



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA.

**CARACTERIZACIÓN DE LAS SUBCLASES DE LAS HDL
EN CONEJOS NUEVA ZELANDA CON
HIPERCOLESTEROLEMIA: EFECTO DE LA
COMBINACIÓN FENOFÍBRATO-ATORVASTATINA.**

TESIS

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

P R E S E N T A

MARTÍNEZ AMAYA ERIKA CORAL



MÉXICO, D.F. A 03 DE MARZO DEL 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE.

VOCAL: MARÍA EVA GONZÁLEZ TRUJANO.

SECRETARIO: ÓSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ.

1er. SUPLENTE: LAURA CARMONA SALAZAR.

2° SUPLENTE: JOSÉ IVÁN PÉREZ VILLATORO.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA, JUAN BADIANO 1.

ASESOR DEL TEMA:

ÓSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ.

SUSTENTANTE (S):

ERIKA CORAL MARTÍNEZ AMAYA

ÍNDICE

Tema	Página
I. RESUMEN	1
II. ANTECEDENTES	
Enfermedad Aterosclerosa Coronaria (EAC)	3
Lipoproteínas	4
Clasificación de las lipoproteínas	6
Lipoproteínas de alta densidad	8
1. Metabolismo de las Lipoproteínas de alta densidad (HDL) y el transporte reverso del colesterol (TRC)	11
1.1 Subclases de las lipoproteínas de alta densidad	14
2. Actividad antioxidante	16
3. Mejoramiento de la función endotelial	17
4. Propiedades antiinflamatorias	17
Estrategias farmacológicas para disminuir el riesgo de EAC	18
1. Estatinas	18
1. Fibratos	20
1. Combinación: Fenofibrato-Atorvastatina (FA)	22
III. HIPÓTESIS	24

IV. OBJETIVOS	
Objetivo General	25
Objetivos Particulares	25
V. METODOLOGÍA	26
Obtención de muestras	26
Análisis de laboratorio	27
Composición química de las HDL y características bioquímicas	27
Aislamiento y análisis de los lípidos de las HDL	27
Tinción enzimática de colesterol total, colesterol libre (CL), fosfatidilcolina y triglicéridos de las subclases de HDL	28-32
Análisis estadístico	32
VI. RESULTADOS	33
Caracterización bioquímica del modelo de dislipidemia	33
Caracterización de las subclases HDL	35
1. Distribución de tamaño	35
2. Distribución de lípidos en las subclases de HDL	37
2.1) Colesterol	37
2.2) Triglicéridos	38
2.3) Fosfolípidos	39
3. Proporciones lipídicas en las subclases de HDL	40

VII. DISCUSIÓN	43
VIII. CONCLUSIONES	50
IX. BIBLIOGRAFÍA	51
X. APÉNDICES	
Apéndice 1. Determinación de proteínas por el método de Lowry	64
Apéndice 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas	65
Apéndice 3. Tinción de lípidos en fase semisólida	66

RESUMEN

La EAC es la segunda causa de muerte en nuestro país; su incidencia es cada vez mayor a edades más tempranas debido a diversos factores de riesgo de tipo genético, obesidad, sedentarismo y hábitos alimenticios, resistencia a la insulina, diabetes y dislipidemias. Las dislipidemias se encuentran entre los 8 principales factores de riesgo de mortalidad de enfermedad cardiovascular en México. Las HDL juegan un papel importante en el desarrollo de EAC gracias a su función ateroprotectora, relacionada con su tamaño y composición química. Uno de los mecanismos más importantes que explican la función ateroprotectora de las HDL es su metabolismo intravascular, conocido como Transporte Reverso del Colesterol (TRC) que genera un grupo heterogéneo de partículas. En el TRC las partículas HDL sufren una remodelación continua, modificando de esta manera su estructura y composición. Debido a que la distribución de tamaños de las HDL es dependiente del TRC, modificaciones en éste deben repercutir en la estructura y composición de las mismas.

La estrategia central a nivel de lípidos plasmáticos para la reducción del riesgo cardiovascular consiste en la disminución de colesterol-LDL (C-LDL). Las estatinas son los fármacos de primera elección para el tratamiento de pacientes en que predominan niveles elevados de C-LDL y colesterol no HDL. Sin embargo, a pesar de su eficacia, aproximadamente el 70% de los sujetos tratados con estos fármacos tiene eventos coronarios por aterosclerosis, riesgo residual que puede radicar en gran medida en otras dislipidemias como la hipertrigliceridemia.

En este contexto, los fibratos han sido ampliamente usados para reducir los niveles plasmáticos de triglicéridos y usualmente se asocian con un incremento de colesterol-HDL (C-HDL). La coadministración de estatina y fenofibrato son frecuentemente usadas para tratar pacientes con dislipidemia; sin embargo, una combinación de dosis fija no es usualmente comercializada.

Para determinar el efecto que tiene la combinación fenofibrato-atorvastatina (FA) sobre el perfil lipídico y la estructura de las subclases de HDL caracterizamos un modelo animal con hipercolesterolemia exógena en conejos Nueva Zelanda. El diseño experimental consto de 5 grupos de estudio: grupo control, grupo dislipidémico, grupo estatina, grupo fibrato y grupo combinación FA. En este modelo se demostró que una dieta rica en lípidos provoca una modificación estructural de las HDL en conejos. Además el perfil de lípidos en el grupo de conejos que recibió la combinación farmacológica fue mejor que el de los fármacos de manera individual. La proporción de partículas pequeñas tipo HDL3b y 3c casi se restablecieron con las del control en los tres grupos tratados farmacológicamente. Sin embargo, la combinación FA aumentó la proporción de partículas HDL2b que se enriquecieron con el colesterol. Asumimos que la combinación FA aumenta los niveles de HDL potencialmente más antiaterogénicas al favorecer la génesis de partículas de mayor diámetro que en el grupo control y dislipidémico, y concomitantemente restablece la proporción de HDL pequeñas que se presentan en situaciones de mayor riesgo cardiovascular. Adicionalmente, el remodelamiento de las HDL podría estar determinado por la combinación farmacológica, con la cual existe una captación del colesterol excedente en la periferia en los animales con dislipidemia por parte de las HDL de menor tamaño, las cuales maduran rápidamente en HDL2b. Independientemente del tamaño de las lipoproteínas que hemos descrito antes, los grupos fibrato y estatina aumentan la cantidad de colesterol transportado por las HDL respecto al grupo control.

Por otra parte la combinación fibrato-estatina restablece las concentraciones de triglicéridos en las subclases de HDL; hecho que se apoya en los resultados que obtuvimos con el cociente Ct/Ph y Tg/Ph. Además, al restablecerse las concentraciones de fosfolípidos con las del control en todas las subclases de HDL, principalmente con la combinación fibrato-estatina, asumimos que esta restituye el número de partículas HDL que se abate por efecto de la hipercolesterolemia exógena.

ANTECEDENTES.

Se ha demostrado que la EAC tiene sus inicios desde la infancia¹ y es la primera causa de mortalidad en los países desarrollados mientras que en nuestro país es la segunda causa de muerte en la población adulta después de la diabetes mellitus²; su incidencia es cada vez mayor a edades más tempranas debido a diversos factores de riesgo de tipo genético, edad, sexo, hipertensión, obesidad, sedentarismo, hábitos alimenticios, resistencia a la insulina, diabetes y dislipidemias³. Las dislipidemias se encuentran entre los 8 principales factores de riesgo de mortalidad de enfermedad cardiovascular en México. Es por ello que las medidas de prevención primaria basadas en el diagnóstico y tratamiento precoces de la EAC son prioritarias entre las estrategias nacionales de salud para enfrentar acertadamente esta patología.

Tanto en hombres como en mujeres la dislipidemia más frecuente es la hipotalipoproteinemia (niveles bajos de HDL en plasma), seguida de hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia. Las dos dislipidemias mixtas más frecuentes son las caracterizadas por triglicéridos altos con C-HDL bajo; y triglicéridos altos con colesterol total alto. Gracias al estudio y tratamiento de las dislipidemias es posible prevenir un número significativo de eventos coronarios².

Enfermedad Aterosclerosa Coronaria.

La aterosclerosis es definida como la presencia de macrófagos cargados de lípidos en el espacio subendotelial, proliferación de células musculares con fibrosis y reducción de la luz del vaso sanguíneo; se forman placas que pueden llegar a calcificarse. Existe daño endotelial y predisposición para la formación de trombos intravasculares⁴, ya que la placa aterosclerótica puede presentar una fractura y causar un coágulo sanguíneo que ocluye la circulación y provocar un episodio isquémico agudo, es decir, infarto o evento vascular cerebral. Además, la formación del ateroma provoca estrechamiento del lumen del vaso y, por tanto, la reducción del aporte sanguíneo a órganos como el corazón o el cerebro.

El desarrollo de la placa ateromatosa comienza con la infiltración de lipoproteínas de alta densidad (LDL) al espacio subendotelial en donde encuentran un ambiente de estrés oxidativo, dando lugar a la peroxidación de sus lípidos. Las LDL oxidadas son factores quimiotácticos⁵ y por lo tanto desencadenan una respuesta inflamatoria que atrae principalmente monocitos desde el torrente sanguíneo, que atraviesan el endotelio vascular y se diferencian en macrófagos, capaces de fagocitar a las LDL oxidadas. La falta de maquinaria enzimática suficiente para degradar los lípidos y lipoperóxidos tiene como consecuencia la acumulación de éstos en el citoplasma del macrófago, transformándose en células espumosas⁶. Antes de morir, las células espumosas liberan citocinas que estimulan al endotelio vascular para que sintetice más adhesinas, exacerbando así el proceso inflamatorio^{7, 8}. Las células espumosas constituyen las etapas tempranas de formación del ateroma.

El C-HDL bajo es el factor de riesgo lipídico que comúnmente se ha asociado con el riesgo de EAC⁹⁻¹⁵; bajas concentraciones plasmáticas de este colesterol (C-HDL < 40 mg/dL) correlacionan negativamente con el riesgo de desarrollar aterosclerosis¹⁶⁻¹⁹. Sin embargo, algunos eventos coronarios prematuros se presentan en pacientes con niveles muy altos de C-HDL, mientras que otros con niveles muy bajos de C-HDL no desarrollan la enfermedad²⁰.

Las HDL ejercen una función protectora en el desarrollo de EAC al evitar la formación del ateroma gracias al papel que desempeñan en el TRC. Además las HDL poseen otras características antiaterogénicas que no dependen exclusivamente de la cantidad, sino de su estructura; por ejemplo: su capacidad antioxidante^{9, 21}, el mejoramiento de la función endotelial² y la regulación de la respuesta inflamatoria^{22, 23}.

Lipoproteínas.

Los lípidos son biomoléculas de origen celular relativamente insolubles en medios acuosos, y altamente solubles en solventes orgánicos²⁴.

Esta definición incluye una alta variedad de moléculas, como los lípidos estructurales (colesterol, esfingolípidos y glicerofosfolípidos), los lípidos de reserva energética (triacilglicéridos), hormonas esteroideas, prostaglandinas y algunas vitaminas como la A y la E, entre otros. Por esta razón, en el presente trabajo, lípido será un término que se utilizará para hacer referencia únicamente al colesterol, ésteres de colesterol, triacilglicéridos y glicerofosfolípidos (los dos últimos serán llamados triglicéridos y fosfolípidos, respectivamente).

Para llevar a cabo su función, los lípidos son transportados a los diferentes tejidos u órganos desde su lugar de síntesis asociados con otras moléculas de carácter anfipático, generando así lo que se conoce como lipoproteína (Figura 1). A excepción de los ácidos grasos no esterificados que principalmente son transportados en plasma por la albúmina, los lípidos plasmáticos se encuentran en las lipoproteínas.

Las lipoproteínas son complejos pseudo-micelares y macromoleculares que poseen en su superficie una monocapa de lípidos anfipáticos (fosfolípidos y colesterol libre), de forma que sus grupos polares se encuentran en contacto con el medio acuoso, mientras que los lípidos hidrófobos (triglicéridos y ésteres de colesterol) se mantienen en el interior^{25, 26}. Este complejo lipídico es estabilizado por proteínas conocidas como apolipoproteínas (apo); gracias a que dichas proteínas tienen dominios con diferentes polaridades que pueden interactuar selectivamente con los lípidos que forman parte de las lipoproteínas, favoreciendo así la estabilidad fisicoquímica de la partícula^{25,26} (Figura 1). Estas apolipoproteínas actúan como ligandos de receptores y como cofactores de enzimas del metabolismo de los lípidos, por lo que su función es de tipo estructural.

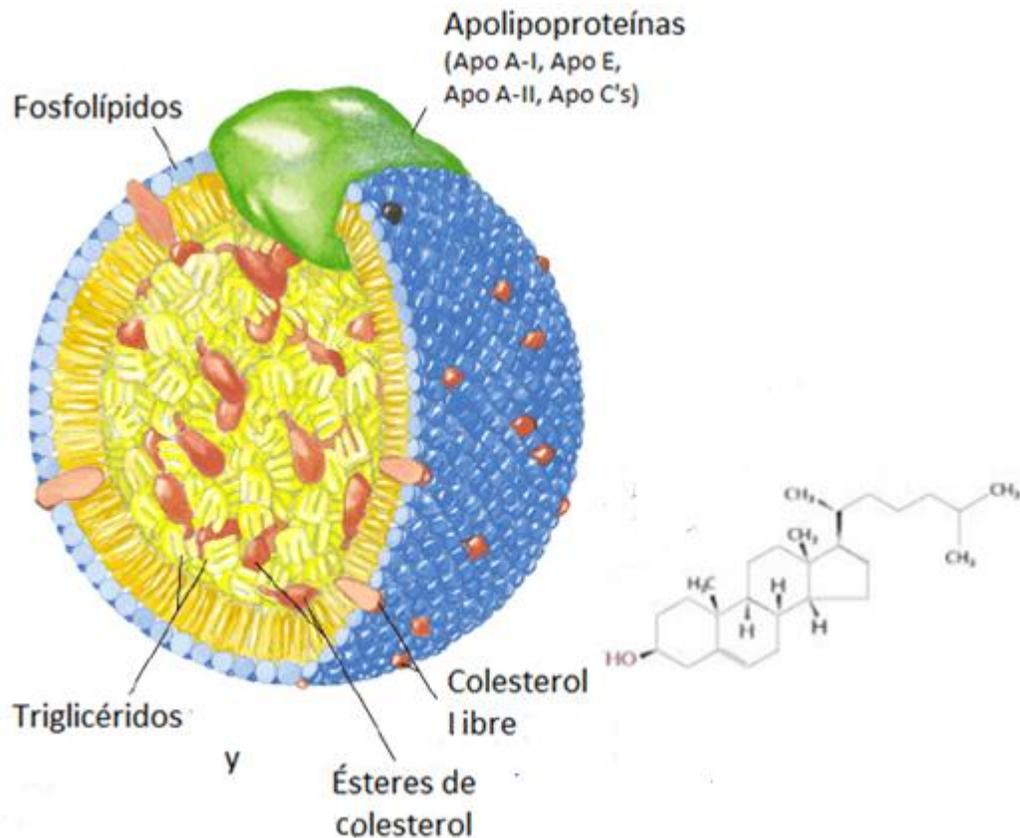


Figura 1. Representación esquemática de los lípidos en una lipoproteína de alta densidad. Los lípidos hidrofóbicos pueden verse ilustrados en el núcleo. Las apolipoproteínas (apo) se unen por interacciones hidrofóbicas a los lípidos más externos y por atracciones electrostáticas a los fosfolípidos para estabilizar a la pseudo-micela lipídica.

Clasificación de las lipoproteínas.

De acuerdo a su origen y metabolismo, la composición y características de las lipoproteínas es variable; se pueden clasificar de acuerdo a su densidad de flotación, movilidad electroforética y contenido de apolipoproteínas.

De acuerdo a su densidad de flotación^{25, 26} se conocen cinco clases de lipoproteínas, que son:

- Quilomicrones: Son lipoproteínas de mayor tamaño, con un diámetro > 70 nm y una densidad < 0.94 g/mL. Presentan un alto contenido de triglicéridos y apo B-48, A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E.

- VLDL, conocidas por sus siglas en inglés como lipoproteínas de muy baja densidad (“Very Low Density Lipoproteins”): $0.94 \text{ g/mL} < \text{densidad} < 1.006 \text{ g/mL}$ y un diámetro de 30 a 70 nm. Se separan en la fracción pre- β del plasma en electroforesis de agarosa y contienen principalmente triglicéridos, apo B-100, C-I, C-II, C-III y E.
- IDL, conocidas por sus siglas en inglés como lipoproteínas de densidad intermedia (“Intermedie Density Lipoproteins”): $1.006 \text{ g/mL} < \text{densidad} < 1.019 \text{ g/mL}$. Se separan en la fracción pre- β del plasma. Poseen colesterol, triglicéridos, apoB-100, C-I, C-II, C-III y E.
- LDL, lipoproteínas de baja densidad (“Low Density Lipoproteins”): $1.019 \text{ g/mL} < \text{densidad} < 1.063 \text{ g/mL}$ y un diámetro de 18-30 nm. Partículas que contienen un alto contenido en colesterol y apo B-100 y en electroforesis de agarosa se separan en la fracción β del plasma.
- HDL llamadas lipoproteínas de alta densidad por sus siglas en inglés “High Density Lipoproteins”: $1.063 \text{ g/mL} < \text{densidad} < 1.210 \text{ g/mL}$ y un diámetro de entre 5 y 12nm. Compuestas por un alto contenido en proteínas, fosfolípidos y colesterol. La principal apolipoproteína que poseen es la A-I, pero contienen también A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E.

Cada tipo de lipoproteína está compuesta de varias subclases que se distinguen por su diámetro, densidad, composición e incluso se habla de una posible diferenciación en base a su funcionalidad biológica. Las lipoproteínas presentan tamaños que van desde los 5 nm hasta más de 70 nm de diámetro y pueden diferenciarse por la proporción de cada componente lipídico y proteico como se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición química de las lipoproteínas plasmáticas²⁷.

Composición porcentual de la fracción lipídica.						
Clase de lipoproteína	Proteína total (%)	Lípido total (%)	Fosfolípidos	Colesterol esterificado	Colesterol sin esterificar	Triglicéridos
HDL ₂ ^a	40-45	55	35	12	4	5
HDL ₃ ^a	50-55	50	20-25	12	3-4	3
LDL	20-25	75-80	15-20	35-40	7-10	7-10
IDL	15-20	80-85	22	22	8	30
VLDL	5-10	90-95	15-20	10-15	5-10	50-65
Quilomicrones	1.5-2.5	97-99	7-9	3-5	1-3	84-89

^a Subclases de HDL

Por su migración electroforética hay tres tipos de lipoproteínas: α , β y pre- β . Las HDL migran en la fracción α ; LDL y VLDL en la fracción β . Una subclase de HDL migra en la fracción pre- β , a estas últimas se conoce como partículas pre- β 1²⁴⁻²⁸ que tienen forma discoidal y están compuestas principalmente de fosfolípidos y apo A-I. Las partículas pre- β 1 poseen una masa molecular de alrededor de 60 kDa, flotan a la densidad de las HDL₃, entre 1.12 y 1.21 g/mL, y además juegan un papel muy importante en la captación de colesterol de las células periféricas²⁹.

Lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Las HDL forman una población heterogénea de partículas de múltiples tamaños, densidades y composición química, que son de especial interés debido a las distintas funciones antiaterosclerosas que desempeñan^{9, 21, 22, 28, 30-32}. Son las lipoproteínas más densas y más pequeñas, su diámetro varía entre 5 y 12 nm, como describimos previamente. La diversidad de estas partículas, es resultado de su velocidad de síntesis y catabolismo, así como de la acción de enzimas y proteínas de transporte que las remodelan continuamente.

La composición química de las HDL, parece ser un determinante de su catabolismo, según ha sido sugerido por trabajos anteriores; algunos estudios sugieren que entre más electronegativa la partícula de HDL menor catabolismo^{33, 34}, mientras que otros evocan que el tamaño señala la tasa de recambio de estas lipoproteínas³⁴. Por ejemplo, algunos estudios demuestran que la acumulación de HDL grandes en plasma se asocia con tasas bajas de catabolismo de apo-A-I, mientras que con intervenciones farmacológicas o estados fisiopatológicos que generan HDL pequeñas se asocia un hipercatabolismo de estas lipoproteínas. Sin embargo, se necesitan evidencias directas que permitan afirmar la relación inversa entre el tamaño y el catabolismo de las HDL.

Como puede observarse en el Cuadro 1, poseen dos tipos de colesterol: colesterol libre (CL) en la superficie de la molécula y colesterol esterificado (CE) en el interior de la misma. Llamamos CL al colesterol no esterificado, ya que el hidroxilo en posición 3 del colesterol puede ser esterificado al reaccionar con un ácido graso, haciendo así referencia al CE. La importancia de la identificación de ambas especies radica en el cambio de polaridad que representa en la HDL, y por consiguiente en la localización del colesterol en la lipoproteína (Figura 1).

La macromolécula se estabiliza principalmente con apo; la apo A-I caracteriza a las HDL que además de su función estructural son indispensables para el eflujo de colesterol de las células periféricas³⁵, primera etapa del TRC que detallamos adelante. Además la apo A-I desempeña la función de cofactor proteico de la lecitina: colesterol acil transferasa (LCAT), enzima clave en el TRC.

Las HDL son las lipoproteínas con mayor proporción proteica (40-55% de su masa seca). La apo A-I, representa hasta un 70% del total de su proteína constitutiva^{29, 36}. Las apo A-II, C-I, C-II, C-III y E, también forman parte de las HDL, y sus características se presentan en la Tabla 2. Los grupos ionizables de los aminoácidos presentes en estas apolipoproteínas aportan a las lipoproteínas plasmáticas una carga generalmente negativa a pH fisiológico, lo que les permite interactuar con las regiones ionizables de los fosfolípidos hacia la interface lípido-agua estabilizando la partícula³⁷.

Tabla 2.- Características de las apolipoproteínas³⁸.

Apo	P.M.	pl	Localización	Sitio de síntesis	Función
A-I	29,016	5.9-5.4	HDL, Qm	Intestino Hígado	Principal componente de las HDL, activador de LCAT, estimula el eflujo del colesterol.
A-II	14,414	5.0	HDL	Intestino Hígado	Proteína componente de HDL, inhibidor de LH y de la LCAT.
A-IV	44,465	5.5	HDL, Qm	Intestino	Activador de LCAT, modulador de LPL y estimula el eflujo del colesterol.
B-100	512,723	-	VLDL, LDL	Hígado	Ligando para receptor de LDL
B-48	240,800	6.8	Qm	Intestino	Proteína estructural de los Qm.
C-I	6,630	7.5	HDL, VLDL, Qm	Hígado	Activador de LCAT, inhibe la captación hepática de Tg.
C-II	8,900	4.9	HDL, VLDL, Qm	Hígado	Activador LPL, inhibición de la captación hepática de Lp-apo B-100.
C-III_{0,1,2}	8,800	4.5-5.0	HDL, VLDL, Qm	Hígado	Inhibidor de la LPL
E_{2,3,4}	34,145	6.0-5.7	VLDL, HDL	Hígado	Ligando de receptor de LDL y de residuos de Qm, estimula el eflujo de colesterol.

P.M.: Peso Molecular, pl: Punto isoeléctrico, LCAT: Lecitin: colesterol acil transferasa, LPL: Lipoproteína lipasa, LH: Lipasa hepática.

Cabe destacar que debido a que la proporción de apolipoproteínas presentes en las HDL es variable, el valor de carga de superficie no es estático y estará determinado por la cantidad y naturaleza de los fosfolípidos³³.

Dos mecanismos por los cuales se controla el tráfico intracelular de los lípidos de las lipoproteínas son: la vía exógena, que parte de los lípidos aportados por la dieta, en la cual los quilomicrones juegan un papel esencial y la vía endógena, que parte de la síntesis hepática de VLDL y TCR donde participan las HDL.

Los efectos antiaterosclerosos de las HDL han sido relacionados con su rol de promover la salida o eflujo del colesterol de las células en el TCR, así como a sus propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes, antiagregantes, anticoagulantes y pro-fibrinolíticas que describimos más adelante^{9, 16, 21-23, 39-42}.

Las HDL son constantemente remodeladas intravascularmente por enzimas, proteínas de transporte y receptores de membrana (figura 3), como se describe a continuación:

1. Metabolismo de las HDL y el TRC.

Se sabe que las HDL desempeñan un papel central en el TRC (figura 3), que es definido como el regreso del colesterol excedente de los tejidos hacia el hígado para su reciclamiento o excreción; mecanismo por el que se ha postulado que las HDL evitan la formación del ateroma (figura 3)^{40, 41}.

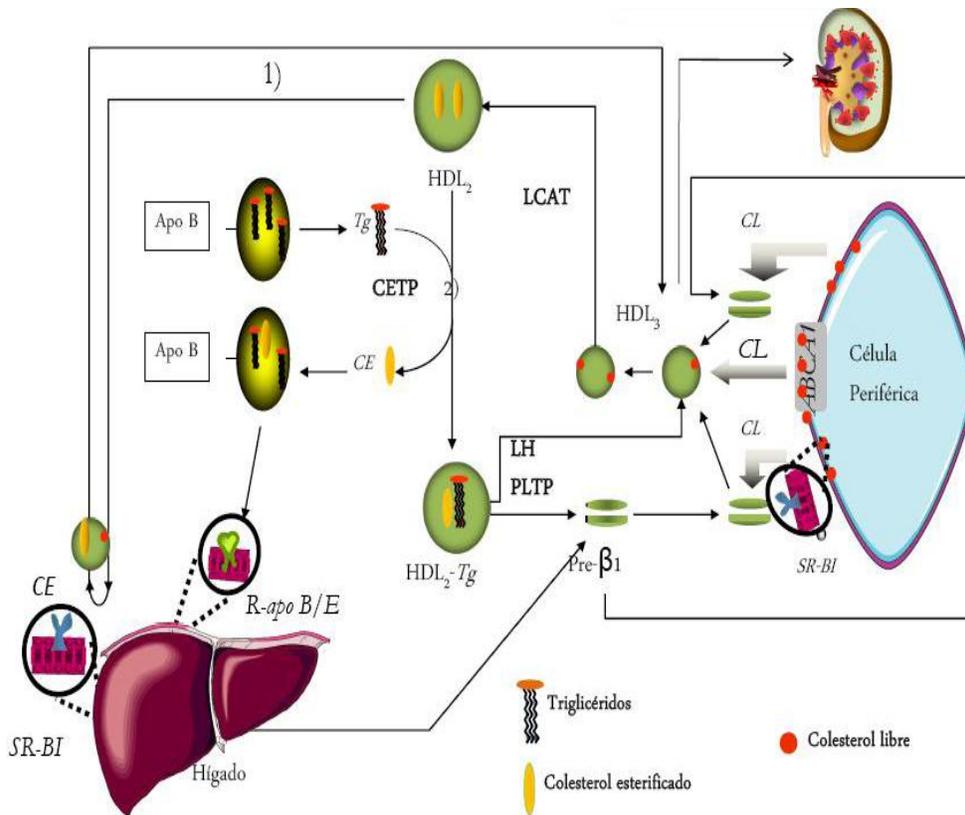


Figura 3.- Esquema del Transporte Reverso del Colesterol. Los aceptores primarios (partículas pre- β 1 o HDL3 en menor proporción) captan el colesterol libre (CL) excedente de las células periféricas por A) contacto simple con la membrana celular, o B) por medio del receptor SR-BI. La incorporación de colesterol en los aceptores primarios de colesterol y la esterificación del mismo por la lecitina: colesterol acil transferasa (LCAT), dan origen a aumentos progresivos del tamaño de la lipoproteína, generando sucesivamente HDL3 y HDL2. El colesterol esterificado (CE) puede seguir dos rutas: 1) por acción de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) es intercambiado por triglicéridos (Tg) provenientes de las lipoproteínas que contienen apo B, principalmente VLDL e IDL llegando así al hígado para su reciclamiento o excreción, gracias al receptor hepático B/E o, 2) es eliminado directamente de la lipoproteína por un mecanismo en el que interviene el receptor hepático scavenger clase B tipo I (SR-BI), generando así HDL de menor tamaño capaces de reiniciar el ciclo. La lipasa hepática (LH) hidroliza los triglicéridos de las HDL captados por la ruta I). Esta hidrólisis en asociación de la actividad de la proteína de transporte de fosfolípidos (PLTP), regenera los aceptores primarios de colesterol.

La primera etapa del TRC es el *eflujo de colesterol* de las células. En éste, el hepatocito secreta partículas pre- β 1 (un tipo de HDL discoidales compuestas por apo A1 ligada a fosfolípidos) que se encargan de captar el colesterol excedente de las células periféricas.

Este proceso se lleva a cabo en mayor proporción gracias a la proteína de membrana ABC-A1 (ATP binding cassette Class A type 1) presente en el hígado, macrófago e intestino⁴¹ y requiere de ATP para bombear colesterol y fosfolípidos activamente hacia las HDL. Cuando las partículas pre- β 1 captan el CL se convierten en partículas HDL3, pequeñas y ricas en apolipoproteínas con pocos lípidos. El colesterol presente en las HDL3 es esterificado por la enzima plasmática lecitin: colesterol acil transferasa (LCAT), que cataliza la transferencia de un ácido graso proveniente de la fosfatidilcolina (lecitina) al CL presente en las HDL3. Así, el colesterol pierde su carácter anfipático y con ello el CE migra hacia el interior de la HDL, produciendo una partícula hidrofóbica de mayor tamaño y menor densidad, conocida como HDL2.

Se conocen dos vías de eliminación para dicho CE, que son la eliminación hepática que se detalla más adelante y la eliminación a través de las lipoproteínas que contienen apo B; en esta vía, el CE de las HDL2 es intercambiado por triglicéridos provenientes de lipoproteínas que contienen apo B mediante la CETP (Proteína de Transferencia de Ésteres de Colesterol). Los triglicéridos de las HDL2 son entonces hidrolizados por la lipasa hepática (LH). Dicha hidrólisis, en asociación con la actividad de la PLTP (Proteína de Transporte de Fosfolípidos) facilita la transferencia de fosfolípidos de las HDL hacia las VLDL, reduce el tamaño de las HDL2 remodelándolas en HDL3 y en partículas pre- β 1 que pueden reiniciar el ciclo de captación del colesterol.

Los sitios catabólicos de las HDL se ubican en el hepatocito y probablemente en el túbulo renal. La eliminación hepática ocurre por la captación de la partícula enriquecida en CE a través del receptor SR-BI (scavenger receptor class B type I) o bien, mediante el receptor apo B/E cuando las HDL están enriquecidas de apo E.

De esta manera, el colesterol de los tejidos periféricos llega al hígado para ser reciclado o excretado mediante las vías biliares⁴³.

Durante el metabolismo intravascular de las HDL participan diferentes tipos de partículas que se encuentran en equilibrio dinámico como se ha explicado; difieren en forma, tamaño y contenido lipídico. El TRC concilia la mayor parte de los hallazgos en referencia al metabolismo de lípidos; sin embargo, con este no es posible explicar porque algunos sujetos con niveles extremadamente bajos de C-HDL no sufren de una aterosclerosis prematura. En este contexto, se cree que la actividad biológica de las HDL y sus propiedades antiaterosclerosas es dependiente de su estructura y composición^{9, 21, 22, 28, 30-32, 38}. En consecuencia cada tipo de HDL tiene diferentes características antiaterogénicas y propiedades anti-oxidantes^{9, 21, 44}, así como diferentes capacidades para promover el eflujo del colesterol en los tejidos periféricos^{28, 45, 46}.

Con fines prácticos y de estudio se han descrito numerosos métodos para clasificar a las HDL en función de ciertas características fisicoquímicas^{30, 38}, entre ellas su tamaño y densidad han sido las más usadas. Enseguida se describen algunas subclases conocidas de HDL.

1.1 Subclases de las lipoproteínas de alta densidad.

La proporción relativa de subclases de HDL en una muestra de plasma refleja el metabolismo de HDL. En consecuencia, estimar las subclases de estas lipoproteínas y su funcionalidad se ha sugerido como una alternativa que puede ser incluida para evaluar el riesgo cardiovascular y como un competente biomarcador del mismo. Al determinarlas, se pueden estimar otras características que denotan mejor la cantidad y función de las HDL que no se consigue al determinar el C-HDL. Sin embargo, aún hoy los métodos que existen son poco reproducibles y difícilmente adaptables al laboratorio clínico. Hasta ahora el C-HDL es el único parámetro reproducible y estandarizado disponible para estimar las concentraciones plasmáticas de esas lipoproteínas⁴⁶⁻⁴⁸.

Ya que las HDL migran en su mayoría dentro de la fracción α del plasma, algunos autores las identifican como α -lipoproteínas. Las HDL comprenden por definición una densidad entre 1.063 y 1.21 g/mL en separación por ultracentrifugación, fracción que puede ser separada en 5 sub-fracciones. Es así que con base en su densidad de flotación se clasifican en HDL grandes, HDL2b ($1.063 < \rho < 1.090$ g/mL) y HDL2a ($1.090 < \rho < 1.120$ g/mL); y pequeñas, HDL3a ($1.120 < \rho < 1.150$ g/mL), HDL3b ($1.150 < \rho < 1.180$ g/mL) y HDL3c ($1.180 < \rho < 1.210$ g/mL). Al determinar las subclases de HDL por electroforesis en gradiente de poliacrilamida en condiciones nativas de las lipoproteínas previamente asiladas por ultracentrifugación^{49, 50} es posible subclasificarlas con base en su densidad de flotación como mencionamos antes y diámetro hidrodinámico⁴⁹⁻⁵²: las HDL2b con diámetro de 10.58-12.36 nm, HDL2a de 9.94-10.58 nm, HDL3a de 8.98-9.94, HDL3b de 8.45-8.98 nm y las HDL3c de 7.90-8.45 nm. Es importante enfatizar que las HDL de conejos presentan el mismo comportamiento; sin embargo, sus HDL2b tienen un intervalo mayor donde se contempla a partículas con diámetro superior a los 13.5 nm⁵³. La resonancia magnética nuclear (RMN) de los protones de los lípidos HDL en una muestra de suero o plasma⁵⁴, también ha sido utilizada para analizar la distribución de tamaños de las HDL^{55, 56}. En la RMN se subclasifica a las HDL en pequeñas, medianas y grandes^{54, 56}. Así, el tamaño de las HDL obtenido por RMN correlaciona con la electroforesis en gradiente de poliacrilamida, útil como estándar de calibración^{55, 56}.

Resultados de estudios *in vitro* y epidemiológicos sugieren una evaluación mejor del riesgo cardiovascular al determinar el tamaño de las HDL que al determinar las concentraciones de C-HDL plasmático. Por otro lado, existe una creciente evidencia acerca de que el rol protector de las HDL es estimado por su contenido de colesterol^{35, 16, 38-41} y ha motivado el estudio de los mecanismos involucrados.

Por estas razones en el presente trabajo de investigación usamos una metodología de cuantificación de las subclases de HDL por sus diferentes lípidos; métodos que nos permitieron evaluar otras características de las lipoproteínas y su composición química.

Adicionalmente, las HDL evitan la propagación de radicales libres en la LDL por acción de la enzima paraoxonasa-1 (PON1) que contribuye a su potencial antiateroscleroso, como se describe a continuación.

2. Actividad antioxidante

La oxidación de lipoproteínas que contienen apo B y lípidos de la membrana celular juega un papel esencial en el desarrollo de lesiones de estría grasa, un paso inicial en la aterogénesis. Los productos de la peroxidación lipídica presente en las LDL oxidadas pueden inducir inflamación, disfunción endotelial y muerte celular por apoptosis, característica de la primera etapa en la formación del ateroma. Varias proteínas físicamente asociadas a las HDL, como apo A-I, LCAT, factor de activación de plaquetas, acetilhidrolasa, y particularmente PON-1 están involucradas en la prevención de la oxidación lipídica o degradación de hidroperóxidos lipídicos²¹.

Existe una correlación positiva entre la concentración de apo A-I y la actividad PON1 ya que la cantidad de partículas HDL determina el número de moléculas de la enzima presente en plasma. PON1 cataliza la conversión de lipoperóxidos proaterogénicos en la LDL a los correspondientes lipohidróxidos^{9, 44} que son biológicamente inocuos. Sin embargo, la capacidad de las HDL para desorber la paraoxonasa de la membrana del hepatocito depende además del contenido de CL presente en la lipoproteína⁹, por lo que la tensión de superficie y la fluidez de la capa de fosfolípidos de las HDL son fundamentales para su asociación con la enzima. Lo que apoya el supuesto de que no todas las partículas HDL poseen el mismo potencial antiaterogénico pues sólo algunas tienen las características estructurales para desorber, transportar en plasma y vectorizar a la paraoxonasa hacia el espacio subendotelial en donde desempeña su papel antiateroscleroso. En este contexto, la actividad plasmática PON1 es determinada por la estructura de las HDL y factores genéticos⁹, además es fácilmente determinada por métodos espectrofotométricos que son susceptibles de ser automatizados.

3. Mejoramiento de la función endotelial

Las HDL estimulan la liberación de óxido nítrico de las células endoteliales⁵⁷⁻⁶⁰ y la expresión del factor tisular⁶⁴; suprimen la expresión de adhesión molecular así como la interacción de las células blancas de la sangre con la pared del vaso^{23, 41, 61-63}. La mejora sobre la función endotelial es principalmente atribuida al rol de esfingosina-1-fosfato (S1P) transportado por las HDL. En pacientes con hipercolesterolemia, la infusión de HDL reconstituidas mejora la función del endotelio deteriorado⁶⁵, y la administración subcutánea de apo A_{Milano} en pacientes con CAD (arteriopatía coronaria) reduce el volumen de la placa coronaria. En este contexto se propone que las HDL mantienen el entorno lipídico en las caveolas, con ello promueven la retención y función de Óxido Nítrico Sintasa Endotelial (eONS) en el dominio y así causan la activación directa eONS vía receptor scavenger clase B, miembro 1 (SCARB1, también conocido como SR-BI) inducido por la señalización de cinasas^{66, 67}.

Las HDL también están involucradas en la regulación del tono vascular y la trombogénesis al inducir la expresión de COX-2 (ciclooxigenasa-2) en las células endoteliales⁶⁸ las que a su vez facilitan la liberación de PGI-2 (prostaciclina I-2 ⁶⁹⁻⁷¹). COX-2 es frecuentemente asociada con procesos inflamatorios⁷² y es altamente inducible, mientras que PGI-2 es bien conocida como un fuerte vasodilatador que actúa sobre las células del músculo liso vascular y a su vez como un potente inhibidor de la adhesión plaquetaria⁷³; disminuyen la liberación de factores de crecimiento que estimulan la proliferación local de células de músculo liso involucradas en el desarrollo del ateroma.

4. Propiedades antiinflamatorias.

Las HDL previenen la inflamación vascular a través de distintos mecanismos; la adhesión de leucocitos a las células endoteliales y su interacción con las células del músculo liso son indispensables para el desarrollo de la placa aterosclerosa. La interacción de los leucocitos con las células endoteliales está mediada por moléculas de adhesión, tales como la molécula de adhesión de células vasculares

1 (VCAM-1), la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la E-selectina, que se expresan abundantemente en las placas ateromatosas. Las VCAM-1 e ICAM-1 son mediadoras de la adhesión de linfocitos y monocitos circulantes, mientras que la E-selectina permite su anclado y rodamiento en la superficie de las células endoteliales. Se ha observado en estudios *in vitro* que las concentraciones fisiológicas de HDL inhiben la expresión de VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina^{3, 27}. En este contexto las HDL modulan la expresión de dichas moléculas; este efecto parece estar vinculado con la inhibición TNF α , así como la interacción del complejo JAK2/STAT3 con apoAI/ABCAI^{74, 75}.

Otras propiedades anti-inflamatorias de las HDL incluyen el control de la expresión de interleucina 8 (IL-8) y proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) bajo condiciones inflamatorias⁷⁶, y la inhibición de un subgrupo de genes de macrófagos estimulados por lipopolisacáridos que regulan la respuesta interferón I⁷⁷.

Estrategias farmacológicas para disminuir el riesgo de EAC.

Las LDL juegan un papel central en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular, por lo que la estrategia central a nivel de lípidos plasmáticos consiste en la disminución de C-LDL para la reducción del riesgo cardiovascular⁷⁸. Actualmente las estatinas son los fármacos de primera elección para el tratamiento de pacientes en que predominan niveles elevados de C-LDL y colesterol no HDL; de todos los fármacos con efecto hipocolesterolemia las estatinas han mostrado mayor eficacia clínica y reducción de la mortalidad cardiovascular en prevención tanto primaria como secundaria. Sin embargo, a pesar de su eficacia, aproximadamente el 70% de los sujetos tratados con estos fármacos tiene eventos coronarios por aterosclerosis⁷⁹. Es por ello que se ha hecho énfasis en la importancia de manejar el riesgo residual que puede radicar en gran medida en otras dislipidemias como la hipertrigliceridemia. En este contexto, los fibratos han sido ampliamente usados para reducir los niveles plasmáticos de triglicéridos y usualmente se asocian con un incremento de colesterol-HDL.

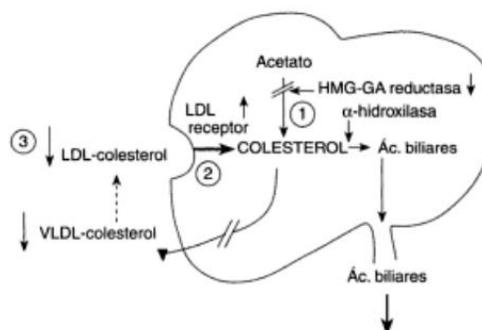
1. Estatinas.

Las estatinas se utilizan ampliamente para reducir el colesterol plasmático total y el C-LDL en pacientes con hiperlipidemia. Además de la acción sobre lípidos plasmáticos, se han descrito otros efectos pleiotrópicos relacionados con su uso: son antiinflamatorias y antitrombogénicas, estabilizan la placa aterosclerótica, disminuyen la proliferación de las células musculares lisas, y disminuyen el estrés oxidativo⁷⁸. Dichos efectos se han atribuido a su capacidad de suprimir la síntesis de isoprenoides no esteroides cuyo precursor es el mevalonato.

Atorvastatina.

La atorvastatina como las demás estatinas, es un análogo del ácido mevalónico que inhibe la síntesis celular de colesterol y reduce los niveles de C-LDL. Como se observa en la figura 4, atorvastatina disminuye la biosíntesis del colesterol inhibiendo competitiva y reversiblemente la Hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA-reductasa, enzima limitante de la síntesis endógena del colesterol), provocando en las células hepáticas disminución en la expresión de genes que codifican la HMG-CoA-reductasa. La reducción de los niveles celulares de CL activa también los factores de transcripción SREBP, que a su vez estimulan la síntesis de receptores para las LDL. Esto resulta en que produce un aumento en la captación celular de LDL y VLDL particularmente en los hepatocitos, así como una disminución de sus niveles plasmáticos⁸⁰.

Figura 4. Mecanismos de acción de los inhibidores de la HGM-CoA reductasa sobre el metabolismo del C-LDL. 1) Producen una inhibición competitiva en la biosíntesis de colesterol. 2) Este descenso del colesterol de *novo* produce un incremento en el número de receptores LDL. 3) En consecuencia, el número de partículas de colesterol LDL en plasma disminuye.



2. Fibratos.

Son usados como hipolipemiantes derivados del ácido clorofenoxiisobutírico (ácido fíbrico) y sus efectos son mediados por alteraciones en la transcripción de genes involucrados en el metabolismo de lípidos y lipoproteínas⁸¹. Son fármacos que disminuyen los niveles de triglicéridos y aumentan los de HDL en humanos, indicados para el tratamiento de hipertrigliceridemia, dislipidemia mixta e hipoalfalipoproteinemia. La evidencia clínica demuestra que los derivados del ácido fíbrico reducen la progresión de aterosclerosis coronaria en pacientes dislipidémicos (por ejemplo, bezafibrato, gemfibrozil) y en pacientes con diabetes tipo 2 (fenofibrato)⁸¹. Sin embargo, se requieren más estudios clínicos para demostrar si los fibratos reducen la mortalidad cardiovascular en la diabetes tipo 2.

Los fibratos actúan como agonistas de receptores α activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR α). Una vez activados inducen la síntesis de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, y ejercen acciones antiinflamatorias: disminuyen los niveles plasmáticos de Proteína C Reactiva (PCR) e Interleucina 6 (IL-6) asociados a la reducción en los niveles de NF- κ B, inhiben moléculas de adhesión y a la fosfolipasa A2 asociada a lipoproteína (Lp-PLA2) sugerida como un biomarcador de riesgo cardiovascular. Los fibratos también exhiben acciones antitrombóticas, profibrinolíticas y mejoran la tolerancia a la glucosa⁸¹. Estas acciones antiaterosclerosas podrían estar mediadas por HDL, pero no existe información suficiente al respecto.

Fenofibrato.

El Fenofibrato (Figura 6) es un pro-fármaco que requiere de desesterificación para pasar a ácido fíbrico, su metabolito activo que es liberado al plasma para activar PPAR- α en el hígado, endotelio vascular, adipocitos y células del músculo. Como el resto de los fibratos, la unión de fenofibrato a los PPAR α resulta en la activación de éstos como factores transcripcionales. El receptor dimeriza, formando un heterodímero con el receptor de ácido-9-cis retinoico (RXR). El heterodímero se une entonces a secuencias de DNA específicas conocidas como elementos de respuesta para PPARs (PPRE) presentes en los promotores de diversos genes involucrados en el metabolismo lipídico (Figura 6)^{79, 81-82}.

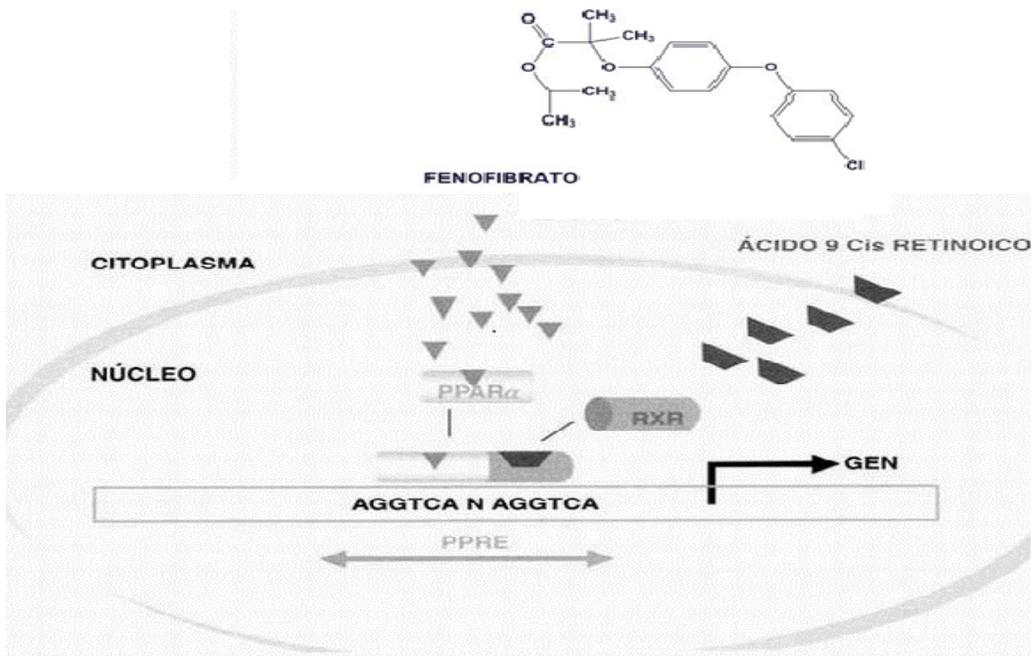


Figura 6. Mecanismo de acción de fenofibrato. El fenofibrato es un agente hipolipemiante que fundamentalmente reduce los niveles plasmáticos de triglicéridos y aumenta el C-HDL: el fibrato se une a su receptor nuclear PPAR α , induciendo la heterodimerización con el receptor nuclear RXR activado por su ligando. El heterodímero es un factor de transcripción que reconoce la secuencia de consenso del DNA indicada en la figura (PPRE). La interacción factor de transcripción-DNA resulta en la expresión de los genes que contienen PPRE en sus secuencias reguladoras, entre ellos el gen de la apo A-I y de la apo A-II de las HDL.

Se sabe que los efectos farmacológicos moleculares de los fibratos, incluyendo al fenofibrato, dependen de su capacidad para activar PPAR- α ; la unión de los fibratos a los PPAR- α aumenta la expresión de enzimas implicadas en la β -oxidación mitocondrial en el hígado y en el músculo esquelético, así como la expresión de otros genes involucrados. Por ejemplo, la acil-coenzima A sintasa y proteínas transportadoras de ácidos grasos que facilitan el transporte intracelular, acilación y β -oxidación de ácidos grasos; el efecto neto es la disminución de la disponibilidad de ácidos grasos para la síntesis de triglicéridos y secreción hepática de VLDL.

Por otra parte, el ácido fibrato incrementa la actividad de la lipoprotein lipasa endotelial (LPL) y la expresión de lipoproteínas apo A-I y apo A-II y disminuyen la de apo C-III, lo que de forma secundaria aumenta la degradación de las VLDL.

En efecto dichos cambios aumentan el catabolismo de los triglicéridos y reducen el contenido de éstos en quilomicrones y VLDL; como resultado de la expresión de los genes de apo A-I y apo A-II aumentan la producción de HDL nacientes^{79, 83} lo que incrementa los niveles plasmáticos de HDL.

Como hemos dicho, en condiciones normales, el CE de las HDL se transfieren a las VLDL, pero este intercambio disminuye cuando los fibratos reducen las VLDL, por lo que el contenido en colesterol de las HDL aumenta. Dependiendo de la anomalía lipídica subyacente se ha observado que los fibratos aumentan los niveles de C-HDL en un 5-15% y que reducen los triglicéridos en plasma en un 30-50%⁸⁴. Los subgrupos de pacientes con triglicéridos elevados y/o C-HDL bajo, son los que reciben un mayor beneficio cardiovascular con una reducción del riesgo relativo de EAC entre 27 y 65%⁸⁵.

3. Combinación FA.

La coadministración de estatina y fibrato son frecuentemente usadas para tratar pacientes con dislipidemia; sin embargo, un combinación de dosis fija no es usualmente comercializada⁸⁶. La eficacia del ácido fíbrico combinado con una baja o moderada dosis de estatina ha sido demostrada en un amplio rango de pacientes, incluyendo pacientes con diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólico o sujetos ancianos. La combinación de ácido fíbrico con simvastatina, atorvastatina y rosuvastatina se ha visto que es más eficaz para mejorar el perfil total de lípidos comparado con la correspondiente dosis de Estatina⁸¹.

La combinación FA puede reducir sustancialmente el riesgo de enfermedad cardiovascular residual que se presenta en algunas poblaciones y que es en parte explicado por el aumento de los niveles de triglicéridos y los niveles disminuidos de C-HDL (en el caso de pacientes con dislipidemia mixta), así como por el incremento de los niveles de partículas LDL y de apo C-III en pacientes dislipidémicos⁸¹.

El NCEP (Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol, por sus siglas en inglés) recomienda el uso de un fibrato en combinación con una estatina en pacientes con dislipidemia mixta. Sin embargo, el médico limita la combinación fibrato-estatina por el mayor riesgo de miotoxicidad en comparación con los fármacos de manera individual; actualmente faltan estudios que examinen los eventos de enfermedad cardiovascular⁸⁶ en este contexto y que sean consistentes con los beneficios al usar la combinación farmacológica sobre los posibles riesgos. A pesar de ello, la combinación de fibratos con estatina parece ser una opción razonable para reducir el riesgo cardiovascular residual.

Por otro lado, no se conoce si existe un efecto potenciador y no sólo aditivo con ambos fármacos. Estudios previos han demostrado que tanto las estatinas como los fibratos aumentan la síntesis de apo A-I, pero no se ha descrito el efecto de la combinación sobre dicha biosíntesis. Además, se sabe que tanto las estatinas como los fibratos mejoran la función endotelial, efecto que podría ser no sólo aditivo sino potenciado con la combinación farmacológica. Actualmente también es desconocido el resultado de la combinación FA sobre la actividad antioxidante mediada por PON-1 y sobre el TRC in vivo, dos de las propiedades que hemos descrito más importantes de las HDL. Asimismo, todos estos efectos podrían estar relacionados con la estructura de las HDL durante el tratamiento con la combinación FA, sin embargo, se sabe muy poco al respecto.

Con base en los diferentes mecanismos descritos, es posible plantear la idea de que la combinación FA puede tener efectos sinérgicos benéficos sobre el metabolismo, composición lipídica, así como sobre la función antiaterogénica de las HDL, más allá de la mejoría en el perfil de lípidos. Para empezar a abordar los posibles efectos sinérgicos de la combinación farmacológica, el presente trabajo de investigación está diseñado para caracterizar el perfil lipídico y las subclases de HDL en un modelo de conejo hipercolesterolémico tratado con la combinación FA. Los resultados de este estudio serán el punto de partida para otros estudios sobre el metabolismo y la función de las HDL durante el tratamiento con la combinación farmacológica.

HIPÓTESIS

La combinación FA produce efectos sinérgicos sobre la distribución de tamaños, composición lipídica y distribución de las subclases de las HDL en comparación con los fármacos individuales.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la combinación FA sobre el perfil lipídico y la estructura de las HDL en un modelo animal con hipercolesterolemia exógena.

OBJETIVOS PARTICULARES

Caracterizar la distribución de subclases de HDL en conejos Nueva Zelanda con hipercolesterolemia exógena.

Establecer si existe un cambio en la distribución de tamaño de las HDL con la combinación FA.

Determinar el cambio en la composición lipídica de subclases de HDL con la combinación FA.

Comparar los efectos de la combinación FA de dichos parámetros vs los fármacos de manera individual.

METODOLOGÍA

Modelo experimental

Se emplearon conejos Nueva Zelanda macho de 3 a 3.5 Kg, se distribuyeron en 5 grupos de estudio. Un primer grupo llamado “control” (n=18) que solo recibió alimento estándar; otros cuatro grupos que fueron sometidos a una dieta controlada consumieron alimento suplementado con colesterol al 0.2% y aceite vegetal de canola al 2% como vehículo. El segundo grupo (grupo estatina, n=9) se sometió a un tratamiento diariamente con atorvastatina en solución en aceite de canola (0.5 mL) a una dosis ponderal de 0.33 mg por kg de peso corporal. El tercer grupo recibió por la misma vía y con el mismo vehículo fenofibrato 2.6 mg por kg de peso (grupo fibrato, n=9). El cuarto grupo recibió la combinación de ambos fármacos en las mismas condiciones (grupo combinación n=9), equivalentes en masa a 20/160 mg de atorvastatina/fenofibrato en el humano. Por último, el quinto grupo, llamado dislipidémico (n=9), que sólo recibió diariamente el vehículo y la dieta enriquecida en colesterol. La duración de cada tratamiento fue de 6 semanas. Todos los procedimientos se realizaron con el acuerdo del Comité Científico y de Ética del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

Obtención de muestras

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena marginal de las orejas, después de un ayuno de 8 horas en tubos con heparina como anticoagulante. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos, transcurrido este tiempo se separó el plasma. Las HDL se aislaron de plasma fresco. En los casos en los que no se empleó plasma enseguida de la punción, éste fue almacenado a -20°C hasta el momento de su análisis.

Análisis de laboratorio

- **Composición química de las HDL y características bioquímicas**

Las concentraciones plasmáticas de colesterol total, CL, triglicéridos y glucosa se cuantificaron mediante métodos enzimáticos colorimétricos comerciales (Randox©, Reino Unido). Las concentraciones de lípidos asociados a las HDL se determinaron precipitando selectivamente las lipoproteínas que contienen apo B en plasma con un reactivo de ácido fosfotúngstico/cloruro de magnesio (Randox©, Reino Unido). Posteriormente se determinaron los diferentes lípidos en el sobrenadante, con métodos enzimáticos colorimétricos comerciales (Randox©, Reino Unido y Wako, Japón). Parámetros que se determinaron cada semana antes, durante y al finalizar cada tratamiento.

- **Aislamiento y análisis de los lípidos de las HDL**

Las HDL plasmáticas fueron separadas por ultracentrifugación secuencial en una ultracentrífuga de mesa Beckman óptima TLX a 100 000 rpm a 10°C en tubos de policarbonato de 1 mL a partir de plasma⁸⁷. Primero se ajustó la densidad de éste a 1.063 g/mL con KBr sólido, ultracentrifugando por 2 horas 30 minutos a 100 000 rpm para separar las lipoproteínas que contienen apo B. Después se ajustó la densidad a 1.21 g/mL con KBr sólido y se ultracentrifugó por 3 horas a 100 000 rpm; enseguida se ajustó nuevamente la densidad a 1.25 g/mL con KBr sólido ultracentrifugando también por 3 horas a 100 000 rpm para aislar a las HDL. Bajo estas condiciones se recupera de 80 a 85% de la apo A-I del plasma total⁸⁸.

Posteriormente las HDL se dializaron en solución amortiguadora de Tris 0.09 M/ácido bórico 0.08 M/EDTA 3mM pH 8.4 (amortiguador TBE).

Con la finalidad de determinar la composición química de las subclases de HDL y así aportar nuevos conceptos acerca de la relación entre el metabolismo y la comprensión de estas lipoproteínas se usaron métodos enzimáticos-colorimétricos en fase gel que permitieron cuantificar los lípidos de las diferentes subclases de HDL en este modelo, como se describe enseguida.

Una vez aisladas las HDL, se separaron las subpoblaciones de estas por su tamaño en electroforesis en gel con gradiente 3-30 % de poliacrilamida en condiciones nativas. Los geles fueron teñidos inicialmente para CL, colesterol total, triglicéridos y fosfolípidos según se describe más adelante para cada uno de ellos^{88, 89}. Enseguida, se obtuvieron los densitogramas de las bandas correspondientes a los lípidos considerados en este trabajo. Posteriormente se decoloró la tinción de lípidos con una mezcla de agua/ácido acético/metanol, para luego teñir los geles de poliacrilamida para proteína con una solución de azul de Coomassie R250, de los cuales se obtuvieron los densitogramas correspondientes a proteína de las HDL.

La proporción y distribución de tamaño de cada una de las subpoblaciones de HDL se estimó mediante densitometría óptica de las bandas correspondientes a los lípidos y proteína de las HDL en cada uno de los geles (Figura 5). El radio hidrodinámico de las subclases de HDL se analizó (HDL2b 10.58-12.36 nm, HDL2a 9.94-10.58 nm, HDL3a 8.98-9.94, HDL3b 8.45-8.98 nm, HDL3c 7.90-8.45 nm) separadas en el gel usando como referencia marcadores de alto peso molecular (tiroglobulina de 17 nm, ferritina de 12.2 nm, catalasa de 10.4 nm, lactato deshidrogenasa de 8.2 nm y albúmina de 7.1 nm, kit Pharmacia, UK)^{88, 89}.

- Tinción enzimática de colesterol total de las subclases de HDL

Para realizar la detección selectiva de colesterol total (colesterol libre + colesterol esterificado) sobre el gel de poliacrilamida se utilizó el siguiente método⁹⁰: se empleó una mezcla enzimática compuesta de colesterol esterasa, colesterol oxidasa y peroxidasa en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 7.4. Se agregó también colato de sodio y Tritón 100X para exponer al colesterol embebido en la estructura de las lipoproteínas. Se usó carboximetilcelulosa como agente viscosante para evitar la difusión de los reactivos y productos de reacción, además para garantizar un contacto homogéneo del reactivo con la superficie del gel de poliacrilamida.

El H_2O_2 , producto final de la secuencia de reacciones enzimáticas, es estequiométricamente proporcional al colesterol total en la muestra y se puso en evidencia con la peroxidasa, azul de tetrazolium (MTT) y fenazín metasulfato (FMS) como aceptores de electrones⁹¹ (Figura 7).

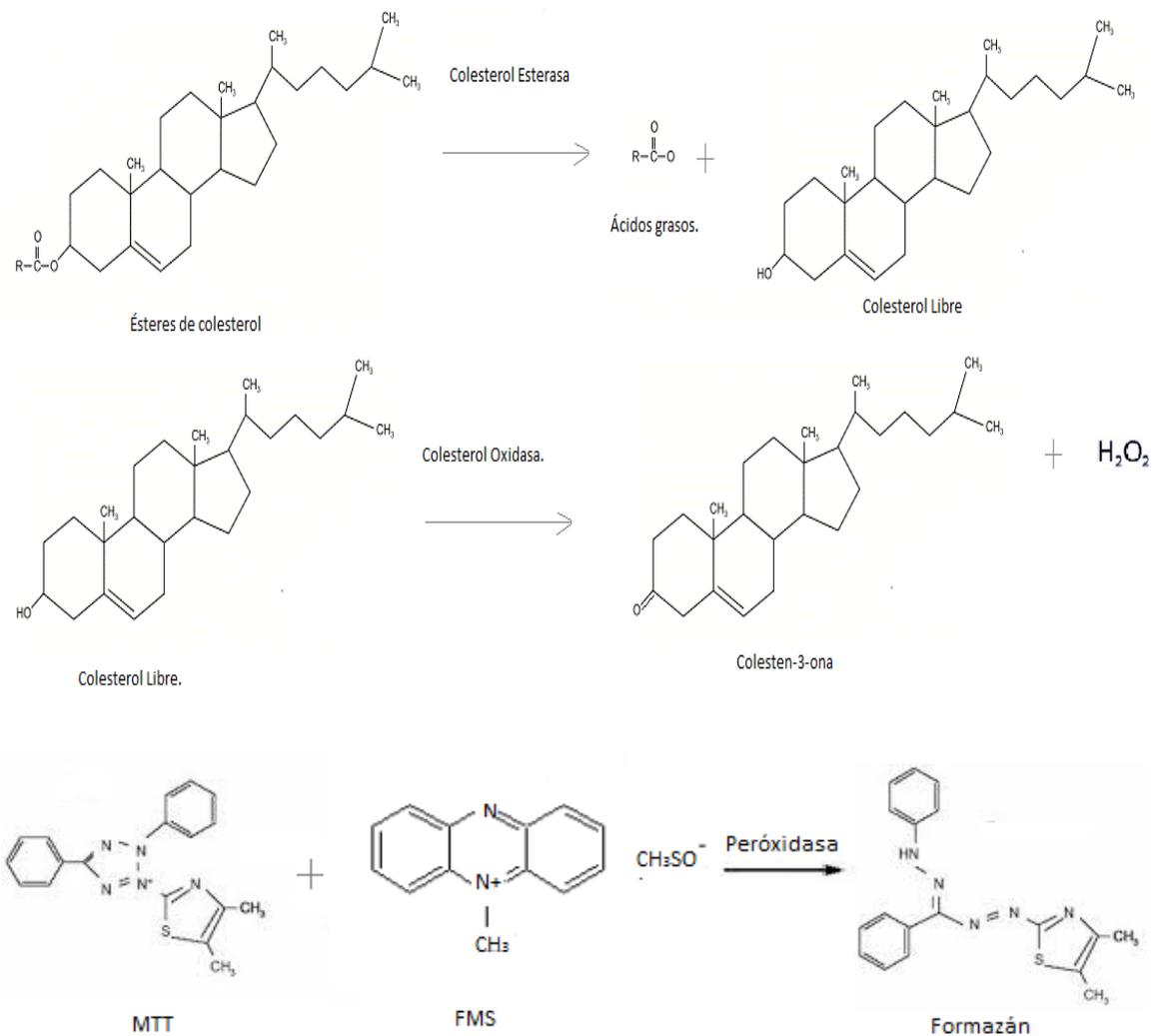


Figura 7. Esquema de las reacciones enzimáticas para la determinación de colesterol. El formazán se analizó por densitometría óptica en un intervalo de longitud de onda de 520 a 570 nm.

El producto de reacción que precipita en el gel fue analizado por densitometría óptica considerando que el área bajo la curva del densitograma representa el 100% del colesterol de la muestra. El porcentaje de la integración parcial en los intervalos de tamaño correspondientes a cada subclase de HDL representó la proporción relativa de cada una de ellas, como referencia se puede observar la Figura 8.

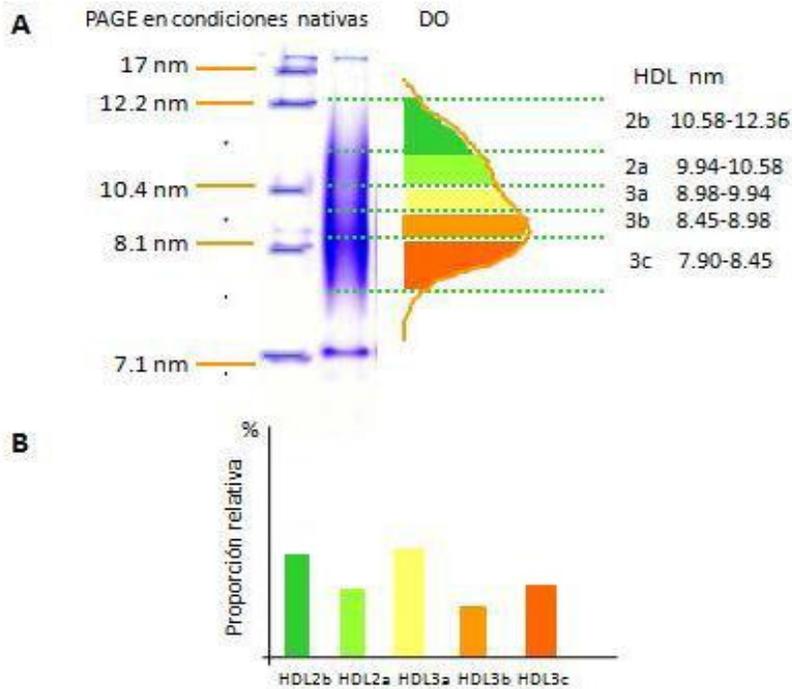


Figura 8. Separación y análisis de las subclases de HDL por electroforesis en gradiente de poliacrilamida (PAGE) en condiciones nativas. Las HDL se separan por PAGE y los barridos se revelan con azul de Coomassie (Panel A).

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

- Tinción enzimática de CL de las subclases de HDL

Se utilizó el mismo procedimiento que para el colesterol total, sin embargo se omitió adicionar la enzima colesterol esterasa para garantizar la cuantificación específica del CL. El CE se calculó por la diferencia entre el colesterol total y el CL.

- Tinción enzimática de fosfatidilcolina de las subclases de HDL.

Para realizar la detección selectiva de fosfatidilcolina sobre el gel de poliacrilamida se empleó una mezcla enzimática compuesta de fosfolipasa D y colina oxidasa en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 7.4, colato de sodio 3 mM y Tritón® 100X 0.1%. Se agregó carboximetilcelulosa, el agente viscosante (Figura 9). El H₂O₂, producto final de la secuencia de reacciones enzimáticas se puso en evidencia con peroxidasa, MTT y FMS⁹². El producto de reacción que precipitó en el gel se analizó por densitometría óptica.

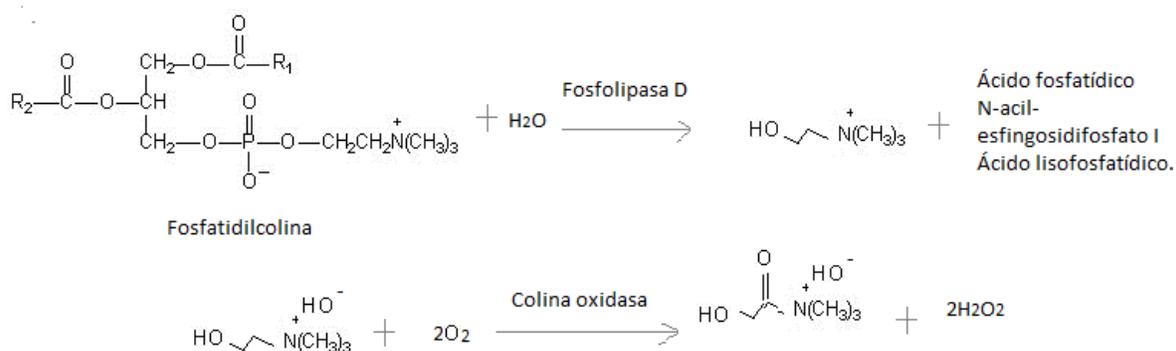


Figura 9. Esquema de las reacciones enzimáticas para la determinación de fosfatidilcolina.

- Tinción enzimática de los triglicéridos de las subclases de HDL.

Se empleó una mezcla enzimática compuesta de lipasa, glicerol cinasa, glicerol-3-fosfato oxidasa y peroxidasa en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 7.4, ATP 1 mM, colato de sodio 3 mM y Tritón® 100X 0.1%. Se agregó además el agente viscosante (figura 10). El H₂O₂ se puso en evidencia con MTT y FMS⁹³.

El producto de reacción precipitó en el gel y se analizó por densitometría óptica.

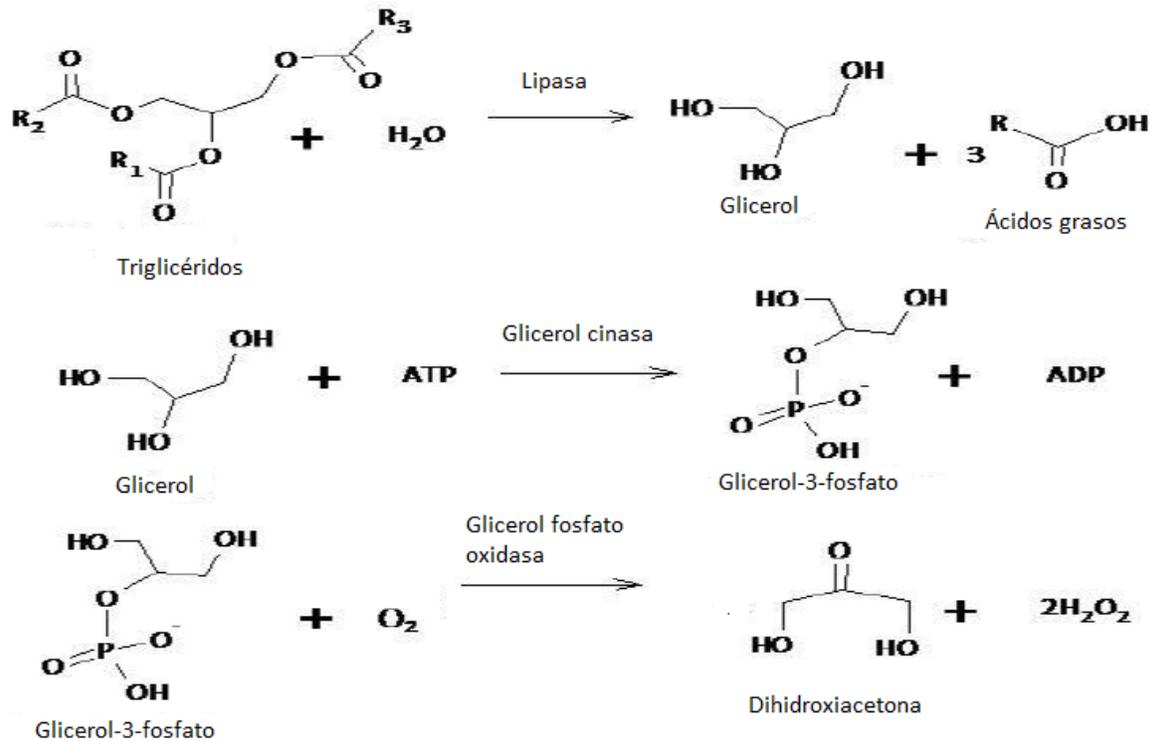


Figura 10. Esquema de las reacciones enzimáticas para la determinación de triglicéridos.

- **Análisis estadístico.**

Las diferencias entre los grupos fueron determinados con el tratamiento como efecto fijo, usando un modelo de ANOVA para las variables continuas con distribución normal. Para comparar las variables que no presentaron distribución normal se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis o se transformaron logarítmicamente para ser analizadas por ANOVA. La normalidad de las variables se realizó por una prueba de Smirnov-Kolmogorov. Para establecer las diferencias significativas específicas entre los diferentes grupos, se utilizó un análisis post-hoc LSD.

Los análisis se llevaron a cabo de acuerdo a la metodología estadística estándar utilizando SPSS. Los resultados se presentan como el promedio más error estándar (EE). La significancia estadística se consideró a partir de una $p < 0.05$.

RESULTADOS

Caracterización bioquímica del modelo de dislipidemia

Con la finalidad de caracterizar el modelo de dislipidemia se determinaron las concentraciones de lípidos plasmáticos de cada grupo de estudio. Para ello, se utilizaron las muestras sanguíneas al final del tratamiento. Los resultados de esta caracterización se muestran en la tabla 3.

- **Tabla 3.** Parámetros de evaluación bioquímica en plasma.

	Grupo				
	Control n=18	Dislipidémico n=9	Estatina n=9	Fibrato n=9	Combinación n=9
Glucosa	94.4±5.6	126.7±36.4 ^a	116.7±27.4 ^a	107.6±20.4 ^b	112.6±15.2
Colesterol	56.5±15.9	515±221.3 ^a	510.7±175.4 ^a	605.0±369.5 ^a	340.9±116.5 ^{a, b, c, d}
Triglicéridos	58.9±16.4	80.9±30.6 ^a	77.0±42.2 ^a	60.0±22.8	45.3±16.67 ^b
Colesterol no-HDL	30.9±15.9	474.7±214.1 ^a	477.9±172.9 ^a	538.3±382.7 ^a	307.7±118.7 ^{a, b, c, d}

Los resultados se expresan como promedio ± EE. ^a P < 0.05 vs control. ^b P < 0.05 vs Dislipidémico. ^c P < 0.05 vs Estatina. ^d P < 0.05 vs Fibrato.

La dieta suplementada induce hipercolesterolemia importante, el colesterol plasmático incrementa aproximadamente 9 veces al comparar con el grupo control según se observa en la Tabla 3. Sin embargo, la suplementación con aceite de canola no afecta de manera importante los niveles de triglicéridos plasmáticos.

En este modelo se presentó una concentración menor de colesterol plasmático de aproximadamente el 33% con el tratamiento fibrato-estatina respecto al grupo dislipidémico, lo cual no ocurrió con los grupos que recibieron el tratamiento farmacológico de forma individual.

Sin embargo, la hipercolesterolemia persiste después de cualquiera de los tratamientos; el colesterol plasmático se mantiene alrededor de 6, 9 y 10 veces por arriba del observado en grupo que recibió combinación, atorvastatina y fenofibrato, respectivamente, en comparación con el grupo control. El comportamiento del colesterol no HDL es similar al del colesterol total (Tabla 3).

La concentración plasmática de triglicéridos es significativamente mayor en el grupo dislipidémico y el grupo tratado con atorvastatina con respecto al grupo control, mientras que en el grupo tratado con fenofibrato los niveles se mantuvieron comparables al de los controles. Por su parte, en el grupo que fue tratado con FA los triglicéridos plasmáticos fueron significativamente menores con respecto al grupo que recibió la dieta suplementada y comparables al control.

A continuación, se evaluó el efecto al administrar la combinación FA y los fármacos de manera individual sobre la composición lipídica de las HDL. Los resultados se presentan en la tabla 4.

- **Tabla 4.** Parámetros de evaluación bioquímica en plasma asociados a las HDL.

	Grupo				
	Control n=18	Dislipidémico n=9	Estatina n=9	Fibrato n=9	Combinación n=9
C-HDL	25.6±9.0	37.5±21.5 ^a	36.0±13.1 ^a	36.1±9.8 ^a	32.4±7.8
Tg-HDL	24.4±5.5	11.4±5.2 ^a	16.7±8.9 ^a	20.3±5.5 ^b	25.2±10.2 ^{b, c}
Ph-HDL	70.4±11.0	41.5±19.9 ^a	53.2±17.1 ^a	56.4±7.7 ^{a, b}	59.8±11.7 ^{a, b}

Los resultados se expresan como promedio ± EE. ^a P < 0.05 vs control. ^b P < 0.05 vs Dislipidémico. ^c P < 0.05 vs Estatina. ^d P < 0.05 vs Fibrato. C, colesterol; Tg, triglicéridos; Ph, fosfolípidos.

La dieta suplementada, el fenofibrato y la atorvastatina afectan significativamente los niveles de C-HDL con respecto al control; la concentración de C-HDL en estos grupos es significativamente mayor que en el grupo control, mientras que la diferencia entre en el grupo que recibió la combinación y el control no alcanzó significado estadístico.

La concentración de triglicéridos-HDL es significativamente menor en el grupo que recibió atorvastatina y la dieta suplementada respecto al grupo control. En contraste, los grupos que recibieron FA o fibrato presentaron niveles de triglicéridos-HDL significativamente mayores en comparación con el grupo dislipidémico. Interesantemente, el grupo que recibió la combinación presentó las concentraciones mayores de triglicéridos-HDL e incluso la diferencia con el grupo atorvastatina alcanza significado estadístico; de esta forma los niveles de triglicéridos entre el grupo que fue tratado con la combinación y el grupo control son semejantes.

Las concentraciones plasmáticas de fosfolípidos-HDL a lo largo de los grupos dislipidémico, estatina, fibrato y la combinación presentan un desplazamiento gradual hacia la concentración del grupo control; alcanzan niveles máximos en el grupo FA. Sin embargo, en comparación al grupo control, los niveles plasmáticos de fosfolípidos-HDL son significativamente inferiores en todos los grupos tratados.

Caracterización de las subclases HDL

1. Distribución de tamaño

La distribución relativa de las subclases de HDL se determina en función del contenido de proteína de las mismas como se describe en la sección de métodos, esta se presenta en la Figura 11.

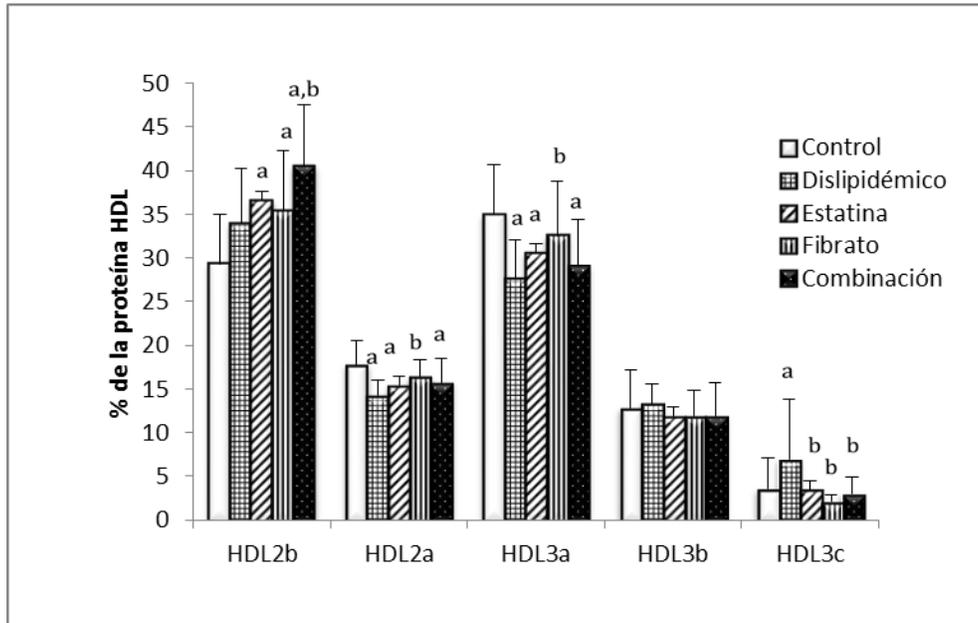


Figura 11. Distribución relativa de las subclases de HDL. $P < 0.05$ vs ^agrupo control, ^bgrupo dislipidémico.

Claramente se aprecia que en la distribución de tamaños existe un desplazamiento de las HDL hacia partículas grandes tipo 2b, progresivamente a lo largo de los grupos fibrato, estatina y dicho desplazamiento es máximo en el grupo que recibió la combinación. El incremento de la proporción relativa de las HDL2b se acompaña de un decremento de las partículas pequeñas tipo HDL3c en los grupos que recibieron los diferentes tratamientos farmacológicos y estos niveles son semejantes a los del grupo control. En contraste, la dieta suplementada se asocia con una mayor proporción de partículas HDL3c pequeñas en comparación al grupo control.

No se encontró ningún cambio adicional asociado a las partículas HDL3b, ya que éstas mantienen los mismos niveles en todos los grupos de estudio. En el caso de las partículas HDL2a el grupo dislipidémico se asocia con una menor proporción de éstas, mientras que los grupos tratados farmacológicamente tienden a restaurar los niveles en dichas partículas respecto al grupo control; fenofibrato logra niveles mayores en comparación con los otros grupos. El comportamiento descrito para las HDL tipo 2a es similar al que presentan las partículas HDL3a.

2. Distribución de lípidos en las subclases de HDL

2.1) Colesterol

Con el interés de determinar la composición química de las subclases de HDL se llevó a cabo la tinción en fase gel de las HDL previamente aisladas, descrita en materiales y métodos. En la Figura 12 se presenta la distribución de cada subpoblación de HDL asociada a las concentraciones plasmáticas de colesterol.

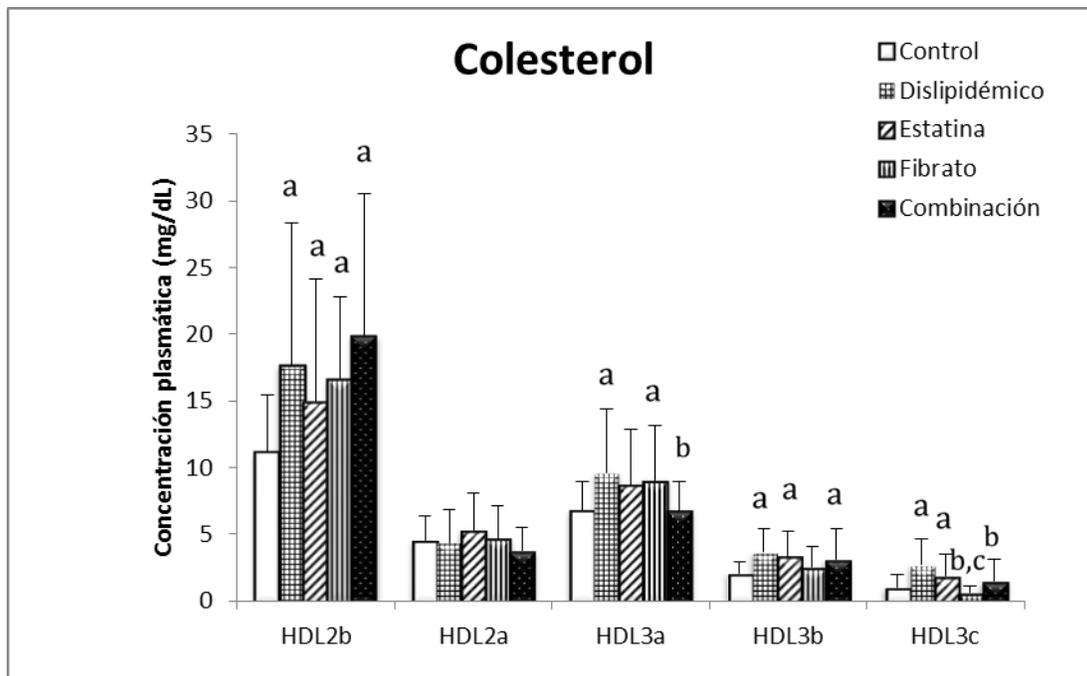


Figura 12. Cambio en la concentración plasmática de colesterol total asociado a las subclases de HDL determinado por método enzimático en la superficie del gel de poliacrilamida. Los resultados mostrados se expresan como promedio \pm EE. $P < 0.05$ vs ^agrupo control, ^bgrupo dislipidémico y ^cgrupo estatina.

Es de notar que las concentraciones plasmáticas de colesterol asociado a las partículas HDL2b en todos los grupos tratados tiende a ser mayor respecto al grupo control, que alcanza máximos niveles en el grupo intervenido con la combinación farmacológica. Estos resultados son consistentes con la tendencia que mostró la distribución de proteína en dicha subclase. En cambio, el colesterol asociado a las HDL2a no representa cambios estadísticamente significativos entre los grupos.

Para las HDL3a, HDL3b y HDL3c el colesterol asociado a éstas es mayor en el grupo dislipidémico que en los demás grupos, aunque sólo con diferencias significativas respecto al grupo control. En el grupo que recibió la combinación fibrato-estatina, el colesterol-HDL3a alcanzó valores similares a los del grupo control, mientras que los grupos dislipidémico, estatina, y fibrato presentaron niveles significativamente mayores que el control. Este comportamiento fue similar al observado en las HDL3c, mientras que el colesterol-HDL3b en el grupo que recibió la combinación no alcanzó los niveles del control.

2.2) Triglicéridos

La distribución de las HDL por contenido de triglicéridos se presenta en la Figura 13. Las concentraciones de triglicéridos de todas las subclases son semejantes entre el grupo control y el grupo que recibió FA, mientras que los grupos que recibieron los fármacos de manera individual los triglicéridos de las subclases de HDL tienden a ser menores que en el grupo control.

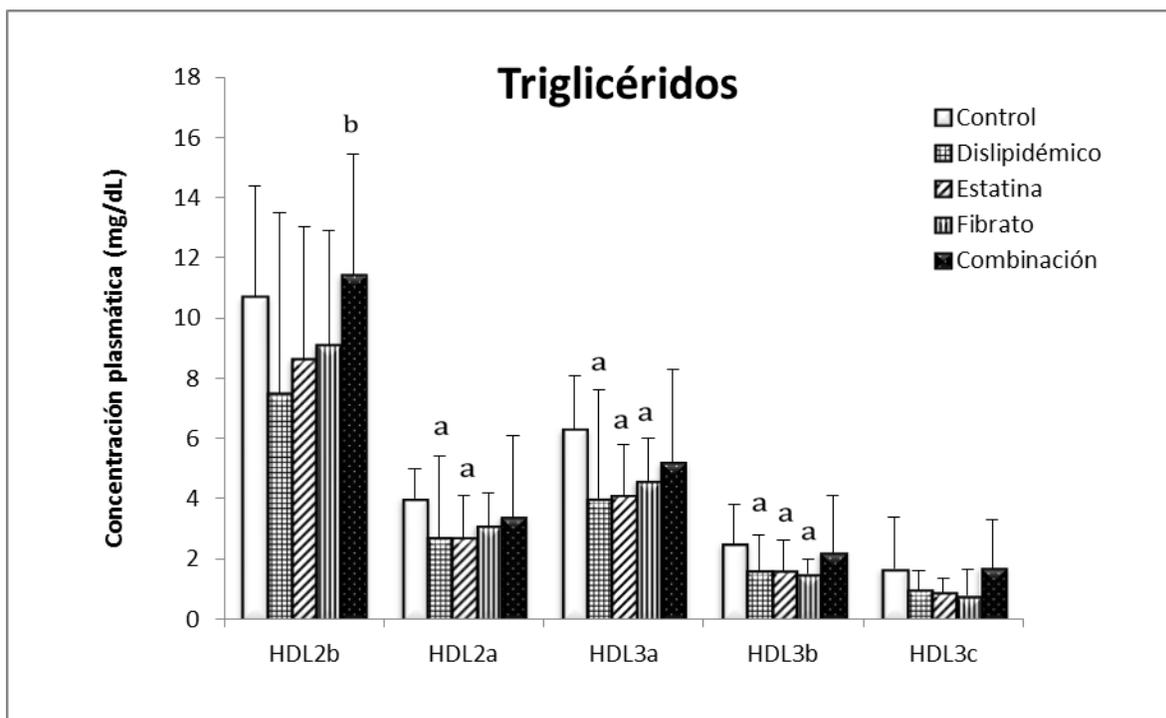


Figura 13. Concentración plasmática de triglicéridos asociado a las subclases de HDL determinada por método enzimático en la superficie del gel de poliácridamida. Los resultados mostrados se expresan como promedio \pm EE. $P < 0.05$ vs ^agrupo control, ^bgrupo dislipidémico.

2.3) Fosfolípidos

La distribución de fosfolípidos en las HDL se presenta en la Figura 14. Las concentraciones de fosfolípidos en las diferentes subclases de HDL presentaron un patrón diferente al de las concentraciones de colesterol. Sin embargo, en las partículas HDL2b y HDL2a se observó el mismo patrón descrito para las concentraciones de triglicéridos; la tendencia de la subclase HDL2a es a su vez es semejante con el porcentaje de proteína que se representó en la Figura 11.

Las concentraciones de fosfolípidos para las partículas subclase HDL3a en los tres grupos que recibieron tratamiento farmacológico presentaron una tendencia a restablecer los valores del grupo control, comportamiento parecido al de los triglicéridos y distribución de proteína; los niveles de fosfolípidos son comparables en los tres grupos tratados farmacológicamente. La distribución de proteína para la subclase HDL3b también es semejante a su distribución de fosfolípidos a excepción del grupo que recibió FA, en el cual se observaron valores ligeramente menores pero con significado estadístico en comparación al grupo control.

Al igual que en la distribución de tamaños determinada por proteína, los niveles de fosfolípidos HDL3c fueron comparables entre todos los grupos.

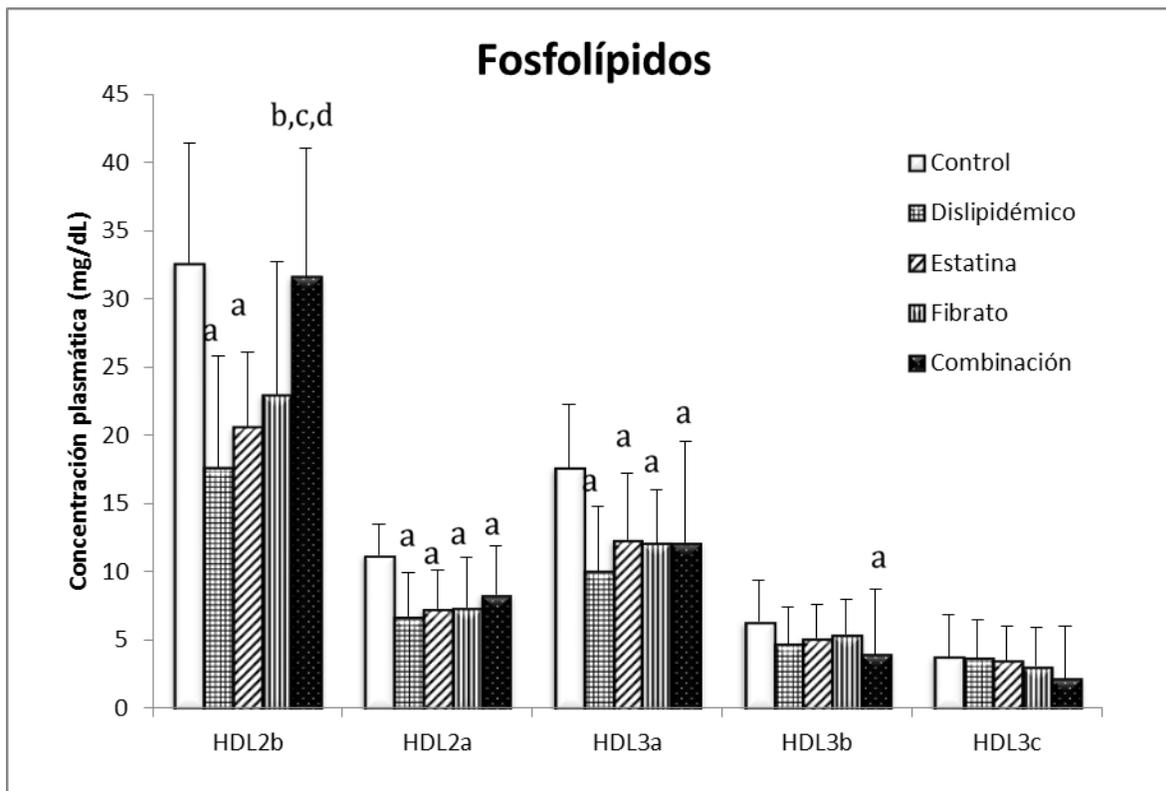


Figura 14. Cambio en la concentración plasmática de triglicéridos asociado a las subclases de HDL. Determinado por método enzimático en la superficie del gel de poliacrilamida. Los resultados mostrados se expresan como promedio \pm EE. $P < 0.05$ vs ^agrupo control, ^bgrupo dislipidémico, ^cgrupo Estatina y ^dgrupo Fibrato.

3. Proporciones lipídicas en las subclases de HDL

Adicionalmente, es posible estimar la composición de lípidos de las subclases de HDL a partir de los cocientes de colesterol total y fosfolípidos (Ct/Ph), así como triglicéridos y fosfolípidos (Tg/Ph). Estos cocientes aportan información sobre la estructura y composición de las HDL, así como del metabolismo asociado a ellas. La relación colesterol total/fosfolípidos se resume en la Tabla 5.

		Grupo				
Cociente	Subclase	Control n=18	Dislipidémico n=9	Estatina n=9	Fibrato n=9	Combinación n=9
Ct/Ph	HDL2b	0.63±0.10	0.91±0.26 ^a	0.86±0.14 ^a	0.80±0.19 ^a	1.05±0.25 ^{a,c,d}
	HDL2a	0.66±0.10	0.89±0.23± ^a	0.80±0.18 ^a	0.77±0.17	0.90±0.28 ^a
	HDLA3a	0.67±0.12	0.90±0.21 ^a	0.83±0.16 ^a	0.88±0.19 ^a	0.92±0.29 ^a
	HDLA3b	0.61±0.10	0.82±0.20 ^a	0.75±0.25 ^a	1.03±0.26 ^{a,b,c}	0.88±0.18 ^{a,d}
	HDL3c	0.53±0.17	0.65±0.17	0.47±0.14	1.06±0.82 ^{a,b,c}	0.90±0.27 ^{a,c}

Tabla 5. Composición de colesterol total (Ct) en las subclases HDL en base al cociente colesterol total/fosfolípidos (Ct/Ph). Los resultados mostrados se expresan como promedio ± EE. P<0.05 vs ^agrupo control, ^bgrupo dislipidémico, ^cgrupo Estatina y ^dgrupo Fibrato.

La tendencia general en todos los grupos es a presentar un cociente Ct/Ph mayor en comparación al grupo control, sugiriendo un enriquecimiento con colesterol de todas las subclases de HDL. Algunas diferencias significativas adicionales se observaron en los grupos fibrato y combinación.

En la Tabla 6 se presenta la relación entre triglicéridos y fosfolípidos.

		Grupo				
Cociente	Subclase	Control n=18	Dislipidémico n=9	Estatina n=9	Fibrato n=9	Combinación n=9
Tg/Ph	HDL2b	0.34±0.11	0.44±0.28	0.40±0.19	0.39±0.22	0.30±0.13
	HDL2a	0.38±0.13	0.39±0.23	0.44±0.16	0.49±0.24	0.33±0.14
	HDLA3a	0.39±0.15	0.37±0.18	0.41±0.15	0.56±0.33 ^{a,b}	0.43±0.24
	HDLA3b	0.65±0.15	0.61±0.19	0.62±0.14	0.88±0.25 ^{a,b,c}	0.67±0.18 ^d
	HDL3c	0.67±0.23	0.68±0.49	0.61±0.20	0.80±0.10	0.58±0.14

Tabla 6. Composición de triglicéridos (Tg) en las subclases HDL en base al cociente triglicéridos/fosfolípidos (Tg/Ph). Los resultados mostrados se expresan como promedio ± EE. P<0.05 vs ^agrupo control, ^bgrupo dislipidémico, ^cgrupo Estatina y ^dgrupo Fibrato.

Salvo por 3 excepciones, los cocientes de Tg/Ph tienden a ser iguales en todos los grupos, sugiriendo un contenido de triglicéridos normal por partícula en cada subclase de HDL.

DISCUSIÓN

En este trabajo caracterizamos las HDL en conejos macho Nueva Zelanda con hipercolesterolemia exógena al término de un tratamiento con FA y cada fármaco de manera individual. Nuestro objetivo fue caracterizar los cambios estructurales de las HDL, incluyendo los niveles de lípidos plasmáticos correspondientes a cada subclase.

Normalmente las grasas de la dieta son hidrolizadas casi exclusivamente en el duodeno y yeyuno; en el duodeno las sales biliares emulsionan las grasas y con ello aumenta su superficie de exposición a las lipasas. Los lípidos parcialmente digeridos forman micelas estables compuestos básicamente por ácidos grasos, monoacilgliceroles, etc.; las micelas difunden por la superficie de las células mucosas del intestino y liberan sus materiales constitutivos con el fin de ser absorbidos⁹⁵. Se absorben de 1/3 a 2/3 del total de triglicéridos consumidos en la dieta, lo demás es transferido a lipoproteínas y transportados principalmente por quilomicrones. Inicialmente planteamos crear un modelo de dislipidemia mixta adicionando a la dieta de los conejos aceite de canola. Sin embargo, una absorción deficiente de triglicéridos en los animales de estudio resultó en valores de triglicéridos plasmáticos ligeramente mayores a los del grupo dislipidémico por lo que nuestro modelo de estudio fue predominantemente de hipercolesterolemia exógena.

La hipercolesterolemia puede presentarse de manera independiente o en combinación con alteraciones de las lipoproteínas que contienen apo A-I. Etiológicamente las dislipidemias relacionadas con las lipoproteínas que contienen apo B se clasifican como primarias o secundarias²⁴. Consideramos la hipercolesterolemia exógena como una dislipidemia secundaria ya que no es consecuencia de una alteración intrínseca en el metabolismo lipídico (primaria), más bien es resultado de la ingesta excesiva de alimentos ricos en colesterol, absorción y metabolismo de los mismos: la homeostasis lipídica se altera y los niveles plasmáticos de colesterol se elevan desmedidamente.

Como mencionamos antes, el CE de la dieta es hidrolizado antes de su absorción por efecto de la colesteryl esterasa pancreática en presencia de ácidos biliares y el CL es transportado hacia el hepatocito en los quilomicrones; el colesterol transportado por lipoproteínas suprime la síntesis de los receptores LDL controlando la entrada de LDL a la célula⁹⁵. En la hipercolesterolemia exógena los triglicéridos para el ensamblado de los quilomicrones se sintetizan en el enterocito a partir de los ácidos grasos libres y monoacilglicérols, productos de la digestión intestinal de los lípidos alimentarios. Sin embargo, los triglicéridos que integran a las VLDL son exclusivamente de síntesis hepática. Asimismo, en la hipercolesterolemia exógena el colesterol de los quilomicrones proviene tanto de los alimentos como de la bilis, mientras que el de las VLDL es de síntesis hepática, de novo y de reciclamiento endógeno²⁴.

Dado que en animales con hipercolesterolemia exógena la expresión de los receptores hepáticos apo B/E se regula a la baja⁹⁶, los conejos alimentados con una dieta rica en colesterol generan un modelo que permite evaluar el efecto hipocolesterolémico de una sustancia cuyo mecanismo de acción está relacionado con la expresión de dichos receptores. Efecto que se puede monitorear con los niveles plasmáticos de colesterol. Además este modelo permite estimar el tamaño de las HDL, lo que puede contribuir a valorar el impacto metabólico de fármacos antiaterosclerosos, ya que alguna intervención farmacológica que cambie la composición química o el tamaño de estas lipoproteínas podría modificar las funciones ateroprotectoras de las HDL y con ello los beneficios clínicos de nuevas terapias.

Nuestros datos sugieren que efectivamente existe una sinergia de la combinación farmacológica a nivel de perfil de lípidos, ya que el tratamiento con FA disminuye significativamente los niveles plasmáticos de colesterol total y de colesterol no HDL con respecto al grupo dislipidémico, efecto que no se observó con los grupos que recibieron el tratamiento farmacológico de forma individual; la estatina no logra una reducción significativa del colesterol respecto al grupo dislipidémico; sin embargo, las concentraciones son superiores a las que se obtuvieron con fibrato.

En nuestro modelo de estudio la permanencia prolongada en plasma de lipoproteínas ricas en colesterol favorece el intercambio lipídico que lleva a cabo la CETP (sustraer colesterol de las HDL y lo transfiere a las VLDL a cambio de TG⁹⁷); en el grupo fibrato y combinación aumenta el catabolismo de las VLDL lo que resultó en una disminución del colesterol en ambos grupos. Adicionalmente se ha postulado que fenofibrato tiene un discreto efecto reductor de las LDL⁸⁰.

Como se mencionó previamente, el exceso de colesterol plasmático en nuestro modelo no es resultado de la biosíntesis; sin embargo, la alteración en la ingesta de colesterol en los conejos de estudio conduce al exceso y acumulación de colesterol en tejidos; disminuye la producción endógena de colesterol en los grupos atorvastatina y combinación gracias a la inhibición de la enzima HMG-CoA reductasa. El bloqueo de la síntesis hepática del colesterol (por acción de la estatina) produce una activación de las proteínas reguladoras SREBP, que activan la transcripción de proteínas que entonces producen una mayor expresión del gen del receptor de LDL (LDLr) y un aumento en la cantidad de receptores funcionales en el hepatocito⁹⁸. Esto resultó en un aumento de la captación de las LDL y así una disminución en los niveles de colesterol sanguíneo. Así, la expresión de LDLr por las células hepáticas representa el principal mecanismo a través del cual disminuyó el colesterol sérico en nuestro modelo de estudio. Este efecto es muy favorable, ya que se sabe que concentraciones elevadas de colesterol representa uno de los principales factores de riesgo de desarrollar aterosclerosis⁹³.

Los efectos del fibrato y de la estatina sobre las concentraciones plasmáticas de triglicéridos fueron los esperados; el efecto máximo sobre los triglicéridos se observó en el grupo que recibió FA, sugiriendo nuevamente un efecto sinérgico de la combinación farmacológica como se ha visto en estudios anteriores⁸⁶. Este efecto es muy relevante debido a que los Tg reflejan la presencia de partículas aterogénicas (como los remanentes de quilomicrón y las IDL) y son un factor de riesgo independiente de EAC⁹⁴ como fue demostrado por tres estudios prospectivos recientes: El estudio de Salud en Médicos (Physicians' Health Study), el Proyecto de Cinco Ciudades de Stanford y el Estudio de Quebec.

Además, la hipertrigliceridemia se asocia a mayor prevalencia de diabetes, obesidad e hipertensión arterial y es causa de prevalencia entre las LDL de sus subclases pequeñas y densas, de cambios pro-coagulantes y de menor actividad fibrinolítica⁹³.

Con base en lo anterior, afirmamos que el perfil de lípidos en el grupo de conejos que recibió la combinación farmacológica fue mejor; triglicéridos, colesterol no HDL y colesterol total en niveles significativamente menores que con la estatina y el fibrato de manera independiente.

Contrario a lo esperado, las máximas concentraciones del C-HDL plasmático se presentaron en el grupo dislipidémico. Sin embargo, este hecho no es necesariamente negativo, pues el C-HDL plasmático no refleja la funcionalidad de las HDL y es un mal indicador del número de éstas^{9, 21, 47, 94}. Estudios epidemiológicos han demostrado consistentemente que niveles bajos de C-HDL son un factor de riesgo independiente de la enfermedad aterosclerosa coronaria, incluso después de ajustar otros factores de riesgo como el sobrepeso, ingesta elevada de carbohidratos, el tabaquismo y el sedentarismo^{3, 14, 15}. Es bien conocido que el C-HDL ha sido uno de los principales indicadores clínicos sobre el riesgo cardiovascular pero es necesario plantear que existen situaciones metabólicas en las que poblaciones con valores elevados de C-HDL presentaron un aumento en eventos cardiovasculares⁴². Además, en algunos casos sujetos con hipoalfalipoproteinemia grave (C-HDL<15mg/dL) que no tienen historial clínico o antecedentes familiares de EAC⁴².

Paradójicamente el C-HDL únicamente fue un 27% mayor en el grupo que recibió la combinación respecto al grupo control sin alcanzar diferencias significativas y con un comportamiento similar al de los otros grupos tratados. Como hemos mencionado en el TRC, una vez que el colesterol es esterificado por la LCAT, éste puede ser intercambiado por triglicéridos provenientes de lipoproteínas que contienen apo B, intercambio facilitado por la CETP. Debido a que la CETP reduce el contenido de colesterol de las HDL, la actividad de esta proteína de transporte correlaciona inversamente con los niveles de C-HDL²⁴.

De esta manera, no se puede descartar que en los conejos con dislipidemia haya disminuido la actividad de la CETP, lo que provocó acumulación de CE en las HDL y resultó en la elevación significativa de los niveles plasmáticos C-HDL. En este sentido, es importante destacar que la inhibición de la CETP²⁴ altera la estructura de las HDL, generando partículas poco funcionales. Sin embargo, fibrato en sinergia con estatina mantiene estable la actividad de dicha proteína, así los niveles de C-HDL permanecen semejantes a los del grupo control. Se requieren más estudios específicamente diseñados para analizar el efecto de la combinación FA sobre la actividad CETP.

A continuación, determinamos la distribución del tamaño de las HDL con base en el porcentaje de proteína de cada subclase. La distribución de partículas fue como esperábamos²⁹, ya que la proporción de partículas pequeñas tipo HDL3b y 3c casi se restablecieron con las del control en los tres grupos tratados farmacológicamente. Dicha distribución de tamaños de HDL es congruente con las concentraciones de colesterol en dichas subclases que siguen un patrón similar al del porcentaje de proteína total. El tratamiento farmacológico en cualquiera de los casos induce mayor proporción de partículas grandes tipo HDL2b y 2a, principalmente con la combinación FA sugiriendo nuevamente un efecto sinérgico de ambos fármacos. Suponemos que existe una captación del colesterol excedente en la periferia en los animales con dislipidemia por parte de las HDL de menor tamaño, las cuales maduran rápidamente en HDL2b; las partículas pre β 1 captan el colesterol de la periferia probablemente en mayor proporción por la proteína ABC-A1 que utiliza ATP.

Este aumento de partículas HDL2b se refleja en concentraciones de colesterol más elevadas (especialmente para la subclase 2b) que alcanza las concentraciones máximas con la combinación FA (figura 12 de resultados). Estas observaciones demuestran que la mayor parte del colesterol se encuentra en las HDL2b y el resto se divide en pequeñas porciones en las otras subclases en nuestro modelo de dislipidemia. Dichos resultados sugieren que el remodelamiento de las HDL podría estar determinado por la combinación farmacológica.

Los efectos sobre las HDL grandes que hemos mencionado pueden tener repercusiones importantes; estudios previos en humanos han demostrado una menor proporción de HDL grandes en sujetos con cardiopatía isquémica coronaria. Asimismo, las HDL grandes han sido asociadas a una disminución de EAC⁹⁹, ya que pacientes con EAC tienen colesterol HDL2 en niveles plasmáticos menores que los sujetos control^{100, 101}. Por otra parte, los pacientes con diabetes mellitus tipo 2, que tienen un alto riesgo de aterosclerosis, presentan HDL pequeñas incluso desde etapas tempranas de la enfermedad³¹.

Independientemente del tamaño de las lipoproteínas que hemos descrito antes, los grupos fibrato y estatina aumentan la cantidad de colesterol transportado por las HDL respecto al grupo control.

Postulamos que la distribución de fosfolípidos en las lipoproteínas refleja el cambio en el número de partículas debido a que la cantidad de fosfolípidos se considera constante por subclase porque este componente delimita el tamaño de la partícula; no puede aumentar o disminuir el contenido de fosfolípidos por partícula porque en tal caso, el diámetro de la partícula cambiaría y por lo tanto quedaría clasificada en otra subclase. Mismo fundamento que soporta la posibilidad de determinar la composición de lípidos de las subclases de HDL en una partícula a partir de los cocientes de colesterol total y fosfolípidos (Ct/Ph), así como triglicéridos y fosfolípidos (Tg/Ph). De aquí que al restablecerse las concentraciones de fosfolípidos con las del control en todas las subclases de HDL principalmente con la combinación FA, asumimos que esta restituye el número de partículas HDL que se abate por efecto de la hipercolesterolemia exógena.

Por otro lado, las concentraciones de triglicéridos de las HDL2b en el grupo FA alcanzaron niveles comparables a las del control (hecho que tampoco se observó con los fármacos de manera individual). Así como los triglicéridos, el CE también encuentra en el interior de las lipoproteínas^{103, 104}; ya que los triglicéridos sólo se restablecen con la combinación FA en la partícula de HDL sugerimos que las partículas con mayores diámetros tienen mayor contenido de CE. El cociente Ct/Ph y Tg/Ph soporta esta idea (Tabla 5 y 6, respectivamente).

Por una parte el cociente Tg/Ph indica que su contenido por partícula es similar en cada subclase de HDL en todos los grupos. Por otra parte, el contenido de colesterol por partícula especialmente en las HDL2b es más elevado con la combinación FA que con los otros grupos de estudio. Con base en estas observaciones, sugerimos que con la combinación farmacológica las HDL tienen un funcionamiento más eficiente en el TRC; existe un acarreo más eficiente del colesterol de los tejidos hacia las HDL probablemente como consecuencia de la activación de PPAR- α . En efecto, la estimulación de los PPAR- α inducen la sobreexpresión de apo A-I, resultado en más partículas circulantes^{29, 96}; estas HDL que nacen como partículas pequeñas tipo pre β 1 maduran rápidamente a partículas tipo HDL 2a y/o 2b (como mencionamos antes) por una captación acelerada de colesterol ya sea proveniente de los tejidos periféricos por sobreexpresión del ABCA1 (que también se estimula por los fibratos) o en otras lipoproteínas plasmáticas. Esta explicación es consistente con el alto contenido de colesterol en las HDL de mayor tamaño. A pesar de que los fibratos también inducen la sobreexpresión de SRBI¹⁰⁵, nuestros resultados no permiten especular acerca de una mayor depuración hepática de colesterol de las HDL en el grupo que recibió la combinación. Estudios de cinética de colesterol *in vivo* son necesarios para poder abordar esta posibilidad.

,

CONCLUSIONES

1. Una dieta rica en lípidos provoca una modificación estructural de las HDL en conejos, que juega un importante papel para determinar la naturaleza de dichas lipoproteínas que están presentes en el plasma.
2. El perfil de lípidos en el grupo de conejos que recibió la combinación farmacológica fue mejor que con los fármacos individuales.
3. Los grupos fibrato y estatina aumentan la cantidad de colesterol transportado por las HDL.
4. La combinación fibrato-estatina aumenta la proporción de partículas HDL2b.
5. Las HDL2b se enriquecieron con colesterol en los conejos tratados con la combinación FA.
6. La combinación FA restablece las concentraciones de triglicéridos en las subclases de HDL.
7. Se restablecen las concentraciones de fosfolípidos en todas las subclases de HDL, principalmente con la combinación FA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Secretaría de Salud Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2002, para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias.
2. Secretaría de Salud información epidemiológica de morbilidad 2000. Dirección general de epidemiología.
3. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, and Huang Y. High density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk: the PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atheroscler* 1996; 124: S11-20.
4. Cushing S, Berliner J, Valente A, Territo M, Navab M, Parhami F, et al: Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein (MCP-1) in human endothelial and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 5134-38.
5. Brown M, Goldstein J. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 223-61.
6. Seifert P, Kazatchine M: Generation of complement anaphylatoxins and C5b-9 by crystalline cholesterol oxidation derivatives depends on hydroxyl group number and position. *Mol Immunol* 1987; 24: 1303-08.
7. Torzewiski J, Oldroyd R, Lachman P, Fitzimmons C, Proufoot D, Bowyer D: Complement-induced release of lesion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 673-77.
8. Aguilar S, Vázquez C, Gamboa M, García S, Ríos G, Holguín R, et al. Obesity, diabetes, hypertension and tobacco consumption in an urban adult Mexican population. *Arch Med Res* 2001; 32: 446-53.

9. Deakin S, Leviev I, Gomaschi M, Calabresi L, Franceschini G, James RW. Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. *J Biol Chem* 2002; 277: 4301-08.
10. Prediman K, Sanjay K, Jan N, and Bojan C. Exploiting the vascular protective effects of high density lipoprotein and its apolipoproteins and idea whose time for testing is coming, parte I. *Circulation* 2001; 104: 2376-86.
11. González Chávez A. Consenso Mexicano de resistencia a la insulina y síndrome metabólico. *Rev Mex Cardiol* 1999; 10: 3-19.
12. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; 106: 3143-21.
13. Sharrett A, Ballantyne C, Coady S, Heiss G, Sorlie P, Catellier D, et al . Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein(a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation* 2001; 104: 1108-13.
14. Wilson PW, Garrison RJ, Castelli WP, Feinleib M, Mcnamara PM, Kannel WB: Prevalence of coronary heart disease in the Framingham Offspring Study: role of lipoprotein cholesterols. *Am J Cardiol* 1980; 46: 649-54.
15. Schaefer EJ, Lamon-fava S, Ordovas JM, Cohn SD, Schaefer MM, Castelli WP, et al: Factors associated with low and elevated plasma high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A-I levels in the Framingham Offspring Study. *J Lipid Res* 1994; 35: 871-82.
16. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Dawber TR: High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977; 62: 707-14.

17. Miller GJ, Miller NE: Plasma high density lipoprotein concentration and development of ischaemic heart disease. *Lancet* 1975; 1: 16-19.
18. Miller NE: Associations of high-density lipoprotein subclasses and apolipoproteins with ischaemic heart disease and coronary atherosclerosis. *Am Heart J* 1987; 113: 589-97.
19. Parra HJ, Arvelier D, Evans AE, Cambou JP, Amouyel P, Bingham A, et al: A case-control study of lipoprotein particles in two populations at constraining risk for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 701-07.
20. Moss AJ, Goldstein RE, Marder VJ, Sparks CE, Oakes D, Greenberg H, et al: Thrombogenic factors and recurrent coronary events. *Circulation* 1999; 99: 2517-22.
21. Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1881-88.
22. Calabresi L, Franceschini G, Sirtori CR, de Palma A, Saresella M, Ferrante P, et al. Inhibition of VCAM-1 expression in endothelial cells by reconstituted high-density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 238: 61-65.
23. Li XP, Zhao SP, Zhang XY, Liu L, Gao M, Zhou QC. Protective effect of high-density lipoprotein on endothelium-dependent vasodilatation. *Int J Cardiol* 2000; 73: 231-36.
24. Barquera C, Campos N. Dislipidemias: epidemiología, evaluación, adherencia y tratamiento. México, 2009. 19, 20, 33-36, 62.
25. Nelson DL, Cox MM. *Principles of Biochemistry*. 4ta edición USA 2004. 820-27.
26. Voet D, Voet J. *Biochemistry* 2da edición USA 1995. 690-704.
27. Aguilar SC, Gómez PF. Lipoproteínas y aterogénesis. *Metabolismo normal de las lipoproteínas*. *Rev Invest Clin* 1989; 2: 22-28.

28. Castro GR, Fielding CJ: Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-b-migrating high density lipoprotein pathway. *Biochemistry* 1988; 27: 25-29.
29. Pérez M. Lipoproteínas de alta densidad (HDL). ¿Un objetivo terapéutico en la prevención de la aterosclerosis? *Arch Cardiol Mex* 2004; 74 (1): 53-67.
30. Festa A, Williams K, Hanley AJ, Otvos JD, Goff DC, Wagenknecht LE, et al. Nuclear magnetic resonance lipoprotein abnormalities in prediabetic subjects in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Circulation* 2005; 111: 3465-72.
31. Pérez M, Torres T, Posadas R, Vidaure G, Carreón T, Mendoza P, et al. Abnormal HDL subclasses distribution in overweight children with insulin resistance or type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 2007; 376: 17-22.
32. Pérez M, Espinola Z, Soto L, Carreón T, Gamboa R, Huesca G, et al. Altered flow mediated vasodilatation, low paraoxonase-1 activities, and abnormal high-density lipoprotein subclasses distribution in Takayasu's arteritis. *Circ J.* 2009; 73: 760-66.
33. Pérez M, Álvarez S, Carreón T, Luc G, Arce F, de la Peña A, et al. Palmitic acid in HDL is associated to low apo AI fractional catabolic rates in vivo. *Clin Chim Acta* 2007; 378: 53-58.
34. Brooks A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 1999; 22: 336-45.
35. Phillips MC, Rothblat GH: HDL and cholesterol efflux. *Atherosclerosis* 1997; 134: 114.
36. Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res* 2005.96: 1221-32.

37. Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Brouillette CG, Venkatachalapathi YV, Anantharamaiah GM. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J Lipid Res* 1992; 33: 141-66.
38. Eckardstein A, Huang Y, Assmann G. Physiological role and clinical relevance of high density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol* 1994; 5: 404-16.
39. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989; 79: 8-15.
40. Barter P, Gotto AM, LaRosa JC, Maroni J, Szarek M, Grundy SM, et al. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. *N Engl J Med* 2007; 357: 1301-10.
41. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1987-94.
42. Pérez M, Carreón T, Franco M, Juárez O. HDL physicochemical characteristics as determinants of their plasma concentrations: what we have learned from thiazolidinediones. En "HDL Cholesterol: Roles, Effects, and Elevation." Frank Columbus, Nov Scien Publish, Inc. 2009, ISBN: 978-1-60741-767-5.
43. Carreón T, Juárez M, Cardoso S, Gómez CH, Franco M, Fievet C, et al. Pioglitazone increases the fractional catabolic and production rates of high-density lipoproteins apo AI in the New Zealand white rabbit. *Atherosclerosis* 2005; 181: 233-40.
44. Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. *Curr Opin Lipidol* 2010; 21: 312-8.

45. de la Llera M, Drazul S, Asztalos BF, Cuchel M, Rader DJ, Rothblat GH. The ability to promote efflux via ABCA1 determines the capacity of serum specimens with similar high-density lipoprotein cholesterol to remove cholesterol from macrophages. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2010; 30: 796-01.
46. Khera AV, Cuchel M, de la Llera M, et al. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med* 2011; 364: 127-35.
47. Murakami H, Tanabe J, Tamasawa N, Matsumura K, Yamashita M, Matsuki K, et al. Reduction of paraoxonase-1 activity may contribute the qualitative impairment of HDL particles in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2013; 99: 30-8.
48. Razavi AE, Ani M, Pourfarzam M, Naderi GA. Associations between high-density lipoprotein mean particle size and serum paraoxonase-1 activity. *J Res Med Sci* 2012; 17: 1020-26.
49. Williams PT, Krauss RM, Nichols AV, Vranizan KM, Wood PD. Identifying the predominant peak diameter of high-density and low-density lipoproteins by electrophoresis. *J Lipid Res* 1990; 31:1131-39.
50. Li Z, McNamara JR, Ordovas JM, Schaefer EJ. Analysis of high density lipoproteins by a modified gradient gel electrophoresis method. *J Lipid Res* 1994; 35: 1698–11.
51. Blanche PJ, Gong EL, Forte TM, Nichols AV. Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1981; 665: 408–19.
52. Warnick GR, McNamara JR, Boggess CN, Clendenen F, Williams PT, Landolt CC. Polyacrylamide gradient gel electrophoresis of lipoprotein subclasses. *Clin Lab Med* 2006; 26: 803-46.

53. Barbagallo C, Fan J, Blanche J, Rizo M, Taylor J, Krauss R. Overexpression of Human Hepatic Lipase and Apo E in Transgenic Rabbits Attenuates Response to Dietary Cholesterol and Alters Lipoprotein Subclass Distributions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 625-32.
54. Jeyarajah EJ, Cromwell WC, Otvos JD. Lipoprotein particle analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Lab Med* 2006; 26: 847-70.
55. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Bennett DW. Quantification of plasma lipoproteins by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Chem* 1991; 37: 377-86.
56. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Bennett DW, Krauss RM. Development of a proton nuclear magnetic resonance spectroscopic method for determining plasma lipoprotein concentrations and subspecies distributions from a single, rapid measurement. *Clin Chem* 1992; 38: 1632–38.
57. Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne LS, Lu P, et al. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 2001; 7: 853-57.
58. Kuvin JT, Ramet ME, Patel AR, Pandian NG, Mendelsohn ME, Karas RH. A novel mechanism for the beneficial vascular effects of high-density lipoprotein cholesterol: enhanced vasorelaxation and increased endothelial nitric oxide synthase expression. *Am Heart J* 2002; 144: 165-72.
59. Mineo C, Yuhanna IS, Quon MJ, Shaul PW. High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases. *J Biol Chem* 2003; 278: 9142-49.
60. Riwanto M, Landmesser U. High-density lipoproteins and Endothelial Functions: Mechanistic Insights and Alterations in Cardiovascular Disease. *J Lipid Res* 2013. [Epub ahead of print].

61. Navab M, Imes SS, Hama SY, Hough GP, Ross LA, Bork RW, et al. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest* 1991; 88: 2039-46.
62. Park SH, Park JH, Kang JS, Kang YH. Involvement of transcription factors in plasma HDL protection against TNF-alpha-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 168-82.
63. Dimayuga P, Zhu J, Oguchi S, Chyu KY, Xu XO, Yano J, et al. Reconstituted HDL containing human apolipoprotein A-1 reduces VCAM-1 expression and neointima formation following periadventitial cuff-induced carotid injury in apoE null mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264: 465-68.
64. Viswambharan H, Ming XF, Zhu S, Hubsch A, Lerch P, Vergères G, et al. Reconstituted high-density lipoprotein inhibits thrombin-induced endothelial tissue factor expression through inhibition of RhoA and stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase but not Akt/endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res* 2004; 94: 918-25.
65. Spieker LE, Sudano I, Hürlimann D, Lerch PG, Lang MG, Binggeli C, et al. High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation* 2002; 105: 1399-02.
66. Kimura T, Tomura H, Mogi C, Mogi C, Kuwabara A, Damirin A, et al. Role of scavenger receptor class B type I and sphingosine 1-phosphate receptors in high density lipoprotein-induced inhibition of adhesion molecule expression in endothelial cells. *J Biol Chem* 2006; 281: 37457-67.
67. Okajima F, Sato K, Kimura T. Anti-atherogenic actions of high-density lipoprotein through sphingosine 1-phosphate receptors and scavenger receptor class B type I. *Endocr J* 2009; 56: 317-34.

68. Liu D, Ji L, Tong X, Pan B, Han JY, Huang Y, et al. Human apolipoprotein A-I induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I-2 release in endothelial cells through ATP-binding cassette transporter A1. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 301: C739-48.
69. Gonzalez D, Rodriguez C, Badimon L, Martinez G. Prostacyclin induction by high-density lipoprotein (HDL) in vascular smooth muscle cells depends on sphingosine 1-phosphate receptors: effect of simvastatin. *Thromb Haemost* 2008; 100: 119–26.
70. Martínez G, Escudero I, Badimon L. Simvastatin potentiates PGI₂ release induced by HDL in human VSMC: effect on Cox-2 up-regulation and MAPK signaling pathways activated by HDL. *Atherosclerosis* 2004; 174: 305–13.
71. Norata GD, Callegari E, Inoue H, Catapano AL. HDL₃ induces cyclooxygenase-2 expression and prostacyclin release in human endothelial cells via a p38 MAPK/CREdependent pathway: effects on COX-2/ PGI-synthase coupling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 871–77.
72. Williams CS, DuBois RN. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am J Physiol* 1996; 270: G393-400.
73. Linton MF, Fazio S. Cyclooxygenase-2 atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13: 497–04.
74. Liu Y, Tang C. Regulation of ABCA1 functions by signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1821: 522-29.
75. Patel S, Di Bartolo BA, Nakhla S, Heather AK, Mitchell TW, Jessup W, et al. Anti-inflammatory effects of apolipoprotein AI in the rabbit. *Atherosclerosis* 2010; 212: 392–97.
76. Navab M, Reddy ST, Van Lenten BJ, Fogelman AM. HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nat Rev Cardiol* 2011; 8: 222–23

77. Suzuki M, Pritchard DK, Becker L, Hoofnagle AN, Tanimura N, Bammler TK, et al. High-density lipoprotein suppresses the type I interferon response, a family of potent antiviral immunoregulators, in macrophages challenged with lipopolysaccharide. *Circulation* 2010; 122: 1919-27.
78. García RA, Delgado LJ, Pérez MP, Fuentes JF, Pérez JF, López MJ. Eficacia de las estatinas en el manejo de la dislipidemia. Un paso adelante. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2011; 11(B): 14-17.
79. Tenenbaum A, Fisman EZ. Balanced pan-PPAR activator bezafibrate in combination with statin: comprehensive lipids control and diabetes prevention? *Cardiovasc Diabetol* 2012; 11:140
80. Núñez CJ, Alegría E, Alvarez L, Walther S, Gimilio AJ, Lahoz RC, et al. Documento abordaje de la dislipidemia. Sociedad Española de Arteriosclerosis (parte II). *Clin Invest Arteriosclerosis* 2012; 24 (1): 40-52.
81. Filippatos TD. A Review of Time Courses and Predictors of Lipid Changes with Fenofibric Acid-Statin Combination. *Cardiovasc Drugs Ther* 2012; 26(3):245–55
82. Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, Leza JC, Moro MA, Portoles A. *Farmacología básica y clínica.* 18a edición China 2008. 467-68.
83. Fruchart JC, Staels B, Duriez P: The role of fibric acids in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2001; 3: 83–92.
84. Pedersen TR, Assmann G, Pierre Bassand J, Chapman MJ, Erber R, Sirtori C. Reducing residual cardiovascular risk: the relevance of raising high-density lipoprotein cholesterol in patients on cholesterol-lowering treatment. *Diabetes Vasc Dis Res* 2006; 3(2):S1–12.
85. McCullough PA, Ahmed AB, Zughuib MT, Glanz ED, Di Loreto MJ. Treatment of hypertriglyceridemia with fibric acid derivatives: impact on lipid subfractions and translation into a reduction in cardiovascular events. *Rev Cardiovasc Med* 2011; 12(4):173-85.

86. Davison MH, Rooney MW, Drucker J, Griffin HE, Oosman S, Beckert M. Efficacy and tolerability of atorvastatin/fenofibrate fixed-dose combination tablet compared with dislipidemia: a 12-week, multicenter, double-blind,
87. Huesca GC, Franco M, Luc G, Montaña LF, Massó F, Posadas RC, et al. Chronic hypothyroidism induces abnormal structure of high-density lipoproteins and impaired kinetics of apolipoprotein A-I in the rat. *Metabolism* 2002; 51: 443-450.
88. Huesca GC, Carreón TE, Nepomucceno MT, Sánchez SM, Galicia HM, Mejía AM, et al. Contribution of cholesteryl ester transfer protein and lecithin: cholesterol acyltransferase to HDL size distribution. *Endocrin Res* 2004; 30: 403-15.
89. Toledo IP, García SC, Ávila VN, Carreón TE, Posadas RC, Vargas AG, et al. Enzymatic assessment of cholesterol on electrophoresis gels for estimating HDL size distribution and plasma concentrations of HDL subclasses. *J Lipid Res.* 2010;51:1610-17
90. García SC, Torres TM, Juárez MM, López OC, Toledo IP, Monter G, 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; 412:2 92-98.
91. Kaysen GA, de Sain-van der Velden MG. New insights into lipid metabolism in the nephrotic syndrome. *Kidney Int Suppl* 1999 Jul; 71:S18-21.
92. Franco M, Bautista R, Pérez-Méndez O, González L, Pacheco U, Sánchez-Lozada LG, et al. Renal interstitial adenosine is increased in angiotensin II-induced hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294:F84-92.
93. Aguilar SC, Gómez PF, Lerman GI, Vázquez CC, Pérez MO, Posadas RC. Diagnóstico y tratamiento de las dislipidemias: posición de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología. *Rev Endoc Nut* 2004; 12(1):7-41.

94. Gugliucci A, Caccavello R, Kotani K, Sakane N, Kimura S. Enzymatic assessment of paraoxonase 1 activity on HDL subclasses: a practical zymogram method to assess HDL function. *Clin Chim Acta* 2013; 415: 162-68.
95. Fleitas EA, Carballo RF, Rosabal BC, Rodríguez FG. Actividad de los receptores hepáticos apo B, E en conejos hipercolesterolémicos tratados con colestina. *Rev Cubana Angiol Cir Vasc* 2004; 5(1):15,16.
96. Ros E, Laguna JC. Tratamiento de la hipertrigliceridemia: fibratos frente a ácidos grasos omega-3. *Rev Esp Cardiol Supl* 2006; 6(D): 53D, 54D.
97. Nissen S, Tuzcu M, Schoenhagen P, Brown BG, Ganz P, Vogel RA, et al. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis. *JAMA* 2004; 291: 1071-80.
98. Ruiz SJ, Fabregate M. Bases fisiológicas del metabolismo lipídico: Control global del riesgo cardiometabólico. Madrid, 2012. 490.
99. Otvos JD, Collins D, Freedman DS, Shalurova I, Schaefer EJ, McNamara JR, et al. LDL and HDL particle subclasses predict coronary events and are changed favorably by gemfibrozil therapy in the Veterans Affairs HDL Intervention Trial (VA-HIT). *Circulation* 2006; 113: 1556–63.
100. Freedman DS, Otvos JD, Jeyarajah EJ, Barboriak JJ, Anderson AJ, Walker JA: Relation of lipoprotein subclasses as measured by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy to coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1046-1053.
101. Morgan J, Carey C, Lincoff A, Capuzzi D: Highdensity lipoprotein subfractions and risk of coronary artery disease. *Curr Atheroscler Rep* 2004; 6: 359-365
102. Rotllan N, Escola GJ, Calpe BL, Blanco VF. Efecto de la expresión de la PTEC, el gemfibrozilo y la rosiglitazona en el transporte inverso de colesterol desde macrófagos a heces in vivo. *Clin Invest Arterioscl* 2009; 21(5): 234.

103. Huesca C, Luc G, Duhal N, Lacroix B, Fruchart J, Pérez M. Ciprofibrate increases synthesis and catabolism of HDL apo AI and AII in patients with hypertriglyceridemia (Abstract). *Atherosclerosis suppl* 2004; 5: 64.
104. Ruiz SJ, Fabregate M. Bases fisiológicas del metabolismo lipídico: Control global del riesgo cardiometabólico. Madrid, 2012. 490.
105. Rotllan N, Escola GJ, Calpe BL, Blanco VF. Efecto de la expresión de la PTEC, el gemfibrozilo y la rosiglitazona en el transporte inverso de colesterol desde macrófagos a heces in vivo. *Clin Invest Arterioscl* 2009; 21(5): 234.

Apéndice 1. Determinación de proteínas por el método de Lowry.

Soluciones.

- Solución de Na_2CO_3 al 20%.
- Solución de tartrato de Na y K 1% con Cu SO_4 0.5%.
- Solución de NaOH 0.8N
- Solución de SDS al 10%
- Solución patrón de albúmina 1mg/mL
- Solución A. Se prepara en el momento de uso:
 - ✓ 1 volumen de tartrato de Na y K
 - ✓ 1 volumen de Na_2CO_3
 - ✓ 2 volúmenes de NaOH
 - ✓ 2 volúmenes de SDS
 - ✓ 2 volúmenes de H_2O

Curva patrón.

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

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

Apéndice 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas.

Solución amortiguadora de muestra.

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

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

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

C= persulfato de amonio 10%.

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

Las soluciones de acrilamida al 3% y 30% se mezclan para generar un gradiente de concentración. Luego de polimerizado el gel, éste se precorre 15 min a 60V para estabilizarlo. Entonces se cargan las muestras como se indica a continuación:

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

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

Apéndice 3. Tinción de lípidos en fase semisólida.

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

Colesterol Total.

Colesterol esterasa 0.075 4 μ U/mL.

Colesterol oxidasa 0.05 4 μ U/mL

Peróxidasa 0.25 4 μ U/mL

Triglicéridos.

Lipasa 37.5 4 μ U/mL

Glicerol cinasa 0.1 4 μ U/mL

Glicerol-3-fosfato oxidasa 0.44 μ U/mL

Peroxidasa 0.13 4 μ U/mL

ATP 0.25 4 μ mol/L

Fosfolípidos.

Fosfolipasa D 0.12 4 μ U/mL

Colina oxidasa 62 4 μ U/mL

Peroxidasa 1.1 4 μ U/mL