



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**EFFECTO DE LA COMBINACIÓN ATORVASTATINA-FENOFIBRATO
SOBRE LA COMPOSICIÓN, METABOLISMO Y PROPIEDADES
ANTIATEROGÉNICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL)
EN CONEJO NUEVA ZELANDA**

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

CRISTÓBAL FLORES CASTILLO

**DIRECTOR DE TESIS
DR. ÓSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

COMITÉ TUTOR

**DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**DR. MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA
FACULTAD DE MEDICINA**

CIUDAD DE MÉXICO. FEBRERO 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Para Samantha, Valeria y Julieta

Para mis hermanas y hermanos

Para mi madre y mi padre

Para mi familia

Este trabajo fue realizado en el laboratorio Metabolismo de Lípidos del Departamento de Biología Molecular en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

Agradecimientos

Al posgrado de Doctorado en Ciencias Biomédicas y a la Universidad Nacional Autónoma de México por la educación brindada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca de manutención (574021) otorgada durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Óscar A. Pérez Méndez y mi comité tutor, la Dra. Sara Frías Vázquez y el Dr. Marco A. Juárez Oropeza por su tutoría y formarme como Doctor en Ciencias.

Al Laboratorio de Metabolismo de Lípidos, al departamento de bioterio del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez por brindar las instalaciones para realizar este trabajo.

Agradezco a todas las personas que de alguna manera participaron en la realización de este gran proyecto.

A toda mi familia

Agradecimientos especiales

Gracias Doctor Óscar Pérez por haberme dado la oportunidad de ser doctor.

Gracias por su apoyo, paciencia, conocimientos, enseñanzas y sobre todo por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo en el Laboratorio de Metabolismo de Lípidos.

Gracias Doc por aceptarme como su alumno. Estoy muy agradecido.

Agradezco a mi comité tutor, a la Dra. Sara Frías Vázquez y al Dr. Marco A. Juárez Oropeza por su apoyo en la realización de este trabajo. Sin su tutoría este trabajo no habría sido posible. Mil gracias.

Gracias a la Dra. Elizabeth Carreón, a la M. en IBB. Victoria López y a la Dra. Mary Luna del Laboratorio Metabolismo de Lípidos, gracias por todo. Estaré eternamente agradecido. Gracias por todo su apoyo.

Gracias por todo a mi casa durante varios años el Laboratorio Metabolismo de Lípidos del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez y a todas las personas que formaron parte de este laboratorio.

Miles de gracias a Andrea Mondragón, Juan Vargas, MVZ. Ezéquiél Contreras, Belen Martínez, Michelle Torres, Miriam Martínez, Dra. Roció Bautista, Roxana Villavicencio, Elvira Guerra, Juan Zamora, Coral Amaya.

Al QFB. Ivan Luqueño, Dra. Patricia Torres, Dra. Tere Espinoza y al Dr. Marco del Laboratorio 10 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, gracias por abrirme las puertas de su laboratorio y por todo su apoyo.

Agradezco a todas las personas que participaron en la realización de este trabajo.

Contenido

Resumen.....	1
Abstract	4
Antecedentes	7
Colesterol, estructura y síntesis.....	7
Lipoproteínas.....	10
Enfermedad aterosclerosa coronaria.....	12
Formación del ateroma.....	12
Lipoproteínas de alta densidad (HDL).....	14
Composición lipídica de las HDL.....	14
Metabolismo de las HDL; Transporte reverso de colesterol.....	16
Propiedades antiaterogénicas de las HDL.....	20
Estatinas.....	20
Fibratos.....	23
Composición vs función de HDL.....	25
Hipótesis.....	28
Objetivo.....	29
Objetivos particulares.....	29
Métodos.....	30
Animales.....	30
<i>Modelo animal de dislipidemia</i>	30
<i>Modelo animal sin dislipidemia</i>	30
Tratamiento farmacológico.....	30
<i>Modelo animal de dislipidemia</i>	30
<i>Modelo animal sin dislipidemia</i>	30
Muestras de sangre.....	31
Parámetros bioquímicos.....	32
Aislamiento de HDL.....	32
Determinación de la estructura de las HDL.....	33
Marcado radiactivo de apo A-I.....	34
Cinética metabólica de apo A-I.....	35

Actividad antioxidante de la enzima paraoxonasa1	36
Preparación de ésteres de colesterol de HDL marcados con tritio	37
Cinética de ésteres de colesterol de HDL marcados con tritio (³ H-EC-HDL)	37
Análisis compartimental	38
Determinación de la actividad de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol	39
Composición de ácidos grasos de las HDL	40
Análisis estadístico	41
Resultados	42
Parámetros bioquímicos.	42
Composición de las lipoproteínas de alta densidad.	44
Catabolismo de la apo A-I de las HDL en conejos con dislipidemia	50
Composición de ácidos grasos de las HDL	50
Estudios cinéticos in vivo de ésteres de colesterol de HDL marcados con tritio	51
Actividad de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol	52
Discusión	53
Conclusión	60
Anexos	61
Anexo 1. Protocolo de extracción de lípidos totales de las HDL	61
Referencias	62

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de la síntesis de colesterol.	9
Figura 2. Principales clases de lipoproteínas según su densidad.....	11
Figura 3. Estructuras químicas de los principales lípidos en las HDL.....	16
Figura 4. Esquema del transporte reverso de colesterol (RCT).....	19
Figura 5. Estructura química de la atorvastatina	21
Figura 6. Esquema de la metodología utilizada en este trabajo.	31
Figura 7. Curva de decaimiento radiactivo.	36
Figura 8. Modelo multicompartimental para la transferencia de EC entre lipoproteínas.....	39
Figura 9. Distribución relativa de tamaño de subpoblaciones de HDL en conejos con dislipidemia	45
Figura 10. Concentración de los lípidos de las subpoblaciones de HDL en conejos con dislipidemia.....	46
Figura 11. Distribución de tamaño de HDL en conejos sin dislipidemia.....	48
Figura 12. Concentración de los lípidos de las subpoblaciones de HDL en conejos sin dislipidemia.....	49
Figura 13. Composición de ácidos grasos de HDL.....	51

Abreviaturas

HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
Apo	Apolipoproteína
EC	Ésteres de colesterol
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad (Very Low-Density Lipoproteins)
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia (Intermediate-Density Lipoproteins)
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (Low-Density Lipoproteins)
HDL	Lipoproteínas de alta densidad (High-Density Lipoproteins)
C-HDL	Colesterol de lipoproteínas de alta densidad
EAC	Enfermedad aterosclerosa coronaria
VCAM-I	Molécula de adhesión de células vasculares tipo I (Vascular Cell Adhesion Molecule I)
ICAM-I	Molécula de adhesión intercelular tipo I (Intercellular Cell Adhesion Molecule I)
MCP-1	Proteína quimiotáctica para monocitos-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1)
LCAT	Lecitina colesterol acilotransferasa
RCT	Transporte reverso de colesterol (Reverse Cholesterol Transport)
ABCA1	Transportador de membrana dependiente de ATP, miembro 1 de la subfamilia ABCA (ATP-Binding Cassette Transporter A1)
CETP	Proteína de transferencia de ésteres de colesterol (Cholesteryl Ester Transfer Protein)
SR-BI	Receptor scavenger clase B tipo 1 (Scavenger Receptor class B type I)
ABCG1	Transportador de membrana dependiente de ATP, miembro 1 de la subfamilia ABCG (ATP-Binding Cassette Transporter G1)
PON1	Paraoxonasa
C-LDL	Colesterol de lipoproteínas de baja densidad
SREBP	Proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (Sterol Regulatory Element-Binding Protein)
SCAP	Proteína activadora de escisión a SREBP (SREBP-Cleavage Activating Protein)

PPARα	Receptores activados por el proliferador de peroxisomas alfa
PPRE	Elementos respuesta específicos para el proliferador de peroxisomas
LPL	Lipoproteína lipasa
Tg-HDL	Triacilgliceroles de lipoproteínas de alta densidad
Ph-HDL	Fosfolípidos de lipoproteínas de alta densidad
FCR	Tasa de catabolismo fraccional (Fractional Catabolic Rate)

Resumen

Los lípidos son un grupo de compuestos que debido a su naturaleza insoluble en agua tienen que ser transportados en lipoproteínas en la sangre. Las lipoproteínas son macromoléculas pseudomicelares conformadas por diversos lípidos y proteínas. Por lo tanto, estas lipoproteínas son muy heterogéneas en su estructura (tamaño, composición lipídica y proteínica) y características fisicoquímicas. En este sentido, las lipoproteínas pueden ser clasificadas de acuerdo con su densidad de flotación en: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL).

Las alteraciones en las concentraciones plasmáticas de lípidos y lipoproteínas se denominan dislipidemias, las cuales son uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. La enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC) es la forma más común de enfermedad cardiovascular. La EAC se caracteriza por la oclusión parcial o total de la luz de los vasos sanguíneos causada por la acumulación y retención de células y lípidos en el espacio subendotelial de los vasos sanguíneos (ateroma). Durante la formación del ateroma, las LDL tienen una función proaterogénica.

En la práctica clínica, uno de los objetivos principales en prevención de las enfermedades cardiovasculares es el tratamiento farmacológico de las dislipidemias. Las estatinas son utilizadas para disminuir las concentraciones plasmáticas de colesterol-LDL y los fibratos para disminuir las concentraciones plasmáticas de triacilglicérolos. Adicionalmente, ambos tratamientos incrementan la concentración plasmática de colesterol de HDL (C-HDL).

Es bien conocida la relación inversa que existe entre la concentración de C-HDL y la reducción del riesgo cardiovascular. Al respecto, el tratamiento con estatinas y fibratos disminuye las concentraciones plasmáticas de colesterol e incrementa las concentraciones de colesterol-HDL. Sin embargo, resultados de diversos ensayos clínicos han demostrado la ineficacia del incremento del C-HDL sobre la reducción del riesgo cardiovascular. Esta paradoja puede ser explicada por la posible relación entre la estructura y la función de las HDL.

La evidencia sugiere que la estructura de las HDL puede ser un mejor marcador de riesgo cardiovascular que la concentración plasmática de C-HDL *per se*. Por lo tanto, es necesario estudiar la estructura y el metabolismo funcional de las HDL en términos de protección cardiovascular.

En este trabajo determinamos la estructura de las HDL determinada por la distribución relativa de tamaño y la composición lipídica de las subpoblaciones de HDL, así como su metabolismo funcional durante el tratamiento con atorvastatina y fenofibrato en conejos Nueva Zelanda con dislipidemia.

Generamos dislipidemia exógena en conejos, la cual fue parcialmente refractaria a la atorvastatina y al fenofibrato a dosis similares a las utilizadas en los humanos. Sin embargo, el tratamiento con la combinación atorvastatina-fenofibrato disminuyó las concentraciones plasmáticas de colesterol y triacilglicérol.

La distribución de tamaño de las HDL cambió hacia partículas grandes con los tratamientos individuales y con la combinación. En cuanto a los lípidos, el colesterol incrementó en las HDL de todos los conejos con dislipidemia, los triacilglicérols en las HDL de los conejos dislipidémicos tratados con la combinación fueron similares a los del grupo control y los fosfolípidos en la subpoblación HDL2b de los conejos dislipidémicos tratados con la combinación fueron similares a los del grupo control.

La depuración plasmática de la apo A-I de las HDL disminuyó en los conejos dislipidémicos e incrementó en todos los conejos que recibieron tratamiento farmacológico.

Por otra parte, en los conejos sin dislipidemia, la combinación atorvastatina-fenofibrato incrementó el tamaño y las concentraciones plasmáticas de colesterol y fosfolípidos de las subpoblaciones grandes de las HDL. La cantidad relativa de ácidos grasos insaturados en las HDL incrementó mientras que la cantidad relativa de ácidos grasos saturados disminuyó en las HDL de todos los conejos que recibieron tratamiento.

El tratamiento con atorvastatina sola o en combinación incrementó la transferencia bidireccional (desde las HDL hacia las VLDL/LDL y viceversa) de ésteres de colesterol entre lipoproteínas. Además, la eliminación directa de los ésteres de colesterol a través de las VLDL/LDL disminuyó con el fenofibrato mientras que la eliminación directa de los ésteres de colesterol a través de las HDL incrementó con la combinación atorvastatina-fenofibrato.

Nuestros resultados sugieren la existencia de un efecto sinérgico entre la atorvastatina y el fenofibrato sobre la estructura y función de las HDL. Indican que la estructura de las HDL es la característica que determina su metabolismo y función, además, contribuyen a un mejor entendimiento de la relación entre la estructura-función de las HDL.

Abstract

Lipids are a group of compounds transported in lipoproteins due to their water-insoluble nature. Lipoproteins are pseudomicellar macromolecules conformed by lipids and proteins. These particles are very heterogeneous in structure and physicochemical characteristics. In this regard, lipoproteins may be classified by their float density in chylomicrons, very low-density lipoproteins (VLDL), intermediate low-density lipoproteins, low-density lipoproteins (LDL), and high-density lipoproteins (HDL).

Dyslipidemias are alterations in plasma lipids and lipoproteins concentrations, and they are one of the main risk factors for the development of cardiovascular diseases. Coronary artery disease is the more common form of cardiovascular disease and it is characterized by the partial or total occlusion of the blood vessels lumen. The occlusion (atheroma) is caused by the accumulation and retention of cells and lipids in the subendothelial space of blood vessels.

During the formation of atheroma, the LDL has a proatherogenic function and the HDL an antiatherogenic function. HDL metabolism is the more accepted mechanism to explain their antiatherogenic properties. However, HDL has other antiatherogenic functions such as an antioxidant, anti-inflammatory and beneficial properties on the vascular endothelium.

In clinical practice, one of the principal objectives in the prevention of cardiovascular disease is the treatment of dyslipidemias. Statins are used to decrease the LDL-cholesterol plasma concentration and fibrates are used to decrease the triglycerides plasma concentration.

It is well known the inverse relationship between the HDL-cholesterol plasma concentration and the reduction of cardiovascular risk. In this respect, the statin and fibrate treatments decrease the total cholesterol and increase the HDL-cholesterol plasma concentrations. However, results from different clinical trials have demonstrated the inefficacy of increasing HDL-cholesterol on

the reduction of cardiovascular risk. This paradox may be explained by the relationship between the structure and function of HDL.

Evidence suggests that the structure of HDL may be a better risk marker of cardiovascular disease than the HDL-cholesterol plasma concentration *per se*. Hence, studying the structure and functional metabolism of HDL in terms of cardiovascular protection is needed.

In this work, we determined the structure of HDL as defined by their relative size and lipid composition of HDL subclasses, as well as their functional metabolism (antiatherogenic HDL properties) during the treatment with atorvastatin and fenofibrate in New Zealand white rabbits with dyslipidemia.

We generated an animal model of exogenous dyslipidemia which was partially refractory to the atorvastatin and fenofibrate at similar doses used in humans. However, the atorvastatin-fenofibrate combination treatment decreased the cholesterol and triglycerides plasma concentrations.

HDL size distribution shifted towards big HDL subclasses with both the individual treatments and in combination. As for lipids of HDL subclasses, cholesterol increased in all the HDL subclasses of rabbits with dyslipidemia. The triglycerides in all the HDL subclasses of dyslipidemic rabbits were similar to those of control rabbits and the phospholipids in the HDL2b subclass of dyslipidemic rabbits treated with the combination were similar to those of control rabbits.

The apoA-I clearance decreased in the dyslipidemic rabbits and increased in the dyslipidemic rabbits that received pharmacological treatment.

On the other hand, we used normal rabbits to determine the fatty acids composition of HDL and the cholesteryl esters transfer between lipoproteins. The atorvastatin-fenofibrate combination increased the HDL size, the cholesterol and phospholipids plasma concentrations of big HDL subclasses. The relative amount of unsaturated fatty acids in HDL increased and the relative

amount of saturated fatty acids decreased in HDL of all rabbits that received pharmacological treatment.

The atorvastatin treatment alone or in combination with fenofibrate increased the bidirectional transfer (from HDL to VLDL/LDL and vice versa) of cholesteryl esters between lipoproteins. Additionally, the direct elimination of cholesteryl esters from VLDL/LDL decreased with the fenofibrate treatment. On the contrary, the direct elimination of cholesteryl esters from HDL increased with the atorvastatin-fenofibrate combination.

Taken together our results suggest the existence of a synergistic effect between atorvastatin and fenofibrate on the structure and function of HDL, additionally they indicate that the HDL structure is the characteristic that determines their metabolism and function. Also, our results contribute to a better understanding of the relationship between the structure-function of HDL.

Antecedentes

Colesterol, estructura y síntesis.

Los lípidos son un grupo de compuestos insolubles en agua. Los cuales tienen diversas funciones en el organismo; los triacilgliceroles son la principal forma de energía almacenada, mientras que los fosfolípidos y el colesterol forman parte de las membranas celulares (1).

El papel del colesterol no se limita a formar parte de las membranas celulares, en concentraciones elevadas en el plasma ha sido asociado con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (2). En virtud de esto, es importante entender como es sintetizado el colesterol en el organismo.

Estructuralmente, el colesterol es una molécula semiplana, la cual contiene un núcleo esteroide (tres anillos de seis carbonos y uno de cinco carbonos), cadenas de hidrocarburos como sustituyentes y un grupo hidroxilo. El colesterol es una molécula anfifílica, es decir, tiene una porción hidrofóbica (núcleo esteroide) y una hidrofílica (grupo hidroxilo) (2). Esta característica le permite al colesterol formar parte de las membranas celulares y de las lipoproteínas, además de ser precursor de varias hormonas y sales biliares (2).

La síntesis de colesterol se realiza en el citoplasma y en el retículo endoplásmico de las células de tejidos como el hígado, el intestino, la corteza suprarrenal y los órganos reproductivos (3). El hígado sintetiza aproximadamente el 70% de todo el colesterol del organismo.

La síntesis de colesterol consiste en una serie de reacciones químicas en las que participan diferentes enzimas y moléculas. El colesterol es sintetizado a partir de la reacción de condensación entre acetil-coenzima A (CoA) y acetoacetil-CoA para producir 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Esta condensación es catalizada por la enzima HMG-CoA sintasa (4). El HMG-CoA producido es reducido a mevalonato por la enzima HMG-CoA reductasa. Esta reacción catalizada por la HMG-CoA reductasa es el paso limitante en la síntesis de colesterol. El mevalonato es

precursor de compuestos isoprenoides vitales para diversas funciones celulares que van desde la síntesis de colesterol hasta el crecimiento celular. La HMG-CoA reductasa es una de las enzimas con mayor regulación en el organismo (5). Debido a esto, la HMG-CoA reductasa es el objetivo de las estatinas, una clase de fármacos que son utilizadas para disminuir las concentraciones de colesterol(2). Prosiguiendo con la síntesis, una serie de reacciones continúan y el mevalonato es fosforilado y convertido en el isoprenoide 3-isopentenil-pirofosfato (PP). Los isoprenoides son compuestos formados por la condensación de varios compuestos de 5 carbonos. El isopentenil-PP y su isómero el dimetilalil-PP producen geranil-PP (10 carbonos). La condensación de geranil-PP con isopentenil-PP produce farnesil-PP (15 carbonos) (6). En este punto, la síntesis de colesterol puede continuar por la vía de producción de esteroides o puede desviarse hacia la vía de síntesis de compuestos no esteroides. El farnesil-PP puede condensarse con otro farnesil-PP y producir el esteroide precursor escualeno o condensarse con isopentenil-PP varias veces y producir isoprenoides-PP de diferentes tamaños (6, 7). El geranilgeranil-PP es un isoprenoide de 20 carbonos involucrado en modificaciones postraduccionales de proteínas (8). Continuando con la vía de producción de esteroides, el escualeno es convertido a lanosterol. En este punto, dos rutas de síntesis de colesterol pueden ocurrir, la vía Bloch que tiene desmosterol como intermediario principal y la vía Kandutsch-Russel que tiene dos intermediarios lanosterol y 7-dehidro-colesterol (9).

A diferencia de la molécula de colesterol, el desmosterol tiene un doble enlace en el carbono 24 de la cadena alquilo del grupo esteroide y el 7-dehidro-colesterol tiene un doble enlace en el carbono 7 del anillo esteroide (10). La síntesis de colesterol y las enzimas involucradas están esquematizadas en la figura 1.

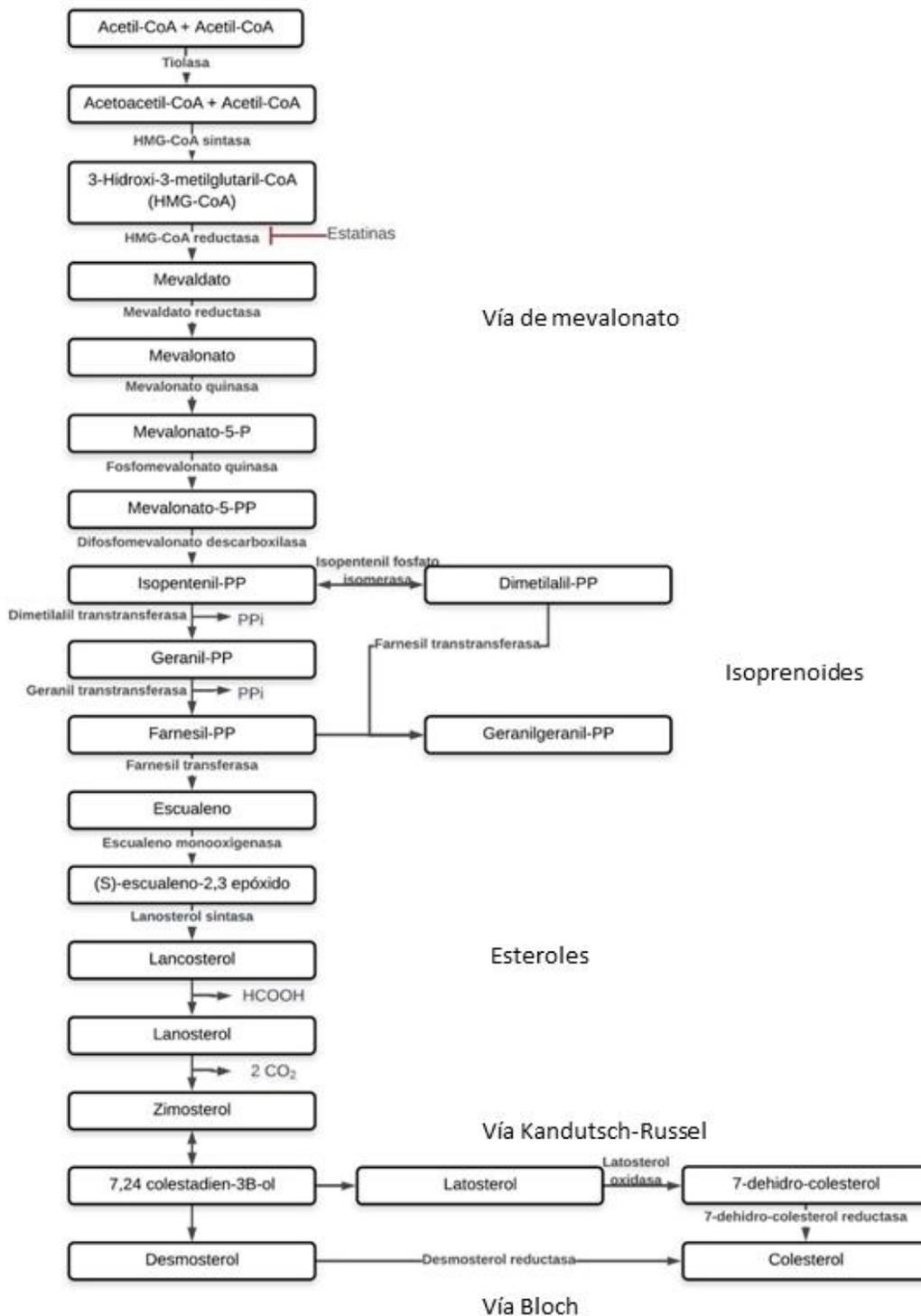


Figura 1. Esquema de la síntesis de colesterol. Algunas de las principales vías, enzimas e intermediarios que participan de la síntesis de colesterol están representados en la figura. La línea roja representa la inhibición de la enzima hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa (vía de mevalonato) por las estatinas y con ello la síntesis de compuestos isoprenoides, los cuales participan en modificaciones postraduccionales de proteínas.

Lipoproteínas

Debido a su naturaleza insoluble en agua, los lípidos en el organismo tienen que ser transportados en lipoproteínas. Las cuales son macromoléculas pseudomicelares conformadas por una fracción proteínica y una lipídica. La fracción proteínica está compuesta por diferentes apolipoproteínas; entre las cuales se encuentran la apo E, apo B, apo A-I, apo A-II y apo C, entre otras. Por su parte, la fracción lipídica consiste en un núcleo de lípidos hidrofóbicos, triacilgliceroles y ésteres de colesterol (EC), rodeados de una monocapa de fosfolípidos y colesterol no esterificado (lípidos hidrofílicos) (11).

Las lipoproteínas son partículas muy heterogéneas en su estructura y características fisicoquímicas. El tamaño y la densidad de las lipoproteínas son características que pueden variar en función del contenido de lípidos y apo; a mayor contenido de lípidos en las lipoproteínas, estas incrementan su tamaño y disminuyen su densidad, mientras que a mayor contenido de apo, mayor densidad. Por lo tanto, las lipoproteínas pueden ser clasificadas de acuerdo a su densidad de flotación en: quilomicrones, densidad (δ) < 0.95 g/mL; lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL; por sus siglas en inglés, Very Low-Density Lipoproteins), δ 0.95-1.006 g/mL; lipoproteínas de densidad intermedia (IDL; por sus siglas en inglés, Intermediate-Density Lipoproteins), δ 1.006-1.019 g/mL; lipoproteínas de baja densidad (LDL; por sus siglas en inglés, Low-Density Lipoproteins), δ 1.019-1.063 g/mL y lipoproteínas de alta densidad (HDL; por sus siglas en inglés, High-Density Lipoproteins), δ 1.063-1.21 g/mL y de acuerdo con el tipo de apo que contienen las lipoproteínas pueden ser clasificadas en: lipoproteínas que contienen apo B (i. e. quilomicrones, VLDL, IDL y LDL) y lipoproteínas que contienen apo A (HDL). Cabe destacar que la proteína característica de los quilomicrones es la apo B-48 (esta proteína representa sólo el 48% de la secuencia total de la apo B-100) y la proteína característica de las VLDL, IDL y LDL es la apo B-

100 (Figura 2). Por otra parte, la proteína más abundante de las HDL es la apo A-I (puede representar hasta el 70% en masa de las apo en estas lipoproteínas).

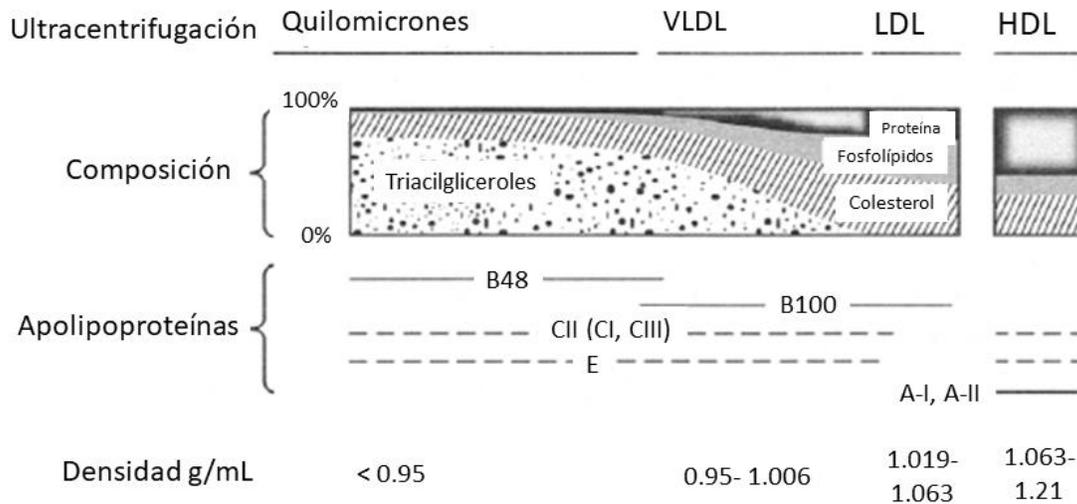


Figura 2. Principales clases de lipoproteínas según su densidad. Quilomicrones y VLDL tienen el mayor contenido de triacilgliceroles y del 1- 10% en masa de apolipoproteínas; LDL y HDL contienen principalmente ésteres de colesterol en el centro y de 20- 50% de apolipoproteínas. Las principales apolipoproteínas que componen a las diferentes clases de lipoproteínas están indicadas con las líneas solidas; las secundarias o menores apolipoproteínas componentes están indicadas con líneas punteadas. En esta imagen “colesterol” incluye ambos colesterol esterificado y no esterificado. Imagen tomada y modificada de Jonas A (12).

El transporte de lípidos en el organismo es la función principal de las lipoproteínas (11, 13).

Los quilomicrones transportan triacilgliceroles y colesterol obtenidos desde el sitio de absorción en el epitelio intestinal hacia varias células del organismo. Las VLDL transportan triacilgliceroles y colesterol desde el hígado y lo distribuyen a las células de los tejidos. Las LDL son las principales transportadoras de colesterol en el organismo y las HDL transportan el colesterol desde células del organismo hacia el hígado para reciclarlo o eliminarlo.

Las dislipidemias son alteraciones en las concentraciones plasmáticas de lípidos y lipoproteínas, las cuales comprenden un amplio grupo de alteraciones metabólicas; la hipercolesterolemia (concentraciones plasmáticas de colesterol elevadas), la hipertrigliceridemia (concentraciones plasmáticas de triacilgliceroles elevadas), la hiperquilomicronemia

(concentraciones plasmáticas elevadas de quilomicrones) y la hipoalfalipoproteinemia (concentraciones plasmáticas disminuidas de C-HDL) son algunas de ellas.

Las dislipidemias pueden presentarse por causas ambientales (estilo de vida), predisposición genética o de manera secundaria con otras enfermedades (síndrome metabólico, diabetes, hipotiroidismo) (14). Así, las dislipidemias son uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

Enfermedad aterosclerosa coronaria

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte a nivel mundial (15, 16) y la enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC) es la forma más común de enfermedad cardiovascular (17). La EAC es una de las principales causas de muerte en países en vías de desarrollo y desarrollados (18). En México, esta enfermedad es la segunda causa de muerte en la población adulta (19). La EAC es una enfermedad de etiología inflamatoria, con diferentes manifestaciones clínicas (angina estable, angina inestable, infarto al miocardio o muerte súbita cardíaca) (17). Los factores genéticos, factores ambientales y el estilo de vida tienen un papel importante para el desarrollo de esta enfermedad (20, 21). La obesidad, la diabetes mellitus tipo 2, el tabaquismo, la hipertensión, el sedentarismo y las dislipidemias (22) son algunos de los principales factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad.

Formación del ateroma

La EAC se caracteriza por la oclusión paulatina de la luz de los vasos sanguíneos causada por el ateroma. La acumulación y retención de células y lípidos en el espacio subendotelial de los vasos sanguíneos es el primer paso para la formación del ateroma. En este proceso intervienen varias células y quimiocinas de diferentes orígenes.

La formación del ateroma inicia con la disfunción del endotelio vascular, la cual es originada tanto por estímulos mecánicos (el flujo sanguíneo en las bifurcaciones de los vasos sanguíneos) como por estímulos químicos (un microambiente altamente oxidante, es decir, concentraciones elevadas de especies reactivas de oxígeno y disminuidas de enzimas antioxidantes). La disfunción del endotelio permite la entrada de LDL al espacio subendotelial (23, 24), donde éstas son oxidadas por especies reactivas de oxígeno. Las LDL oxidadas en sinergia con quimiocinas activan a las células endoteliales y las células endoteliales activadas expresan moléculas de adhesión, principalmente, selectina E, moléculas de adhesión de células vasculares tipo I (VCAM-I; por sus siglas en inglés, Vascular Cell Adhesion Molecule I) y moléculas de adhesión intercelular tipo I (ICAM-I; por sus siglas en inglés, Intercellular Cell Adhesion Molecule I). Las células endoteliales activadas expresan una mayor cantidad de moléculas de adhesión que las células endoteliales no activadas. Las moléculas de adhesión facilitan la entrada de células del sistema inmunológico al espacio subendotelial donde desencadenan una respuesta inflamatoria. Por esta razón, la enfermedad aterosclerosa coronaria es considerada una enfermedad inflamatoria (25). Adicionalmente, las células endoteliales activadas secretan la proteína quimiotáctica para monocitos-1 (MCP-1; por sus siglas en inglés, Monocyte Chemotactic Protein-1). Esta proteína atrae monocitos al espacio subendotelial lo que intensifica la respuesta inflamatoria (26). En el espacio subendotelial, los monocitos se diferencian a macrófagos, los cuales expresan receptores scavenger tipo SR-A y CD36; estos receptores internalizan VLDL, remanentes de lipoproteínas que contienen apo E y LDL modificadas (oxidadas, glicosiladas). La internalización y la incapacidad de los macrófagos para eliminar estas partículas modificadas genera células espumosas (27, 28), las cuales liberan factores quimiotácticos que exacerbaban la acumulación y la formación de células espumosas.

En esta etapa de la formación del ateroma las HDL tendrían una función de protección (antiaterogénica) (29).

Lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Las HDL son muy heterogéneas en forma, composición y características fisicoquímicas. Estas lipoproteínas pueden ser partículas discoidales o esféricas, con diámetros hidrodinámicos que varían en el rango de los 5-13 nm. De acuerdo a su densidad de flotación, las HDL pueden ser separadas en dos fracciones; HDL2 (δ 1.063-1.125 g/ml) y HDL3 (δ 1.125-1.21 g/ml) (30). Además, las HDL pueden ser separadas en 5 subpoblaciones en orden decreciente de tamaño, HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL3b y HDL3c (31) mediante electroforesis en geles de gradiente de poliacrilamida en condiciones nativas.

La heterogeneidad de las HDL es resultado de los diferentes lípidos y proteínas que las conforman. La fracción proteínica de las HDL incluye apolipoproteínas, enzimas, proteínas de transferencia de lípidos, proteínas de respuesta de fase aguda, por mencionar algunas. Sin embargo, las apo son las proteínas más abundantes en las HDL. La apo A-I puede representar hasta el 70% de la proteína en las HDL. Empero, la apo A-II, apo A-IV, apo AV, apo M y apo E forman parte de estas lipoproteínas aunque en menor proporción (32). Adicionalmente, estudios de proteómica y lipidómica reportan la presencia de varias proteínas (LCAT, paraoxonasa1, factor activador de plaquetas, proteína a del suero amiloide, α 1- tripsina, entre otras) y más de 200 lípidos en las HDL (33, 34).

Composición lipídica de las HDL

Las HDL están conformadas principalmente por fosfolípidos (glicerofosfolípidos y esfingolípidos), colesterol (esterificado y no esterificado) y triacilgliceroles (35). La cantidad de estos lípidos es variable en las HDL. Los fosfolípidos representan hasta el 50% en masa de los

lípidos totales y son componentes estructurales de las HDL. El colesterol no esterificado representa del 5-10% en masa de los lípidos totales y el colesterol esterificado; la forma de colesterol más abundante en estas lipoproteínas representa del 30-40% en masa de los lípidos totales (36). Los triacilgliceroles representan del 5-12% en masa de los lípidos totales en las HDL y son obtenidos de las lipoproteínas que contienen apo B al ser intercambiados por colesterol esterificado.

Los ácidos grasos de las HDL forman parte de la estructura de los diferentes lípidos que las conforman. La fosfatidilcolina es el glicerofosfolípido más abundante en las HDL y está conformada por dos cadenas de ácidos grasos unidas por un enlace éster a una molécula de glicerol (Figura 3a) (37) y un residuo de colina. Los pares de ácidos grasos de la fosfatidilcolina pueden ser ácido palmítico (16:0)/ ácido linoleico (18:2); ácido esteárico (18:0)/ ácido linoleico (18:2); ácido palmítico (16:0)/ ácido araquidónico (20:4) o ácido palmítico (16:0)/ ácido oleico (18:1) (38). Los ácidos grasos saturados 16:0/ 18:0 están presentes principalmente en las cadenas de la lisofosfatidilcolina de las HDL (38). La fosfatidiletanolamina contiene ácidos grasos de cadena larga (36:2 y 38:4) principalmente (39). La esfingomielina es el esfingolípido principal en las HDL (38). La esfingomielina (Figura 3b) contiene un grupo fosfato de colina unido al residuo de esfingosina en el extremo hidroxilo mediante un enlace éster y una cadena de un ácido graso unida al extremo amino de la esfingosina mediante un enlace amida (37). Los ácidos grasos más abundantes en la esfingomielina son el 18:1/ 16:0 y 18:2/ 24:0.

Los fosfolípidos aportan la mayor cantidad de los ácidos grasos de las HDL, sin embargo, el colesterol esterificado y los triacilgliceroles también contienen ácidos grasos en su estructura. El grupo hidroxilo del colesterol es la parte polar y reactiva de la molécula. En esta parte la reacción de esterificación del colesterol se realiza. Durante la esterificación, el ácido graso en la posición *sn*-2 de la fosfatidilcolina se une al grupo hidroxilo del colesterol mediante un enlace éster por acción de la enzima LCAT (LCAT; por sus siglas en inglés, Lecithin Cholesterol AcylTransferase)

(40). El linoleato de colestero (Figura 3d, ácido graso 18:2) es la forma de colesterol esterificado más abundante en las HDL (38). Los triacilgliceroles consisten en una molécula de glicerol unida a tres cadenas de ácidos grasos mediante enlaces éster (Figura 3e). Los principales ácidos grasos presentes en los triacilgliceroles de las HDL son el 16:0, 18:1 y 18:2.

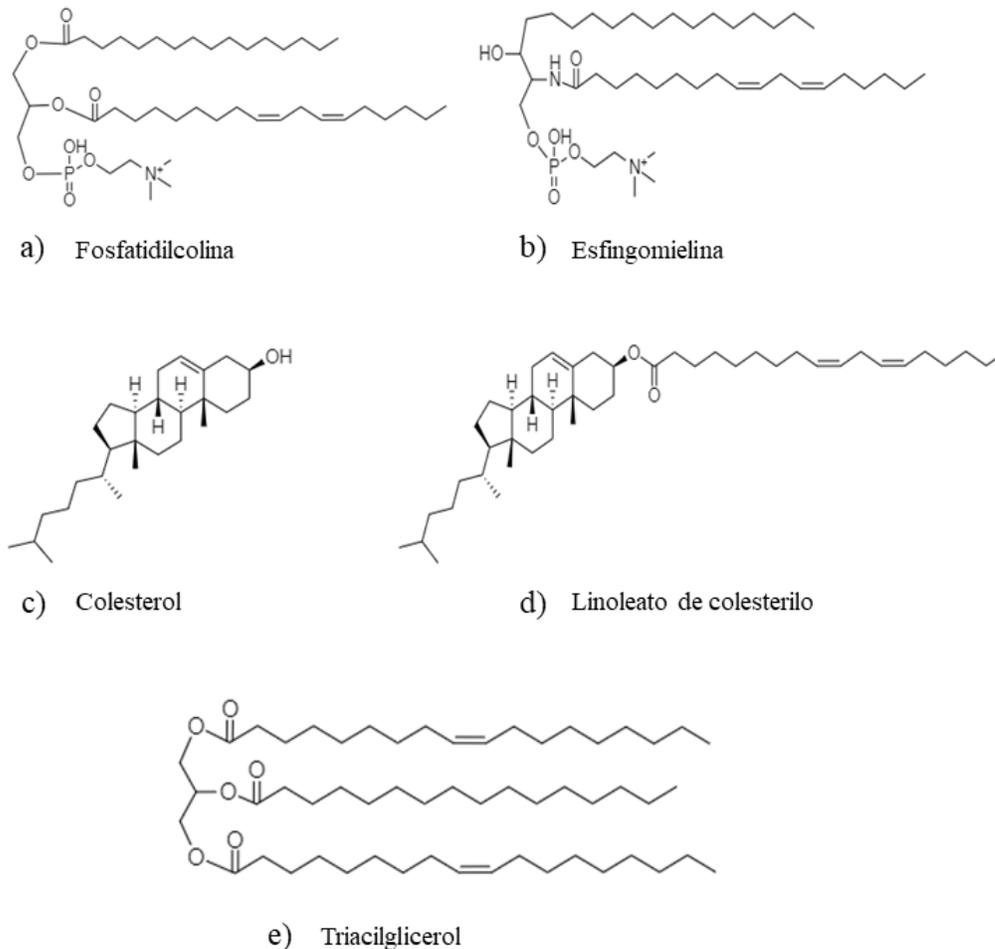


Figura 3. Estructuras químicas de los principales lípidos en las HDL. Los principales fosfolípidos en las HDL son a) la fosfatidilcolina y b) la esfingomielina, estos aportan la mayor cantidad de ácidos grasos en las HDL. c) y d) El linoleato de colestero es el éster de colesterol más abundante en las HDL. e) Los triacilgliceroles tienen ácidos grasos saturados principalmente.

Metabolismo de las HDL; Transporte reverso de colesterol

El metabolismo intravascular de las HDL es considerado la principal función antiaterogénica de las HDL. A este también se le conoce como transporte reverso de colesterol (RCT; por sus siglas

en inglés, Reverse Cholesterol Transport) y se define como el retorno de colesterol desde las células del organismo (incluyendo las células espumosas en el ateroma) hacia el hígado para su eliminación o reciclaje.

El RCT (Figura 4) inicia con la secreción hepática de partículas discoidales (partículas pre- β 1), las cuales están compuestas por apo A-I y fosfolípidos. Estas partículas obtienen el colesterol (eflujo de colesterol) de las células del organismo a través del transportador de membrana dependiente de ATP, miembro 1 de la subfamilia ABCA (ABCA1; por sus siglas en inglés, ATP-Binding Cassette Transporter A1) (41). El colesterol en las partículas pre- β es esterificado por la enzima LCAT (40) y los ésteres de colesterol hidrofóbicos se internan en la partícula, lo cual remodela la partícula pre- β en una partícula esférica de mayor tamaño (HDL2).

Los ésteres de colesterol de las HDL2 pueden ser eliminados de las HDL por dos vías. En una de ellas, los ésteres de colesterol en las HDL2 son intercambiados por triacilgliceroles provenientes de las VLDL/LDL. El intercambio es facilitado por la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP; por sus siglas en inglés, Cholesteryl Ester Transfer Protein). A su vez, los ésteres de colesterol intercambiados a las VLDL/LDL son eliminados por el receptor hepático apo B/E. En la otra vía, los ésteres de colesterol de las HDL son eliminados a través del receptor hepático (SR-BI; por sus siglas en inglés Scavenger Receptor class B type I). Este receptor elimina selectivamente los ésteres de colesterol de las HDL y recicla una partícula de menor tamaño (HDL3). El mecanismo por el cual el receptor SR-BI capta los ésteres de colesterol aún es desconocido (42-44).

Las partículas HDL3 son capaces de reiniciar el ciclo de captación de colesterol. Estas partículas HDL3 aceptan colesterol a través del transportador de membrana dependiente de ATP miembro 1 de la subfamilia ABCG (ABCG1; por sus siglas en inglés, ATP Binding Cassette Transporter G1) (45). Por otra parte, los triacilgliceroles intercambiados a las HDL por la CETP

son hidrolizados por acción de la lipasa hepática. Esta hidrólisis, en sinergia con la actividad de la proteína de transporte de fosfolípidos remodela a las HDL y genera partículas de menor tamaño; HDL3 y apo A-I pobre en lípidos capaces de reiniciar el ciclo de captación de colesterol.

Los componentes lipídicos y proteínicos de las HDL son catabolizados de manera individual (46). Como se mencionó anteriormente, los lípidos son eliminados a través de diferentes receptores y enzimas y la apo A-I disociada o pobre en lípidos puede ser eliminada a través de receptores cubulina y megalina, del túbulo renal (46, 47).

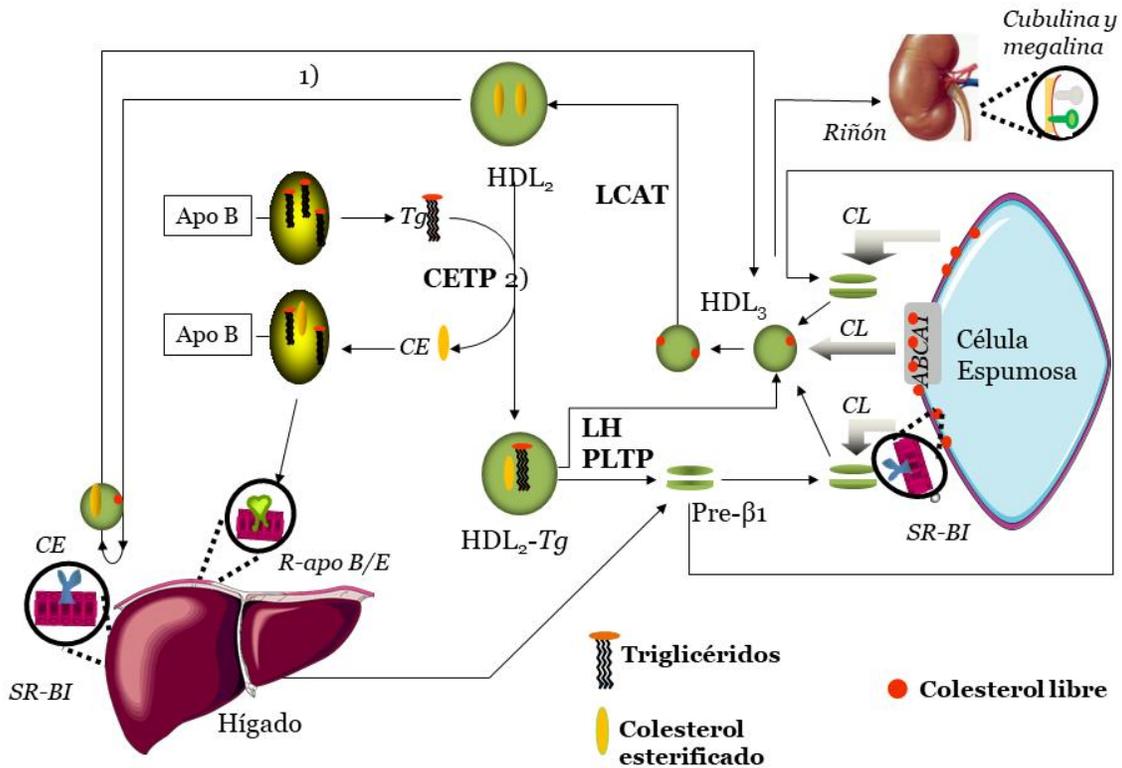


Figura 4. Esquema del transporte reverso de colesterol (RCT). El RCT inicia con la síntesis hepática de partículas pre-β1, las cuales obtienen el colesterol de las células espumosas (o periféricas) a través del receptor de membrana dependiente de ATP ABCA1 dando como resultado una partícula HDL3. El colesterol en las HDL3 es esterificado por acción de la enzima lecitina colesterol acilo transferasa (LCAT), lo cual genera una partícula de mayor tamaño HDL2. Los ésteres de colesterol (CE) en las HDL2 pueden ser 1) captados selectivamente por el receptor hepático SR-BI, proceso que genera partículas HDL3 capaz de reiniciar el ciclo de captación o 2) intercambiados por triacilglicerol provenientes de lipoproteínas que contienen apo B (intercambio facilitado por la proteína de transferencia de ésteres de colesterol, CETP). Los CE intercambiados en las lipoproteínas que contienen apo B son eliminados por el receptor hepático apo B/E. Las HDL con triacilglicerol son remodeladas en partículas más pequeñas por acción de la lipasa hepática (LH) y la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP). La apo A-I y las HDL pequeñas son catabolizadas a través de receptores megalina y cubulina en el riñón.

Propiedades antiaterogénicas de las HDL

El RCT es el mecanismo más aceptado para explicar la función antiaterogénica de las HDL. Diversos estudios han asociado las diferentes etapas del RCT (eflujo de colesterol, transferencia de lípidos entre lipoproteínas y catabolismo de la apo A-I) con la disminución del riesgo cardiovascular (48-50).

Sin embargo, durante el RCT el tamaño y la composición química de las HDL son modificados por varios factores de remodelación (45), lo cual genera varias subpoblaciones con diferentes propiedades antiaterogénicas (51-60). Por ejemplo, la actividad antioxidante de las HDL ha sido atribuida a su asociación con la enzima paraoxonasa (PON1) (61). La PON1 previene la oxidación de las LDL y la captación de las LDLox por los macrófagos, reduce el estrés oxidativo en los macrófagos y elimina a las LDLox (62). Esta asociación con la PON1 es más abundante en las subpoblaciones pequeñas de las HDL (63). Además, las HDL tienen propiedades benéficas sobre la función del endotelio vascular (64). Al respecto, las HDL mantienen el balance de lípidos en microdominios de membrana denominados caveolas. Las caveolas están formadas principalmente por oligómeros de la proteína caveolina-1 en sitios con una gran cantidad de colesterol (65, 66). De esta manera, las HDL estimulan la producción de óxido nítrico por las células endoteliales. las HDL retienen y mantienen el funcionamiento de la sintasa de óxido nítrico (67). Además, las HDL regulan la respuesta inflamatoria (55, 68) al modular la expresión de moléculas de adhesión VCAM-I, ICAM-I y selectina E en el endotelio vascular.

Estatinas

Uno de los objetivos principales en la prevención primaria de las enfermedades cardiovasculares es la reducción de la concentración plasmática de C-LDL y las estatinas son la primera elección farmacológica para lograr este objetivo (69, 70).

Las estatinas están conformadas por dos estructuras principales: una estructura de anillos, los cuales pueden ser anillos parcialmente reducidos de naftaleno (lovastatina, simvastatina, pravastatina), pirrol (atorvastatina), indol (fluvastatina), pirimidina (rosuvastatina), piridina (cerivastatina) o quinolina (pitavastatina) con diferentes sustituyentes y un farmacóforo, el cual consiste en un segmento de ácido dihidroxiheptanoico (71). Los sustituyentes de la estructura de anillos determinan la solubilidad y otras propiedades farmacológicas de las estatinas. El farmacóforo es similar en estructura al sustrato natural de la enzima HMG-CoA reductasa, el HMG-CoA (Figura 5).

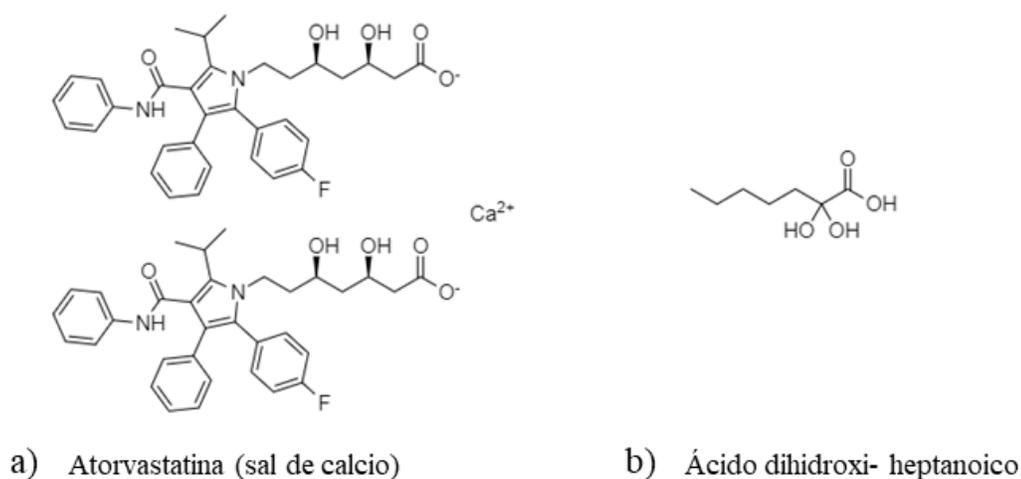


Figura 5. Estructura química de la a) atorvastatina y estructura química del b) ácido dihidroxi-heptanoico. El farmacóforo de la atorvastatina es similar en estructura al ácido dihidroxi-heptanoico y a un segmento del sustrato de la enzima HMG-CoA reductasa.

Las estatinas son inhibidores competitivos de la HMG-CoA reductasa, enzima clave en la síntesis endógena del colesterol. Las estatinas compiten con el HMG-CoA por la unión al sitio activo. Una vez formado el complejo estatina-enzima, la conformación de la HMG-CoA reductasa es alterada dando como resultado la inactivación de la enzima y, por lo tanto, la síntesis de colesterol disminuye. Esta disminución de colesterol puede ocurrir mediante dos mecanismos; en uno, las estatinas inhiben la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa, disminuyendo así la

síntesis de colesterol *de novo* y en el otro, las estatinas incrementan la expresión del ARNm del receptor hepático de LDL. El catabolismo de las LDL incrementa (72), en respuesta al incremento del número de receptores y la captación de LDL circulantes.

La expresión del ARNm del receptor hepático de LDL y la síntesis de colesterol son reguladas a través de proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP; por sus siglas en inglés, Sterol Regulatory Element-Binding Protein). Adicionalmente, estas proteínas regulan la transcripción de genes que codifican para otras proteínas, como la enzima HMG-CoA reductasa, el receptor hepático SR-BI (73) y el transportador de membrana ABCA1 (74).

Las proteínas SREBP son proteínas de membrana que pertenecen a una familia de factores de transcripción conformada por 3 subtipos; SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2. Las proteínas SREBP-1 se encuentran abundantemente en el hígado y glándulas suprarrenales. Estas proteínas regulan el metabolismo de triacilglicerol y ácidos grasos. En contraste, la proteína SREBP-2 se encuentran en todos los tejidos y está involucrada en la regulación del metabolismo del colesterol (75, 76). Las proteínas SREBP son sintetizadas en el retículo endoplásmico de las células.

La regulación vía SREBP se lleva a cabo en la membrana del retículo endoplásmico, donde la proteína SREBP forma un complejo (SREBP/SCAP) con otra proteína de membrana denominada proteína activadora de escisión a SREBP (SCAP; por sus siglas en inglés, SREBP-Cleavage Activating Protein).

La proteína SCAP contiene dos dominios; el dominio de detección de esteroides (SSD; por sus siglas en inglés, Sterol-Sensing Domain) en el extremo amino y el dominio de repetición de aminoácidos (WD, triptófano, aspartato) en el extremo carboxilo. El dominio WD consta de 5 repeticiones de secuencias de 40 aminoácidos aproximadamente, involucradas en interacciones proteína-proteína. El dominio WD es la región de SCAP que forma el complejo SREBP/SCAP con el dominio carboxilo terminal de SREBP (76, 77).

En condiciones de concentraciones disminuidas de colesterol (p. ej. durante el tratamiento con estatinas), el complejo SREBP/SCAP se mueve hacia el aparato de Golgi en donde actúan dos proteasas, la proteasa de sitio 1 y la proteasa de sitio 2 (S1P y S2P; por sus siglas en inglés, Site-1 Protease y Site-2 Protease respectivamente) sobre SREBP para liberar su forma activa. La S1P hidroliza a SREBP en el bucle luminal. Posteriormente, S2P hidroliza el extremo amino terminal y libera el factor de transcripción activo (nSREBP) de la membrana. nSREBP se traslada al núcleo donde se une a elementos reguladores de esteroides en el promotor de genes blanco (78). En condiciones de concentraciones elevadas de colesterol, el complejo SREBP/SCAP se mantiene anclado a la membrana del retículo endoplásmico y la activación de SREBP no ocurre.

Actualmente, el tratamiento con estatinas es la única alternativa farmacológica capaz de reducir el riesgo cardiovascular (79). El tratamiento con estatinas disminuye principalmente las concentraciones de C-LDL. Sin embargo, manifiesta efectos limitados sobre las concentraciones plasmáticas de triacilglicéridos y C-HDL (80). Con el tratamiento con estatinas, diferentes moléculas involucradas en el metabolismo de lípidos manifiestan efectos benéficos, por ejemplo, las concentraciones plasmáticas de apo A-I incrementan (81) al inhibir la vía de señalización de la proteína Rho y la activación de PPAR α en células HepG2 (80, 82). La función endotelial de pacientes con dislipidemia tratados con estatinas mejora al aumentar la expresión de la eNOS y la liberación de óxido nítrico por las células endoteliales (83). Además, el tratamiento con estatinas tiene efectos sobre el tejido adiposo, el cual recientemente ha despertado interés por su papel en el metabolismo energético del organismo y su asociación con las enfermedades cardiovasculares (84).

Fibratos

Los fibratos son agonistas de los receptores activados por el proliferador de peroxisomas alfa (PPAR α), los cuales pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares de factores de

transcripción activados por ligandos (85). En general, los PPAR activan la transcripción de genes involucrados en el metabolismo energético, por ejemplo, en el hígado activan genes involucrados en el metabolismo de ácidos grasos, en el tejido adiposo activan genes involucrados en el almacenamiento de lípidos y en macrófagos activan genes involucrados en el RCT.

Los PPAR α son expresados ampliamente en tejidos con un metabolismo acelerado de ácidos grasos como el hígado, el riñón, el corazón y músculo esquelético (86).

El mecanismo de acción de los fibratos involucra su unión a los PPAR α formando un heterodímero con el receptor nuclear retinoico (RXR) activado por su ligando. El heterodímero se une a elementos de respuesta específicos para el proliferador de peroxisomas (PPREs) localizados en la región promotora de genes blanco. En consecuencia, la transcripción de los genes blanco es activada. Los PPREs consisten en la repetición de la secuencia AGGTCA separada por uno o dos nucleótidos (86, 87). Los PPAR α regulan la transcripción de genes por dos mecanismos. El primer mecanismo es directo y activa la transcripción de genes. Este mecanismo depende de la unión directa al ADN. El segundo mecanismo es indirecto y depende de su interferencia (interacción proteína-proteína) con factores de transcripción de otras vías de señalización. La interferencia de los PPARs con la vía de señalización del factor de necrosis tumoral puede inhibir la producción de moléculas inflamatorias (87).

Los fibratos son empleados en la práctica clínica para tratar pacientes con desórdenes lipídicos. El tratamiento con fibratos tiene efectos sobre los lípidos, proteínas y lipoproteínas. Los fibratos disminuyen la concentración plasmática de triacilgliceroles al inhibir su síntesis y acelerar su depuración. Los fibratos activan a los PPAR α e inducen la beta oxidación de los ácidos grasos en el hígado, lo que reduce la disponibilidad de ácidos grasos para la síntesis y secreción de VLDL (88). Adicionalmente, la expresión y la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) incrementa. Esta enzima hidroliza a los triacilgliceroles de las diferentes lipoproteínas (89) e incrementa la síntesis

de la apo AV (90). Además, los fibratos tienen efectos sobre la apolipoproteína C, la cual participa en el metabolismo de los triacilgliceroles. La apo C-III disminuye el catabolismo de las lipoproteínas ricas en triacilgliceroles al interferir en su unión con el endotelio y la subsecuente lipólisis por la LPL. La síntesis de apo A-I y AII también incrementa con este tratamiento, dando como resultado un incremento en la concentración de C-HDL. Además, el tratamiento con fibratos modifica la composición y el metabolismo de las HDL (91).

Composición vs función de HDL

Es bien conocida la relación inversa que existe entre la concentración plasmática de C-HDL y el riesgo cardiovascular (92). En consecuencia, diferentes estrategias empleando agentes farmacológicos (estatinas, fibratos, inhibidores de CETP, ácidos grasos omega 3, niacina) han sido desarrolladas para disminuir la concentración plasmática de colesterol total e incrementar (indirectamente) la concentración plasmática de C-HDL y con ello disminuir el riesgo cardiovascular.

Al respecto, el tratamiento con estatinas y fibratos disminuye las concentraciones plasmáticas de colesterol e incrementa el C-HDL (3). Sin embargo, los resultados de diferentes ensayos clínicos han demostrado la ineficacia del incremento del C-HDL sobre la reducción del riesgo cardiovascular (93-96). La concentración plasmática de C-HDL en los pacientes aumenta, pero dicho aumento no se asocia con una disminución del riesgo cardiovascular (93, 95, 96). Esto puede ser explicado debido a que la concentración de C-HDL por sí sola no refleja la compleja composición de las HDL ni su funcionalidad.

La posible relación entre la estructura y función de las HDL es controversial y no ha sido dilucidada.

Diversos estudios sugieren que las propiedades antiaterogénicas de las HDL están relacionadas con su estructura y composición lipídica. Al respecto, resultados de estudios epidemiológicos indican que la fracción de las HDL2 (subpoblaciones grandes) es la protectora. Mientras que estudios de proteómica y lipidómica revelaron la alteración de la estructura de las HDL en ciertas condiciones patológicas y que la presencia de HDL alteradas aumenta el riesgo cardiovascular (97, 98). Por ejemplo, pacientes con EAC tienen HDL pequeñas enriquecidas con apo E (99). Dicho enriquecimiento podría ser utilizado como marcador de detección de la enfermedad aterosclerosa coronaria. Además, los fosfolípidos y los ácidos grasos han sido asociados con la funcionalidad de las HDL; el incremento en la cantidad de esfingomielina disminuye el eflujo de colesterol *in vitro* (100). El fosfatidilinositol, la fosfatidilserina, el fosfatidilglicerol y el ácido fosfatídico son fosfolípidos cargados negativamente (38) que pueden modificar la carga de superficie de las HDL (101, 102) y afectar interacciones con otras proteínas (dependientes de la carga). Por su parte, el cambio de ácidos grasos saturados a insaturados ha sido asociado con partículas HDL más fluidas (103), las cuales tienen una mejor capacidad de aceptar colesterol (104). En contraste, el transporte de colesterol alterado en pacientes con síndrome metabólico ha sido asociado con partículas HDL enriquecidas con triacilgliceroles (105) y ácidos grasos saturados (106). Adicionalmente, la actividad antioxidante y antiinflamatoria de las HDL de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 está alterada posiblemente por el incremento de ácidos grasos oxidados en las mismas (107). Por otra parte, estudios metabólicos indican que el catabolismo de la apo A-I de las HDL guarda una relación inversa con el tamaño y estructura de las lipoproteínas (58, 59).

En conjunto, la evidencia sugiere que la composición lipídica y proteínica de las HDL puede ser un mejor marcador de riesgo cardiovascular que sólo la concentración de C-HDL. En consecuencia, la validez de la concentración plasmática de C-HDL como marcador de riesgo

cardiovascular es cuestionable (67, 108, 109). Esto plantea la necesidad de estudiar la estructura y el metabolismo funcional (RCT) de las HDL en términos de protección cardiovascular.

Diversos estudios han demostrado que tanto las estatinas como los fibratos tienen efectos sobre la estructura de las HDL; modifican la composición de las subpoblaciones de HDL e incrementan la síntesis de apo A-I. Asimismo, estos fármacos mejoran la función endotelial, al igual que las HDL. Sin embargo, no se sabe si existe un efecto sinérgico entre las estatinas y los fibratos sobre la estructura de las HDL y el RCT in vivo. De ser así, la combinación atorvastatina-fenofibrato podría convertirse en un objetivo terapéutico; ya que los fármacos actúan de manera complementaria sobre diferentes parámetros bioquímicos y pueden actuar de manera complementaria.

Es importante enfatizar que la administración simultánea de estatinas y fibratos puede exacerbar el riesgo de efectos secundarios sobre músculo e hígado (110). De ahí la importancia de valorar en su justa dimensión los efectos benéficos de la combinación farmacológica. Esta información permitirá contrastar adecuadamente el riesgo-beneficio que ofrece para el paciente dicha combinación farmacológica.

Hipótesis

La combinación farmacológica atorvastatina-fenofibrato modificará la estructura y la composición lipídica de las HDL, lo cual tendrá una repercusión favorable sobre el metabolismo de estas lipoproteínas en términos de protección cardiovascular.

Objetivo

Determinar el efecto de la combinación farmacológica atorvastatina-fenofibrato sobre la estructura de las HDL y el efecto de dichos cambios estructurales sobre la función de las HDL determinada por la cinética catabólica de apo A-I y la transferencia de ésteres de colesterol entre lipoproteínas.

Objetivos particulares

Determinar el efecto de la combinación farmacológica atorvastatina-fenofibrato sobre la estructura de las HDL con base en la distribución relativa de tamaño y la concentración de los lípidos de las subpoblaciones de HDL.

Determinar el efecto de la combinación farmacológica atorvastatina-fenofibrato sobre la depuración de la apo A-I de las HDL.

Determinar el efecto de la combinación farmacológica atorvastatina-fenofibrato sobre la transferencia de ésteres de colesterol entre lipoproteínas.

Métodos

Animales

Modelo animal de dislipidemia

Conejos Nueva Zelanda macho de 3 a 3.5 kg de peso fueron utilizados en este estudio. Los conejos fueron alimentados con una dieta alta en grasa que consistió en; alimento estándar para conejo suplementado con colesterol (0.2% p/p) y aceite de canola (2% p/p) para generar dislipidemia (hipercolesterolemia exógena).

Modelo animal sin dislipidemia

Conejos Nueva Zelanda macho de 2 a 2.5 kg de peso fueron utilizados y alimentados con una dieta estándar para conejo. Todos los conejos recibieron agua *ad libitum*.

Todos los procedimientos fueron realizados con el acuerdo del Comité Científico del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

Tratamiento farmacológico

Modelo animal de dislipidemia

Los conejos fueron aleatorizados en cinco grupos: el grupo de conejos control, el grupo dislipidemia (D), el grupo D+ atorvastatina, el grupo D+ fenofibrato y el grupo D+ combinación (n= 9 para cada uno de los grupos). Los conejos recibieron diariamente por vía oral 0.33 mg/kg de peso de atorvastatina o 2.6 mg/kg de peso de fenofibrato o la combinación de ambos fármacos (0.33 mg/kg de atorvastatina más 2.6 mg/kg de fenofibrato). Adicionalmente, los conejos de los grupos control y dislipidemia recibieron diariamente por vía oral el vehículo de administración de los fármacos (500 µl de aceite de canola).

Modelo animal sin dislipidemia

Los conejos fueron aleatorizados en cuatro grupos: el grupo de conejos control, el grupo atorvastatina, el grupo fenofibrato y el grupo combinación (n= 6 para todos los grupos). Los conejos fueron medicados diariamente por vía oral. Las dosis utilizadas fueron las mismas que

aquellas descritas anteriormente. Adicionalmente, los conejos del grupo control recibieron diariamente por vía oral el vehículo de administración de los fármacos (50 µl de aceite de canola + 450 µl de agua).

La duración de los tratamientos fue de ocho semanas.

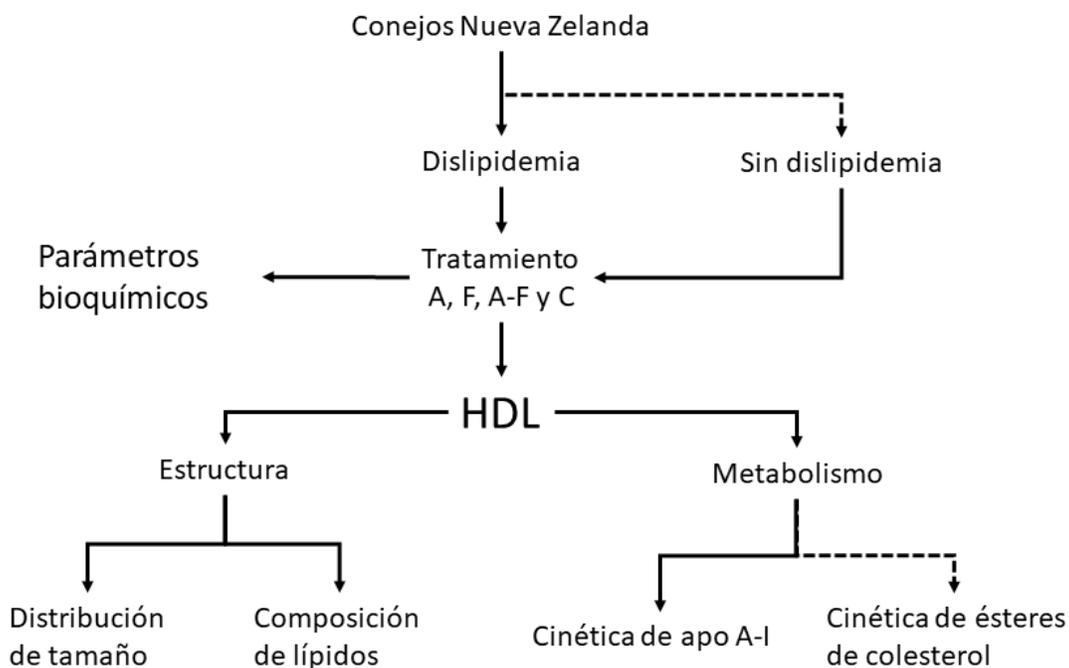


Figura 6. Esquema de la metodología utilizada en este trabajo. Empleamos conejos Nueva Zelanda, a los cuales les generamos dislipidemia con una dieta enriquecida con colesterol al 0.2% p/p y aceite de canola al 2% p/p. Posteriormente, les administramos tratamiento farmacológico A, atorvastatina 0.66 mg/kg/día; F, fenofibrato 2.6 mg/kg/día; A-F, atorvastatina más fenofibrato y C, vehículo de administración. Cuantificamos diferentes parámetros bioquímicos (ver texto) y aislamos las HDL del plasma de todos los conejos. Determinamos la estructura de las HDL mediante la distribución de tamaño y la composición de lípidos de las subpoblaciones de HDL. Además, realizamos cinéticas metabólicas de apo A-I y ésteres de colesterol. La línea punteada indica que la cinética de ésteres de colesterol fue realizada en conejos sin dislipidemia (conejos alimentados con una dieta normal).

Muestras de sangre

Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción de la arteria central de la oreja de los conejos después de un ayuno de diez horas. Las muestras de sangre fueron recolectadas en tubos con anticoagulante (15 UI/ml heparina sódica) y fueron centrifugadas a 1300 g durante 15 minutos.

El plasma fue separado en alícuotas de 1 ml, las cuales fueron utilizadas o congeladas a -70°C hasta su uso.

Parámetros bioquímicos

Las concentraciones plasmáticas de colesterol, triacilgliceroles y glucosa fueron cuantificadas a partir de plasma fresco mediante métodos enzimáticos colorimétricos disponibles comercialmente (Laboratorios Randox, Antrim, Reino Unido y Wako Chemicals, Richmond, VA, EUA). Las concentraciones plasmáticas de los lípidos asociados a las HDL (colesterol; C-HDL, triacilgliceroles; Tg-HDL y fosfolípidos; Ph-HDL) fueron cuantificadas en plasma fresco después de precipitar selectivamente a las lipoproteínas que contienen apo B (VLDL/LDL) con un reactivo de ácido fosfotúngstico/ cloruro de magnesio (Laboratorios Randox, Antrim, RU). El sobrenadante fue recuperado y en éste las concentraciones plasmáticas de C-HDL, Tg-HDL y Ph-HDL fueron cuantificadas mediante métodos enzimáticos colorimétricos. Adicionalmente, la concentración plasmática de apo A-I fue cuantificada en los conejos sin dislipidemia mediante un ensayo de ELISA (Mybiosource, San Diego, CA, EUA). Todas las cuantificaciones fueron realizadas siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Aislamiento de HDL

Las HDL fueron aisladas a partir de plasma mediante ultracentrifugación secuencial. La densidad (δ) de 1 ml de plasma fue ajustada a 1.063 g/ml con bromuro de potasio (KBr) sólido. El plasma δ 1.063 g/ml fue colocado en tubos de policarbonato de 3.2 ml y 2 ml de disolución de KBr (δ 1.063 g/ml) fueron agregados a los tubos para obtener un volumen aproximado de 3 ml. Los tubos con plasma δ 1.063 g/ml fueron centrifugados durante 2.5 h a 10°C y 543 000 g. La fracción del sobrenadante (VLDL/ LDL) fue eliminada y el volumen total de la fracción de plasma restante (HDL) fue ajustado a una δ 1.21 g/ml con KBr sólido. El plasma δ 1.21 g/ml fue colocado en tubos

y el volumen de disolución de KBr (δ 1.21 g/ml) necesario para obtener un total de 3 ml fue agregado a los tubos. Los tubos δ 1.21 g/ml fueron centrifugados durante 3 h a 10 °C y 543 000 g. La fracción del sobrenadante (HDL) fue recuperada y fue centrifugada durante 3 h a 10 °C y 543 000 g con disolución de KBr δ 1.25 g/ml. Finalmente, las HDL fueron recuperadas del sobrenadante y fueron dializadas en una membrana de celulosa con amortiguador TBE (Tris 0.09 mol/l, ácido bórico 0.08 M y EDTA 3 mM, pH 8.4) al menos tres veces.

Determinación de la estructura de las HDL

La estructura de las HDL fue determinada mediante la distribución relativa de tamaño y la concentración de los lípidos de las subpoblaciones de HDL a través de electroforesis en condiciones nativas en geles de poliacrilamida de gradiente 3–30 % a partir de HDL aisladas. Con esta técnica las HDL son separadas en 5 subpoblaciones (HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL3b y HDL3c) en orden decreciente de tamaño.

Brevemente, 25 μ g de proteína HDL (muestra) fueron depositados por pozo en tres geles de poliacrilamida de gradiente 3-30%. La electroforesis fue realizada durante 22 h a 180 V a 10 °C. Los geles fueron teñidos con reactivos enzimáticos desarrollados en el laboratorio y fueron incubados durante 30 minutos a 37 °C en condiciones de oscuridad para revelar colesterol, triacilgliceroles y fosfolípidos (111, 112). Al terminar el periodo de incubación, los geles fueron lavados con agua y fueron escaneados en un densitómetro GS-670 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) para obtener la imagen de lípido correspondiente. Posteriormente, los geles fueron desteñidos con una disolución de metanol, ácido acético y agua (25, 10 y 65 % volumen/ volumen, respectivamente) y fueron teñidos con una disolución de azul de commasie R-250 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) al 0.1 % para revelar proteína. Nuevamente, los geles fueron lavados y escaneados para obtener la imagen de proteína.

La distribución de subpoblaciones de HDL fue estimada mediante densitometría con el software molecular analyst (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Un kit de proteínas globulares de alto peso molecular (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, RU) y los siguientes intervalos de tamaño para cada subpoblación de HDL: HDL 3c, 7.94-8.45 nm; HDL 3b, 8.45-8.98 nm; HDL 3a, 8.98-9.94 nm; HDL 2a, 9.94-10.58 nm; HDL 2b, 10.58-13 nm fueron utilizados para estimar el radio hidrodinámico de las HDL. La proporción relativa de proteína o lípidos de cada subpoblación de HDL fue calculada integrando las áreas bajo la curva para cada subpoblación de HDL con respecto al área bajo la curva total del densitograma. Las concentraciones plasmáticas de colesterol, triacilgliceroles y fosfolípidos de cada subpoblación de HDL fueron calculadas multiplicando la proporción relativa de cada subpoblación de HDL por la concentración plasmática del lípido correspondiente. La distribución relativa de tamaño de las subpoblaciones de HDL fue expresada como proporción relativa de proteína HDL en porcentaje y la concentración de lípidos por cada subpoblación de HDL fue expresada en mg/dl.

Marcado radiactivo de apo A-I

A partir de plasma de conejos donadores, las HDL fueron aisladas mediante ultracentrifugación secuencial como se describió previamente. La parte proteínica de las HDL (apo A-I) fue marcada con el isótopo radiactivo yodo 125 (^{125}I). Brevemente, 1 mg de proteína HDL fue mezclado con 1 mCi de yoduro de sodio (Na^{125}I , 100 mCi/ml, American Radiolabeled Chemicals Inc, San Luis, MO, EUA) y (36 μl) cloramina T en (80 μl) amortiguador de fosfatos (PBS, 150 mM NaCl/8.6 mM Na_2HPO_4 /1.4mM NaH_2PO_4). La mezcla fue agitada durante 3 min. Metabisulfito de sodio (40 μl) y barbital (375 μl) fueron agregados a la mezcla para detener la reacción. Las HDL marcadas con ^{125}I (^{125}I -HDL) fueron separadas en fracciones (350 μl) con una columna de 1 x 10 cm empaquetada con Sephadex G-25 (50-150 μm , Pharmacia Fine Chemicals,

NJ, EUA), 10 ml de solución salina (0.9%) fueron utilizados como eluyente. De esta manera, la radiactividad remanente del ^{125}I libre fue eliminada de la muestra. Las fracciones con elevada concentración de proteínas y radiactividad (^{125}I -HDL) fueron mezcladas. Las ^{125}I -HDL fueron esterilizadas con filtros de 0.22 μm de diámetro (Millipore, Burlington, MA, EUA) y fueron almacenadas a 4 °C hasta su uso.

La cuantificación de proteínas fue realizada mediante el método de Lowry (113).

Cinética metabólica de apo A-I

La cinética metabólica de apo A-I fue realizada en los conejos con dislipidemia durante la octava semana de tratamiento. Brevemente, un bolo de ^{125}I -HDL equivalente a 7×10^7 cuentas por minuto (cpm; por sus siglas en inglés, counts per minute) fue administrado por punción de la vena marginal de la oreja derecha de los conejos. Diversas muestras de sangre de 1 ml fueron obtenidas por punción de la vena de la oreja izquierda a diferentes tiempos; 10 min, 1 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 24 h, 48 h y 72 h. Las muestras de sangre fueron centrifugadas durante 15 min a 4 °C y 1300 g.

La radiactividad de ^{125}I -HDL fue medida en 100 μl de plasma con un contador de radiactividad gamma. Los datos de radiactividad de ^{125}I -HDL fueron ajustados por el decaimiento radiactivo natural del ^{125}I . Con estos datos, las curvas de decaimiento radiactivo de ^{125}I (porcentaje de radiactividad vs tiempo) fueron construidas (Figura 7). La radiactividad de la muestra de sangre obtenida a los 10 min fue utilizada como la radiactividad inicial (100%) de ^{125}I -HDL. Los datos experimentales de las cinéticas fueron ajustados a un modelo bicompartimental para calcular la tasa de catabolismo fraccional (FCR, por sus siglas en inglés Fractional Catabolic Rate) de la apo A-I de las HDL utilizando el software SAAMII (Figura 7).

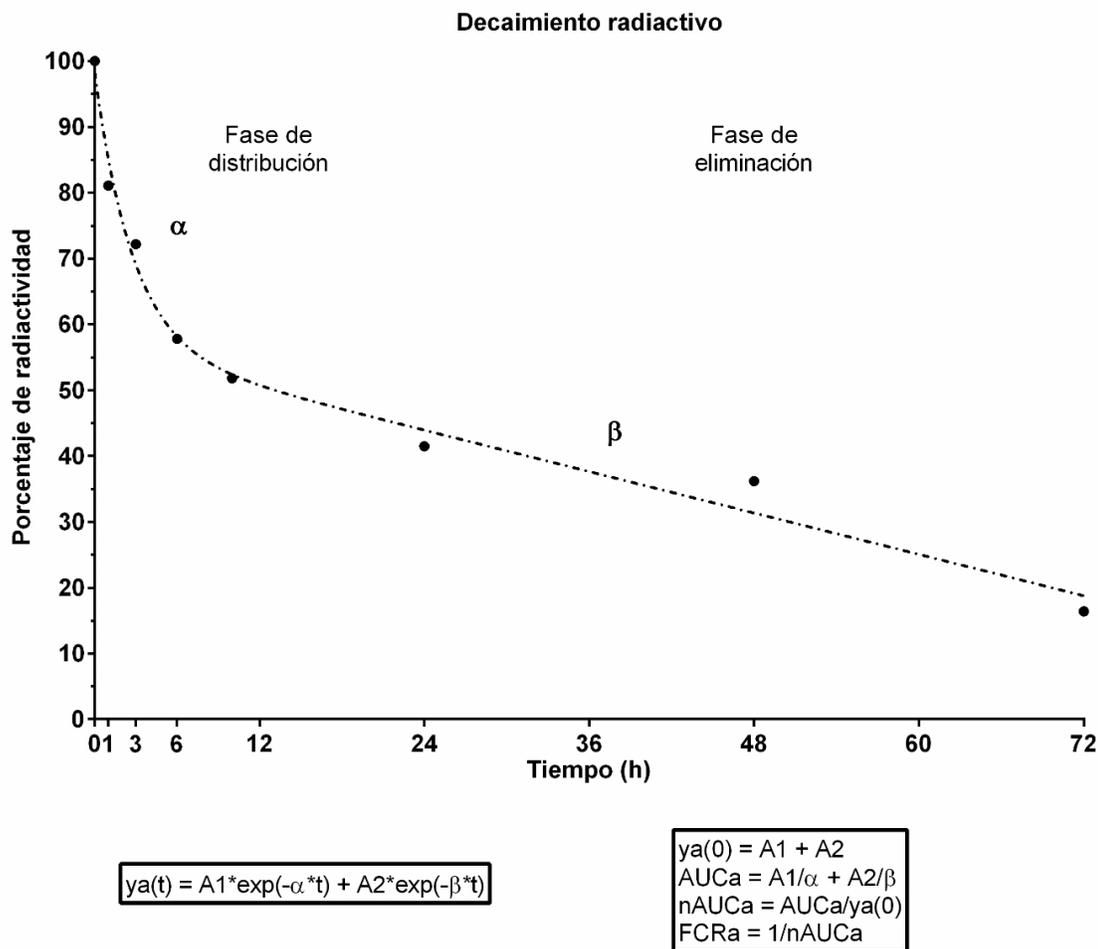


Figura 7. Curva de decaimiento radiactivo. A1= intersección de la recta de distribución con el eje de las ordenadas; A2= intersección de la recta de eliminación con el eje de las ordenadas; α = pendiente de la recta de distribución, β = pendiente de la recta de eliminación; t= tiempo.

Actividad antioxidante de la enzima paraoxonasa 1

La actividad de la PON1 fue determinada usando fenilacetato como sustrato y espectrofotometría a una longitud de onda de 270 nm (57). Un ml de disolución de reacción (fenilacetato 1 mmol/l, cloruro de calcio 0.9 mmol/l y tris-HCL 20 mmol/l, pH 8) fue colocado en una celda de cuarzo y 10 μ l de suero de conejo (dilución 1:40) fueron añadidos a la celda. La absorbancia inicial y a los 3 min fue registrada. La actividad arilesterasa de la PON1 fue expresada como el número de micromoles de fenilacetato hidrolizados por minuto por mililitro de suero. El

coeficiente de extinción molar E_{270} 1310 mol/l cm (114) de la reacción de hidrolisis del fenilacetato fue utilizado para calcular la actividad PON1.

Preparación de ésteres de colesterol de HDL marcados con tritio

Plasma de conejos donadores fue utilizado para obtener ésteres de colesterol de HDL marcados con tritio ($^3\text{H-EC-HDL}$). Diez mililitros de plasma fueron ajustados a δ 1.063 g/ml con KBr. El plasma δ 1.063 g/ml fue centrifugado durante 2.5 h a 10°C y 543 000 g. El sobrenadante fue eliminado y el volumen de plasma δ 1.063 g/ml restante fue dializado contra amortiguador PBS al menos tres veces. Posteriormente, el volumen del plasma fue medido y colocado en un tubo de vidrio. El plasma fue atemperado y mezclado con 1 $\mu\text{l/ml}$ de colesterol marcado radiactivamente con tritio ($^3\text{H-C}$ 1 $\mu\text{Ci/mL}$ $1\alpha,2\alpha(n)\text{-}^3\text{H-}$ colesterol, American Radiolabeled Chemicals Inc, San Luis, MO, EUA). El plasma fue incubado durante 18 h a 37°C con agitación constante para permitir la esterificación del $^3\text{H-C}$ en las HDL por acción de la enzima LCAT. Después del periodo de incubación, las HDL marcadas con tritio ($^3\text{H-EC-HDL}$) fueron aisladas mediante ultracentrifugación secuencial. Las $^3\text{H-EC-HDL}$ fueron separadas en fracciones de 350 μl con una columna de 1 x 10 cm empaquetada con Sephadex G-25 (50-150 μ , Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, USA); 10 ml de solución salina fueron utilizados como eluyente. Con este procedimiento la radiactividad remanente del $^3\text{H-C}$ libre fue eliminada. Las fracciones con elevada concentración de colesterol y radiactividad ($^3\text{H-EC-HDL}$) fueron mezcladas. Las $^3\text{H-EC-HDL}$ fueron esterilizadas con filtros de 0.22 μm de diámetro (Millipore, Burlington, MA, EUA) y fueron almacenadas a 4°C hasta su uso.

Cinética de ésteres de colesterol de HDL marcados con tritio ($^3\text{H-EC-HDL}$)

La cinética metabólica de colesterol fue realizada en los conejos sin dislipidemia. La cinética de colesterol fue realizada durante la quinta semana de tratamiento. Brevemente, un bolo de $^3\text{H-}$

EC-HDL equivalente a 1×10^6 cpm fue administrado por punción de la vena marginal de la oreja derecha de los conejos. Diversas muestras de sangre de 1 ml fueron obtenidas por punción de la vena de la oreja izquierda a diferentes tiempos; 5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, 180 min, 240 min y 300 min.

Las muestras de sangre fueron colocadas en tubos con heparina (15 UI/ml) y fueron centrifugadas durante 15 min a 1300 g y 4 °C. Posteriormente, la fracción de lipoproteínas que contienen apo B (δ 1.063 g/ml, VLDL/LDL) y la fracción de lipoproteínas que contienen apo A (δ 1.21 g/ml, HDL) fueron aisladas mediante ultracentrifugación secuencial. Las fracciones VLDL/LDL y HDL aisladas fueron colocadas en frascos de vidrio con 4 ml de líquido de centelleo. La radiactividad de ^3H -EC-HDL en las fracciones fue medida en un contador de centelleo TRI-CARB 2200CA (Packard Instruments, Downers Grove, IL, EUA).

Análisis compartimental

Los datos experimentales fueron ajustados a un modelo de distribución farmacológica de dos compartimentos. En el modelo (Figura 8) consideramos dos compartimentos principales; el compartimento 1 corresponde a la fracción plasmática HDL y el compartimento 2 a la fracción plasmática VLDL/LDL (Debido al efecto esperado de los tratamientos, concentraciones bajas de LDL son esperadas; por lo tanto, agrupamos a las VLDL y LDL en una sola fracción). Adicionalmente, en el modelo consideramos cuatro constantes de transferencia. La transferencia de ^3H -EC desde la fracción plasmática HDL hacia la fracción VLDL/LDL (transferencia pro-aterogénica) fue representada por la constante de transferencia $K(1, 2)$, la transferencia de ^3H -EC desde la fracción plasmática VLDL/LDL hacia la fracción HDL (transferencia antiaterogénica) fue representada por la constante de transferencia $K(2, 1)$ y las transferencias de salida de ^3H -EC de la fracción HDL y VLDL/LDL fueron representadas por las constantes de transferencia $K(1, 0)$ y

$K(2, 0)$, respectivamente. El modelo y el ajuste matemático fueron realizados con el software SAAMII (SAAM Institute, Washington, EUA). Las tasas de flujo ésteres de colesterol ($\mu\text{mol/l por min}$) fueron calculadas multiplicando la concentración plasmática de ésteres de colesterol por la constante de transferencia correspondiente.

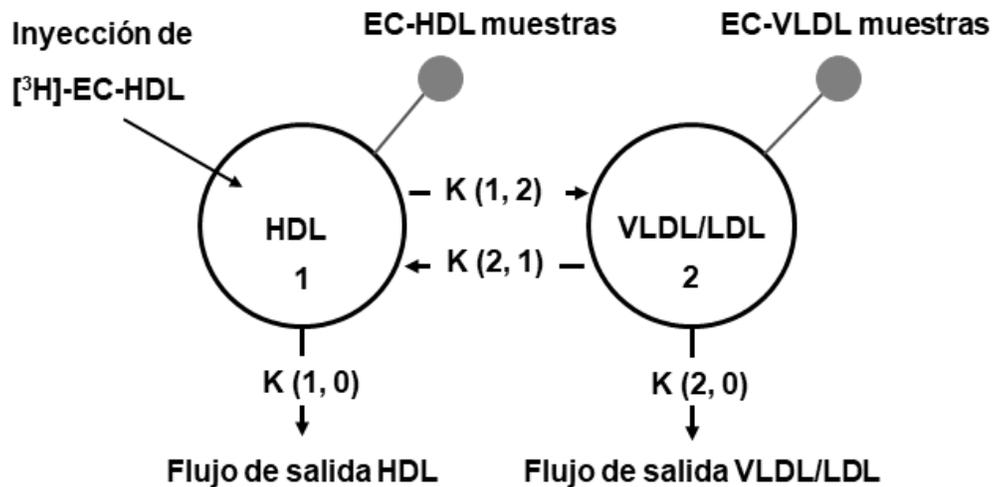


Figura 8. Modelo multicompartimental para la transferencia de EC entre lipoproteínas. Los círculos representan los compartimentos de las dos fracciones de lipoproteínas y las flechas representan la dirección de la transferencia o la vía de eliminación de EC. Los círculos grises representan el compartimento donde las muestras fueron obtenidas.

Determinación de la actividad de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol

La actividad de la CETP fue determinada a partir de plasma de cinco donadores humanos clínicamente sanos. La fracción VLDL/LDL (δ 1.063 g/ml) fue aislada del plasma mediante ultracentrifugación secuencial y fue refrigerada hasta su uso. El plasma restante que contiene a las HDL y a la LCAT fue dializado contra amortiguador PBS al menos 3 veces y el plasma dializado fue marcado con $^3\text{H-C}$ (1 $\mu\text{l/ml}$ de plasma; $1\alpha,2\alpha(n)\text{-}^3\text{H-cholesterol}$, American Radiolabeled Chemicals Inc, San Luis, MO, EUA) como se describió anteriormente. Posteriormente, la fracción de HDL3 ($^3\text{H-EC-HDL3}$, δ 1.12 g/ml) marcada radiactivamente fue aislada mediante ultracentrifugación secuencial. Las $^3\text{H-EC-HDL3}$ aisladas fueron refrigeradas hasta su uso. La actividad CETP fue determinada de la siguiente manera; 3 μl de $^3\text{H-EC-HDL3}$ (120 mg/ml de

proteína), 100 µl de VLDL/LDL (2.5 mg/ml de proteína) y 10 µl de plasma de conejo que contiene a la CETP fueron mezclados en tubos con 500 µl de amortiguador tris (10 mM). Los tubos con la mezcla fueron incubados durante 16 h a 37 °C. Al finalizar la incubación, 10 µl de la mezcla de reacción fueron colocados en frascos de vidrio con líquido de centelleo para medir la radiactividad total. Por otra parte, las VLDL/LDL fueron precipitadas con 50 µl de una disolución de dextran sulfato (10 g/l) y sulfato de magnesio (0.5 M). La mezcla de reacción fue centrifugada durante 10 min a 1300 g y 4 °C. El sobrenadante fue separado y colocado en frascos con líquido de centelleo. La radiactividad fue medida en un contador de centelleo. La actividad de transferencia de lípidos de la CETP fue expresada como el porcentaje de radiactividad transferida desde las HDL3 (sobrenadante) hacia las VLDL/LDL por diez µl de plasma de conejo durante 16 h. Las muestras fueron realizadas por duplicado. Además, blanco de reactivo y de muestra fueron incluidos con cada determinación.

$$[\text{Radiactividad total (cpm)} - \text{Radiactividad HDL3 (cpm)} / \text{Radiactividad total (cpm)}] * 100$$

Composición de ácidos grasos de las HDL

La composición de los ácidos grasos de las HDL fue realizada mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC- MS por sus siglas en inglés). A partir de HDL aisladas, los lípidos totales fueron extraídos mediante el método de Folch (Anexo 1). Los ácidos grasos fueron esterificados (metilados) con una disolución anhidra de benceno:metanol y ácido sulfúrico (Anexo 1). La preparación de la muestra para la cromatografía de gases fue realizada de la siguiente manera: cinco µl de oleato de etilo (1:50 en hexano, control interno) y 15 µl de hexano fueron añadidos a las muestras de ácidos grasos metilados. 0.8 µl de la mezcla fueron inyectados en el cromatógrafo de gases. Los ácidos grasos metilados fueron separados y analizados en un sistema GC-MS Hewlett Packard 5890/5972. Las siguientes condiciones fueron utilizadas para la

cromatografía: columna capilar recubierta con polietilenglicol de 30 m de longitud, 0.32 mm de diámetro y 0.5 μm de grosor del recubrimiento (HP-INNOWAX 19091N-213, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, EUA), gas helio (0.999% pureza) como fase móvil con una presión de 244 kPa, split flow 15 ml/min, temperatura del inyector 240 °C, temperatura del detector 260 °C, temperatura inicial del horno 170 °C y temperatura final del horno 260 °C y tiempo total del análisis 21 min. Los espectros de masa fueron obtenidos con una energía ionizante de 70 eV y rango de escaneo de 50 a 700 a.m.u a 1.5 escaneos/seg. Los ácidos grasos metilados fueron identificados al comparar el tiempo de retención y el espectro de masa con aquellos de los ácidos grasos esterificados utilizados como estándar. Las condiciones fueron probadas y estandarizadas con las siguientes mezclas de ácidos grasos esterificados Supelco Fame Mix GLC-10, GLC-20 y GLC-50 (Sigma- Aldrich, San Luis, MO, EUA).

Análisis estadístico

La distribución normal de los datos fue determinada con la prueba Kolmogorov-Smirnov. Los datos con distribución normal fueron expresados como media \pm error estándar. Las comparaciones entre grupos fueron realizadas con la prueba ANOVA. Los datos sin distribución normal fueron expresados como mediana \pm rango intercuartilar y las comparaciones entre grupos fueron realizadas con la prueba Kruskal-Wallis. Las pruebas estadísticas fueron realizadas con el software IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 21 para Windows. Todas las comparaciones fueron consideradas estadísticamente diferentes con un valor de $p < 0.05$.

Resultados

Parámetros bioquímicos.

Determinamos el efecto del tratamiento con atorvastatina, fenofibrato y la combinación de ambos fármacos sobre diferentes parámetros bioquímicos en conejos con y sin dislipidemia. La concentración plasmática de colesterol fue nueve veces mayor en los conejos con dislipidemia que aquella en los conejos control (Tabla 1). Adicionalmente, la concentración plasmática de triacilgliceroles sólo incrementó 30% en los conejos con dislipidemia con respecto a aquella en los conejos control. Por otra parte, las concentraciones plasmáticas de colesterol y triacilgliceroles en los conejos con dislipidemia que recibieron tratamiento con atorvastatina (D+ atorvastatina) y fenofibrato (D+ fenofibrato) fueron similares a aquellas de los conejos con dislipidemia (Tabla 1). Sin embargo, la concentración plasmática de colesterol disminuyó 3 veces en los conejos con dislipidemia que recibieron el tratamiento combinado (D+ combinación) con respecto a aquella en los conejos dislipidemia (Tabla 1). De manera similar, la concentración plasmática de triacilgliceroles disminuyó 40% en los conejos D+ combinación con respecto a aquella en los conejos con dislipidemia. Adicionalmente, las concentraciones plasmáticas de C-HDL, Tg-HDL y Ph-HDL en los conejos D+ combinación fueron similares a aquellas de los conejos control, mientras que en los conejos D+ atorvastatina y D+ fenofibrato estas concentraciones fueron similares a aquellas en los conejos con dislipidemia (Tabla 1). Por otra parte, la actividad antioxidante determinada por la actividad de la enzima PON1 fue similar en todos los grupos de conejos con dislipidemia (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros bioquímicos y actividad antioxidante (PON1) en conejos con dislipidemia

Parámetros	Control <i>n</i> = 9	Dislipidemia <i>n</i> = 9	D+ atorvastatina <i>n</i> = 9	D+ fenofibrato <i>n</i> = 9	D+ combinación <i>n</i> = 9
Colesterol	56.5 ± 5.3	515 ± 73.8 ^a	510.7 ± 58.5 ^a	605 ± 123.2 ^b	340.9 ± 38.8 ^{a,b,c,d}
Tg	58.9 ± 5.5	80.9 ± 10.2 ^a	77 ± 14.1 ^a	60 ± 7.6 ^a	45.3 ± 5.6 ^b
Glucosa	94.4 ± 1.9	126.7 ± 12.1 ^a	116.7 ± 9.1 ^a	107.6 ± 6.8	112.6 ± 5.1
C-HDL	25.6 ± 3.0	37.5 ± 7.2 ^a	36 ± 4.4 ^a	36.1 ± 3.3 ^a	32.4 ± 2.6 ^{a,b,c,d}
Tg-HDL	24.4 ± 1.8	11.4 ± 1.7 ^a	16.7 ± 3.0 ^a	20.3 ± 1.8 ^b	25.2 ± 3.4 ^{b,c}
Ph-HDL	70.4 ± 3.7	41.5 ± 6.6 ^a	53.2 ± 5.7 ^a	56.4 ± 2.6 ^{a,b}	59.8 ± 3.9 ^{a,b}
PON1	360.7 ± 28.0	324.1 ± 29.0	305.7 ± 3.0	349.3 ± 38.3	316.6 ± 15.8

Tg, triacilglicerol; C-HDL, colesterol de lipoproteínas de alta densidad; Tg-HDL, triacilglicerol de lipoproteínas de alta densidad; Ph-HDL, fosfolípidos de lipoproteínas de alta densidad; PON1, paraoxonasa1. Los datos son media ± error estándar y están expresados en mg/dl y en μmol/ml/min para la actividad PON1. Prueba ANOVA, *p* < 0.05 vs. a conejos control, b dislipidemia, c D+ atorvastatina y d D+ fenofibrato.

En cuanto, al efecto de los tratamientos sobre los diferentes parámetros bioquímicos en los conejos sin dislipidemia, observamos que tuvieron efectos limitados sobre las concentraciones plasmáticas de los lípidos de estos conejos. Las concentraciones plasmáticas de colesterol y glucosa fueron similares entre todos los conejos tratados y los conejos control (Tabla 2). Por su parte, el tratamiento con fenofibrato tendió a disminuir la concentración plasmática de triacilglicerol (Tabla 2). Las concentraciones plasmáticas de C-HDL y Ph-HDL en los conejos tratados con la combinación fueron 44 y 24 % mayores, respectivamente, que aquellas en los conejos control (Tabla 2). Adicionalmente, las concentraciones plasmáticas de C-HDL y Ph-HDL fueron diferentes entre los conejos tratados sólo con atorvastatina o fenofibrato y los conejos tratados con la combinación (Tabla 2). Finalmente, las concentraciones plasmáticas de apo A-I en los conejos tratados con fenofibrato y la combinación incrementaron 55 y 41 %, respectivamente, con respecto a aquellas en los conejos control (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros bioquímicos en conejos sin dislipidemia

Parámetro	Control n = 6	Atorvastatina n = 6	Fenofibrato n = 6	Combinación n = 6
Colesterol	54.49 ± 2.34	46.02 ± 4.09	48.86 ± 6.40	50.23 ± 2.73
Triacilgliceroles	66.28 ± 4.46	82.43 ± 20.06	58.65 ± 7.37	66.45 ± 10.09
Glucosa	112.6 ± 5.76	113.14 ± 2.52	115.12 ± 5.04	109.90 ± 1.80
C-HDL	30.60 ± 1.17	30.55 ± 2.11	34.48 ± 3.54	43.96 ± 4.70 ^{a,b,c}
Tg-HDL	37.02 ± 5.08	39.11 ± 5.63	32.88 ± 1.85	41.19 ± 8.57
Ph-HDL	76.32 ± 6.79	73.73 ± 3.20	71.58 ± 7.03	94.79 ± 8.22 ^{b,c}
Apo A-I	398.6 ± 32.6	408.1 ± 20.8	617.6 ± 10.8 ^a	560.2 ± 77.0 ^a

C-HDL, colesterol de lipoproteínas de alta densidad; Tg-HDL, triacilgliceroles de lipoproteínas de alta densidad; Ph-HDL, fosfolípidos de lipoproteínas de alta densidad; Apo A-I, apolipoproteína AI. Los datos son media aritmética ± error estándar y están expresados en mg/dl. Prueba ANOVA, $p < 0.05$ vs. a conejos control, b atorvastatina y c fenofibrato.

Estructura de las lipoproteínas de alta densidad.

La estructura de las HDL fue determinada con base en la distribución relativa de tamaño y la concentración de los lípidos de las subpoblaciones de HDL. La distribución de subpoblaciones de HDL fue realizada mediante electroforesis de geles de poliacrilamida en gradiente 3-30% en condiciones nativas y el análisis densitométrico de los geles. Con respecto a la distribución relativa de tamaño de las subpoblaciones de HDL, la proporción relativa de la subpoblación HDL2b (subpoblación grande) fue 24, 20 y 38% mayor en los conejos D+ atorvastatina, D+ fenofibrato y D+ combinación respectivamente, que aquella en los conejos control (Figura 9). La proporción relativa de las subpoblaciones HDL2a y HDL3a fue 20 y 15 % menor en los conejos D+ atorvastatina y D+ combinación respectivamente, que aquella en los conejos control (Figura 9) y la proporción relativa de la subpoblación HDL3c fue dos veces mayor en los conejos dislipidemia que aquella en los conejos control (Figura 9).

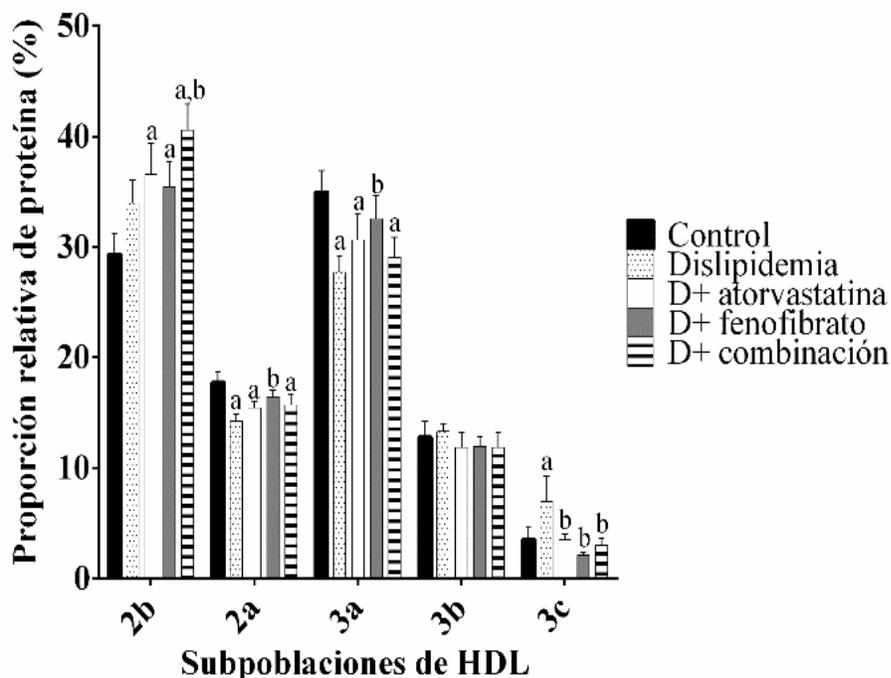


Figura 9. Distribución relativa de tamaño de subpoblaciones de HDL en conejos con dislipidemia. La combinación atorvastatina–fenofibrato incrementa el tamaño de las HDL. Distribución relativa de tamaño de subpoblaciones de HDL. El área total bajo la curva de los densitogramas fue considerada como el 100% y las áreas parciales entre los intervalos de tamaño como el porcentaje relativo de cada subpoblación de HDL. Los datos son media \pm error estándar. $n = 9$. ANOVA, $p < 0.05$ vs. a control, b dislipidemia.

En cuanto a la composición de lípidos, la concentración de colesterol en la subpoblación HDL2b fue hasta 50% mayor en todos los grupos de conejos alimentados con la dieta alta en grasa (Figura 10a) que aquella en los conejos control. De manera similar, la concentración de colesterol en las subpoblaciones HDL3a, HDL3b y HDL3c incrementó en todos los conejos alimentados con la dieta alta en grasa (Figura 10a). La concentración de triacilgliceroles en las subpoblaciones de HDL del grupo D+ combinación fue similar a aquella del grupo control (Figura 10c), mientras que en el resto de los grupos esta concentración tendió (sin significado estadístico) a disminuir (Figura 10c). La concentración de fosfolípidos en la subpoblación HDL2b del grupo D+ combinación fue similar a aquella del grupo control, mientras que en el resto de los grupos esta concentración disminuyó (Figura 10b).

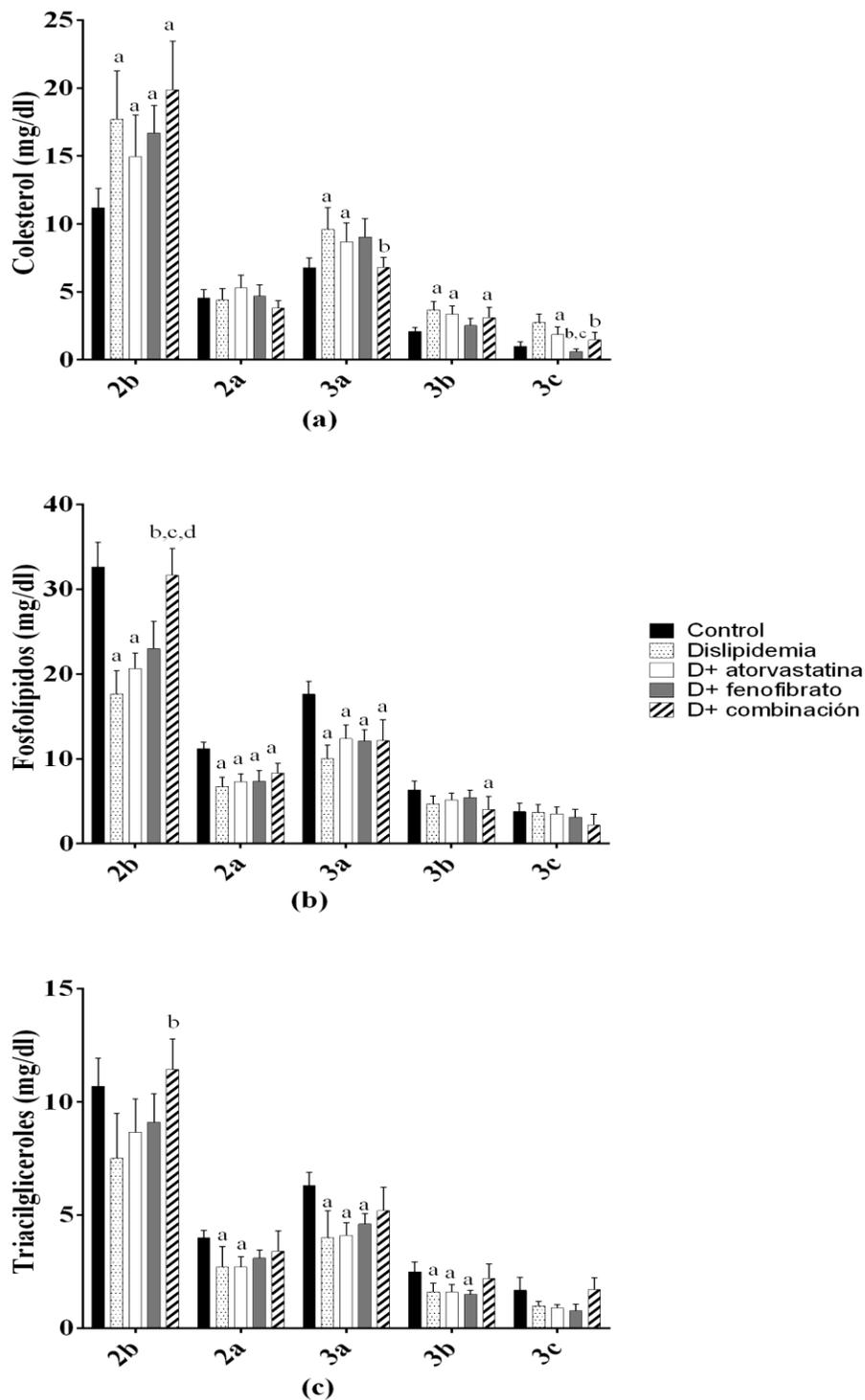


Figura 10. Concentración de los lípidos de las subpoblaciones de HDL en conejos con dislipidemia. La combinación atorvastatina-fenofibrato incrementa la concentración de colesterol y fosfolípidos en las subpoblaciones grandes. Los datos son media \pm error estándar. $n = 9$. ANOVA, $p < 0.05$ vs. a control, b dislipidemia, c D+ atorvastatina y d D+ fenofibrato.

En los conejos sin dislipidemia, además de la distribución relativa de tamaño de subpoblaciones de HDL, determinamos el tamaño máximo de la subpoblación dominante de las HDL mediante el análisis densitométrico de los geles y observamos un desplazamiento del punto máximo de absorbancia hacia las subpoblaciones grandes de las HDL de los conejos tratados con atorvastatina o fenofibrato individualmente, con respecto a aquel de los conejos control (Figura 11a, atorvastatina y fenofibrato a 10.39 ± 0.08 nm vs. control a 10.06 ± 0.04 nm, $p = 0.011$). Sin embargo, el mayor desplazamiento del punto máximo de absorbancia hacia la subpoblación grande HDL2b fue en los conejos tratados con la combinación (Figura 11a, punto máximo de absorbancia a 10.67 ± 0.10 nm vs. control a 10.06 ± 0.04 nm, $p < 0.001$). Adicionalmente, la distribución de tamaño de las HDL de los conejos tratados con la combinación cambió hacia la subpoblación HDL2b (Figura 11b). La distribución de tamaño de las HDL de los conejos tratados con atorvastatina y fenofibrato individualmente fue similar a aquella de los conejos control (Figura 11b).

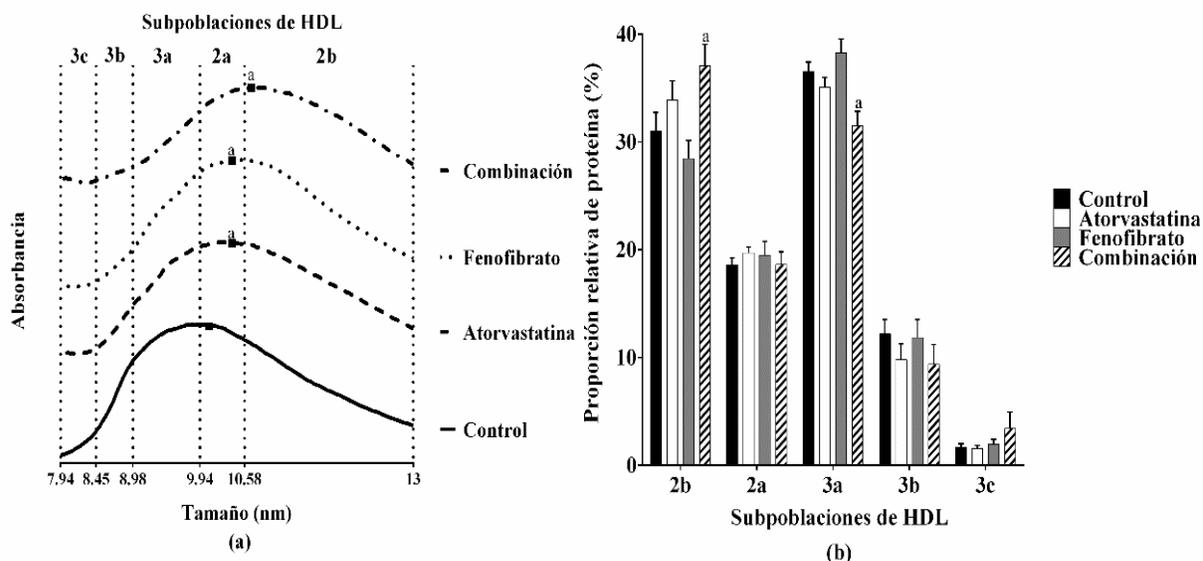


Figura 11. Distribución de tamaño de HDL en conejos sin dislipidemia. (a) Gráfica de tamaño máximo de subpoblaciones de HDL. Unidades arbitrarias de absorbancia utilizadas en el eje vertical. (b) Distribución relativa de tamaño de subpoblaciones de HDL. El área total bajo la curva de los densitogramas fue considerada como el 100% y las áreas parciales entre los intervalos de tamaño como el porcentaje relativo de cada subpoblación de HDL. Los datos son media \pm error estándar. $n = 9$. ANOVA, $p < 0.05$ vs. a control, b atorvastatina.

En cuanto a la concentración de colesterol por subpoblación de HDL, esta fue similar entre los conejos que sólo recibieron atorvastatina o fenofibrato y aquella de los conejos control (Figura 12a). Sin embargo, la concentración de colesterol fue incrementada en un 40 % en las subpoblaciones HDL2b, HDL2a y HDL3a de los conejos tratados con la combinación con respecto a aquella del grupo control (Figura 12a). De manera similar, el tratamiento en combinación incrementó en un 35 y 15 % la concentración plasmática de fosfolípidos en las subpoblaciones HDL2b y HDL2a, respectivamente, con respecto a aquella de los conejos control (Figura 12b). Adicionalmente, la concentración plasmática de fosfolípidos en las subpoblaciones HDL2b y HDL2a fue diferente entre los conejos tratados con atorvastatina o fenofibrato individualmente y los conejos tratados con la combinación (Figura 12b). Finalmente, no hubo cambios en la concentración plasmática de triacilglicérols de las subpoblaciones de HDL entre los cuatro grupos de conejos (Figura 12c).

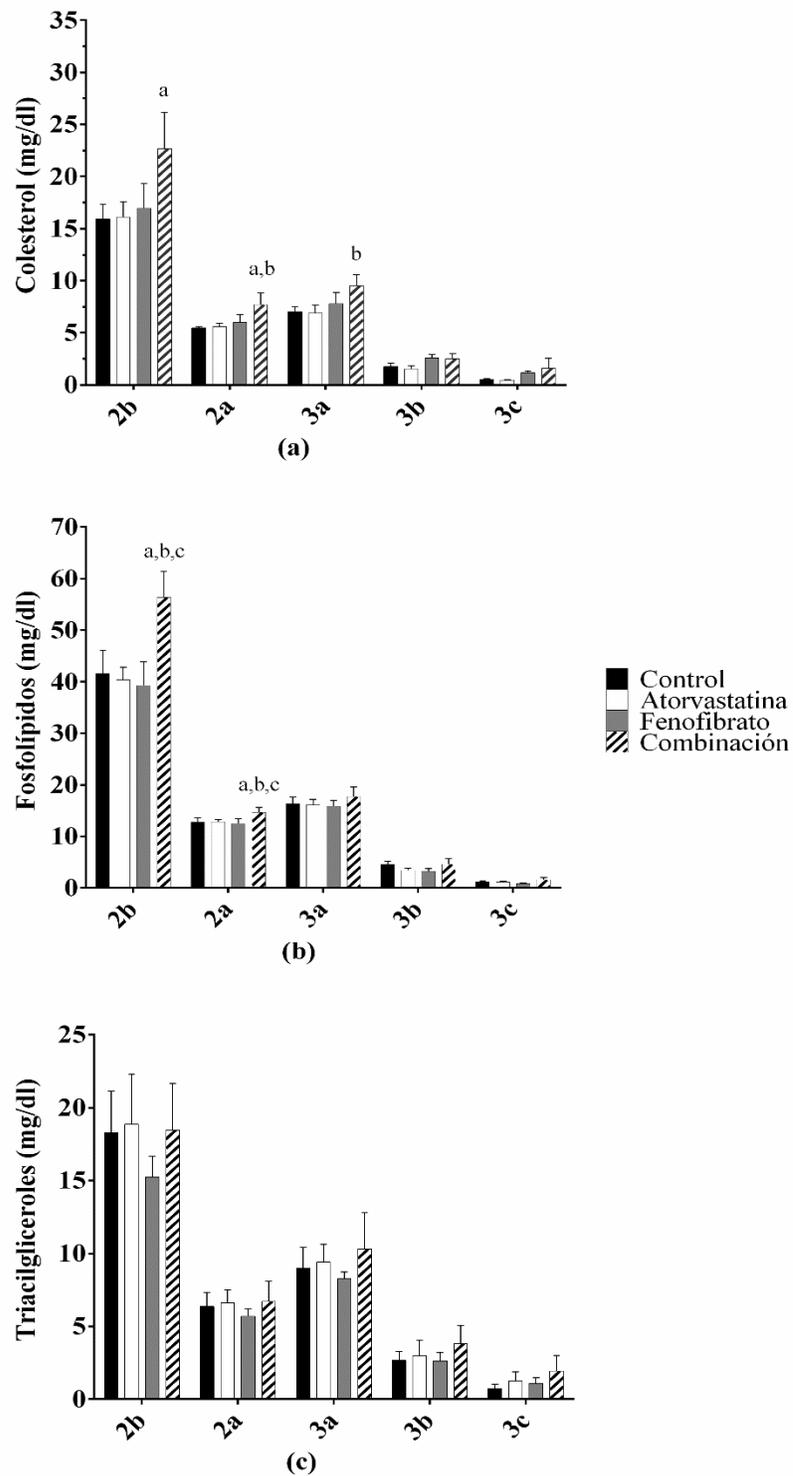


Figura 12. Concentración de los lípidos de las subpoblaciones de HDL en conejos sin dislipidemia. La combinación atorvastatina-fenofibrato incrementa la concentración de colesterol y fosfolípidos en las subpoblaciones grandes. Los datos son media \pm error estándar. $n = 6$. ANOVA, $p < 0.05$ vs. a control, b atorvastatina, c fenofibrato.

Catabolismo de la apo A-I de las HDL en conejos con dislipidemia

Algunos reportes sugieren que el tamaño y la composición de las HDL podrían estar relacionados con la depuración de la apo A-I. Por lo tanto, realizamos estudios cinéticos para calcular el FCR de la apo A-I de las HDL. El FCR de la apo A-I del grupo dislipidemia disminuyó 20 % con respecto al FCR de los conejos control mientras que el FCR de la apo A-I de los grupos D+ atorvastatina, D+ fenofibrato y D+ combinación aumentó 25, 15 y 30 % respectivamente, con respecto al FCR de los conejos control (Tabla 3). En resumen, los tratamientos farmacológicos aumentaron la depuración de la apo A-I de las HDL.

Tabla 3. Tasa de catabolismo fraccional de la apo A-I de las HDL.

Grupos	FCR (h⁻¹) apo A-I	p vs control	p vs dislipidemia
Control	0.0241 ± 0.0010		0.003
Dislipidemia	0.0186 ± 0.0011	0.003	
D + atorvastatina	0.0298 ± 0.0017	0.021	< 0.001
D + fenofibrato	0.0274 ± 0.0009	0.033	< 0.001
D + combinación	0.0311 ± 0.0017	0.004	< 0.001

FCR, tasa de catabolismo fraccional. Los datos son media ± error estándar. *n* = 9. Prueba ANOVA.

Composición de ácidos grasos de las HDL

Determinamos la composición de ácidos grasos en las HDL mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). La cantidad relativa de ácidos grasos saturados disminuyó mientras que la cantidad relativa de ácidos grasos insaturados incrementó en las HDL de los conejos sin dislipidemia que recibieron tratamiento (efecto independiente del tratamiento). La cantidad relativa de ácido palmítico (16:0) disminuyó en un 30, 25 y 27 % en las HDL de los conejos sin dislipidemia tratados con atorvastatina, fenofibrato y la combinación, respectivamente, con respecto a aquella de los conejos control (Figura 13). De manera similar, la cantidad relativa de ácido esteárico (18:0) disminuyó aproximadamente 25 % en las HDL de todos los conejos sin dislipidemia tratados, con respecto a aquella de los conejos control (Figura 13). En contraste, la

cantidad relativa de ácido oleico (18:1, Δ^9) incrementó en un 79, 61 y 74 % en las HDL de los conejos sin dislipidemia tratados con atorvastatina, fenofibrato y la combinación, respectivamente, con respecto a aquella de los conejos control. Finalmente, la cantidad relativa de ácido linoleico (18:2, $\Delta^{9,12}$) incrementó en un 60, 68 y 64 % en las HDL de los tres grupos de conejos sin dislipidemia tratados con respecto a aquella de los conejos control (Figura 13).

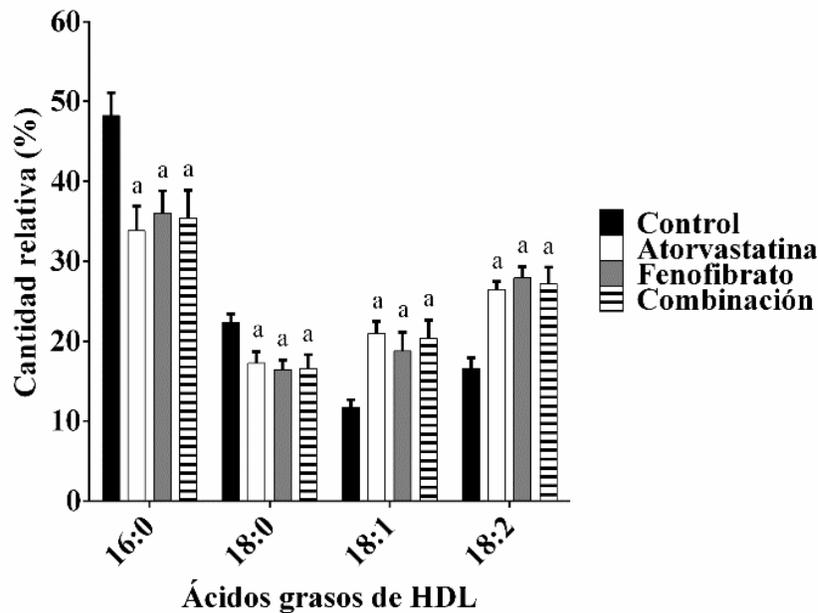


Figura 13. Composición de ácidos grasos de HDL. La cantidad relativa de ácidos grasos totales de HDL cambió de ácidos grasos saturados a ácidos grasos insaturados en las HDL de los conejos tratados. A partir de HDL aisladas los ácidos grasos totales fueron extraídos. Los ácidos grasos fueron determinados por CG-MS. Los ácidos grasos fueron identificados por su tiempo de retención y espectro de masas; 16:0, ácido palmítico; 18:0, ácido esteárico; 18:1, ácido oleico; 18:2, ácido linoleico. Los datos son media \pm error estándar. $n = 6$. ANOVA $p < 0.05$ a vs control.

Estudios cinéticos in vivo de ésteres de colesterol de HDL marcados con tritio

Para explorar si las modificaciones de la estructura de las HDL tienen efecto sobre el transporte de colesterol, realizamos estudios cinéticos (in vivo) de ésteres de colesterol (EC- ^3H -HDL) marcados con tritio en los conejos sin dislipidemia. El intercambio de los EC entre lipoproteínas (HDL hacia VLDL/LDL y viceversa) fue incrementado en los conejos que recibieron tratamiento. La transferencia de masa de EC desde las HDL hacia las VLDL/LDL fue cuatro y siete veces mayor

en los conejos tratados con atorvastatina y la combinación, respectivamente, que aquella en los conejos control (Tabla 4). El tratamiento con fenofibrato incrementó la transferencia de EC tres veces desde la fracción HDL hacia VLDL/LDL y dos veces desde la fracción VLDL/LDL hacia HDL, con respecto a aquellas del grupo control. Sin embargo, los incrementos no fueron estadísticamente significativos. Adicionalmente, la eliminación de EC a través de la fracción HDL fue aproximadamente dos veces mayor en los conejos tratados con la combinación que aquella en los conejos control (Tabla 4). En contraste, la eliminación de EC a través de la fracción VLDL/LDL disminuyó a la mitad con el tratamiento de fenofibrato con respecto a aquella de los conejos tratados con atorvastatina y control (Tabla 4).

Tabla 4. Transferencia de ésteres de colesterol entre lipoproteínas

Constantes	Flujos de masa de EC	Control <i>n</i> = 6	Atorvastatina <i>n</i> = 6	Fenofibrato <i>n</i> = 6	Combinación <i>n</i> = 6
K (1, 2)	HDL hacia VLDL/LDL	10.60 (8.09–12.29)	71.30 ^a (43.45–84.11)	32.74 (9.23–64.87)	38.92 ^a (21.65–51.77)
	VLDL/LDL hacia HDL	11.46 (5.19–22.16)	80.63 ^a (52.42–101.25)	23.37 (12.62–68.91)	82.81 ^a (10.55–190.81)
K (1, 0)	Flujo de salida HDL	3.28 (3.06–5.14)	4.69 (3.22–6.70)	2.34 (1.66–5.56)	5.69 ^a (5.20–6.31)
	Flujo de salida VLDL/LDL	8.08 (5.07–9.55)	7.26 (6.67–9.19)	3.94 ^{a,b} (2.22–4.98)	5.83 (3.89–18.91)

Los datos son media y rango intercuartilar. Las transferencias de masa de ésteres de colesterol están expresadas en $\mu\text{mol/l}$ por minuto. Prueba Kruskal-Wallis, $p < 0.05$ vs. a control y b atorvastatina.

Actividad de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol

Para explicar si las elevadas transferencias de EC entre lipoproteínas fueron debido a un incremento en la actividad de transferencia de lípidos de la CETP, determinamos dicha actividad en el plasma de los conejos. La actividad de transferencia de la CETP fue similar entre todos los conejos tratados y control ($25.02 \pm 3.03\%$, $24.48 \pm 2.32\%$, $25.12 \pm 2.82\%$, and $23.10 \pm 3.78\%$ para los conejos tratados con atorvastatina, fenofibrato, combinación y control, respectivamente, $p > 0.05$).

Discusión

La ineficacia de los tratamientos farmacológicos dirigidos a reducir el riesgo cardiovascular a través de incrementar las concentraciones de C-HDL (93-96), indica que el C-HDL no refleja la funcionalidad de estas lipoproteínas. De hecho, la estructura (tamaño, contenido de lípidos y proteínas) de las HDL es un mejor marcador de sus funciones antiaterogénicas (115). Por ejemplo, cambios en el contenido de lípidos de las HDL sin incremento de la concentración de C-HDL han sido asociados con el incremento de tejido adiposo café en ratones. A su vez, la activación del tejido adiposo café ha sido asociado con un eflujo de colesterol de las HDL mejorado (49), el cual esta inversamente relacionado con el riesgo de enfermedades cardiovasculares (116). De acuerdo con esta idea, en este estudio determinamos la estructura y composición lipídica de las HDL, así como su funcionalidad durante el tratamiento con atorvastatina y fenofibrato en conejos Nueva Zelanda con dislipidemia exógena.

En la primera parte del estudio, determinamos el efecto de la combinación atorvastatina-fenofibrato sobre la composición, función antioxidante (determinada por la actividad PON1) y metabolismo de las HDL (el catabolismo de la apo A-I) en conejos Nueva Zelanda en condiciones de dislipidemia.

Generamos dislipidemia exógena en los conejos mediante una dieta enriquecida con colesterol y aceite de canola. La dislipidemia generada tuvo concentraciones de colesterol muy elevadas en los conejos (nueve veces mayores que aquellas en los conejos control) y, en consecuencia, la dislipidemia exógena generada en nuestro modelo fue parcialmente refractaria a los fármacos utilizados individualmente a dosis similares a las prescritas en los humanos (20 mg de atorvastatina y 160 mg de fenofibrato por día). Sin embargo, la combinación atorvastatina-fenofibrato disminuyó las concentraciones plasmáticas de colesterol en nuestro modelo de dislipidemia exógena. En este sentido, diversos estudios clínicos han sugerido que los efectos benéficos del uso de la combinación

de estatinas y fibratos superan a aquellos de cada fármaco individualmente en pacientes con EAC (117-120). Estos efectos benéficos pueden ser debido a una sinergia entre los fármacos y/o a una mejora en la función de las HDL (67, 121).

Utilizamos conejos Nueva Zelanda debido a la similitud de su metabolismo con el de los humanos (122). Además, esta especie ha sido ampliamente utilizada para evaluar el metabolismo de las lipoproteínas (91, 123-129).

En el modelo de dislipidemia exógena, la concentración de C-HDL disminuyó en los conejos tratados con atorvastatina y fenofibrato individualmente. Contrariamente, en los conejos tratados con la combinación (atorvastatina-fenofibrato) la concentración de C-HDL incrementó con respecto a aquella en los conejos control. El C-HDL ha sido ampliamente utilizado como marcador de riesgo cardiovascular (130). El incremento de C-HDL en los conejos con dislipidemia tratados con la combinación parece estar asociado con la acumulación del colesterol en las HDL, lo cual es consistente con el incremento de tamaño de las HDL (elevada proporción de la subpoblación HDL2b, Figura 9) y con el incremento en las concentraciones plasmáticas de colesterol de las cinco subpoblaciones de HDL de los conejos con dislipidemia tratados con la combinación (Figura 10). Sin embargo, concentraciones elevadas de C-HDL no siempre resultan en una disminución del riesgo cardiovascular. El tratamiento con inhibidores de CETP incrementa el C-HDL, sin embargo, este incremento de C-HDL no reduce el riesgo cardiovascular (96, 131, 132).

Por otra parte, las concentraciones plasmáticas de triacilgliceroles en algunas subpoblaciones de HDL de los conejos con dislipidemia disminuyeron con los tratamientos individuales. Esta disminución sugiere que las HDL tienen una menor proporción de triacilgliceroles y una mayor proporción de colesterol en las subpoblaciones de HDL. Sin embargo, en las subpoblaciones de HDL de los conejos tratados con la combinación esto no ocurre. Por lo tanto, la composición de

las HDL de los conejos con dislipidemia tratados con la combinación es similar a aquella de los conejos control.

Varios estudios han postulado que la composición de las HDL está relacionada con sus propiedades antiaterogénicas. Al respecto, se sabe que la asociación de las HDL con la enzima PON1 depende de su estructura (133, 134). Nuestros resultados demuestran que, a pesar de las modificaciones observadas en la composición de las HDL, la actividad PON1 no cambia en los diferentes grupos de conejos con dislipidemia. Este resultado indica claramente que ni la atorvastatina, ni el fenofibrato, ni la combinación de ambos fármacos y ni las concentraciones elevadas de colesterol modifican la asociación de las HDL con la PON1 (en este modelo).

De manera similar, la composición de las HDL está relacionada con su catabolismo (58, 67, 112, 121, 126, 135, 136). HDL grandes han sido asociadas con un catabolismo lento, mientras que las HDL pequeñas con un catabolismo rápido (58, 121, 135). Realizamos estudios cinéticos de apo A-I (depuración plasmática de la apo A-I de las HDL) y calculamos el FCR de la apo A-I de las HDL. Contrario a lo esperado, no observamos una diferencia en el tamaño de las HDL entre los conejos con dislipidemia y los conejos control, sin embargo, la depuración de la apo A-I de los conejos con dislipidemia fue más lenta con respecto a aquella de los conejos control y de los conejos dislipidémicos tratados con atorvastatina, fenofibrato y la combinación (Tabla 3). Posiblemente, las elevadas concentraciones de colesterol en las VLDL/LDL de estos conejos saturaron los receptores de apo E, lo cual disminuyó la velocidad de eliminación de las lipoproteínas o la lenta depuración de la apo A-I puede ser consecuencia de una interacción competitiva entre la apo A-I y otras lipoproteínas (quilomicrones) para unirse al receptor apo E. Los receptores de apo E forman parte de una importante ruta catabólica de lipoproteínas en los conejos (137). Paradójicamente, HDL grandes y enriquecidas con triacilgliceroles tienen un

catabolismo más lento que aquel de las HDL normales en conejos (138). Sin embargo, en nuestro estudio, las HDL no estuvieron enriquecidas con triacilglicérolos.

Por otra parte, los tratamientos con atorvastatina, fenofibrato y la combinación indujeron un cambio en la distribución de subpoblaciones de HDL hacia partículas grandes. No obstante, la tasa de catabolismo fraccional de la apo A-I incrementó con cualquiera de los tres tratamientos (Tabla 3). Esto sugiere que el tamaño de las HDL no es el principal determinante del catabolismo de las HDL como ha sido propuesto en otros estudios (58, 121, 135, 138). Independientemente de la falta de asociación entre el tamaño y el catabolismo de las HDL, estudios previos han demostrado un incremento en el catabolismo de la apo A-I con el tratamiento de estatinas y fibratos (139-141). Lo cual es congruente con nuestros resultados; además, considerando que el catabolismo rápido de la apo A-I de las HDL ha sido observado en pacientes con bajo riesgo de EAC (142), el aumento de la depuración de la apo A-I en este estudio sugiere un efecto benéfico de los fármacos sobre el metabolismo de la apo A-I de las HDL. Además, el tratamiento con estatinas y fibratos incrementa la tasa de catabolismo de la apo A-I. De hecho, la rápida depuración de la apo A-I de las HDL puede ser reflejo de un metabolismo mejorado; el aumento en el recambio de las HDL implica un menor tiempo de residencia en el plasma, lo cual evita que las lipoproteínas se deterioren al ser reemplazadas por lipoproteínas recién sintetizadas. A través de este mecanismo es posible que el proceso de formación del ateroma se retrase y el riesgo de desarrollar EAC disminuya (121).

Una de las limitantes del modelo de dislipidemia exógena fueron las elevadas concentraciones plasmáticas de colesterol obtenidas, las cuales no nos permitieron determinar las transferencias de ésteres de colesterol entre lipoproteínas. Realizamos las cinéticas de EC de HDL marcados con tritio en los conejos dislipidémicos, sin embargo, los datos obtenidos no pudieron ser ajustados matemáticamente al modelo multicompartmental. Por lo tanto, en la segunda parte de este estudio,

determinamos la estructura y la composición de ácidos grasos de las HDL y las transferencias de colesterol entre lipoproteínas *in vivo* en conejos sin dislipidemia.

Realizamos cinéticas de EC de HDL marcados radiactivamente y encontramos un gran incremento en la transferencia bidireccional de EC entre lipoproteínas (desde HDL hacia VLDL/LDL y desde VLDL/LDL hacia HDL) en todos los conejos tratados. Estas transferencias nos sugieren un incremento en la actividad de la CETP. En este sentido, un estudio reciente demostró que el tratamiento prolongado con pitavastatina incrementa la actividad de la CETP (143). Adicionalmente, el tratamiento con fenofibrato regula a la alza la expresión de esta proteína en ratones transgénicos (144). Sin embargo, en nuestro estudio, la actividad de la CETP no cambió con ninguno de los tratamientos y por lo tanto descartamos que la CETP favorezca el incremento de la transferencia bidireccional de EC entre lipoproteínas. Es importante enfatizar que la regulación a la alza de la CETP con fenofibrato fue demostrada en ratones transgénicos, la cual es una especie que no expresa naturalmente CETP; por lo tanto, el promotor de la CETP de estos ratones es probablemente diferente al de los conejos. Además, las diferencias estructurales entre la pitavastatina y la atorvastatina podrían ser las responsables de que en nuestro estudio la actividad de transferencia de lípidos de la CETP no incrementara.

Cabe destacar que más del 90 % del colesterol intercambiado entre HDL y LDL es independiente de la CETP (145, 146). Así, el mecanismo potencial para explicar las transferencias obtenidas pueda estar relacionado con el tamaño, composición lipídica y fluidez de las HDL (103, 147, 148). Al respecto, el tamaño de las HDL incrementó en los conejos tratados con atorvastatina, fenofibrato y la combinación (la proporción relativa de la subpoblación de HDL2b aumentó). Dado que el intercambio de colesterol desde HDL2 hacia LDL es más rápido que aquel desde HDL3 hacia LDL (145), se puede postular que las HDL grandes incrementan la transferencia de colesterol entre lipoproteínas. Nuestros resultados son congruentes con este postulado.

La transferencia neta de EC desde VLDL/LDL hacia HDL incrementó en los dos grupos de conejos que recibieron atorvastatina (sola o en combinación con fenofibrato, Tabla 4). La atorvastatina incrementó la transferencia de masa de EC desde las lipoproteínas proaterogénicas hacia las antiaterogénicas, lo cual es apoyado por los efectos cardioprotectores de las estatinas (149). Por su parte, el fenofibrato no tuvo efecto sobre esta transferencia.

En cuanto a la eliminación de EC desde el plasma, la combinación atorvastatina-fenofibrato incrementó el flujo de salida de EC vía las HDL. Al respecto, los fibratos y las estatinas incrementan la expresión del receptor SR-BI en células periféricas (122, 150, 151), el cual capta selectivamente a los EC de las HDL (152). Por lo tanto, la eliminación incrementada de EC vía HDL puede ser consecuencia de un efecto sinérgico de la combinación sobre la expresión del receptor SR-BI. Sin embargo, no podemos descartar otros posibles mecanismos de eliminación de EC, por ejemplo, una transferencia acelerada de partículas HDL hacia el compartimento intersticial (153), una actividad aumentada de la lipoproteína lipasa (49) y/o una entrega de EC hacia las células periféricas independiente del receptor SR-BI (154) pueden ocurrir.

En contraste al flujo de salida de los EC vía HDL, la eliminación de EC del plasma vía VLDL/LDL disminuyó con el fenofibrato; nuestro resultado es contrario a la sobreexpresión de los receptores de VLDL y LDL esperada con el tratamiento con fibrato (155, 156). Sin embargo, no podemos descartar una lenta eliminación en el plasma de partículas VLDL/LDL a través del endotelio microvascular; aunque las características del endotelio y lipoproteínas necesarias para que esto ocurra aún son desconocidas.

La fluidez de la superficie de las HDL es otra característica que puede afectar la transferencia de colesterol entre lipoproteínas (103, 148, 157). Esta característica puede ser afectada por la estructura de las HDL. El tamaño y el grado de saturación de las cadenas de los ácidos grasos en las HDL determinan la fluidez de la partícula tamaño de la partícula. A mayor tamaño, mayor

fluidez de la partícula (157). De manera similar, una mayor proporción de ácidos grasos insaturados en las HDL aumenta su fluidez. Considerando esto, el incremento en la proporción de la subpoblación grande HDL2b y el incremento en la proporción de ácidos grasos insaturados de los conejos tratados con atorvastatina, fenofibrato y la combinación apoyan la idea de partículas HDL más fluidas. La fluidez de las HDL ha sido relacionada con el incremento en la transferencia de colesterol entre lipoproteínas (145, 146).

Nuestros resultados claramente demuestran la disminución en la proporción de ácidos grasos saturados (palmítico 16:0 y esteárico 18:0) y el incremento en la proporción de ácidos grasos insaturados (oleico 18:1 y linoleico 18:2) en las HDL de los conejos tratados con atorvastatina, fenofibrato y la combinación (Figura 13). La atorvastatina y el fenofibrato tienen efectos opuestos sobre la enzima esteroil-coenzima A desaturasa 1 (SCAD-1), enzima clave en la conversión de ácido palmítico y esteárico a ácido palmitoleico y oleico, respectivamente. La atorvastatina regula a la baja la expresión de SCAD-1 (158) y el fenofibrato incrementa su expresión y actividad (159, 160). Por otra parte, el ácido linoleico no es sintetizado en células animales, sin embargo, es componente de varios lípidos de las HDL (38). Por lo tanto, el incremento en la proporción de ácido oleico y linoleico y la disminución de ácido palmítico y esteárico en las HDL de los conejos tratados posiblemente no esté relacionado con la síntesis endógena de estos lípidos sino a una mejora en la absorción de ácidos grasos insaturados o a una limitada degradación de estos. Sin embargo, estudios específicos en este tema son necesarios para dilucidar el mecanismo de este cambio en el perfil de ácidos grasos.

Reconocemos como una limitante de este estudio la falta de resultados con respecto a la eliminación de colesterol en las heces, la cual es considerada el paso final en el RCT. Al respecto, es conocido que la atorvastatina estimula la eliminación de colesterol a través de las heces (161),

en contraste, el fenofibrato disminuye la eliminación de colesterol a través de las heces (162), por lo tanto, nos enfocamos sólo en las transferencias de EC entre lipoproteínas.

Cabe destacar que este trabajo fue realizado en un modelo *in vivo* y los resultados obtenidos forman parte del balance entre la producción, la remodelación (captación y transferencia de lípidos entre lipoproteínas) y la eliminación de las HDL.

Conclusión

En este estudio, determinamos diferentes cambios en la estructura de las HDL producidos por el tratamiento con atorvastatina y fenofibrato en conejos con y sin dislipidemia. Nuestros resultados sugieren la existencia de un efecto sinérgico entre la atorvastatina y el fenofibrato sobre la estructura y función de las HDL. La combinación atorvastatina-fenofibrato incrementa el tamaño de las HDL en los conejos con y sin dislipidemia. La depuración plasmática de la apo A-I de las HDL incrementó con la combinación, aunque también con los tratamientos individuales. Además, la transferencia bidireccional de EC aumentó con la combinación y de manera similar, la eliminación de EC vía HDL incrementó con este tratamiento. Los ácidos grasos de las HDL cambiaron de un perfil saturado a uno insaturado con los tres tratamientos. En conjunto, estos resultados indican que la estructura de las HDL es la característica que determina su metabolismo y función, además, contribuyen a un mejor entendimiento de la relación entre la estructura-función de las HDL.

Anexos

Anexo 1. Protocolo de extracción de lípidos totales de las HDL

Primera extracción

A una parte de HDL (fase acuosa) agregar 3 partes de reactivo de Folch (fase orgánica). Agitar durante 60 seg en agitador Vortex. Centrifugar durante 15 min a 4500 rpm y 4 °C. Recuperar fase orgánica y colocar en otro tubo (etiquetado “fase orgánica”)

Segunda y tercera extracción

Agregar a la fase acuosa la mitad (1.5 partes) del volumen original de reactivo de Folch usado en la primera extracción. Agitar durante 60 seg en agitador Vortex. Centrifugar durante 15 min a 4500 rpm y 4 °C. Recuperar fase orgánica y colocar en el tubo “fase orgánica”

Fase orgánica

Eliminar el agua remanente en la fase orgánica con sulfato de sodio (Na_2SO_4). Filtrar la fase orgánica con papel filtro en un frasco de vidrio previamente pesado para retirar el Na_2SO_4 . Evaporar el disolvente orgánico en baño maría. Secar el frasco con lípidos y pesarlo nuevamente.

Derivatización

Preparar disolución anhidra benceno metanol (1:1). Añadir 2 ml de la disolución benceno: metanol y 50 μl de ácido sulfúrico concentrado al frasco con lípidos. Agitar el frasco durante 16 horas a temperatura ambiente o agitar durante una hora a 37 °C. Posteriormente, realizar 3 extracciones con hexano. Colocar la fase orgánica en un frasco de vidrio previamente pesado, evaporar el disolvente en baño maría y un flujo de nitrógeno gaseoso. Secar, limpiar y pesar el frasco de vidrio con ácidos grasos derivatizados.

Referencias

1. Lehninger AL, Nelson DDL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*: W. H. Freeman; 2005.
2. Cerqueira NM, Oliveira EF, Gesto DS, Santos-Martins D, Moreira C, Moorthy HN, et al. Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview. *Biochemistry*. 2016;55(39):5483-506. Epub 2016/09/08.
3. Egom EE, Hafeez H. Biochemistry of Statins. *Advances in clinical chemistry*. 2016;73:127-68. Epub 2016/03/16.
4. Yeganeh B, Wiechec E, Ande SR, Sharma P, Moghadam AR, Post M, et al. Targeting the mevalonate cascade as a new therapeutic approach in heart disease, cancer and pulmonary disease. *Pharmacology & therapeutics*. 2014;143(1):87-110. Epub 2014/03/04.
5. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 1990;343(6257):425-30. Epub 1990/02/01.
6. Holstein SA, Hohl RJ. Isoprenoids: remarkable diversity of form and function. *Lipids*. 2004;39(4):293-309. Epub 2004/09/11.
7. Liang PH, Ko TP, Wang AH. Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *European journal of biochemistry*. 2002;269(14):3339-54. Epub 2002/07/24.
8. Wood WG, Li L, Muller WE, Eckert GP. Cholesterol as a causative factor in Alzheimer's disease: a debatable hypothesis. *Journal of neurochemistry*. 2014;129(4):559-72. Epub 2013/12/18.
9. Moutinho M, Nunes MJ, Rodrigues E. The mevalonate pathway in neurons: It's not just about cholesterol. *Experimental cell research*. 2017;360(1):55-60. Epub 2017/02/25.
10. Singh P, Saxena R, Srinivas G, Pande G, Chattopadhyay A. Cholesterol biosynthesis and homeostasis in regulation of the cell cycle. *PloS one*. 2013;8(3):e58833. Epub 2013/04/05.
11. Aluganti Narasimhulu C, Fernandez-Ruiz I, Selvarajan K, Jiang X, Sengupta B, Riad A, et al. Atherosclerosis--do we know enough already to prevent it? *Current opinion in pharmacology*. 2016;27:92-102. Epub 2016/03/15.
12. Jonas A, Phillips MC. Chapter 17 - Lipoprotein structure. In: Vance DE, Vance JE, editors. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes Fifth Edition* ed: Elsevier; 2008. p. 485-506.
13. Feingold KR, Grunfeld C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth MA: MDText.com, Inc.; 2000.

14. Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *European heart journal*. 2011;32(14):1769-818. Epub 2011/06/30.
15. Mathers CD, Boerma T, Ma Fat D. Global and regional causes of death. *British medical bulletin*. 2009;92:7-32. Epub 2009/09/25.
16. Moran AE, Roth GA, Narula J, Mensah GA. 1990-2010 global cardiovascular disease atlas. *Global heart*. 2014;9(1):3-16. Epub 2014/11/30.
17. Alvarez-Alvarez MM, Zanetti D, Carreras-Torres R, Moral P, Athanasiadis G. A survey of sub-Saharan gene flow into the Mediterranean at risk loci for coronary artery disease. *European journal of human genetics : EJHG*. 2017;25(4):472-6. Epub 2017/01/18.
18. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015;385(9963):117-71. Epub 2014/12/23.
19. Secretaría-de-Salud. Información epidemiológica de morbilidad 2000. Dirección General de Epidemiología.
20. Girelli D, Martinelli N, Peyvandi F, Olivieri O. Genetic architecture of coronary artery disease in the genome-wide era: implications for the emerging "golden dozen" loci. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2009;35(7):671-82. Epub 2009/12/17.
21. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004;364(9438):937-52. Epub 2004/09/15.
22. Rached FH, Chapman MJ, Kontush A. An overview of the new frontiers in the treatment of atherogenic dyslipidemias. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2014;96(1):57-63. Epub 2014/04/15.
23. Gimbrone MA, Jr., Garcia-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation research*. 2016;118(4):620-36. Epub 2016/02/20.
24. Brown RA, Shantsila E, Varma C, Lip GY. Current understanding of atherogenesis. *The American journal of medicine*. 2016. Epub 2016/11/27.
25. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-26. Epub 1999/01/14.

26. van Diepen JA, Berbee JF, Havekes LM, Rensen PC. Interactions between inflammation and lipid metabolism: relevance for efficacy of anti-inflammatory drugs in the treatment of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2013;228(2):306-15. Epub 2013/03/23.
27. Yu XH, Fu YC, Zhang DW, Yin K, Tang CK. Foam cells in atherosclerosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2013;424:245-52. Epub 2013/06/21.
28. Miller YI, Choi SH, Fang L, Tsimikas S. Lipoprotein modification and macrophage uptake: role of pathologic cholesterol transport in atherogenesis. *Sub-cellular biochemistry*. 2010;51:229-51. Epub 2010/03/10.
29. Rader DJ, Alexander ET, Weibel GL, Billheimer J, Rothblat GH. The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2009;50 Suppl:S189-94. Epub 2008/12/10.
30. De Lalla OF, Gofman JW. Ultracentrifugal analysis of serum lipoproteins. *Methods of biochemical analysis*. 1954;1:459-78. Epub 1954/01/01.
31. Nichols AV, Krauss RM, Musliner TA. Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Methods in enzymology*. 1986;128:417-31. Epub 1986/01/01.
32. Watts GF, Barrett PH, Chan DC. HDL metabolism in context: looking on the bright side. *Curr Opin Lipidol*. 2008;19(4):395-404. Epub 2008/07/09.
33. Shah AS, Tan L, Long JL, Davidson WS. Proteomic diversity of high density lipoproteins: our emerging understanding of its importance in lipid transport and beyond. *J Lipid Res*. 2013;54(10):2575-85. Epub 2013/02/26.
34. Orsoni A, Therond P, Tan R, Giral P, Robillard P, Kontush A, et al. Statin action enriches HDL3 in polyunsaturated phospholipids and plasmalogens and reduces LDL-derived phospholipid hydroperoxides in atherogenic mixed dyslipidemia. *J Lipid Res*. 2016;57(11):2073-87. Epub 2016/11/03.
35. Annema W, von Eckardstein A. High-density lipoproteins. Multifunctional but vulnerable protections from atherosclerosis. *Circ J*. 2013;77(10):2432-48. Epub 2013/09/27.
36. Kontush A, Therond P, Zerrad A, Couturier M, Negre-Salvayre A, de Souza JA, et al. Preferential sphingosine-1-phosphate enrichment and sphingomyelin depletion are key features of small dense HDL3 particles: relevance to antiapoptotic and antioxidative activities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(8):1843-9. Epub 2007/06/16.
37. Boyer R. *Conceptos de bioquímica*. México: International Thomson Editores; 2000. 694 p.

38. Kontush A, Lhomme M, Chapman MJ. Unraveling the complexities of the HDL lipidome. *J Lipid Res.* 2013;54(11):2950-63. Epub 2013/04/02.
39. Kontush A, Lindahl M, Lhomme M, Calabresi L, Chapman MJ, Davidson WS. Structure of HDL: particle subclasses and molecular components. *Handbook of experimental pharmacology.* 2015;224:3-51. Epub 2014/12/20.
40. Arora S, Patra SK, Saini R. HDL-A molecule with a multi-faceted role in coronary artery disease. *Clin Chim Acta.* 2016;452:66-81.
41. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee S, Zhang L, Roomp K, Van-Dam M. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet.* 1999;22:336-45.
42. Krieger M. Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu Rev Biochem.* 1999;68(523-558).
43. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science (New York, NY).* 1996;271(5248):518-20. Epub 1996/01/26.
44. Levinson SS, Wagner SG. Implications of reverse cholesterol transport: recent studies. *Clin Chim Acta.* 2015;439:154-61. Epub 2014/12/03.
45. Nicholls SJ, Nelson AJ. HDL and cardiovascular disease. *Pathology.* 2019;51(2):142-7. Epub 2019/01/08.
46. Zhou L, Li C, Gao L, Wang A. High-density lipoprotein synthesis and metabolism (Review). *Molecular medicine reports.* 2015;12(3):4015-21. Epub 2015/06/18.
47. Rye KA, Barter PJ. Regulation of high-density lipoprotein metabolism. *Circulation research.* 2014;114(1):143-56. Epub 2014/01/05.
48. Saleheen D, Scott R, Javad S, Zhao W, Rodrigues A, Picataggi A, et al. Association of HDL cholesterol efflux capacity with incident coronary heart disease events: a prospective case-control study. *The lancet Diabetes & endocrinology.* 2015;3(7):507-13. Epub 2015/05/31.
49. Bartelt A, John C, Schaltenberg N, Berbee JFP, Worthmann A, Cherradi ML, et al. Thermogenic adipocytes promote HDL turnover and reverse cholesterol transport. *Nature communications.* 2017;8:15010. Epub 2017/04/20.
50. Pérez-Méndez O, Bruckert E, Franceschini G, Duhal N, Lacroix B, Bonte JP, et al. Metabolism of apolipoproteins AI and AII in subjects carrying similar apoAI mutations, apoAI Milano and apoAI Paris. *Atherosclerosis.* 2000;148:317-25.

51. Deakin S, Leviev I, Gomaraschi M, Calabresi L, Franceschini G, James R. 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;227:4301-8.
52. Kontush A, Chantepie S, Chapman M. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1881-8.
53. Festa A, Williams K, Hanley A, Otvos J, Goff D, Wagenknecht L, et al. Nuclear magnetic resonance lipoprotein abnormalities in prediabetic subjects in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Circulation.* 2005;111:3465-72.
54. Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high density lipoprotein. *Biochemistry.* 1992;31:11112-7.
55. Calabresi L, Franceschini G, Sirtori CR, De PA, 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- 5.
56. Pérez-Méndez O, Torres-Tamayo M, Posada-Romero C, Vidaure-Garcés V, Carreón-Torres E, Mendoza-Pérez E, et al. Abnormal HDL subclasses distribution in overweight children with insulin resistance or type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 2007;376:17-22.
57. Pérez-Méndez O, Espinola-Zavaleta N, Soto-López M, Carreón-Torres E, Gamboa R, Huesca-Gómez C, et al. Altered flow mediated vasodilatation, low paraoxonase-1 activities, and abnormal high-density lipoprotein subclasses distribution in Takayasu's arteritis. *Circ J.* 2009;73:760-6.
58. Carreón-Torres E, Juárez-Meaveapeña M, Cardoso-Saldaña G, 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.
59. Huesca-Gómez C, Luc G, Duhail N, Lacroix B, Fruchart J, Pérez-Méndez O. Ciprofibrate increases synthesis and catabolism of HDL apo AI and AII in patients with hypertriglyceridemia (Abstract). *Atherosclerosis.* 2004;5(suppl):64.
60. Navab M, Reddy ST, Van Lenten BJ, Fogelman AM. HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8:222-32.
61. Kulka M. A review of paraoxonase 1 properties and diagnostic applications. *Pol J Vet Sci.* 2016;19(1):225-32.

62. Pizzini A, Lunger L, Demetz E, Hilbe R, Weiss G, Ebenbichler C, et al. The Role of Omega-3 Fatty Acids in Reverse Cholesterol Transport: A Review. *Nutrients*. 2017;9(10). Epub 2017/10/07.
63. Gugliucci A, Menini T. Paraoxonase 1 and HDL maturation. *Clin Chim Acta*. 2015;439:5-13. Epub 2014/09/28.
64. 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- 6.
65. Patel HH, Insel PA. Lipid rafts and caveolae and their role in compartmentation of redox signaling. *Antioxidants & redox signaling*. 2009;11(6):1357-72. Epub 2008/12/09.
66. Sargiacomo M, Scherer PE, Tang Z, Kubler E, Song KS, Sanders MC, et al. Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(20):9407-11. Epub 1995/09/26.
67. Pérez-Méndez O, Pacheco HG, Martínez-Sánchez C, Franco M. HDL-cholesterol in coronary artery disease risk: function or structure? *Clin Chim Acta*. 2014;429:111-22.
68. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:1987- 94.
69. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts)Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *European heart journal*. 2016;37(29):2315-81. Epub 2016/05/26.
70. National Clinical Guideline Centre UK. Lipid Modification: Cardiovascular Risk Assessment and the Modification of Blood Lipids for the Primary and Secondary Prevention of Cardiovascular Disease. London: National Clinical Guideline Centre, 2014.; 2014 Jul.
71. Gazzo P, Proto MC, Gangemi G, Malfitano AM, Ciaglia E, Pisanti S, et al. Pharmacological actions of statins: a critical appraisal in the management of cancer. *Pharmacol Rev*. 2012;64(1):102-46. Epub 2011/11/23.

72. Soufi M, Ruppert V, Kurt B, Schaefer JR. The impact of severe LDL receptor mutations on SREBP-pathway regulation in homozygous familial hypercholesterolemia (FH). *Gene*. 2012;499(1):218-22. Epub 2012/03/20.
73. Lopez D, McLean MP. Sterol regulatory element-binding protein-1a binds to cis elements in the promoter of the rat high density lipoprotein receptor SR-BI gene. *Endocrinology*. 1999;140(12):5669-81. Epub 1999/12/01.
74. Tamehiro N, Shigemoto-Mogami Y, Kakeya T, Okuhira K, Suzuki K, Sato R, et al. Sterol regulatory element-binding protein-2- and liver X receptor-driven dual promoter regulation of hepatic ABC transporter A1 gene expression: mechanism underlying the unique response to cellular cholesterol status. *J Biol Chem*. 2007;282(29):21090-9. Epub 2007/05/29.
75. Bengoechea-Alonso MT, Ericsson J. SREBP in signal transduction: cholesterol metabolism and beyond. *Current opinion in cell biology*. 2007;19(2):215-22. Epub 2007/02/17.
76. Sato R. Sterol metabolism and SREBP activation. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2010;501(2):177-81. Epub 2010/06/15.
77. Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. Protein sensors for membrane sterols. *Cell*. 2006;124(1):35-46. Epub 2006/01/18.
78. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Maintaining cholesterol homeostasis: sterol regulatory element-binding proteins. *World journal of gastroenterology*. 2004;10(21):3081-7. Epub 2004/10/01.
79. Kapur NK, Musunuru K. Clinical efficacy and safety of statins in managing cardiovascular risk. *Vasc Health Risk Manag*. 2008;4(2):341-53. Epub 2008/06/20.
80. Yamashita S, Tsubakio-Yamamoto K, Ohama T, Nakagawa-Toyama Y, Nishida M. Molecular mechanisms of HDL-cholesterol elevation by statins and its effects on HDL functions. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2010;17(5):436-51. Epub 2010/06/02.
81. Schaefer JR, Schweer H, Ikewaki K, Stracke H, Seyberth HJ, Kaffarnik H, et al. Metabolic basis of high density lipoproteins and apolipoprotein A-I increase by HMG-CoA reductase inhibition in healthy subjects and a patient with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 1999;144:177-84.
82. Martin G, Duez H, Blanquart C, Berezowski V, Poulain P, Fruchart JC, et al. Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPARalpha and induces HDL apoA-I. *The Journal of clinical investigation*. 2001;107(11):1423-32. Epub 2001/06/08.

83. Dilaveris P, Giannopoulos G, Riga M, Synetos A, Stefanadis C. Beneficial effects of statins on endothelial dysfunction and vascular stiffness. *Current vascular pharmacology*. 2007;5(3):227-37. Epub 2007/07/14.
84. Luna-Luna M, Medina-Urrutia A, Vargas-Alarcon G, Coss-Rovirosa F, Vargas-Barron J, Perez-Mendez O. Adipose Tissue in Metabolic Syndrome: Onset and Progression of Atherosclerosis. *Archives of medical research*. 2015;46(5):392-407. Epub 2015/05/27.
85. Gilde AJ, Fruchart J-C, Staels B. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors at the Crossroads of Obesity, Diabetes, and Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48(9 Supplement):A24-A32.
86. Gervois P, Fruchart JC, Staels B. Drug Insight: mechanisms of action and therapeutic applications for agonists of peroxisome proliferator-activated receptors. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*. 2007;3(2):145-56. Epub 2007/01/24.
87. Marx N, Duez H, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. *Circulation research*. 2004;94(9):1168-78. Epub 2004/05/15.
88. Gomaschi M, Adorni MP, Banach M, Bernini F, Franceschini G, Calabresi L. Effects of established hypolipidemic drugs on HDL concentration, subclass distribution, and function. *Handbook of experimental pharmacology*. 2015;224:593-615. Epub 2014/12/20.
89. Moutzouri E, Kei A, Elisaf MS, Milionis HJ. Management of dyslipidemias with fibrates, alone and in combination with statins: role of delayed-release fenofibric acid. *Vascular Health and Risk Management*. 2010;6:525-39.
90. Noonan JE, Jenkins AJ, Ma JX, Keech AC, Wang JJ, Lamoureux EL. An update on the molecular actions of fenofibrate and its clinical effects on diabetic retinopathy and other microvascular end points in patients with diabetes. *Diabetes*. 2013;62(12):3968-75. Epub 2013/11/23.
91. Fournier N, Tuloup-Minguez V, Pourci ML, Therond P, Jullian JC, Wien F, et al. Fibrate treatment induced quantitative and qualitative HDL changes associated with an increase of SR-BI cholesterol efflux capacities in rabbits. *Biochimie*. 2013;95(6):1278-87. Epub 2013/02/16.
92. Birner-Gruenberger R, Schittmayer M, Holzer M, Marsche G. Understanding high-density lipoprotein function in disease: recent advances in proteomics unravel the complexity of its composition and biology. *Prog Lipid Res*. 2014;56:36-46.

93. Boden WE, Probstfield JL, Anderson T, Chaitman BR, Desvignes-Nickens P, Koprowicz K, et al. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N Engl J Med*. 2011;365(24):2255-67. Epub 2011/11/17.
94. Keech A, Simes RJ, Barter P, Best J, Scott R, Taskinen MR, et al. Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet*. 2005;366(9500):1849-61. Epub 2005/11/29.
95. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJ, Komajda M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med*. 2007;357(21):2109-22. Epub 2007/11/07.
96. Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, Ballantyne CM, Barter PJ, Brumm J, et al. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med*. 2012;367(22):2089-99. Epub 2012/11/07.
97. Davidsson P, Hulthe J, Fagerberg B, Camejo G. Proteomics of apolipoproteins and associated proteins from plasma high-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(2):156-63. Epub 2009/09/26.
98. Kontush A, Lhomme M. Lipidomics of Plasma High-Density Lipoprotein: Insights into Anti-Atherogenic Function. *Journal of Glycomics & Lipidomics*. 2015;5(3).
99. Vaisar T, Pennathur S, Green PS, Gharib SA, Hoofnagle AN, Cheung MC, et al. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(3):746-56. Epub 2007/03/03.
100. Marmillot P, Patel S, Lakshman MR. Reverse cholesterol transport is regulated by varying fatty acyl chain saturation and sphingomyelin content in reconstituted high-density lipoproteins. *Metabolism*. 2007;56(2):251-9. Epub 2007/01/17.
101. Lee JY, Min HK, Choi D, Moon MH. Profiling of phospholipids in lipoproteins by multiplexed hollow fiber flow field-flow fractionation and nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*. 2010;1217(10):1660-6. Epub 2010/01/28.
102. Kajani S, Curley S, McGillicuddy FC. Unravelling HDL-Looking beyond the Cholesterol Surface to the Quality Within. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(7). Epub 2018/07/11.

103. Sola R, Baudet MF, Motta C, Maille M, Boissier C, Jacotot B. Effects of dietary fats on the fluidity of human high-density lipoprotein: influence of the overall composition and phospholipid fatty acids. *Biochim Biophys Acta*. 1990;1043(1):43-51. Epub 1990/03/12.
104. Davidson WS, Gillotte KL, Lund-Katz S, Johnson WJ, Rothblat GH, Phillips MC. The effect of high density lipoprotein phospholipid acyl chain composition on the efflux of cellular free cholesterol. *J Biol Chem*. 1995;270(11):5882-90. Epub 1995/03/17.
105. Jove M, Naudi A, Portero-Otin M, Cabre R, Rovira-Llopis S, Banuls C, et al. Plasma lipidomics discloses metabolic syndrome with a specific HDL phenotype. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2014;28(12):5163-71. Epub 2014/08/30.
106. Skeggs JW, Morton RE. LDL and HDL enriched in triglyceride promote abnormal cholesterol transport. *J Lipid Res*. 2002;43(8):1264-74. Epub 2002/08/15.
107. Morgantini C, Natali A, Boldrini B, Imaizumi S, Navab M, Fogelman AM, et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of HDLs are impaired in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2011;60(10):2617-23. Epub 2011/08/20.
108. Rader DJ, Hovingh GK. HDL and cardiovascular disease. *Lancet*. 2014;384(9943):618-25. Epub 2014/08/19.
109. McGarrah RW, Craig DM, Haynes C, Dowdy ZE, Shah SH, Kraus WE. High-density lipoprotein subclass measurements improve mortality risk prediction, discrimination and reclassification in a cardiac catheterization cohort. *Atherosclerosis*. 2016;246:229-35. Epub 2016/01/25.
110. Amend KL, Landon J, Thyagarajan V, Niemcryk S, McAfee A. Incidence of hospitalized rhabdomyolysis with statin and fibrate use in an insured US population. *Ann Pharmacother*. 2011;45:1230-9.
111. García-Sánchez C, Torres-Tamayo M, Juárez-Meavepeña M, López-Osorio C, Toledo-Ibelles P, Monter-Garrido M, 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(3-4):292-8. Epub doi:10.1016/j.cca.2010.10.021.
112. Toledo-Ibelles P, García-Sánchez C, Ávila-Vazzini N, Carreon-Torres E, Posada-Romero C, Vargas-Alarcón G, et al. Enzymatic assesment of cholesterol on electrophoresis gels for

estimating HDL size distribution and plasma concentrations of HDL subclasses. *J Lipid Res.* 2010;51:1610-7.

113. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75. Epub 1951/11/01.

114. Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *American journal of human genetics.* 1983;35(6):1126-38. Epub 1983/11/01.

115. Rached FH, Chapman MJ, Kontush A. HDL particle subpopulations: Focus on biological function. *Biofactors.* 2015;41(2):67-77. Epub 2015/03/27.

116. Asztalos BF, Horvath KV, Schaefer EJ. High-Density Lipoprotein Particles, Cell-Cholesterol Efflux, and Coronary Heart Disease Risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(9):2007-15. Epub 2018/07/14.

117. Farnier M, Picard S. Diabetes: statins, fibrates, or both? *Current atherosclerosis reports.* 2001;3(1):19-28. Epub 2000/12/21.

118. Singh A, Davidson M. Combination therapy with statins: who benefits? *Endocrinology and metabolism clinics of North America.* 2014;43(4):993-1006. Epub 2014/11/30.

119. Reyes-Soffer G, Rondon-Clavo C, Ginsberg HN. Combination therapy with statin and fibrate in patients with dyslipidemia associated with insulin resistance, metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Expert opinion on pharmacotherapy.* 2011;12(9):1429-38. Epub 2011/03/24.

120. Athyros VG, Papageorgiou AA, Athyrou VV, Demitriadis DS, Kontopoulos AG. Atorvastatin and micronized fenofibrate alone and in combination in type 2 diabetes with combined hyperlipidemia. *Diabetes care.* 2002;25(7):1198-202. Epub 2002/06/28.

121. Pérez-Méndez O, Carreón-Torres E, Franco M, Juárez-Oropeza MA. HDL physicochemical characteristics as determinants of their plasma concentrations: what we have learned from thiazolidinediones. *HDL and LDL cholesterol: physiology and clinical significance.* 2009:145-70.

122. Zhao SP, Wu ZH, Hong SC, Ye HJ, Wu J. Effect of atorvastatin on SR-BI expression and HDL-induced cholesterol efflux in adipocytes of hypercholesterolemic rabbits. *Clin Chim Acta.* 2006;365(1-2):119-24. Epub 2005/09/28.

123. Yang Y, Yan B, Fu M, Xu Y, Tian Y. Relationship between plasma lipid concentrations and HDL subclasses. *Clin Chim Acta.* 2005;354(1-2):49-58. Epub 2005/03/08.

124. Flores-Castillo C, Zamora-Perez JA, Carreon-Torres E, Arzola-Paniagua A, Aguilar-Salinas C, Lopez-Olmos V, et al. Atorvastatin and fenofibrate combination induces the predominance of the large HDL subclasses and increased apo AI fractional catabolic rates in New Zealand white rabbits with exogenous hypercholesterolemia. *Fundam Clin Pharmacol*. 2015;29(4):362-70. Epub 2015/05/20.
125. Kee P, Caiazza D, Rye KA, Barret PH, Morehouse LA, Barter PJ. Effect of inhibiting cholesteryl ester transfer protein on the kinetics of high-density lipoprotein cholesteryl ester transport in plasma: in vivo studies in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:884-90.
126. Carreón-Torres E, Rendón-Sauer K, Monter-Garrido M, Toledo-Ibelles P, Gamboa R, Menjivar M, et al. Rosiglitazone modifies HDL structure and increases HDL-apo AI synthesis and catabolism. *Clin Chim Acta*. 2009;401:37-41.
127. Martínez-Ramírez M, Flores-Castillo C, Sanchez-Lozada LG, Bautista-Perez R, Carreon-Torres E, Fragoso JM, et al. Hyperuricemia is Associated with Increased Apo AI Fractional Catabolic Rates and Dysfunctional HDL in New Zealand Rabbits. *Lipids*. 2017;52(12):999-1006. Epub 2017/09/25.
128. López-Olmos V, Carreón-Torres E, Luna-Luna M, Flores-Castillo C, Martínez-Ramírez M, Bautista-Pérez R, et al. Increased HDL size and enhanced apo A-I catabolic rates are associated with doxorubicin-induced proteinuria in New Zealand white rabbits. *Lipids*. 2016;51:311-20.
129. Priyadharsini RP. Animal models to evaluate anti-atherosclerotic drugs. *Fundam Clin Pharmacol*. 2015;29(4):329-40. Epub 2015/06/23.
130. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med*. 1977;62(5):707-14. Epub 1977/05/01.
131. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJ, Komajda M, et al. ILLUMINATE Investigators. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med*. 2007;357:2109- 22.
132. Niesor EJ, Magg C, Ogawa N, Okamoto H, von der Mark E, Matile H, et al. Modulating cholesteryl ester transfer protein activity maintains efficient pre-beta-HDL formation and increases reverse cholesterol transport. *J Lipid Res*. 2010;51(12):3443-54. Epub 2010/09/24.
133. Razavi AE, Ani M, Pourfarzam M, Naderi GA. Associations between high density lipoprotein mean particle size and serum paraoxonase-1 activity. *Journal of research in medical*

sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences. 2012;17(11):1020-6. Epub 2013/07/09.

134. 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;415:162-8. Epub 2012/11/06.

135. Pérez-Méndez O, Álvarez-Salcedo P, Carreón-Torres E, Luc G, Arce-Fonseca M, de-la-Peña A. Palmitic acid reduces the fractional catabolic rates of HDL apo A-I in vivo: contribution of the surface negative charge. *Clin Chim Acta*. 2007;378:53- 8.

136. Toledo-Ibelles P, Franco M, Carreon-Torres E, Luc G, Tailleux A, Vargas-Alarcon G, et al. Normal HDL-apo AI turnover and cholesterol enrichment of HDL subclasses in New Zealand rabbits with partial nephrectomy. *Metabolism*. 2013;62(4):492-8. Epub 2012/10/24.

137. Mahley RW, Weisgraber KH, Hussain MM, Greenman B, Fisher M, Vogel T, et al. Intravenous infusion of apolipoprotein E accelerates clearance of plasma lipoproteins in rabbits. *The Journal of clinical investigation*. 1989;83(6):2125-30. Epub 1989/06/01.

138. Lewis GF, Lamarche B, Uffelman KD, Heatherington AC, Honig MA, Szeto LW, et al. Clearance of postprandial and lipolytically modified human HDL in rabbits and rats. *Journal of Lipid Research*. 1997;38(9):1771-8.

139. Verges B, Florentin E, Baillot-Rudoni S, Petit JM, Brindisi MC, Pais de Barros JP, et al. Rosuvastatin 20 mg restores normal HDL-apoA-I kinetics in type 2 diabetes. *J Lipid Res*. 2009;50(6):1209-15. Epub 2009/01/27.

140. Watts GF, Barrett PH, Ji J, Serone AP, Chan DC, Croft KD, et al. Differential regulation of lipoprotein kinetics by atorvastatin and fenofibrate in subjects with the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2003;52(3):803-11. Epub 2003/02/28.

141. Rashid S, Uffelman KD, Barrett PH, Lewis GF. Effect of atorvastatin on high-density lipoprotein apolipoprotein A-I production and clearance in the New Zealand white rabbit. *Circulation*. 2002;106(23):2955-60. Epub 2002/12/04.

142. El Khalil L, Majd Z, Bakir R, Perez-Mendez O, Castro G, Poulain P, et al. Fish-eye disease: Structural and in vivo metabolic abnormalities of high-density lipoproteins. *Metabolism*. 1997;46(5):474-83.

143. Chapman MJ, Orsoni A, Robillard P, Therond P, Giral P. Duality of statin action on lipoprotein subpopulations in the mixed dyslipidemia of metabolic syndrome: Quantity vs quality

over time and implication of CETP. *Journal of clinical lipidology*. 2018;12(3):784-800 e4. Epub 2018/03/27.

144. Beyer TP, Chen Y, Porter RK, Lu D, Schmidt RJ, Mantlo NB, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists regulate cholesterol ester transfer protein. *Lipids*. 2008;43(7):611-8. Epub 2008/05/16.

145. Lund-Katz S, Hammerschlag B, Phillips MC. Kinetics and mechanism of free cholesterol exchange between human serum high- and low-density lipoproteins. *Biochemistry*. 1982;21(12):2964-9. Epub 1982/06/08.

146. Gillard BK, Rosales C, Xu B, Gotto AM, Jr., Pownall HJ. Rethinking reverse cholesterol transport and dysfunctional high-density lipoproteins. *Journal of clinical lipidology*. 2018;12(4):849-56. Epub 2018/05/08.

147. Padro T, Cubedo J, Camino S, Bejar MT, Ben-Aicha S, Mendieta G, et al. Detrimental Effect of Hypercholesterolemia on High-Density Lipoprotein Particle Remodeling in Pigs. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(2):165-78. Epub 2017/07/08.

148. Cazzola R, Cassani E, Barichella M, Cestaro B. Impaired fluidity and oxidizability of HDL hydrophobic core and amphipathic surface in dyslipidemic men. *Metabolism*. 2013;62(7):986-91. Epub 2013/02/19.

149. Chapman MJ, Le Goff W, Guerin M, Kontush A. Cholesteryl ester transfer protein: at the heart of the action of lipid-modulating therapy with statins, fibrates, niacin, and cholesteryl ester transfer protein inhibitors. *European heart journal*. 2010;31(2):149-64. Epub 2009/10/15.

150. Lopez D, McLean MP. Activation of the rat scavenger receptor class B type I gene by PPARalpha. *Molecular and cellular endocrinology*. 2006;251(1-2):67-77. Epub 2006/04/06.

151. Li Y, Wang Q, Zhou J, Xu Q, Chu X, Sun T, et al. Rosuvastatin attenuates atherosclerosis in rats via activation of scavenger receptor class B type I. *Eur J Pharmacol*. 2014;723:23-8. Epub 2013/12/18.

152. Shen WJ, Azhar S, Kraemer FB. SR-B1: A Unique Multifunctional Receptor for Cholesterol Influx and Efflux. *Annual review of physiology*. 2018;80:95-116. Epub 2017/11/11.

153. Michel CC, Nanjee MN, Olszewski WL, Miller NE. LDL and HDL transfer rates across peripheral microvascular endothelium agree with those predicted for passive ultrafiltration in humans. *J Lipid Res*. 2015;56(1):122-8. Epub 2014/11/16.

154. Muñoz-Vega M, Masso F, Paez A, Vargas-Alarcon G, Coral-Vazquez R, Mas-Oliva J, et al. HDL-Mediated Lipid Influx to Endothelial Cells Contributes to Regulating Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-1 Expression and eNOS Phosphorylation. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(11):pii: E3394. Epub 2018/11/02.
155. Huang Z, Zhou X, Nicholson AC, Gotto AM, Jr., Hajjar DP, Han J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in mice induces expression of the hepatic low-density lipoprotein receptor. *British journal of pharmacology*. 2008;155(4):596-605. Epub 2008/10/15.
156. Gao Y, Shen W, Lu B, Zhang Q, Hu Y, Chen Y. Upregulation of hepatic VLDLR via PPARalpha is required for the triglyceride-lowering effect of fenofibrate. *J Lipid Res*. 2014;55(8):1622-33. Epub 2014/06/06.
157. Massey JB, Pownall HJ. Surface properties of native human plasma lipoproteins and lipoprotein models. *Biophysical journal*. 1998;74(2 Pt 1):869-78. Epub 1998/04/09.
158. Martin-Fuentes P, Garcia-Otin AL, Calvo L, Gomez-Coronado D, Civeira F, Cenarro A. Atorvastatin decreases stearyl-CoA desaturase gene expression in THP-1 macrophages incubated with oxidized LDL. *Lipids*. 2009;44(2):115-23. Epub 2008/11/05.
159. Yamazaki T, Okada H, Sakamoto T, Sunaga K, Tsuda T, Mitsumoto A, et al. Differential induction of stearyl-CoA desaturase 1 and 2 genes by fibrates in the liver of rats. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2012;35(1):116-20. Epub 2012/01/10.
160. Montanaro MA, Bernasconi AM, Gonzalez MS, Rimoldi OJ, Brenner RR. Effects of fenofibrate and insulin on the biosynthesis of unsaturated fatty acids in streptozotocin diabetic rats. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. 2005;73(5):369-78. Epub 2005/08/16.
161. Schonewille M, de Boer JF, Mele L, Wolters H, Bloks VW, Wolters JC, et al. Statins increase hepatic cholesterol synthesis and stimulate fecal cholesterol elimination in mice. *J Lipid Res*. 2016;57(8):1455-64. Epub 2016/06/18.
162. Post SM, Duez H, Gervois PP, Staels B, Kuipers F, Princen HM. Fibrates suppress bile acid synthesis via peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-mediated downregulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(11):1840-5. Epub 2001/11/10.