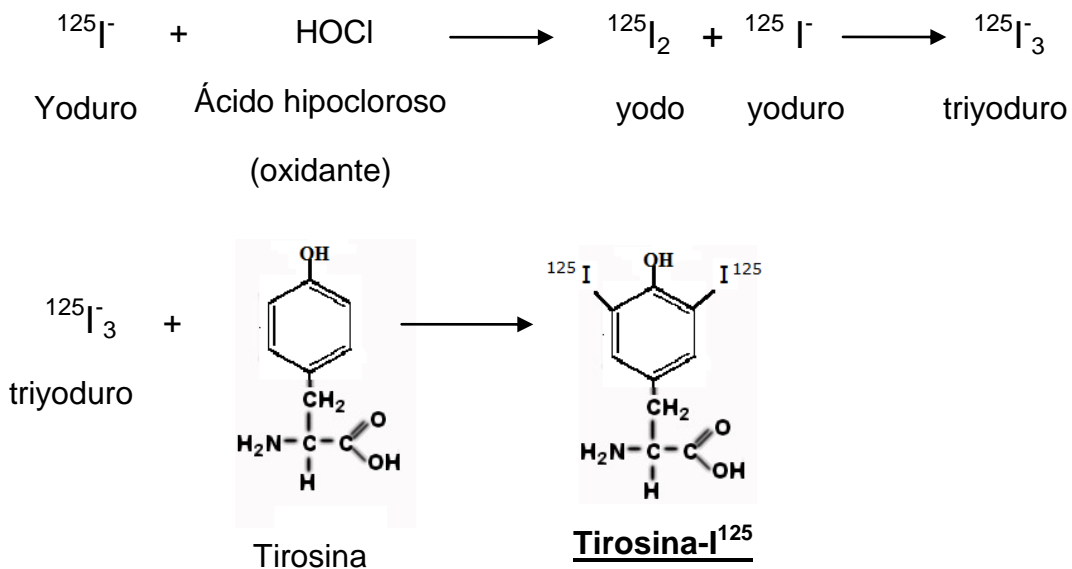
Reacción 1. Descomposición de la cloramina T en medio acuoso para generar el agente oxidante:



En presencia de proteína y yoduro libre, puede conseguirse una incorporación de yodo en los residuos de tirosina de la proteína altamente eficiente (ver reacción 2). Aunque el mecanismo de reacción no se ha establecido completamente, se cree que implica la generación de yodo catiónico (I^+) que es un agente oxidante fuerte. La reacción es rápida y se dirige bajo condiciones suaves a pH neutro. La reacción se efectúa en un volumen pequeño (100 μ L de volumen total final). El isótopo $Na^{125}I$ se obtiene comercialmente.

La cantidad de cloramina T utilizada en la reacción debe ser suficiente para neutralizar cualquier agente reductor presente en la disolución de $Na^{125}I$ y para oxidar el yoduro a yodo (I^- a I_2). La reacción de iodación solo requiere de 10 segundos a 2 minutos. Es importante recordar que aunque se genera I_2 esta especie insoluble en presencia de yoduro (I^-) forma yodo yodurado o triyoduro (I_3^-) que es soluble.

Reacción 2. Reacción del yoduro con el oxidante para generar el triyoduro y la especie reactiva I⁺, la cual reacciona con los residuos de tirosina de las proteínas. Nota: no se muestra el mecanismo de acción ni la generación de la especie reactiva.



La reacción se detiene con la adición de metabisulfito sódico (Na₂S₂O₅). La finalidad de la adición de este compuesto es reducir el yodo que no ha reaccionado. La cantidad de metabisulfito utilizada es el equivalente químico de la cloramina T más un pequeño exceso.