

00346

11
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Estudio de la función vascular en ratas
nefróticas con deficiencia en antioxidantes.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA CELULAR)
P R E S E N T A:

Q.F.B. ROSALINDA POSADAS SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRÍ

MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

273/28

4



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Presidente	Dra. Victoria Chagoya de Sánchez
Secretario	Dra. María Elena Ibarra Rubio
Primer Vocal	Dr. José Pedraza Chaverrí
Segundo Vocal	Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza
Tercer Vocal	Dra. Guadalupe Baños de MacCarthy
Suplente	Dra. Verónica Guarnier Lanz
Suplente	Dr. Rolando Hernández Muñoz

Sitio donde se desarrollo el estudio:

Laboratorio 209, Edificio B
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

Departamento de Bioquímica
Instituto Nacional de Cardiología
"Ignacio Chávez"

Departamento de Endocrinología
Instituto Nacional de Cardiología
"Ignacio Chávez"

El presente trabajo se realizó gracias al financiamiento económico otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, proyecto 1003P-M.

La juventud es algo más que una etapa de la vida. Es una actitud mental frente a ella. Ser joven es tener temple en la voluntad, calidad y altura en la imaginación, vigor en las emociones.

Solo seremos viejos cuando hayamos perdido nuestros ideales.

Seremos jóvenes en la medida de nuestra fe, de la confianza en nosotros mismos, y en tanto la esperanza aliente nuestro ánimo.

Mientras nuestro corazón sea capaz de recibir mensajes de belleza, de alegría y de entusiasmo, seguiremos siendo jóvenes. Solo habremos envejecido si al corazón lo cubren las nieves del escepticismo y los hielos de la derrota.

Douglas MacArthur

¿Y que es trabajar con amor?

Es tejer la tela con fibras sacadas de vuestro corazón, es como si vuestro ser más amado tuviera que vestirse con esa tela.

Es construir una morada con cariño y embellecerla como si fuese para albergar al ser más amado.

Es como poner la semilla con ternura y cosechar con regocijo, como si el fruto fuese para alimentar al ser más amado.

Es fundir a todas las cosas que creáis un soplo de vuestro propio espíritu.

Gibrán Jalil Gibrán

El mundo anda siempre en busca de hombres que no se vendan;
de hombres honrados, sanos desde el centro hasta la periferia,
íntegros hasta el fondo del corazón.

Hombres de conciencia fija e inmutable como la aguja que marca el norte.
Hombres que defiendan la razón aunque los cielos caigan y la tierra tiemble.

Hombres que digan la verdad sin temor al mundo.
Hombres que o se jacten ni huyan; que no flaqueen ni vacilen.

Hombres que tengan valor sin necesidad de acicate. Hombres
que sepan lo que han de decir y lo digan; que sepan cuál
es su puesto y lo ocupen; hombres que conozcan su trabajo
y su deber y lo cumplan.

Hombres que no mientan, ni se escurran ni rezonguen, hombres que quieran comer sólo lo
que han ganado y que no deban lo que llevan puesto.

O. Sweet M.

Dedico este trabajo a mi adorado esposo Alex y a mis queridísimos papi, mami y Diana. Todo el amor que me han brindado ha sido el motor de mi andar en esta aventura, la fuente de juventud que alimenta mi espíritu, la fuerza que me permitió recuperar el ánimo tantas veces perdido; la luz que me impulsó y guió para salir de la obscuridad de la desesperación, el refugio en esos días de cansancio y desesperanza, el consuelo ante las constantes derrotas, el paño que tantas veces enjugó lágrimas de decepción y alegría, la viva mirada de Dios recordándome que hay que vivir a plenitud y con valentía para conquistar cada uno de nuestros sueños, la razón por la cual vale la pena estar y sentirme viva.

Me han ayudado a mantener jóvenes mis ideales y mi actitud frente a la vida, a recuperar la confianza en mí misma; dieron a mi corazón todo un ramillete con mensajes llenos de amor. Así logré sembrar una semilla.....que no fue fácil cuidar; fueron tantas las veces que traté de desistir, pero siempre estuvieron aquí para devolverme la fe en mí misma, en mi capacidad, en mis ideales de ser una mujer íntegra, fiel a sus principios, sin dobleces, con el valor suficiente para defender y cumplir con su trabajo y así.....llego la cosecha.

No hubiera sido posible concluir este trabajo si ustedes no formaran parte de mi vida, si no estuvieran a mi lado para compartir un paso más en este andar por la isla de la aventura y los sueños, y así recordarme que cada acción tiene repercusiones en el mundo exterior y exige de mí una gran responsabilidad pensamiento y acción.

Esta pequeña parte de mí.....les pertenece.....LOS AMO.

INDICE

ABREVIATURAS.....	8
I. RESUMEN.....	9
II. ANTECEDENTES	12
1. SÍNDROME NEFRÓTICO, CARACTERÍSTICAS Y CAMBIOS EN LA PERMEABILIDAD CAPILAR	12
2. LDL OXIDADA, EFECTOS SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL	13
3. FUNCIÓN ENDOTELIAL Y SU MODULACIÓN POR LOS ANTIOXIDANTES.....	14
4. SUSCEPTIBILIDAD A LA OXIDACIÓN DE LDL.....	16
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
IV. OBJETIVO.....	19
V. HIPÓTESIS	19
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	20
2. ANÁLISIS DE LABORATORIO.....	22
<i>a) Lípidos y lipoproteínas</i>	22
<i>b) Glucosa, creatinina, albúmina y proteínas totales</i>	23
<i>c) Vitamina E</i>	23
<i>d) Función endotelial</i>	24
<i>e) Aislamiento de la LDL, por ultracentrifugación</i>	25
<i>f) Susceptibilidad a la oxidación de la LDL</i>	26

<i>g) Subclases de LDL</i>	27
VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
VIII. RESULTADOS	29
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	29
2. LÍPIDOS, LIPOPROTEÍNAS Y VITAMINA E	31
3. RELAJACIÓN DEPENDIENTE DE ENDOTELIO.....	32
4. SUSCEPTIBILIDAD A LA OXIDACIÓN DE LA LDL.....	35
5. SUBCLASES DE LDL.....	37
6. ASOCIACIÓN ENTRE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL Y LAS VARIABLES ANALIZADAS.....	37
7. ANÁLISIS MULTIVARIADO.....	38
IX. DISCUSIÓN	40
X. CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFÍA	47
AGRADECIMIENTOS	52

Abreviaturas

Ach	Acetilcolina
AE	Aterosclerosis
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
ANOVA	Análisis de varianza
ANP	Aminonucleósido de puromicina
ApoB100	Apolipoproteína B-100
Car	Carbacol
CE ₅₀	Concentración efectiva 50
c-HDL	Colesterol de la lipoproteína de alta densidad
c-LDL	Colesterol de la lipoproteína de baja densidad
c-VLDL	Colesterol de la lipoproteína de muy baja densidad
CT	Colesterol total
DO	Densidad óptica
EAC	Enfermedad arterial coronaria
FL	Fase de latencia
GMP	Guanosín monofosfato
HC	Hipercolesterolemia
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HLP	Hiperlipidemia
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HTA	Hipertensión
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDL _{ox}	Lipoproteína de baja densidad oxidada
Log CE ₅₀	Logaritmo de la concentración efectiva 50
nm	Nanómetros
NO	Oxido nítrico
Se	Selenio
SN	Síndrome nefrótico
SSI	Solución salina isotónica
TG	Triacilgliceroles
VitE	Vitamina E

RESUMEN

Antecedentes: Se ha demostrado que la hipercolesterolemia (HC) y, de manera particular, la lipoproteína de baja densidad oxidada (LDLox), son factores importantes en el desarrollo de la disfunción endotelial. En el síndrome nefrótico (SN) la dislipidemia más frecuente es el incremento en los niveles del colesterol de LDL. Existen datos que muestran la alteración en la relajación vascular dependiente de endotelio, en el SN del ser humano y del inducido experimentalmente; sin embargo, no se ha estudiado el efecto de las subclases (tamaño) y la susceptibilidad a la oxidación *in vitro* de LDL sobre la disfunción endotelial presente en esta enfermedad renal.

Objetivo: Investigar la relación de la disfunción endotelial con las subclases y susceptibilidad a la oxidación de LDL en ratas con SN con o sin deficiencia de los antioxidantes vitamina E (vitE) y selenio (Se) en la dieta.

Material y métodos: Se estudiaron cuatro grupos de ratas macho Wistar: testigo alimentados con dieta habitual (T), testigo alimentado con dieta deficiente en vitE y Se (Tdef), SN alimentado con dieta habitual (SN) y SN alimentado con dieta deficiente en vitE y Se (SNdef). La nefrosis, inducida por la administración subcutánea de aminonucleósido de puromicina (ANP), y la alimentación con la dieta deficiente en antioxidantes se iniciaron en forma simultánea. En la semana 9, los animales se sacrificaron por decapitación. En el suero se determinaron los niveles de albúmina, creatinina, proteínas totales, vitE, glucosa, colesterol total (CT), triacilgliceroles (TG), colesterol de la lipoproteína de alta densidad (c-HDL), colesterol de la lipoproteína de baja densidad (c-LDL), subclases y susceptibilidad a la oxidación de LDL. Se calculó la

relación molar vitamina E/c-LDL (vitE/c-LDL) como un índice del contenido antioxidante del c-LDL. Las subclases de LDL se determinaron por electroforesis en gradiente de poliacrilamida y condiciones no desnaturalizantes. La susceptibilidad a la oxidación de LDL se midió por la técnica de Esterbauer modificada. Se empleó la duración de la fase de latencia (minutos), definida como el intervalo entre la adición del sulfato de cobre y el inicio de oxidación rápida, como índice de la susceptibilidad a la oxidabilidad de LDL. La concentración de vitamina E se midió por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La funcionalidad endotelial se evaluó mediante el análisis de las respuestas de anillos de aorta torácica precontraídos, a la administración de concentraciones crecientes de acetilcolina (Ach) o carbacol (Car). Los resultados se expresaron como concentración efectiva 50 (CE₅₀) y porcentaje de relajación máxima.

Resultados: Los animales con SN presentaron hiperlipidemia con elevación de los niveles séricos de CT, TG, c-HDL y c-LDL. La relación molar vitE/c-LDL fué significativamente menor en las ratas SNdef (25.52×10^{-4}), Tdef (165.66×10^{-4}) y SN (268.81×10^{-4}) con respecto a la de los testigos (617.55×10^{-4} , $p < 0.001$). En comparación con los testigos, la relajación dependiente de endotelio inducida por Ach o Car fue significativamente menor en los animales nefróticos. En las ratas SN y SNdef se observó disminución significativa de la duración de la fase de latencia (11.82 min. y 19.99 min., respectivamente), con respecto a la observada en los grupos Tdef y T (26.76 min. y 36.68 min., respectivamente). No se encontraron diferencias en las subclases de LDL entre los grupos estudiados. El análisis univariado mostró que la respuesta de relajación vascular dependiente de endotelio, inducida por Ach o Car, se asoció con aumento de la susceptibilidad a la oxidación de LDL expresado por

disminución en la duración de la fase de latencia ($r = -0.5621$, $p < 0.01$ y $r = -0.5007$, $p < 0.01$, respectivamente) y con una menor relación molar de vitE sérica por colesterol de LDL ($r = -0.6415$, $p < 0.01$ y $r = -0.5034$, $p < 0.01$, respectivamente). La fase de latencia y el colesterol de LDL fueron las únicas variables que se asociaron en forma independiente con la relajación vascular dependiente de endotelio inducida por Ach y Car, respectivamente.

Conclusiones: Estos hallazgos sugieren que la disfunción endotelial del SN es consecuencia del aumento en la susceptibilidad a la oxidación de LDL, secundaria a la deficiencia en agentes antioxidantes, y no a cambios en el tamaño de la partícula de la lipoproteína de baja densidad.

ANTECEDENTES

1. Síndrome nefrótico, características y cambios en la permeabilidad capilar

En el síndrome nefrótico (SN) la pérdida de la permeabilidad capilar selectiva da lugar a proteinuria,¹ la cual provoca desequilibrio en las velocidades de síntesis y catabolismo de las proteínas plasmáticas.² El SN se caracteriza por proteinuria, hipoalbuminemia, edema, hiperlipidemia (HLP), lipiduria y estado de hipercoagulabilidad.³ Estas alteraciones sistémicas son responsables de gran parte de la morbimortalidad de esta enfermedad. La HLP, presente en 70-100% de los pacientes con SN,⁴ se caracteriza por elevación de los niveles de triacilgliceroles (TG), colesterol total (CT), colesterol de la lipoproteína de baja densidad (c-LDL) y colesterol de la lipoproteína de muy baja densidad (c-VLDL).^{2,3} Las concentraciones de la lipoproteína de alta densidad (HDL) pueden ser normales, sin embargo las subclases de HDL presentan una distribución anormal con reducción en los niveles de HDL₂ e incremento de HDL₃.⁵⁻⁷ Estas anomalías lipoproteicas aumentan el riesgo de aterosclerosis (AE) y, particularmente, de enfermedad arterial coronaria (EAC). Un estudio prospectivo, controlado, con seguimiento a 5 años demostró un aumento de 5 veces en el número de eventos coronarios en 143 pacientes con SN crónico en comparación con sujetos control apareados por sexo y edad.⁸ Además, se ha mostrado relajación vascular dependiente de endotelio anormal, en el SN del ser humano⁹ y en el inducido experimentalmente.^{10,11}

Los modelos experimentales de SN también presentan HLP⁵. Uno de los más empleados es el inducido con aminonucleósido de puromicina (ANP) que se

caracteriza por niveles elevados de todas las fracciones de lipoproteínas.^{3,5,12} Además de ser un importante factor de riesgo para el desarrollo de EAC, la hipercolesterolemia (HC) del SN parece estar involucrada en el inicio y progresión de daño glomerular.¹³ En ratas con nefrectomía unilateral, el aumento de colesterol dietario provocó HC y progresión de la enfermedad renal.¹⁴ En este modelo experimental el tratamiento con probucol, agente antioxidante, redujo la proteinuria, mejoró el perfil de lípidos¹⁵ y disminuyó el desarrollo de la glomerulosclerosis focal y segmentaria.¹⁶ En el SN experimental, el análisis histológico de los depósitos en los glomérulos reveló la presencia de colesterol y fosfolípidos. Además, con técnicas inmunohistoquímicas se ha demostrado la presencia de LDL oxidada (LDLox) en glomérulos de ratas con glomerulosclerosis focal.¹⁷

2. LDL oxidada, efectos sobre la función endotelial

El exceso de LDL circulante y el mayor tiempo de residencia de estas partículas en el compartimento intravascular, así como su mayor penetración al espacio subendotelial, favorecen la modificación oxidativa de sus componentes lipídicos y proteicos. *In vivo*, se generan grandes cantidades de radicales libres, durante diversos procesos fisiopatológicos, capaces de producir lipoperoxidación. Además, los macrófagos, las células endoteliales y de músculo liso pueden participar en la lipoperoxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de la LDL.¹⁸⁻²⁰ Inicialmente, los antioxidantes lipofílicos previenen la modificación de la lipoproteína; sin embargo, cuando los antioxidantes se consumen, los AGPI se oxidan y se forman hidroxiácidos reactivos. Hasta este momento, la estructura de la apolipoproteína B100 (apoB100) se encuentra

intacta y la partícula se considera "mínimamente modificada".²¹ Una vez establecida, la lipoperoxidación se autocataliza y da lugar a una reacción en cadena, con cúmulo de gran cantidad de productos de lipoperoxidación que reaccionan y modifican covalentemente los residuos de aminoácidos de la apoB100, provocando la disminución progresiva de la carga positiva de la partícula.²² Los nuevos epítopes ya no son reconocidos por el receptor natural de LDL y la LDLox es captada con avidez y en mayor cantidad por el receptor atípico ("scavenger") de los macrófagos.^{18,20} A diferencia de los receptores naturales de LDL, los receptores atípicos carecen de la capacidad de regularse a la baja, en consecuencia, la captación de grandes cantidades de LDL modificada transforma a los macrófagos en células espumosas que al acumularse forman la llamada estría grasa, considerada como la lesión inicial de la AE. La oxidación confiere citotoxicidad y aterogenicidad a la partícula de LDL.^{18,20} La exposición vascular local a LDLox *in vivo* promueve el engrosamiento de la íntima e inhibe la relajación vascular mediada por endotelio.²³

3. Función endotelial y su modulación por los antioxidantes

La fisiología normal de la pared vascular depende de la presencia de un endotelio funcionalmente intacto, capaz de modular el tono vascular local y prevenir la trombosis.²⁴ El endotelio regula el intercambio de agua y moléculas pequeñas entre la sangre y el intersticio, participa en el control de trombosis y trombolisis, modula las interacciones del vaso con plaquetas y leucocitos, regula el tono y crecimiento vascular. Las células endoteliales son capaces de detectar los cambios en fuerzas hemodinámicas y responder a estímulos físicos y químicos mediante la síntesis de una

gran variedad de moléculas vasoactivas y tromborreguladoras así como a factores de crecimiento.²⁵ El óxido nítrico (NO) se genera en la células endoteliales por la oxidación de la L-arginina a L-citrulina en una reacción estereoespecífica catalizada por la sintasa del óxido nítrico endotelial. El NO liberado por el endotelio difunde al interior de las células del músculo liso, donde la interacción con el átomo de hierro del grupo hemo de la guanilato ciclasa activa a esa enzima y favorece el incremento de GMP cíclico^{21,26} y la reducción de calcio intracelular, produciendo la relajación vascular.²⁵ Además, el NO inhibe la agregación y adhesión plaquetaria a la pared de los vasos sanguíneos. El NO tiene una función importante en el sistema cardiovascular mediante la modulación de la vasomoción y hemostasis. El daño endotelial, ya sea provocado por un trauma físico o por una lesión a nivel celular, se considera actualmente como un evento potencialmente iniciador de la aterogénesis. Aún en animales normocolesterolémicos, el daño físico al endotelio puede originar la formación de lesiones aterosclerosas.²⁵ Las alteraciones en la fisiología endotelial se han involucrado tanto en la AE temprana como en el progreso de la enfermedad.²⁵ El enlace biológico entre el daño endotelial y la AE quizá esté relacionado con una disminución en la biodisponibilidad del NO, que puede predisponer a la adhesión plaquetaria y de leucocitos, a la vasoconstricción y proliferación de células del músculo liso.²¹ En modelos experimentales para AE, HC, hipertensión (HTA) y diabetes, se ha demostrado que la disminución de NO junto con el aumento en los niveles del anión superóxido, parecen ser las causas de la disminución en la actividad del agente vasorrelajante.²⁷ El incremento de radicales libres en la pared vascular generados por la LDLox pueden oxidar al NO a nitritos, nitratos y

peroxinitritos, provocando una mayor formación de radicales libres y la activación de citocinas,²⁷ lo cual se traduce en disminución de la relajación dependiente de endotelio.

4. Susceptibilidad a la oxidación de LDL

Las LDL son partículas heterogéneas en tamaño, densidad, carga eléctrica y composición. Las técnicas de electroforesis y ultracentrifugación permiten separar a la LDL en dos o más fracciones que difieren en composición, densidad, tamaño y peso molecular.^{28,29} Las partículas más pequeñas y densas son más susceptibles a la oxidación.^{30,31} La vitamina E (vitE) y el selenio (Se) son factores importantes en la protección de los lípidos contra la oxidación.^{32,33} La vitE se encuentra estructuralmente incorporada en la LDL^{19,32,34} y actúa como un antioxidante intrínseco que impide la transferencia de electrones involucrada en el inicio y propagación de la lipoperoxidación.³³ El Se es un cofactor necesario para la síntesis y actividad de la glutatión peroxidasa, enzima responsable de la detoxificación de los peróxidos orgánicos capaces de oxidar a las lipoproteínas.³⁵ La capacidad para resistir la modificación oxidativa depende, entre otros factores, de la cantidad de antioxidantes presentes en la LDL. La suplementación con vitE incrementa el contenido de este antioxidante en la partícula y aumenta su resistencia a la oxidación.³⁶

Los métodos empleados para investigar la oxidación de la LDL pueden dividirse en dos categorías: a) la evaluación de la susceptibilidad a la oxidación *in vitro* de la partícula aislada y b) la detección de la LDLox *in vivo*. Para investigar la oxidabilidad de la LDL, la lipoproteína aislada se enfrenta a estímulos pro-oxidantes.³⁷ La cinética de oxidación se puede medir por la formación de dienos conjugados³⁷ y sustancias reactivas al ácido

tiobarbitúrico,³⁸ por el desarrollo de fluorescencia^{38,39} y por cambios en la movilidad electroforética de la apoB100.⁴⁰ La mayoría de los estudios clínicos han mostrado mayor susceptibilidad a la oxidación de la LDL, o bien, un incremento en la cantidad de LDLox, en condiciones como la HC,⁴⁰ EAC,⁴¹ HTA,⁴² tabaquismo,⁴³ uremia,⁴⁴ disfunción endotelial^{23,45} y disminución de la elasticidad de arterias.⁴⁶ El suplemento con un antioxidante como vitamina E, además de conferir a la LDL mayor resistencia a la oxidación,^{36,47,48} mejora la relajación vascular dependiente de endotelio en el humano⁴⁹ y disminuye la progresión del daño renal en la nefrosis experimental.^{50,51} Estos datos apoyan la participación de la LDLox en el inicio y progresión de la AE.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el síndrome nefrótico, la dislipidemia más frecuente es el aumento en las concentraciones de c-LDL. Además de ser un factor de riesgo importante para el desarrollo de EAC, la HC puede acentuar el daño renal. Numerosos estudios han demostrado que la HC se asocia con incremento en la proporción de LDLox, partícula tóxica para los tejidos, especialmente el endotelio, en el que puede provocar alteración funcional evidente aún en aquellos casos en los que la morfología de las células endoteliales permanece normal.⁵² Existen reportes de alteración en la relajación vascular dependiente de endotelio en pacientes⁹ y animales con SN,^{10,11} anormalidad probablemente inducida por la HC que acompaña a esta patología. Las LDL son partículas heterogéneas en tamaño y densidad.^{28,29} Las partículas pequeñas y densas son más susceptibles a la oxidación.^{30,31} La susceptibilidad a la oxidación de la LDL depende, entre otros factores, de su contenido en vitamina E.^{36,47,48}

En la literatura no existe información sobre la relación entre HC, subclases de LDL, susceptibilidad a la oxidación de esta lipoproteína y alteración de la función endotelial en el SN del ser humano o en el inducido en el animal experimental.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de las anomalías lipoproteicas del SN experimental sobre la relajación dependiente de endotelio en ratas con y sin deficiencia de antioxidantes en la dieta, y la asociación entre el tamaño y la susceptibilidad a la oxidación de la LDL con la disfunción endotelial.

HIPÓTESIS

La alteración en la relajación dependiente de endotelio en ratas nefróticas se asocia con una mayor susceptibilidad a la oxidación de LDL, que puede ocurrir como consecuencia del incremento en la concentración de c-LDL, de la deficiencia de vitamina E y selenio y del cambio en el tamaño de la partícula de la lipoproteína de baja densidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

Se usaron ratas Wistar macho recién destetadas (aproximadamente 30 g de peso). Después de la ablactación, los animales se alimentaron durante dos semanas con dieta habitual (TD 84254, Teklad Premier Laboratory Diets, Madison, Wis). Transcurrido ese periodo, los animales se asignaron en forma aleatoria a uno de los cuatro grupos:

1. Testigo con dieta habitual (T)
2. Testigo con dieta deficiente en vitamina E y selenio (Tdef)
3. Nefróticas con dieta habitual (SN)
4. Nefróticas con dieta deficiente en vitamina E y selenio (SNdef)

La inducción del SN e inicio de la alimentación con dieta deficiente en antioxidantes (TD84253, Teklad Premier Laboratory Diets, Madison, Wis) fueron simultáneos. El SN se indujo con inyecciones subcutáneas repetidas de ANP al 2% en NaCl al 0.85% aplicadas los días 0, 1, 2, 3 y 4 (15 mg/kg peso) y con refuerzos los días 16 y 39 (dosis 50 mg/kg peso). En las mismas fechas se inyectó a los animales testigo un volumen similar del vehículo (NaCl al 0.85%). Las ratas Tdef y SNdef se alimentaron con la dieta comercial deficiente en vitE y Se, mientras que los animales T y SN continuaron con la dieta habitual. Los animales tuvieron libre acceso al agua y alimento. La composición de las dietas se muestra en las tablas 1 y 2. A la semana nueve de haber iniciado el tratamiento, los animales se colocaron en jaulas metabólicas para la recolección de orina de 24 horas. Después de un ayuno de 12-14 horas las ratas se pesaron y sacrificaron por decapitación. Se recolectó sangre y el suero se obtuvo por

centrifugación a 2500 rpm (908 x g) durante 20 minutos, se adicionó EDTA (1 mg/ml de suero) como antioxidante y se almacenó a -70°C hasta su uso. Se disecaron el corazón, pulmón, hígado, bazo, riñón y glándulas suprarrenales y se almacenaron a -70°C para la determinación posterior de los niveles de vitE.

Tabla 1. Composición de la dieta habitual y la deficiente en vitamina E y selenio

Componente	Dieta habitual (g/Kg.)	Dieta deficiente de vitamina E y Se (g/Kg.)
Levadura Torula	300.00	300.00
DL-metionina	3.0	3.0
Sacarosa	594.1283	595.4143
Manteca, sin tocoferol	50	50
Mezcla de minerales	50.0	50.0
Sulfato de manganeso (MnSO ₄ ·H ₂ O)	0.154	0.154
Sulfato de cromo-potasio (CrK(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O)	0.0193	0.0193
Acido p-aminobenzoico	0.1	0.1
Biotina	0.0004	0.0004
Vitamina B ₁₂	0.05	0.05
Pantotenato de calcio	0.02	0.02
Citrato dihidrogenado de colina	1.0	1.0
Acido fólico	0.002	0.002
Inositol	0.1	0.1
Complejo bisulfito sódico de menadione	0.015	0.015
Niacina	0.03	0.03
Pinidoxina HCl	0.01	0.01
Riboflavina	0.01	0.01
Tiamina HCl	0.01	0.01
Vitamina A (palmitato en aceite de maíz)	0.06	0.06
Vitamina D ₂ (en aceite de maíz 400,00 U/g)	0.005	0.005
Mezcla de sacarosa con 0.0445% de selenito	1.236	-----
Acetato de DL-alfa tocoferol 1000 U/g	0.05	-----

Tabla 2. Composición de la mezcla de minerales

Componente	Fórmula	g/Kg. de mezcla
Carbonato de calcio	CaCO ₃	543.0
Carbonato de magnesio	MgCO ₃	25.0
Sulfato de magnesio	MgSO ₄	16.0
Cloruro de sodio	NaCl	69.0
Cloruro de potasio	KCl	112.0
Fosfato monobásico de potasio	KH ₂ PO ₄	212.0
Pirofosfato férrico soluble		20.5
Yoduro de potasio	KI	0.08
Sulfato de manganeso	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.35
Fluoruro de sodio	NaF	1.0
Sulfato de aluminio y potasio	AlK(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	0.17
Sulfato cúprico	CuSO ₄	0.90

Análisis de laboratorio

Lípidos y lipoproteínas

Las concentraciones séricas de CT y TG se determinaron por métodos enzimáticos, con reactivos de Boehringer Mannheim en un autoanalizador bicromático Hitachi 705. El colesterol de HDL se midió después de precipitar las lipoproteínas que contienen apo B con fosfotungstato-MgCl₂. Los valores de las lipoproteínas de baja densidad se calcularon empleando la fórmula de Friedewald modificada por DeLong.⁵³ Los coeficientes de variación fueron: intraanálisis de 0.43%, 0.89% y 1.72% e interanálisis de 1.76%, 2.03% y 3.24% para CT, TG y c-HDL, respectivamente. Todas las determinaciones se llevaron a cabo con un estricto control de calidad mediante la

participación del laboratorio de Lípidos del Instituto Nacional de Cardiología en el Programa de Estandarización del Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Georgia, E.U.A. Las mediciones se realizaron por duplicado. Los resultados se expresaron en mg/dl.

Glucosa, creatinina, albúmina y proteínas totales

La glucosa se midió por el método de glucosa oxidasa con reactivos de Boehringer Mannheim en un autoanalizador bicromático Hitachi 705. La creatinina y albúmina séricas se determinaron por los métodos de Jaffé y verde de bromocresol, respectivamente, en un autoanalizador Ilab 900 (Instrumentation Laboratory). Las proteínas totales se cuantificaron con el método de Lowry *et. al.*⁵⁴ Las determinaciones se efectuaron por duplicado. Los resultados de glucosa y creatinina se expresaron en mg/dl; los de albúmina y proteínas totales se expresaron en g/dl.

Vitamina E

La vitE tisular y sérica se midió por HPLC (Millipore, bomba de cambio de flujo manual modelo 510) de acuerdo al método de Huang y Shaw⁵⁵ modificado. El tejido se descongeló y homogeneizó en un amortiguador de fosfatos (0.01 M, pH 7.4). A un 1.0 ml del homogenado se le adicionaron 2.0 ml de una solución de 10 g/l de pirogalol en alcohol absoluto y 0.3 ml de una solución saturada 2.5 M de KOH. Los tubos tapados se agitaron en vortex y se incubaron a 70°C en baño María durante 30 minutos. Después de la saponificación, los tubos se enfriaron en un baño de hielo, se adicionó 1.0 ml de agua y 4.0 ml de n-hexano. Para el análisis de vitE sérica, se mezclaron de

0.3 a 0.5 ml de plasma con 2 ml de la solución de pirogalol, 1 ml de HCl concentrado y 6 ml de n-hexano. Los tubos, que contenían la muestra de tejido o de suero, se agitaron en vortex por 2 minutos y después de la separación se recuperó la capa orgánica. Una vez evaporado el solvente, el residuo se disolvió en 0.6 ml de metanol. Se inyectaron 20 μ l de muestra. Para la determinación se utilizó una columna Novapak C18 de fase reversa a una velocidad de flujo de 1.0 ml/min (1800 psi) en condiciones isocráticas y con metanol como fase móvil. El α -tocoferol se registró con un detector de densidad óptica a 292 nm. Se utilizó α -tocoferol (USPC, INC No. catálogo 66760) para elaborar una curva con las siguientes concentraciones 0.60, 3.01, 6.02, 12.05 y 24.1 nmoles. El tiempo de retención del pico del α -tocoferol fue 3.68 ± 0.025 minutos. En tubos por separado se agregó una cantidad conocida de α -tocoferol para calcular la recuperación obtenida. La recuperación de α -tocoferol varió de 94.31 a 100.46%. Se utilizó el integrador Millipore modelo 746 para procesar los datos. Las determinaciones se hicieron por duplicado. En suero, los resultados de vitamina E se expresaron en μ g/ml y en tejidos en nmoles de vitamina E por gramo.

Función endotelial

La función endotelial se estudió con una técnica previamente descrita.⁵⁶ La aorta torácica se extrajo rápidamente. Después de eliminar el tejido conectivo, se cortó transversalmente en anillos (3 mm de longitud), teniendo especial cuidado para no dañar el endotelio: La funcionalidad del endotelio se evaluó siempre analizando una rata testigo y una nefrótica con la misma dieta. En cada experimento se utilizó un par de anillos de la parte central de la misma aorta. Cada uno de los anillos se suspendió

horizontalmente en una cámara para órgano aislado (volumen 5 ml), sujeto por dos ganchos de Nichrom. Uno de ellos se fijó a la pared de la cámara y el otro a un transductor de tensión isométrica (FT03, Grass Medical Instruments) conectado a un polígrafo Grass modelo 79D. Los anillos se mantuvieron en solución Tyrode (glucosa 4.5 mM, NaCl 118 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, NaHCO_3 24 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mM, KCl 4.7 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.5 mM, pH 7.4) a 37°C y con burbujeo constante de carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2). Los anillos se sometieron a una tensión inicial de 2 g y se equilibraron durante 1 h. La tensión se verificó constantemente en este periodo y, cuando fue necesario, se reajustó a 2 g. Se obtuvieron curvas de concentración-respuesta a la administración de acetilcolina y carbacol. Los análisis se realizaron por cuadruplicado. La relajación inducida por acetilcolina o carbacol se expresó como porcentaje de reducción de tensión (relajación) con respecto a la tensión obtenida en respuesta a norepinefrina o fenilefrina (0.2 μM), respectivamente.

Aislamiento de la LDL por ultracentrifugación

De cada animal, 1 ml de suero que había permanecido congelado y almacenado a -70°C, se descongeló y utilizó para el aislamiento de la LDL a 10°C. La LDL se aisló por ultracentrifugación a 100,000 r.p.m. (355,206xg) en la ultracentrífuga TL100 (Beckman). Brevemente, se ajustó la densidad del suero a 1.063 g/ml con bromuro de potasio sólido y se ultracentrifugó durante 4 horas. Terminada la corrida, se mezclaron 200 μl del sobrenadante con 676 μl de solución salina isotónica (SSI) y se continuó la ultracentrifugación durante 3 horas. Se recuperó el infranadante y se lavó con SSI por ultracentrifugación durante 3 horas. En la preparación de LDL se cuantificó la

concentración de proteína por el método de Lowry *et. al.*⁵⁴ Con objeto de disminuir el tiempo entre el aislamiento y el ensayo para medir la susceptibilidad a la oxidación, la preparación no se dializó⁵⁷.

Susceptibilidad a la oxidación de la LDL

La susceptibilidad a la oxidación *in vitro* de la LDL se determinó por el método descrito por Esterbauer³⁷ con pequeñas modificaciones. La LDL aislada se diluyó en amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.4 (PBS), 0.16 M NaCl saturado con oxígeno, a una concentración final de 50 µg de proteína/ml. La oxidación de la lipoproteína se inició mediante la adición de una solución recién preparada de CuSO₄ a una concentración final de 25 µM, a 37°C. La cinética de oxidación se monitoreó mediante lecturas espectrofotométricas a 234 nm, para seguir la formación de dienos conjugados^{37,58}. Se registraron lecturas de densidad óptica (DO) cada 2 minutos, durante 200 minutos. Con estos datos se construyó la curva de la cinética de oxidación y a partir de ella se calculó la fase de latencia (FL). La FL, definida como el intervalo entre la adición del sulfato de cobre y el inicio de oxidación rápida, se determinó por la intersección de la recta de la línea basal con la tangente de la fase de oxidación.^{37,44,58} Los coeficientes de variación intra e interensayo para la FL fueron 2.94% y 5.77%, respectivamente. Los resultados se expresaron en minutos.

Se eligió la FL por que es una medición reproducible y un marcador aceptable de la oxidabilidad de LDL.³⁷ La FL se relaciona con el contenido antioxidante de la LDL⁵⁹ que fue la característica que nosotros buscamos modificar con la dieta deficiente en vitamina E y selenio.

Subclases de LDL

Las subclases de LDL se determinaron por el método de Krauss y Burke⁶⁰ modificado. Brevemente, se corrió una electroforesis en gradiente del 2 al 14% de poliacrilamida, en condiciones no desnaturalizantes y no reductoras. Se cargaron 10 μ l (aproximadamente 5-10 μ g de proteína) en cada uno de los pozos. La electroforesis se realizó durante 20 horas a 150 V. La solución amortiguadora de corrida fue 0.09 M Tris, 0.08 M de ácido bórico y 0.003 M de EDTA \cdot H₂O, pH 8.3. Después de la separación, el gel se fijó durante 15 a 20 minutos en metanol/ácido acético/agua (45:10:45% v/v). La tinción se realizó con azul de Coomassie (0.1% p/v) en metanol/ácido acético/agua (45:10:45 % v/v). El gel se decoloró en metanol/ácido acético/agua (45:10:45% v/v) con agitación constante, hasta que los blancos quedaron transparentes. Los geles se hidrataron en agua glicerinada al 1% y una vez secos se analizaron con un densitómetro (modelo 620 de Bio-Rad Laboratories Ltd., U.K.) usando el programa Molecular Analyst, de Bio-Rad v. 1.1. Para la construcción de la gráfica de calibración se utilizaron como estándares una cama de látex (38 nm) y de proteínas de alto peso molecular (Pharmacia): tiroglobulina (17 nm), apoferritina (12.2 nm) y catalasa (6.2 nm). La gráfica de calibración se ajustó a la mejor recta quedando una ecuación cuadrática:

$$\left(y = 10^{b[0]+b[1]\cdot x+b[2]\cdot x^2+b[3]\cdot x^3+b[4]\cdot x^4} \right)$$

Los resultados se expresaron en nanómetros.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calcularon las medidas de tendencia central y de dispersión de las variables continuas. La diferencia global entre los cuatro grupos estudiados se evaluó con el ANOVA paramétrico y no paramétrico (prueba de Kruskal-Wallis por rangos) en función de la distribución de la variable. Con la prueba de Scheffé (variables paramétricas) o de U de Mann-Whitney (variables no paramétricas) se determinó entre cuáles grupos existían diferencias significativas. El logaritmo de la concentración molar del agonista necesaria para producir el 50% de la respuesta máxima ($\log CE_{50}$) se calculó con el paquete Microsoft Excel para Windows 95 v. 7.0. La asociación entre las variables estudiadas se determinó por el análisis de correlación simple utilizando el coeficiente de correlación de Pearson para las variables de distribución normal y prueba de Spearman para las de distribución no normal. La independencia de las asociaciones se determinó por análisis de regresión múltiple por pasos. Para todas las pruebas se estableció el nivel de significado estadístico de 0.05. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS v. 8.0.

RESULTADOS

1. Características generales

Las características generales de los grupos estudiados se presentan en la tabla 3. El análisis de varianza (ANOVA) paramétrico y no paramétrico, reveló diferencias significativas entre los grupos para el peso, proteinuria, proteínas totales y albúmina. De acuerdo a lo esperado, los animales nefróticos presentaron niveles mayores de proteína en orina y concentraciones menores de albúmina en suero en comparación con los testigos. Los niveles de proteínas totales fueron significativamente menores en las ratas SNdef al compararlas con los grupos restantes.

Tabla 3. Características generales de los grupos estudiados

	Grupos				p
	Testigo	Testigo deficiente	Nefrótica	Nefrótica deficiente	
n	15	17	8	10	
Peso (g)	316.1±13.4	286.9±9.8	245.0±11.2 ^a	192.4±13.8 ^{ab}	<0.05
C. alimento (g/24 h)	23.5±3.5	20.7±2.1	20.1±1.5	16.9±1.2	ns
Proteinuria (mg/24h)	7.41±1.98	9.91±2.23	437.3±60.1 ^{ab}	370.1±42.6 ^{ab}	<0.01
Proteínas (g/dl)	7.34±0.3	6.52±0.15	6.79±0.14	5.89±0.25 ^{abc}	0.01
Albúmina (g/dl)	3.22±0.05	3.12±0.07	2.17±0.12 ^{ab}	2.48±0.15 ^{abc}	<0.01
Glucosa (mg/dl)	70.8±4.69	71.7±3.0	69.3±7.36	73.4±3.57	ns
Creatinina (mg/dl)	0.71±0.02	0.89±0.06	0.80±0.05	0.77±0.04	ns

Los datos están expresados como media ± error estándar. C. alimento = consumo de alimento. ns = no significativo. a vs testigo, b vs testigo deficiente, c vs nefrótica.

Las ratas SNdef fueron las de menor peso, seguidas por SN, Tdef y finalmente las T; el consumo de alimento fue similar en los cuatro grupos y no explica estas diferencias.

Los niveles de glucosa y creatinina fueron similares en los cuatro grupos.

En comparación con los que recibieron dieta habitual, la concentración de vitE en los diferentes tejidos analizados fue significativamente menor en los animales alimentados con dieta deficiente en vitE y Se, independientemente de si presentaban o no nefrosis (tabla 4). Sorpresivamente la concentración de vitE en corazón y riñón de las ratas SNdef fue menor a la de los Tdef.

Tabla 4. Concentraciones de vitamina E en tejidos

Tejidos	Grupos				p
	Testigo	Testigo deficiente	Nefrótica	Nefrótica deficiente	
n	15	17	8	10	
Corazón	17.09±2.46	2.42±0.29 ^{bc}	17.93±2.50	1.21±0.11 ^{abc}	<0.001
Pulmón	15.11±1.99	3.13±0.27 ^{bc}	16.69±1.89	2.49±0.24 ^{bc}	<0.001
Hígado	16.04±2.41	2.86±0.27 ^{bc}	18.99±1.87	2.89±0.13 ^{bc}	<0.001
Bazo	16.62±0.94	2.13±0.32 ^{bc}	17.09±1.63	1.98±0.34 ^{bc}	<0.001
Riñón	9.08±1.23	1.99±0.19 ^{bc}	7.46±0.83	0.78±0.09 ^{abc}	<0.001
Suprarrenales	101.5±12.8	16.83±1.90 ^{bc}	139.6±16.9	10.58±0.7 ^{bc}	<0.001

Los datos están expresados como media ± error estándar (nmol vitamina E/g de tejido). ANOVA: a vs testigo, b vs testigo deficiente, c vs nefrótica

2. Lípidos, lipoproteínas y vitamina E

En comparación con las ratas testigos, las nefróticas mostraron elevación significativa de los niveles de CT, TG, c-HDL y c-LDL (tabla 5). Las concentraciones de vitE en el suero de ratas SN fueron significativamente más altas (tabla 5) que en los otros grupos. Puesto que la vitE se transporta en las lipoproteínas, era de esperarse que el aumento de estas partículas en las ratas SN³⁵ se asociara a mayor concentración absoluta de vitE en estos animales. Sin embargo, cuando estos valores se expresaron como la relación molar vitE/c-LDL (figura 1) se observó mayor cantidad de vitE por colesterol de LDL en los testigos que en las ratas SN. Como se podía anticipar, los animales alimentados con dieta deficiente en antioxidante tuvieron el índice vitE/c-LDL más bajo. Todas las diferencias alcanzaron significado estadístico.

Tabla 5. Concentración de lípidos, lipoproteínas y vitamina E en suero

	Grupos				ANOVA p
	Testigo	Testigo deficiente	Nefrótica	Nefrótica deficiente	
n	15	17	8	10	
CT (mg/dl)	68.8±4.66	74.1±4.48	187.8±10.13 ^{ab}	165.5±7.71 ^{ab}	<0.001
TG (mg/dl)	68.8±7.22	92.5±7.70 ^a	172.6±28.5 ^{ab}	140.4±21.9 ^{abc}	<0.001
c-HDL (mg/dl)	53.1±3.61	52.6±3.51	118.9±4.85 ^{ab}	83.70±8.81 ^{ab}	<0.001
c-LDL (mg/dl)	6.02±1.10	7.41±1.04	39.38±4.69 ^{ab}	59.34±6.61 ^{ab}	<0.001
[x10 ⁻³ (mol/L)]	[157±29]	[193±27]	[1023 ±122]	[1543 ±172]	
Vitamina E (µg/ml)	3.03±0.29	1.11±0.10 ^a	11.01±2.05 ^{ab}	1.51±0.07 ^{abc}	<0.001
[x10 ⁻³ (mol/L)]	[6.97±0.7]	[2.55±0.23]	[25.32±4.71]	[3.47±0.16]	

Los datos están expresados como media ± error estándar. CT = colesterol total, TG = triacilglicérols, c-HDL = colesterol de la lipoproteína de alta densidad, c-LDL = colesterol de la lipoproteína de baja densidad. ANOVA: a vs testigo, b vs testigo deficiente, c vs nefrótica

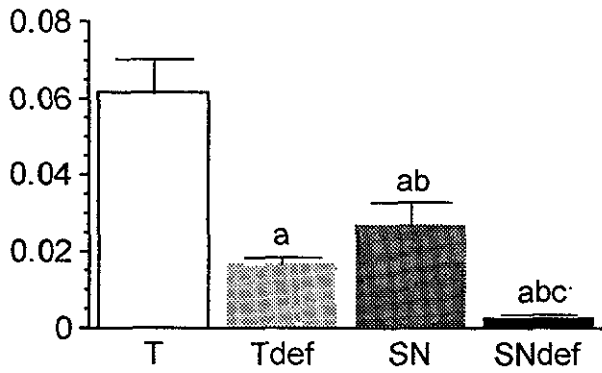


Figura 1. Relación molar de vitamina E/colesterol de LDL. T = testigo (n = 15), Tdef = testigo deficiente en antioxidantes (n=15), SN = nefrótica (n=8), SNdef = nefrótica deficiente en antioxidantes (n=10). Los datos están expresados como media \pm error estándar. ANOVA $p < 0.001$, a vs. testigo, b vs. testigo deficiente, c vs. nefrótica

3. Relajación dependiente de endotelio

Los anillos de aorta con endotelio intacto se relajaron en forma concentración-dependiente en respuesta a concentraciones crecientes de acetilcolina (figura 2) y carbacol (figura 3).

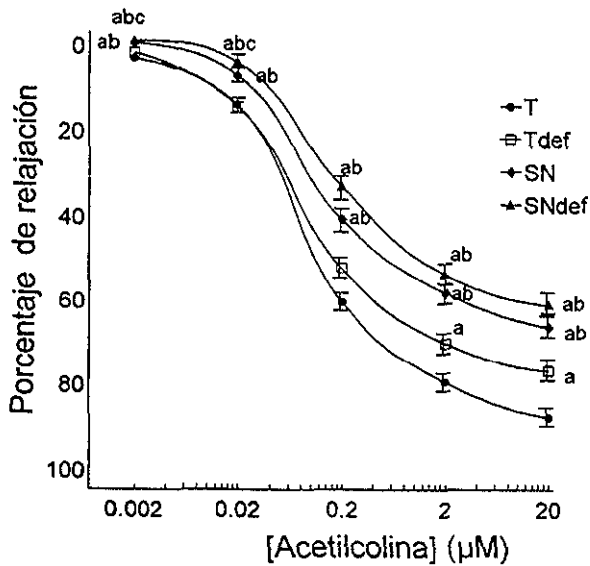


Figura 2. Relajación vascular en respuesta a acetilcolina en anillos de aorta precontractados. T = testigo (n = 15), Tdef = testigo deficiente en antioxidantes (n = 17), SN = nefrótica (n = 8), SNdef = nefrótica deficiente en antioxidantes (n = 10). Los datos están expresados como media \pm error estándar. ANOVA $p < 0.001$, a vs. testigo, b vs. testigo deficiente, c vs. nefrótica.

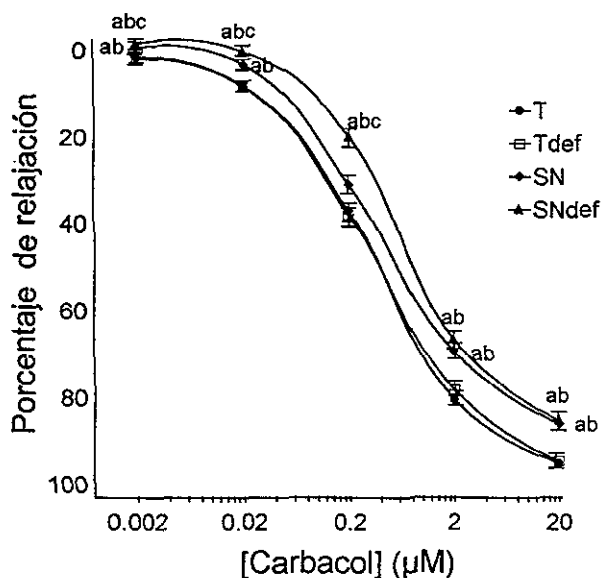


Figura 3. Relajación vascular en respuesta a carbacol en anillos de aorta precontraídos.

T = testigo (n = 15), Tdef = testigo deficiente en antioxidantes (n = 17), SN = nefrótica (n=8), SNdef = nefrótica deficiente en antioxidantes (n = 10). Los datos están expresados como media ± error estándar. ANOVA p<0.001, a vs. testigo, b vs. testigo deficiente, c vs. nefrótica.

Las curvas concentración-respuesta de los anillos de ratas nefróticas (SN y SNdef) se desplazaron significativamente ($p < 0.001$) a la derecha en comparación con las curvas de los animales testigo (Figuras 2 y 3, ver CE_{50} en tabla 6). En la figura 2, se observa que en los animales nefróticos, principalmente los deficientes en vitE y Se, la respuesta a todas las concentraciones de Ach empleadas fué significativamente menor que en los testigo. La mejor respuesta de relajación dependiente de endotelio en las ratas testigo (85.04%) fué diferente no sólo a la presentada por las ratas SNdef (59.36%, $p < 0.001$) y SN (64.44%, $p < 0.001$), sino también significativamente mayor que la de las ratas Tdef (74.39%, $p < 0.001$, figura 2, tabla 6).

Resultados similares a los observados con acetilcolina, se obtuvieron al emplear carbacol (figura 3). La relajación máxima en respuesta a carbacol fue significativamente

menor en las ratas SNdef (83.23%, $p < 0.001$) y SN (83.88%, $p < 0.001$) al compararlos con los Tdef (92.05%) y T (92.5%) (tabla 6). También se observó un desplazamiento significativo hacia la derecha de las curvas dosis-respuesta a Car de los animales SNdef y SN con respecto a las de los Tdef y T (ver CE_{50} tabla 6).

La función endotelial, evaluada por la respuesta a concentraciones crecientes de Ach y Car, y a través de la concentración efectiva para obtener el 50 por ciento de la relajación (CE_{50}), disminuyó en los animales con SN (grupo SN y SNdef) en comparación con los testigo (T y Tdef) (figuras 2 y 3, Tabla 6).

Tabla 6. Efecto de la nefrosis y deficiencia en antioxidantes sobre la relajación inducida con acetilcolina y carbacol (0.002-20 μ M).

Grupo	CE_{50} (M)	Log CE_{50} (M)	Porcentaje de relajación máxima
Acetilcolina			
Testigo	$6.14 \times 10^{-7} \pm 1.0 \times 10^{-7}$	-6.49 ± 0.08	85.05 ± 1.61
Testigo deficiente	$2.87 \times 10^{-6} \pm 8.7 \times 10^{-7}^a$	-6.12 ± 0.09^a	74.39 ± 2.14^a
Nefrótica	$3.41 \times 10^{-6} \pm 1.2 \times 10^{-6}^{ab}$	-5.78 ± 0.09^{ab}	64.44 ± 2.86^{ab}
Nefrótica deficiente	$9.59 \times 10^{-6} \pm 6.8 \times 10^{-6}^{ab}$	-5.71 ± 0.10^{ab}	59.36 ± 2.77^{ab}
Carbacol			
Testigo	$5.91 \times 10^{-7} \pm 7.92 \times 10^{-8}$	-6.38 ± 0.05	92.50 ± 0.85
Testigo deficiente	$7.13 \times 10^{-7} \pm 1.02 \times 10^{-7}$	-6.35 ± 0.06	92.05 ± 0.90
Nefrótica	$9.28 \times 10^{-6} \pm 5.51 \times 10^{-6}^{ab}$	-5.92 ± 0.11^{ab}	83.88 ± 2.32^{ab}
Nefrótica deficiente	$3.36 \times 10^{-6} \pm 8.46 \times 10^{-7}^{abc}$	-5.76 ± 0.07^{abc}	83.23 ± 1.61^{ab}

Los datos están expresados en promedio \pm error estándar. Log CE_{50} = logaritmo de la concentración efectiva de agonista para obtener el 50% de la respuesta máxima. CE_{50} = Concentración efectiva del agonista para obtener el 50% de la respuesta máxima. ANOVA $p < 0.0001$, a vs. testigo, b vs. testigo deficiente, c vs nefrótica.

4. Susceptibilidad a la oxidación de la LDL

Evaluamos la susceptibilidad a la oxidación de la LDL aislada de ratas T, Tdef, SN y SNdef. La figura 4 muestra una curva típica de la cinética de oxidación de la partícula inducida por la adición de CuSO_4 . La duración de la fase de latencia es una medida directa de la resistencia de la LDL a la oxidación y, principalmente, está relacionada con el contenido de antioxidantes y algunas características intrínsecas de la partícula de LDL, entre otras, la abundancia relativa de AGPI y colesterol.^{22,33}

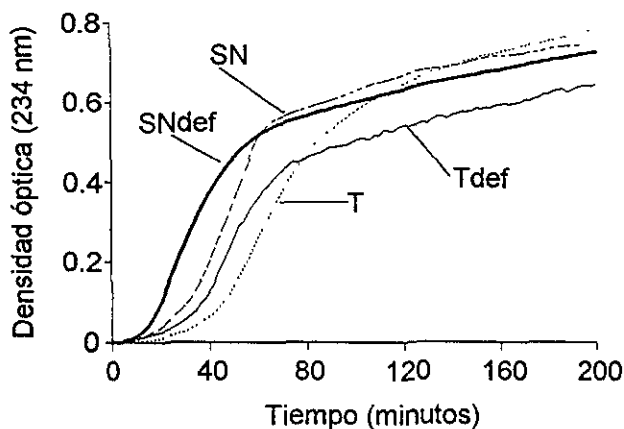


Figura 4. Cinética de la oxidación *in vitro* de LDL.

La oxidación de la LDL se registró espectrofotométricamente en forma continua a 234 nm, para seguir la formación de dienos conjugados después de la adición de CuSO_4 al tiempo cero.

T = testigo, Tdef = testigo deficiente en antioxidantes, SN = nefrótica, SNdef = nefrótica deficiente en antioxidantes.

Se encontró diferencia con significado estadístico entre los cuatro grupos estudiados (figura 5). La FL más corta se observó en las ratas SNdef, indicando que la LDL de estos animales es más susceptible a la oxidación (figura 5). Por el contrario, la LDL de las ratas testigo, alimentadas con dieta normal, fué la más resistente al proceso de oxidación (fase de latencia más prolongada).

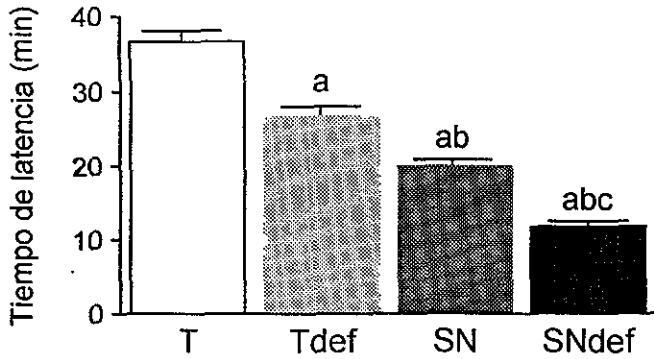


Figura 5. Susceptibilidad a la oxidación de la LDL de ratas nefróticas y testigo con y sin deficiencia de antioxidantes en la dieta.

T= testigo (n=8), Tdef = testigo deficiente en antioxidantes (n=8), SN = nefrótica (n=8), SNdef = nefrótica deficiente en antioxidantes (n=6). Los datos están expresados como media \pm error estándar. ANOVA $p < 0.05$, a vs. Testigo, b vs. Testigo deficiente, c vs. nefrótica.

La FL se asoció directa y significativamente con la concentración de albúmina en suero ($r = 0.5806$, $p < 0.01$) y la relación molar vitE/c-LDL ($r = 0.6520$, $p < 0.01$), y de manera inversa y significativa con los niveles de proteína en orina ($r = -0.7989$, $p < 0.01$), CT ($r = -0.7005$, $p < 0.01$), c-LDL ($r = -0.8504$, $p < 0.01$) (figura 6).

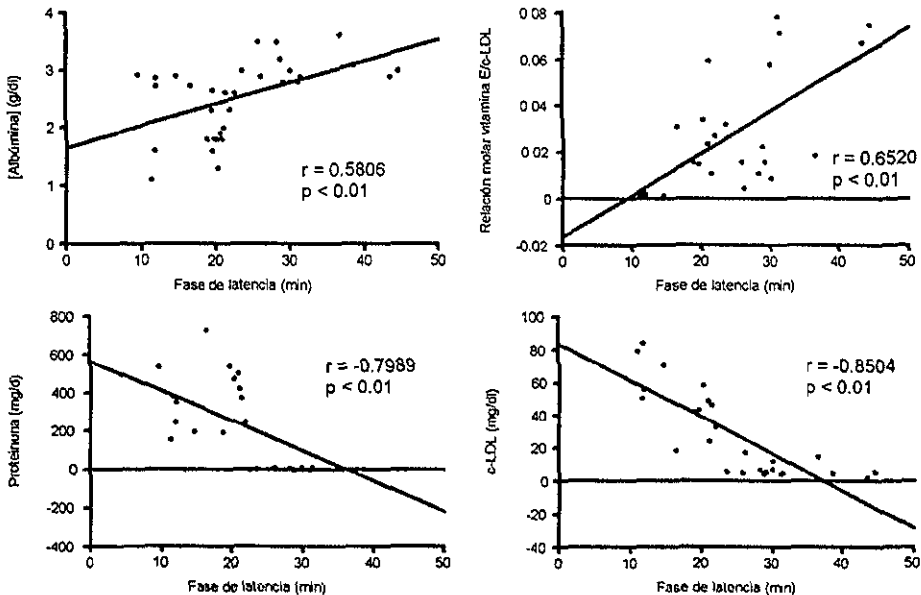


Figura 6. Correlación de Spearman entre la fase de latencia y otras variables.

5. Subclases de LDL

Las subclases de LDL de los animales estudiados se determinaron por electroforesis en un gel en gradiente de poliacrilamida y condiciones no reductoras. Las subclases de LDL fueron similares en los cuatro grupos de animales estudiados (figura 7).

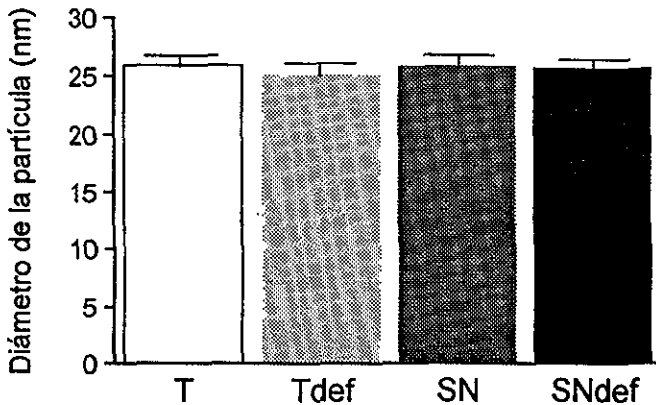


Figura 7. Subclases de LDL de ratas nefróticas y testigo con y sin deficiencia de antioxidantes en la dieta.

T= testigo (n=15), Tdef = testigo deficiente en antioxidantes (n=10), SN = nefrótica (n=8), SNdef = nefrótica deficiente en antioxidantes (10). Los datos están expresados como media \pm error estándar. ANOVA p = no significativa.

6. Asociación entre la disfunción endotelial y las variables analizadas.

La asociación del logaritmo de la concentración efectiva 50 de Ach y Car con los niveles de las otras variables se investigó mediante análisis de correlación (tabla 7). Se encontró una relación directa y significativa del $\log CE_{50}$ de Ach y Car con la proteinuria, CT, TG, c-HDL, c-LDL e inversa y significativa con la relación molar vitamina E/c-LDL y FL. El tamaño de la partícula de LDL sólo se asoció directa y significativamente con el $\log CE_{50}$ de Ach.

Tabla 7. Correlación de Spearman entre la concentración efectiva 50 de acetilcolina y carbacol y otras variables.

	Acetilcolina		Carbacol	
	Log CE ₅₀		Log CE ₅₀	
	r _s	p	r _s	p
Proteinuria	0.5060	<0.01	0.2955	<0.05
Albúmina	-0.2067	ns	-0.1775	ns
Colesterol total	0.6408	<0.01	0.4536	<0.01
Triacilgliceroles	0.3887	<0.01	0.3244	<0.01
c-HDL	0.4571	<0.01	0.3089	<0.05
c-LDL	0.6601	<0.01	0.3805	<0.01
Relación vitE/c-LDL	-0.6415	<0.01	-0.5034	<0.01
Tamaño de LDL	0.3163	<0.05	-0.0777	ns
Fase latencia	-0.5621	<0.01	-0.5621	<0.01

c-HDL = colesterol de la lipoproteína de alta densidad, c-LDL = colesterol de la lipoproteína de baja densidad, relación vitE/c-LDL = relación molar de la vitamina E por el colesterol de la lipoproteína de baja densidad.

7. Análisis multivariado

Para examinar la independencia de las asociaciones entre log CE₅₀ de Ach y Car y los lípidos, relación vitE/c-LDL, FL y proteinuria, se empleó el análisis de regresión múltiple. En el modelo se utilizaron como variables independientes la proteinuria, CT, TG, c-HDL, c-LDL, tamaño de la partícula de LDL, FL y la relación molar vitE/c-LDL y como variables dependientes los valores del logaritmo de CE₅₀ para Ach y Car. En la tabla 8 se muestra que el log CE₅₀ de Ach se asoció en forma inversa e independiente

sólo con la FL, mientras que el log CE₅₀ de Car se asoció en forma directa e independiente con c-LDL.

Tabla 8. Análisis de regresión múltiple para el logaritmo de la concentración efectiva 50 de acetilcolina y carbacol.

Variables			
Dependientes	Independientes	β	p
<u>Log CE₅₀ acetilcolina</u>	Proteinuria	-0.0934	0.6768
	Colesterol total	0.1396	0.5894
	Triacilgliceroles	0.1106	0.5744
	Colesterol de LDL	0.2597	0.3610
	Colesterol de HDL	0.0013	0.9949
	Tamaño de LDL	0.1929	0.2569
	Relación vitamina E/c-LDL	-0.2274	0.3041
	Fase de latencia	-0.6525	0.0007
<u>Log CE₅₀ carbacol</u>	Proteinuria	-0.1946	0.3645
	Colesterol total	-0.4825	0.8677
	Triacilgliceroles	-0.0737	0.7071
	Colesterol de LDL	0.5506	0.0043
	Colesterol de HDL	-0.0443	0.8301
	Tamaño de LDL	0.1333	0.4590
	Relación vitamina E/c-LDL	-0.0690	0.7649
	Fase de latencia	-0.0417	0.8906

Log CE₅₀ = logaritmo de la concentración efectiva de acetilcolina o carbacol para obtener el 50% de la respuesta máxima.

DISCUSIÓN

La presencia de dislipidemia es común en las enfermedades renales y puede contribuir a la mayor incidencia de enfermedad arterial coronaria en estas entidades.⁸ El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto de las anomalías lipoproteicas del SN experimental sobre la relajación dependiente de endotelio en ratas con y sin deficiencia de antioxidantes en la dieta, así como examinar la asociación del tamaño y la susceptibilidad a la oxidación de LDL con la disfunción endotelial. Nuestra hipótesis fue que la alteración en la relajación vascular dependiente de endotelio se asocia con una mayor susceptibilidad a la oxidación de LDL, que puede ocurrir como consecuencia del incremento en la concentración de c-LDL, de la deficiencia de vitamina E y selenio y, probablemente, del cambio en el tamaño de la partícula de la lipoproteína de baja densidad.

Se ha informado que, en el SN experimental inducido por ANP, existe un incremento de los niveles circulantes de las fracciones lipoproteicas.^{3,12,61} En este estudio, en las ratas con SN (SN y SNdef) se observó un aumento significativo de los niveles en suero de CT, TG, c-LDL y c-HDL (tabla 5) en comparación con los testigos (T y Tdef). Aunque se elevaron tanto los niveles de c-HDL como de c-LDL, el incremento de esta última fracción fue 6.5 y 8 veces mayor en las ratas SN y SNdef vs. T y Tdef, respectivamente; mientras que, el incremento de c-HDL fue de tan sólo 1.5 y 2.5 veces en las SNdef y SN en comparación con las Tdef y T, respectivamente. La magnitud de la HC fue menor a la descrita previamente en la literatura. Ito *et al.* reportaron concentraciones de colesterol total de 483 ± 18 mg/dl⁶² y 519 ± 22 mg/dl¹⁰ a los 30 y 40 días, respectivamente,

post-inducción de la nefrosis con daunomicina. En este estudio encontramos valores de colesterol total de 187.8 ± 10 mg/dl en las ratas SN y 165.5 ± 7.7 mg/dl en las SNdef, después de 56 días de evolución del SN. La severidad de la HC del SN se encuentra íntimamente relacionada con la magnitud de proteinuria.¹⁵ A los 30 y 40 días, Ito y colaboradores reportaron 550 ± 43 mg de proteínas/día⁶² y 656 ± 100 mg de proteínas/día,¹⁰ respectivamente. En nuestro caso fue de 437 ± 60 mg de proteínas/día para las ratas SN y 370 ± 43 mg de proteínas/día para las SNdef, a los 56 días de evolución de la enfermedad (tabla 3). Por lo tanto, es posible que la menor elevación de colesterol en este estudio se deba al menor grado de proteinuria observado en estos animales.

Por otra parte, en el SN, el CT habitualmente se correlaciona de manera inversa con los niveles de albúmina.^{3,4} En nuestras ratas SN los niveles de albúmina en suero se asociaron inversa y significativamente con colesterol total ($r = -0.5139$, $p < 0.01$), c-LDL ($r = -0.6303$, $p < 0.01$), y proteinuria ($r = -0.4682$, $p < 0.01$), indicando la estrecha relación existente entre la pérdida de proteínas por la orina y la HC presente en el SN.

Es de interés mencionar que en este estudio pudimos confirmar anomalías de lípidos y lipoproteínas previamente descritos en el síndrome nefrótico del ser humano y del animal experimental. Sin embargo, no pudimos demostrar que el SN se asocie a cambios en el tamaño de LDL en este modelo experimental.

Aunque el peso inicial fue similar en todos los grupos y no se observaron diferencias significativas en consumo de alimento, nuestras ratas con SN, al igual que en estudios previos,^{10,15} tuvieron menor peso en comparación con las testigo, lo cual indica que la ganancia ponderal es lenta en los animales nefróticos.

Los niveles tisulares de vitamina E se relacionan con el consumo de este compuesto; asimismo, su concentración en hígado es considerada como un índice de la ingesta diaria y como reservorio de vitamina E en el organismo.³² En el presente trabajo, el estado antioxidante de los animales se moduló mediante la dieta. En los animales alimentados con dieta deficiente en antioxidantes (Tdef y SNdef), las concentraciones de vitamina E en suero y en hígado fueron significativamente menores que en las ratas que recibieron la dieta habitual. Estos hallazgos comprobaron que la dieta deficiente en vitamina E y selenio, administrada por ocho semanas, produce una depleción adecuada de esta vitamina en suero y tejidos y, por tanto, deficiencia de antioxidantes. Se hace notar que a pesar del aumento de vitamina E circulante en las ratas con SN, la concentración tisular de esta vitamina fue similar a la del grupo testigo, en todos los órganos estudiados (tabla 4). Esto puede deberse a una regulación a la baja en el receptor de LDL demostrada en el SN experimental;⁶³ la menor actividad del receptor de LDL impide la captura de VLDL y LDL (lipoproteínas que transportan la vitamina E) por el hígado y tejidos extrahepáticos.

Por otro lado, los valores de vitamina E en los tejidos fueron similares en los grupos Tdef y SNdef con excepción de riñón y corazón, donde la disminución de la vitamina en las ratas SNdef fue más acentuada que en las Tdef (tabla 4), resultado para el cual no tenemos una explicación.

Al igual que lo observado en ratas con hipercolesterolemia inducida por dieta rica en colesterol,³⁵ la concentración más alta de vitamina E en suero se encontró en el grupo SN. Esto, como ya se mencionó, se debe al mayor número de partículas de LDL presentes en la HC. Sin embargo, al calcular la relación molar vitamina E/c-LDL, se

observó menor cantidad de vitamina E por colesterol de LDL en las ratas con SN en comparación con las T. Este resultado sugiere que en los animales con SN, principalmente en los SNdef, existe una deficiencia relativa de vitamina E que puede condicionar una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo *in vivo*.

En el humano y en el animal experimental, la HC se asocia a incremento en el proceso de oxidación, lo que favorece la disfunción endotelial y la aterogénesis.^{18,20,21} En pacientes con elevación de LDL se han encontrado anormalidades en la vasodilatación dependiente de endotelio.⁶⁴ La disfunción endotelial también se ha observado en ratas con HC y deficiencia de antioxidantes,³⁵ así como en animales con SN.^{9,10} Nuestros resultados apoyan los hallazgos de estos estudios. La función endotelial, evaluada por la respuesta a concentraciones crecientes de Ach y Car, y a través de la concentración efectiva para obtener el 50 por ciento de la relajación (CE₅₀), disminuyó en los animales con SN (grupo SN y SNdef) en comparación con los testigo (T y Tdef). Aunque la disfunción endotelial fué más acentuada en los animales SNdef, sugiriendo que la deficiencia de antioxidantes agravó la anormalidad endotelial, la diferencia fué significativa sólo cuando se analizó la CE₅₀ en respuesta a Car. La CE₅₀ en respuesta a Ach en el grupo Tdef, fué significativamente menor que en el grupo T (tabla 6), lo cual sugiere que aún en ausencia de alteraciones lipoproteicas, la deficiencia de antioxidantes, por sí misma, también produce anormalidades en la función endotelial. La deficiencia nutrimental de vitamina E y selenio favorece la producción de aniones superóxido y, probablemente, altera la función del endotelio mediante el incremento en la destrucción de NO por radicales libres derivados del oxígeno.⁶⁵ La oxidación de LDL *in vitro* es mayor al aumentar la cantidad de AGPI presentes en la partícula y disminuye

al incrementar su contenido en antioxidantes. La vitamina E es el antioxidante más abundante y cuando la dieta se suplementa con esta vitamina, su contenido en la partícula aumenta y la hace más resistente al proceso de oxidación.⁴⁸

Son varios los mecanismos a través de los cuales el endotelio controla la función vascular; uno de ellos es a través de la liberación de NO que difunde a las células del músculo liso vascular, donde incrementa el nivel de GMP cíclico dando lugar a la relajación del vaso.⁶⁶⁻⁶⁹ La acción biológica del NO se altera en respuesta a numerosos estímulos nocivos. Se ha demostrado *in vitro*⁵² e *in vivo*²³ que la LDLox es un potente inhibidor de la dilatación dependiente de endotelio. Kugiyama *et. al.*⁵² observaron, en anillos de arteria de conejo, que la LDLox, pero no la LDL nativa, induce una dilatación anormal en respuesta a Ach. Sin embargo, en el SN no se había estudiado la relación entre la relajación dependiente de endotelio y la susceptibilidad a la oxidación de la LDL. La susceptibilidad de estas lipoproteínas a la oxidación fue mayor en las ratas nefróticas, principalmente en las SNdef, las cuales también mostraron mayor alteración de la relajación dependiente de endotelio. Además, el análisis de regresión múltiple mostró que la función endotelial en respuesta a Ach y Car se asoció en forma independiente con la duración de la FL y con las concentraciones de c-LDL, respectivamente. Estas observaciones, no descritas previamente en el SN, sugieren que la oxidación de LDL participa de manera importante en la disfunción endotelial de este modelo experimental. Los resultados son consistentes con trabajos que han informado el efecto de la HC y LDLox sobre la función del endotelio.⁴⁵ Son varios los mecanismos mediante los cuales la LDLox puede inhibir la relajación vascular mediada por endotelio;²¹ estos incluyen: a) disminución de la síntesis de NO⁶⁶ como

consecuencia de reducción de la transcripción, así como aumento de degradación del ARNm de la sintasa de NO,^{67,70} b) reducción de la liberación de NO,⁷¹ c) aumento en la destrucción de NO por interacción directa con LDLox⁷² y d) incremento en la producción de radicales libres de oxígeno⁷³ capaces de reaccionar e inactivar al NO.^{52,74} Es probable que la función endotelial anormal observada en este estudio sea consecuencia tanto de la HC secundaria al SN, como de la disminución en la protección antioxidante de la LDL, lo que da como resultado un incremento en la susceptibilidad a la oxidación de esta partícula lipoproteica.

En resumen, en el presente estudio se demostró por primera vez que, en el SN experimental, el defecto en la relajación dependiente de endotelio se asocia en forma independiente con las concentraciones del c-LDL y la susceptibilidad a la oxidación de esta lipoproteína, pero no con el tamaño de la partícula. A su vez, la susceptibilidad a la oxidación de LDL se asoció en forma directa con la concentración de albúmina en suero y la relación molar vitamina E/c-LDL y en forma inversa con la proteinuria y los niveles de c-LDL; los resultados sugieren la existencia de una estrecha relación de la proteinuria, hipoalbuminemia, HC y deficiencia relativa de vitamina E, características todas ellas del SN, con la susceptibilidad a la oxidación de LDL.



CONCLUSIONES

En animales con SN la deficiencia relativa de vitamina E y la disfunción endotelial se relacionan con un aumento en la susceptibilidad a la oxidación de la LDL, pero no con cambios en el tamaño de la partícula. Estos hallazgos sugieren que el estrés oxidativo es un determinante importante de la disfunción endotelial del SN experimental y probablemente del ser humano. La deficiencia en antioxidantes puede ser fisiopatológicamente importante tanto en el inicio como en la progresión de enfermedad vascular secundaria al SN.

Los resultados de este trabajo, apoyan el empleo terapéutico de la vitamina E en el SN. Nuestros datos hacen pensar que en el SN del ser humano o del animal experimental, la suplementación con vitamina E, favorecerá el aumento en la concentración de este antioxidante en la partícula de LDL, haciéndola más resistente a los procesos oxidativos y, por consiguiente, disminuyendo la disfunción endotelial y muy probablemente la progresión del daño renal así como las complicaciones cardiovasculares presentes en esta enfermedad.

Se requieren estudios adicionales para determinar la participación de la LDL oxidada en esta enfermedad renal, así como para evaluar el posible mecanismo a través del cual la hipercolesterolemia y/o LDL oxidada, en conjunto con la deficiencia en vitamina E, dan lugar a la disfunción endotelial del SN.

BIBLIOGRAFÍA

1. Marsh JB: Lipoprotein metabolism in experimental nephrosis. *J Lipid Res* 25:1619-1623, 1984
2. Kaysen GA: Plasma composition in the nephrotic syndrome. *Am J Nephrol* 13:347-359, 1993
3. Harris RC, Ismail N: Extrarenal complications of the nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis* 23:477-497, 1994
4. Olbricht CJ, Koch KM: Treatment of hyperlipidemia in nephrotic syndrome: time for a change?. *Nephron* 62:125-129, 1992
5. Wheeler DC, Bernard DB: Lipid abnormalities in the nephrotic syndrome: causes, consequences, and treatment. *Am J Kid Dis* 23:331-346, 1994
6. Keane WF, Kasiske BL: Hyperlipidemia in the nephrotic syndrome. *N Engl J Med* 323:603-604, 1990
7. Kaysen GA: Nonrenal complications of the nephrotic syndrome. *Annu Rev Med* 45:201-210, 1994
8. Ordoñez JD, Hiatt RA, Killebrew EJ, Fireman BH: The increased risk of coronary heart disease associated with nephrotic syndrome. *Kidney Int* 44:638-642, 1993
9. Stoes ESG, Joles JA, Chang PC, Koomans HA, Rabelink TJ: Impaired endothelial function in patients with nephrotic range proteinuria. *Kidney Int* 48:544-550, 1995
10. Ito M, Oguri M, Naruse A, Ito H, Suzuki Y, Satake N: Impaired endothelium-dependent relaxation in isolated thoracic aorta of rats with daunomycin-induced nephrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 258:388-395, 1991
11. Ito M, Yamamoto I, Naruse A, Suzuki Y, Satake N, Shibata S: Impaired relaxing response to isoprenaline in isolated thoracic aorta of nephrotic rats: decrease in release of EDRF from endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 29:232-239, 1997
12. Gherardi E, Calandra S: Plasma and urinary lipids and lipoproteins during the development of nephrotic syndrome induced in the rat by puromycin aminonucleoside. *Biochim Biophys Acta* 710:188-196, 1981
13. Avram MM: Similarities between glomerular sclerosis and atherosclerosis in human renal biopsy specimens: a role for lipoprotein glomerulopathy. *Am J Med* 87:39N-41N, 1989
14. Eddy AA: Interstitial inflammation and fibrosis in rats with diet-induced hypercholesterolemia. *Kidney Int* 50:1139-1149, 1996
15. Hirano T, Mamo JCL, Nagano S, Sugisaki T: The lowering effect of probucol on plasma lipoprotein and proteinuria in puromycin aminonucleoside-induced nephrotic rats. *Nephron* 58:95-100, 1991
16. Hirano T, Morohoshi T: Treatment of hyperlipidemia with probucol suppresses the development of focal and segmental glomerulosclerosis in chronic aminonucleoside nephrosis. *Nephron* 60:443-447, 1992
17. Magil AB, Frohlich JJ, Innis SM, Steinbrecher UP: Oxidized low-density lipoprotein in experimental focal glomerulosclerosis. *Kidney Int* 43:1243-1250, 1993

18. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL: Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320:915-924, 1989
19. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G: The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 13:341-390, 1992
20. Witztum JL, Steinberg D: Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 88:1785-1792, 1991
21. Cox DA, Cohen ML: Effects of oxidized low-density lipoprotein on vascular contraction and relaxation: clinical and pharmacological implications in atherosclerosis. *Pharmacol Rev* 48:3-19, 1996
22. Berry EM: The effects of nutrients on lipoprotein susceptibility to oxidation. *Curr Opin Lipidol* 3:5-11, 1992
23. Matthys KE, Van Hove CE, Kockx MM, Andries LJ, Van Osselaer N, Herman AG, Bult H: Exposure to oxidized low-density lipoprotein in vivo enhances intimal thickening and selectively impairs endothelium-dependent dilation in the rabbit. *Cardiovas Res* 37:239-246, 1998
24. Bassenge E, Busse R: Endothelial modulation of coronary tone. *Prog Cardiovasc Dis* 30:349-380, 1988
25. Celermajer DS: Endothelial dysfunction: Does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol* 30:325-333, 1997
26. Vogel RA: Coronary risk factors, endothelial function, and atherosclerosis: A review. *Clin Cardiol* 20:426-432, 1997
27. Quyyumi AA: Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am J Med* 105:32S-39S, 1998
28. Griffin BA, Caslake MJ, Yip B, Tait GW, Packard CJ, Shepherd J: Rapid isolation of low density lipoprotein (LDL) subfractions from plasma by density gradient ultracentrifugation. *Atherosclerosis* 83:59-67, 1990
29. Krauss RM, Blanche PJ: Detection and quantitation of LDL subfractions. *Curr Opin Lipidol* 3:377-383, 1992
30. Sevanian A, Hwang J, Hodis H, Cazzolato G, Avogaro P, Bittolo-Bon G: Contribution of an in vivo oxidized LDL to LDL oxidation and its association with dense LDL subpopulations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:784-793, 1996
31. Chait A, Brazg RL, Tribble DL, Krauss RM: Susceptibility of small, dense, low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B. *Am J Med* 94:350-356, 1993
32. Farrell PM, Roberts RJ: Vitamin E. Modern nutrition in health and disease. Edited by Shels ME, Olson JA, Shike M. Philadelphia, Lea & Febiger, pp 326-340, 1994
33. Liebler DC: The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Crit Rev Toxicol* 23:147-169, 1993
34. Kayden HJ, Traber MG: Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. *J Lipid Res* 34:343-358, 1993
35. Raji L, Nagy J, Coffee K, DeMaster EG: Hypercholesterolemia promotes endothelial dysfunction in vitamin E- and selenium-deficient rats. *Hypertension* 22:56-61, 1993

36. Princen HMG, van Duyvenvoorde W, Buytenhek R, van der Laarse A, van Poppel G, Leuven JAG, van Hinsbergh VWM: Supplementation with low doses of vitamin E protects LDL from lipid peroxidation in men and women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:325-333, 1995

37. Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M: Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Rad Res Comms* 6:67-75, 1989

38. Zhang A, Vertommem J, Van Gaal L, De Leeuw I: A rapid and simple method for measuring the susceptibility of low-density-lipoprotein and very-low-density-lipoprotein to copper-catalyzed oxidation. *Clin Chim Acta* 227:159-173, 1994

39. Cominacini L, Garbin U, Davoli A, Micciolo R, Bosello O, Gaviraghi G, Scuro LA, Pastorino AM: A simple test for predisposition to LDL oxidation based on the fluorescence development during copper-catalyzed oxidative modification. *J Lipid Res* 32:349-358, 1991

40. Napoli C, Postiglione A, Triggiani M, Corso G, Palumbo G, Carbone V, Ruocco A, Ambrosio G, Montefusco S, Marloni A, Condorelli M, Chiariello M: Oxidative structural modifications of low density lipoprotein in homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 118:259-273, 1995

41. Regnstrom J, Nilsson J, Tornvall P, Landou C, Hamsten A: Susceptibility to low-density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet* 339:1183-1186, 1992

42. Maggi E, Marchesi E, Ravetta V, Falaschi F, Finardi G, Bellomo G: Low-density lipoprotein oxidation in essential hypertension. *J Hypertens* 11:1103-1111, 1993

43. Salonen JT, Korpela H, Nyyssönen K, Porkkala E, Tuomainen T-P, Belcher JD, Jacobs DR, Salonen R: Lowering of body iron stores by blood letting and oxidation resistance of serum lipoproteins: a randomized cross-over trial in male smokers. *J Intern Med* 237:161-168, 1995

44. Maggi E, Bellazzi R, Falaschi F, Frattoni A, Perani G, Finardi G, Gazo A, Nai M, Romanini D, Bellomo G: Enhanced LDL oxidation in uremic patients: an additional mechanism for accelerated atherosclerosis? *Kidney Int* 45:876-883, 1994

45. Anderson TJ, Meredith IT, Charbonneau F, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP, Ganz P: Endothelium-dependent coronary vasomotion relates to the susceptibility of LDL to oxidation in humans. *Circulation* 93:1647-1650, 1996

46. Toikka JO, Niemi P, Ahotupa M, Niinikoski H, Viikari JSA, Ronnema T, Hartiala JJ, Raitakari OT: Large-artery elastic properties in young men. Relationships to serum lipoproteins and oxidized low-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:436-441, 1999

47. Jialal I, Grundy SM: Effect of dietary supplementation with alpha-tocopherol on the oxidative modification of low density lipoprotein. *J Lipid Res* 33:899-906, 1992

48. Dieber-Rotheneder M, Puhl H, Waeg G, Striegl G, Esterbauer H: Effect of oral supplementation with D- α -tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoproteins and resistance to oxidation. *J Lipid Res* 32:1325-1332, 1991

49. Neunteufl T, Kostner K, Katzenschlager R, Zehetgruber M, Maurer G, Weidinger F: Additional benefit of vitamin E supplementation to simvastatin therapy on vasoreactivity of the brachial artery of hypercholesterolemic men. *J Am Coll Cardiol* 32:711-716, 1998

50. Trachtman H, Schwob N, Maesaka J, Valderrama E: Dietary vitamin E supplementation ameliorates renal injury in chronic puromycin aminonucleoside nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 5:1811-1819, 1995

51. Washio M, Nanishi F, Okuda S, Onoyama K, Fujishima M: Alpha tocopherol improves focal glomerulosclerosis in rats with adriamycin-induced progressive renal failure. *Nephron* 68:347-352, 1994
52. Kugiyama K, Kerns SA, Morrisett JD, Roberts R, Henry PD: Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins. *Nature* 344:160-162, 1990
53. De Long DM, De Long ER, Wood PD, Lippel K, Rifkind BM: A comparison of methods for the estimation of plasma low and very low density lipoprotein cholesterol. *JAMA* 256:2372-2377, 1986
54. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951
55. Huang CJ, Shaw HM: Tissue vitamin E status is compromised by dietary protein insufficiency in young growing rats. *J Nutr* 124:571-579, 1994
56. Baños G, Carvajal K, Cardoso G, Zamora J, Franco M: Vascular reactivity and effect of serum in a rat model of hypertriglyceridemia and hypertension. *Am J Hypertens* 10:379-388, 1997
57. Brussaard HE, Gevers Leuven JA, Kluff C, Krans HMJ, van Duyvenvoorde W, Buytenhek R, van der Laarse A, Princen HMG: Effect of 17 β -estradiol on plasma lipids and LDL oxidation in postmenopausal women with type II diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:324-330, 1997
58. Maggi E, Chiesa R, Melissano G, Castellano R, Astore D, Grossi A, Finardi G, Bellomo G: LDL oxidation in patients with severe carotid atherosclerosis. A study of in vitro and in vivo oxidation markers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 14:1892-1899, 1994
59. Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Striegl G, Waeg G: Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am J Clin Nutr* 53:314S-321S, 1991
60. Krauss RM, Burke DJ: Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. *J Lipid Res* 23:97-104, 1982
61. Joven J, Masana L, Villabona C, Vilella E, Bargalló T, Trias M, Figueras M, Turner PR: Low density lipoprotein metabolism in rats with puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. *Metabolism* 38:491-495, 1989
62. Ito M, Naruse A, Yamamoto I, Oguri M, Suzuki Y, Satake N, Shibata S: Nephrosis augments contractile response to adrenoceptor agonists by the decrease in release of endothelium-derived relaxing factor from the endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 269:589-595, 1994
63. Vaziri ND, Liang KH: Down-regulation of hepatic LDL receptor expression in experimental nephrosis. *Kidney Int* 50:887-893, 1996
64. Gilligan DM, Sack MN, Guetta V, Casino PR, Quyyumi AA, Rader DJ, Panza JA, Cannon RO: Effect of antioxidant vitamins on low density lipoprotein oxidation and impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 24:1611-1617, 1994
65. Davidge ST, Ojimba J, McLaughlin MK: Vascular function in the vitamin E-deprived rat. An interaction between nitric oxide and superoxide anions. *Hypertension* 31:830-835, 1998
66. Loscalzo J, Welch G: Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Progr Cardiovasc Dis* 38:87-104, 1995
67. Harrison DG: Endothelial control of vasomotion and nitric oxide production. A potential target for risk factor management. *Cardiol Clin* 14:1-15, 1996
68. Moncada S, Higgs A: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329:2002-2012, 1993

69. Wennmalm A: Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease. *J Intern Med* 235:317-327, 1994
70. Selwyn AP, Kinlay S, Creager M, Libby P, Ganz P: Cell dysfunction in atherosclerosis and the ischemic manifestations of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 79:17-23, 1997
71. Sattar N, Petrie JR, Jaap AJ: The atherogenic lipoprotein phenotype and vascular endothelial dysfunction. *Atherosclerosis* 138:229-235, 1998
72. Chin JH, Azhar S, Hoffman BB: Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. *J Clin Invest* 89:10-18, 1992
73. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG: Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 91:2546-2551, 1993
74. Rubanyi GM, Vanhoutte PM: Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 250:H822-H827, 1986

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Como llegar a este día sin volver a maravillarme de estar viva. Sin agradecerte al mirar hacia atrás y ver una vida plena. . .llena de felicidad! Señor, me has regalado una vida como la que jamás imaginé; cada vez que recorro uno a uno los instantes vividos pienso en cual grande es mi deuda contigo, cuanto más debo esforzarme para corresponder a tanto amor. Gracias por todos los amaneceres al lado de Alex, por todas las sonrisas y lágrimas que han ido construyendo nuestra felicidad. Por los momentos de profunda tristeza donde un rayo de luz me ha devuelto la fe y la confianza, por los instantes de desilusión y desesperanza en que una oración le ha dado tranquilidad a mi espíritu, gracias por los momentos difíciles que me han ayudado a ser más fuerte y segura de mí misma. Por la brisa que al chocar en mi rostro me ha infundido una profunda tranquilidad, permitiéndome continuar mi camino. Gracias por mi familia, aún en crecimiento; ha sido fuente inagotable de amor y comprensión, donde mis errores nunca han sido lo suficientemente graves como para no ser digna de amor, donde sin importar cuán equivocada esté nunca me han faltado apoyo y consejos para rectificar mi actitud. Donde el ambiente de paz y tranquilidad me hacen disfrutar intensamente la vida.

Gracias por rodearme, por igual, de personas ejemplares por su dedicación, responsabilidad, solidaridad, compañerismo, alegría y amor; así como de personas que en su inseguridad, envidia y egoísmo casi lograron envolverme en un ambiente de desamor. Tanto unos como otros me han ayudado a descubrir cualidades y virtudes que ahora me han convertido en una mujer con más fuerza y confianza en sus propias cualidades y consciente de sus grandes limitaciones, y que de una forma u otra han sido un motor que no me ha dejado estancarme, por el contrario me ha impulsado cada vez más a seguir adelante, siempre con la mirada muy en alto y sobre todo con mucha dignidad y confianza en lo que soy y deseo ser . . .

Gracias por mis padres, apoyo incondicional en todas y cada una de mis decisiones, por que sin importar cuanto tiempo pase a mi regreso siempre encuentro sus brazos abiertos y cada vez..... más llenos de amor.

Gracias por Diana, ejemplo de tenacidad y superación. Por todas y cada una de la situaciones que nos unieron más y nos han permitida gozar de una verdadera experiencia de ser...hermanas.

A mi adorado esposo: Alex

Gracias por ser el arquitecto del hogar lleno de amor, cálido, acogedor y alegre que jamás pude imaginar; al que siempre es tan agradable llegar y donde todos mis miedos, dudas, inseguridades y tristezas son más pequeños y las alegrías, sonrisas y cantos crecen con cada día que compartimos.

Gracias porque entre tus brazos siempre encuentro la calma, la tranquilidad y en ocasiones hasta la cordura y la prudencia que en diversas situaciones me han hecho tanta falta.

Gracias por tu silencio sin reproches, por todas las ocasiones que comprendiste que simplemente buscaba ser escuchada, no aconsejada, ni juzgada y sin decir palabra me dejaste hablar. Gracias por todas las veces donde el silencio ha dicho más que mil palabras, cuando tus ojos con tanta ternura me han dicho te amo., cuando tus manos me han colmado de caricias haciéndome sentir profundamente amada.

Gracias por todas las noches en que he llegado tarde y en las que al no encontrar un cariñoso recibimiento has preparado la cena con tanto amor, has encendido la lavadora, doblado y acomodado la ropa en cada closet...en cada cajón, recogido los trastes olvidados y preparado la cafetera para el inicio del siguiente día

Gracias por esas tardes de silenciosa lectura, cuando tu compañía hizo más sencillo concluir con las labores académicas. Gracias por todas las ocasiones en las que cediste salidas y diversión a cambio redacción, dibujos, correcciones, lectura y estudio.

Gracias por qué a pesar de ser un lenguaje diferente, me has escuchado con atención cuando estudio, siendo mi mejor auditorio. Gracias por todos los desayunos no compartidos, en los que en silencio apoyaste mi constante carrera para no llegar tarde a mis actividades junto con un beso y una pequeña pero sustanciosa colación.

Gracias por casi diez años de ir construyendo una historia común, en la que hemos concretado tantos sueños e ilusiones; recorriendo el camino tomados de las manos y mirando siempre a un horizonte lleno de luz y esperanza. Gracias por no permanecer al margen y ser protagonista tanto de mis logros como de mis tropiezos. Gracias por un sueño más convertido en realidad; sin ti, sin tu compañía, apoyo, comprensión y amor este día tan esperado no sería hoy una realidad.

Gracias por todo lo que soy y he podido ser desde que estoy a tu lado...TE AMO.

A mis Padres

Gracias porque desde mis primeros movimientos hasta mis pasos actuales siempre he sentido libertad para actuar bajo la mirada vigilante de su amor. Porque rodeada siempre de un gran amor, me dieron ejemplo no solo de hombre y mujer de bien, sino de pareja ejemplar fundada y unida en el amor, la sinceridad, el respeto, el compromiso. Así sembraron en mí el firme deseo de luchar por algo que hoy es parte de mi realidad...un matrimonio en camino hacia la felicidad.

Gracias por enseñarme que siempre es sano el equilibrio entre el trabajo y la relación de pareja, por convencerme de que los logros se saborean mejor al calor del amor, por mostrarme que todo cuanto logramos cobra valor solo cuando somos capaces de compartirlo con aquella persona que, desde afuera, ha trabajado por ello tan duro como uno mismo.

Gracias a su gran enseñanza, no de palabras y frases vacías, sino por el contrario de ejemplo y vida, hoy me siento una mujer viva, llena de amor y dispuesta a crecer día a día en un mundo que aún puede ser mejor. Gracias por el regalo de un hogar lleno de amor y felicidad, donde nunca ha faltado nada y siempre sobra amor que compartir.

Gracias por las llamadas de atención, por los besos y abrazos, por las vacaciones, por el tiempo que compartimos al cien por ciento, por el diálogo y la comunicación. Por todos los recuerdos que en mi mente y corazón sólo me hablan de un gran amor y de un hogar feliz.

Gracias por la vida...gracias a Dios por la bendición de que sean mis padres....Los AMO.

A Mami

Porque tu ejemplo de mujer ha sido siempre guía de mis pasos; como hija, compañera, esposa, madre has sido fiel en tu entrega, cada uno hemos tenido nuestro espacio en tu corazón. Porque el cansancio jamás ha sido mas grande que tu deseo de estar con nosotras, de compartir nuestras vidas aún llenas de dudas e inquietudes. Porque aún con el paso de los años nunca dejamos de ser .tus pequeñas. y siempre encontramos tus brazos abiertos, en esos momentos de miedo y duda. Porque aún sin pedirlo, tus caricias llegan a nosotros en los momentos en que más las necesitamos. Por ser un digno ejemplo como profesionista comprometida consigo misma. Me siento sumamente orgullosa de ti..espero algún día llegar a ser como tú. TE AMO.

A Papi

Gracias por darme la oportunidad de la interacción genética. No ha sido fácil pero ha valido la pena. Porque siendo tan parecidos somos tan diferentes. Por tu lucha constante entre el deber y el querer, por aceptar el reto del trabajo compartido. Aún en contra de lo que piensa el mundo, no ha sido fácil para mí llevar a cuestas tu nombre, es un gran orgullo pero sobre todo.. una enorme responsabilidad; me ha negado tantos derechos que serían míos siendo alguien ajena, pero me ha dado la oportunidad no sólo de trabajar hombro a hombro con el jefe, sino con el padre.

Por ser para mí un ejemplo de superación y lucha constante. Por enseñarme a amar el trabajo y a comprometerme por él. Por todas esas tardes en las que inviertes tu tiempo intentando compartirme parte del arte de la investigación. Porque así como hace algunos años jugamos a la comidita y cantamos el chorrito, ahora compartimos mis primeros pasos aún titubantes en este apasionante camino. Gracias por llevarme de viaje a la isla de la aventura; siendo éste mi primer recorrido, pido a Dios me permita muchos más a tu lado. Aún me falta mucho por aprender, mucho que trabajar, mucho que recorrer pero tengo el ánimo para hacerlo porque sé que siempre aceptarás el reto de hacerlo conmigo.

Muchas gracias papi ..JE AMO.

A Diamis

Gracias por tu gran ejemplo de tenacidad y lucha. Porque siempre que las cosas parecían salir mal, aún en la distancia, supiste darme ánimos y llenar mi cara con una sonrisa y hasta mi voz con una carcajada. Porque caminando senderos diferentes, nuestra relación se ha hecho muy estrecha y el amor cada vez más grande. Por ser una excelente cómplice, un fino oído siempre atento a cada uno de mis sonidos, aún los mas íntimos. Porque cuando me sentía derrotada, el recuerdo de tu constante lucha para conseguir tus metas logró que aflorara en mí la fuerza y ese pequeño extra para llegar hasta el fin. Por que sintiéndome tan orgullosa de ti, deseo darte algo que te permita sentirte orgullosa de mí. Porque soy muy afortunada de tener una hermana pequeña que resultó ser tan grande y fuerte frente a la vida, pero que al mismo tiempo no deja de ser terriblemente sensible a una puesta de Sol.

JE ZUERO

A Félix y Bety

Gracias por todo su amor. Por abrirme las puertas de su casa y sobre todo ...de su corazón. Por hacerme sentir muy querida. Por escucharme y aconsejarme, por las bromas y los abrazos, por los paseos en familia. Por estar siempre pendientes de nosotros. Por ese hogar que me regaló un maravilloso esposo y un excelente hermano. Soy muy afortunada de contar con otro papá y otra mamá. Los adoro.

A mi Abis

Gracias por todo tu amor, por todos los recuerdos felices de la infancia donde siempre estuviste presente. Porque en el camino de ser abuelita llegaste a ser amiga. Por todo el interés y apoyo que jamás me faltó, por la tranquilidad y alegría que siento a tu lado. Por todos y cada uno de tus consejos, por todas las tardes que pasamos entre pláticas y risas. Por llenar mi vida de instantes tan hermosos que nunca olvidaré. Por comprenderme, ayudarme, aconsejarme y tratar de entenderme. Por toda la luz que has dado a mi vida. TE QUERO.

A mi querida Lidia

Gracias por tu gran ejemplo de madre y esposa. Por tu interés constante en nosotros, por todas tus oraciones y sacrificios que ayudaron a formar a mi primera familia y que ahora son parte fundamental de los cimientos de mi nuevo hogar. Por la herencia de la fe y del amor a Dios, gracias a este hermoso regalo mi vida esta completa.

A Paty Fuentes

Porque ante los momentos difíciles, tu recuerdo siempre me ayudo a reunir las fuerzas necesarias para seguir adelante. Porque sé que aún en la distancia y el silencio nuestra unión es tan estrecha como la fuerza del pensamiento. Gracias por ser parte de los momentos más importantes en mi vida.

A mi tía Rebe

Gracias por un amor tan grande que se siente intensamente en la ausencia. Por los pensamientos y oraciones que cruzan la distancia y el tiempo. Por tu presencia en mi vida y en mis primeros recuerdos.

A Pepin

Gracias por todas las clases de computación y estadística. Por todos los consejos que me ayudaron a solucionar los problemas en el laboratorio. Por tu apoyo y confianza aún en los momentos en que los resultados no eran alentadores. Por tu constante interés en mis dudas. Por todas esas horas frente a la computadora haciendo cálculos y análisis. Por las sugerencias para elaborar tablas y figuras. Por recorrer este difícil pero apasionante camino como compañero y guía. Por tu disposición para ayudarme a solucionar cada uno de los baches que fui encontrando en el camino. Por una gran amistad y todo el tiempo que hemos compartido. Te quiero mucho.

A Toño

Gracias por esas pláticas al atardecer, en las que generosamente me brindaste tu tiempo y sobre todo tus consejos. Porque siempre compartiste conmigo ideas, enseñanzas, consejos, experiencias y dudas que me ayudaron a recorrer el camino con mejores armas para evitar tropiezos muy dolorosos. Por tu gran ejemplo de generosidad, por enseñarme que el servir es un arte que es muy importante cultivar. Porque sin importar que tan ocupado estuvieras, siempre te diste el tiempo para prestar ayuda en respuesta a cualquier solicitud. Por todos los momentos en que los chistes lograron liberar la tensión acumulada y por aquellas pláticas en las que filosofando me ayudaste a encontrar una salida a mis preocupaciones. Por los consejos que sirvieron para retomar el camino y seguir adelante. Por compartir el camino en esta gran aventura de la maestría; aún a pesar de los momentos difíciles, disfrute hacer este recorrido contigo, el cual resultó ser un aprendizaje compartido y sobre todo.....entre amigos.

Gracias por brindarme toda tu confianza y permitirme utilizar tu computadora como si fuera mía, dándome la posibilidad de no detener el recorrido y poder llegar al final. Estoy en deuda contigo.

A mi querida July

Gracias a tu ayuda pude asistir a mis clases. Porque fuiste un apoyo importante para que yo pudiera dedicarle tiempo al estudio mientras tu compartías mis obligaciones laborales. Porque al trabajar entre amigas el ambiente fue agradable y cordial, permitiéndome encontrar los espacios para el estudio y el trabajo de laboratorio. Por ser oído a mis palabras y voz ante mis dudas. Porque siempre tu sonrisa me ayudo a recuperar el ánimo y a luchar por llegar a la meta. Por las palabras jamás pronunciadas y las miradas que han revelado los mas íntimos sentimientos. Por brindarme la

oportunidad de una amistad que ha vencido el tiempo y la distancia. Por infundirme confianza y ánimo en todas las ocasiones que intenté abandonar el camino. *TE QUERO MUCHO.*

A mi querida e inolvidable Adelita:

Gracias por tu gran ejemplo como investigadora y mujer. Por ser una excelente cómplice y amiga. Por el tiempo compartido en el laboratorio entre presión y trabajo. Por tu invaluable apoyo durante los largos días de experimentos, en que no me faltó tu ánimo y compañía para continuar. Por escucharme en esos días de desánimo y darme el consejo exacto para devolverme la confianza y la ganas para seguir el camino. Por todo el interés que siempre mostraste por mis actividades, sueños, deseos y logros. Por tu alegría ante mis éxitos. Por tu presencia ayer, hoy y siempre.

A la Dra. Sandra Gómez Arroyo

Porque en el aula la relación fue más allá que profesor-alumno. Por las mañanas en que compartimos no sólo conocimientos sino experiencias. Por los consejos y el tiempo dedicado a resolver dudas, pero sobre todo a escuchar.

Al Dr. José Pedraza

Gracias por creer que sería capaz de iniciar y concluir este trabajo. Por confiar en mí en esos momentos en que yo tuve tantas dudas. Por el apoyo e interés por cada paso dado. Por la oportunidad de trabajar en otro laboratorio, experiencia que me ayudó a valorar lo que tengo. Por el tiempo y la preocupación invertidos en cada una de las etapas de este trabajo. Por permitir una relación de amistad y trabajo. Por una gran experiencia de vida y académica que no olvidaré. Muchas gracias!

A la Dra. Chagoya, Al Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza

Gracia por dedicar tanto tiempo a la evaluación de este trabajo. Por sus observaciones que ayudaron a mi formación durante este periodo tan importante en mi vida académica. Por las reuniones en las que las críticas, fueron en realidad consejos entre amigos. Por la experiencia compartida. Porque sus recomendaciones no fueron solo académicas sino que traspasaron al terreno personal, proporcionándome la oportunidad de conocer un poco más allá del investigador y llegar al ser humano. Por escuchar mis inquietudes y proporcionar varias opciones. Por estos años compartidos en esta etapa de mi vida ..Gracias.

A la Dra. Mc Carthy:

Por su asesoría y entrenamiento para la evaluación de la función endotelial. Por mantener las puertas de su laboratorio siempre abiertas para mis dudas y el desarrollo de mi trabajo experimental. Por los largos días de experimentos en donde siempre hubo una palabra de aliento o un gesto amable que lograron darle alegría al momento. Por la atención y el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A la Dra. Ma. Elena Barra Rubio, Dra. Verónica Quarner Lanz y al Dr. Rolando Hernández Muñoz Por aceptar ser parte del jurado que evaluó este trabajo, por el tiempo dedicado a la revisión del mismo. Sus sugerencias fueron de gran importancia.

A CONACyT

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico que recibí durante mis estudios de posgrado y, sobre todo, por el apoyo financiero para la realización del proyecto, sin su ayuda este sueño no sería hoy una realidad.

A la Facultad de Ciencias

Gracias por abrirme las puertas y permitir que en tus aulas continuara mi formación académica, en el apasionante mundo de la investigación. Ha sido una gran experiencia.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi querida UNAM

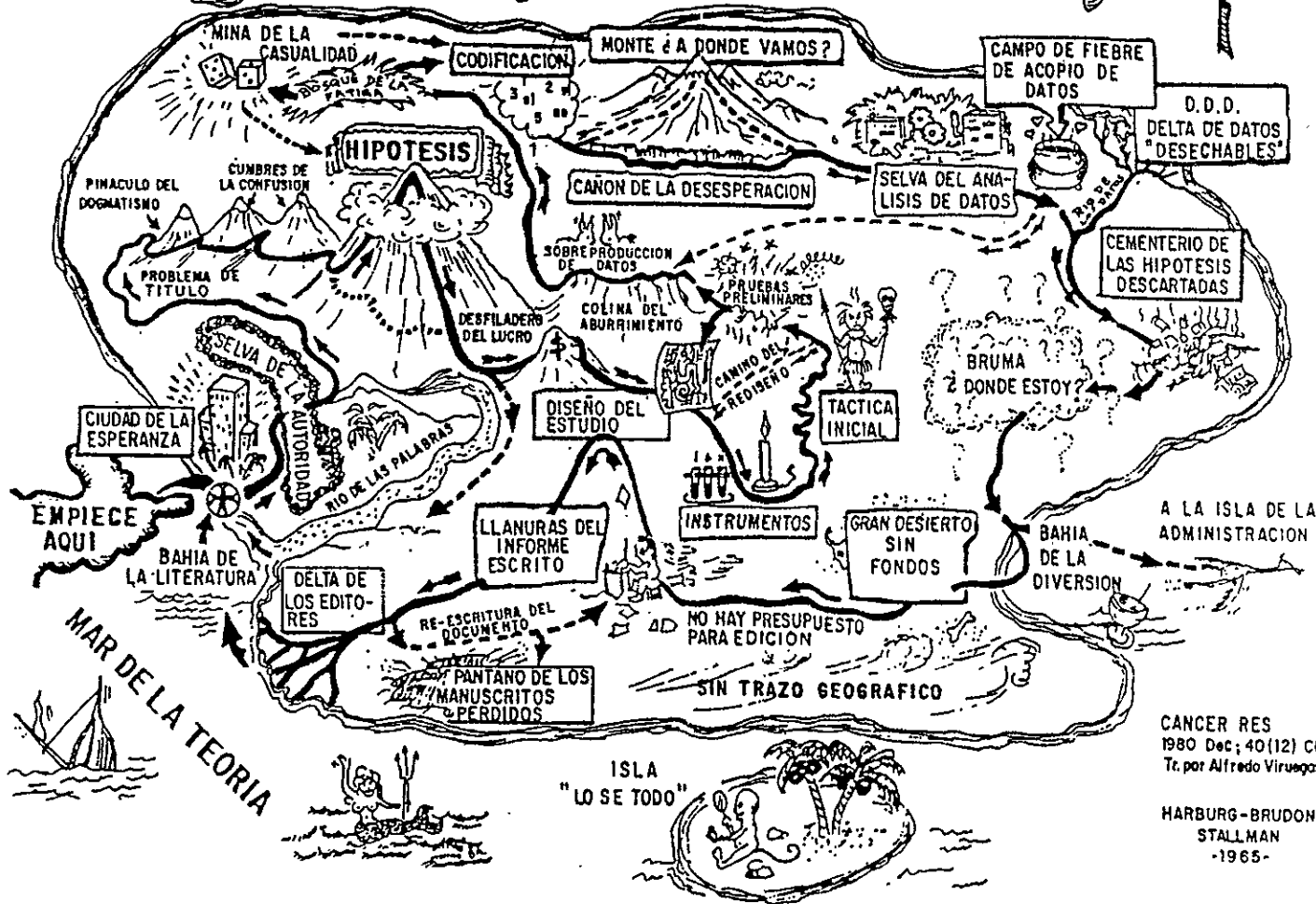
Gracias porque entre tus aulas no solo permitiste mi formación de licenciatura, tus puertas permanecieron abiertas para que pudiera iniciar el recorrido por la isla de la investigación. Por permitir y apoyar mi formación como universitaria en los campos académicos como alumno y profesor; gracias por darme de las armas necesarias para poner en alto tu nombre, y para ser parte activa del cambio y progreso del mundo exterior. Por los incontables recursos humanos y materiales que siempre estuvieron a mi alcance, porque en mi camino a los largo de nueve años por tus aulas, auditorios y jardines no sólo se ha transformado mi vida científica sino también mi vida personal. Me siento muy orgullosa de ser universitaria.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

LA ISLA DE LA INVESTIGACIÓN

Regla Única: No Obstruir la Trayectoria de la Investigación

OCEANO DE LA EXPERIENCIA



CANCER RES
1980 Dec; 40(12) CONTRATAPA
Tr. por Alfredo Viruegas Hernández

HARBURG-BRUDON
STALLMAN
-1965-