

00524  
177



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

IMPLEMENTACION DE UN METODO PARA LA  
DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA  
LECITINA COLESTEROL ACILO TRANSFERASA: SU IMPACTO  
SOBRE EL METABOLISMO DE LIPOPROTEINAS DE ALTA  
DENSIDAD EN SUJETOS CON CARDIOPATIA ISQUEMICA  
CORONARIA.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A :

**MARISELA SANCHEZ SOLORIO**



MEXICO, D. F.



**EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA**

2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## JURADO ASIGNADO:

### PROFESORES:

PRESIDENTE: RAÚL AGUILAR CABALLERO.  
VOCAL: LAURA PENICHE VILLALPANDO.  
SECRETARIO: OSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ.  
1er. SUPLENTE: GLORIA GUTIERREZ VENEGAZ.  
2do. SUPLENTE: ENEIDA BAILÓN VELEZ.

### SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE METABOLISMO DE LÍPIDOS Y ATROSCLEROSIS.  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA. INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLÓGÍA  
"IGNACIO CHÁVEZ".

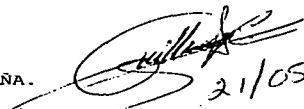
### ASESOR:

Dr. OSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ.



### SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. GUILLERMO CELESTINO CARDOSO SALDAÑA.



21/05/03

### SUSTENTANTE:

MARISELA SÁNCHEZ SOLORIO.



Tesis apoyada por el CONACYT, proyecto J-28942M

A Dios, Gracias por cumplir este sueño, uno de tantos que te he pedido .....

- Así quedo Jacob solo, y luchó con él un hombre hasta rayar el alba.
- Pero viendo que no le podía vencer le tocó en la articulación del muslo, y descoyuntóse la articulación del muslo de Jacob mientras luchaba con él.
- Por lo cual dijo: "Déjame que ya raya el alba". Mas contesto: "No te dejare ir si no me bendices".
  - Preguntóle él: "Cuál es tú nombre?" Y respondió: "Jacob".
- Le dijo entonces: "En adelante no te llamarás más Jacob, sino Israel; porque has luchado con Dios y con hombres, y has prevalecido"
- Preguntóle Jacob: "Dime, por favor, tú nombre?". Más él no contestó. "Por qué me preguntas mi nombre?" Y le bendijo allí.

GENESIS, 32, 24- 29.

## AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Oscar A. Pérez Méndez por su asesoría y colaboración en el desarrollo de esta Tesis, con profundo respeto e infinita admiración por su gran profesionalismo.

A la Dra. Claudia Huesca Gómez por su amistad y colaboración al inicio de esta Tesis.

Al Dr. Carlos Posadas Romero, Jefe del Departamento de Endocrinología del INC por la donación de las muestras de los sujetos cardiopatas y de los adolescentes, por prestarme el equipo del laboratorio de endocrino y por su apoyo académico.

A la Dra. Ana María Mejía, Jefa del Banco de Sangre del INC, por la donación de muestras de los sujetos sin cardiopatía y por su amistad incondicional.

Al Dr. Guillermo C. Cardoso Saldaña por su asesoría en el desarrollo de esta Tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por su apoyo a través del proyecto J28942M otorgado al Dr. Oscar A. Pérez Méndez para la realización de esta Tesis.

A la Dra. Verónica Guarner, Jefa del Departamento de Fisiología por permitirme el ser parte de su equipo de trabajo.

A mi jurado asignado, por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

A todos mis profesores, con profundo respeto, ya que constituyen el eje central de esta meta que representa el principio de mi carrera.

Con especial cariño a mis hermanos Norma y Hugo, por todo lo que hemos compartido juntos, ya que con fe y empeño se pueden llegar a muchos lados, siempre y cuando nos lo proponamos. Los quiero mucho.

A mi tía Nina y a mi tío Manolo, ya que sin su apoyo esta meta sería irrealizable. Gracias por haber sido un gran ejemplo a seguir, por haberme dado la libertad de ser lo que soy, la educación y la formación que constituye la herencia más valiosa que pudieron haberme dado.

A mis tías y tíos:, Anita, Rosita, Lulú, Maru, Carmen, Toño, Arturo, Nino, Rey y Arturo Carmona , por sus valiosos consejos, sincero cariño e incondicional apoyo para la realización de este hermoso sueño.

A mis abues, Carmen y Jesús, por todo el cariño amor y comprensión que me brindaron, por ser el pilar principal de mi formación, y ser un maravilloso ejemplo de honestidad y responsabilidad e infinita humanidad, por haber estado en los momentos más hermosos y más difíciles de mi vida, por la tenacidad y fuerza que me dieron con sus palabras. Por confiar en mí y por otorgarme un camino de luz a seguir.....QEPD.

A la memoria de mi Mami, por enseñarme que la i y la j llevan punto. Sólo que hay que ponerlos en casos especiales, como en este. Gracias por darme la vida.

A todos mis primos y sobrinos, por todos los gratos momentos que hemos y seguiremos compartiendo, esperando que logren todas sus metas en la vida, no importando lo grande o pequeñas que sean, lo importante es realizarlas. Con inmenso cariño.

En especial, a todos mis amigos del Laboratorio de Metabolismo de Lípidos: Tomas, Luis, Vladi, Juan Carlos, Miguel, Serafin y mi comadre Eli, por su apoyo desinteresado, su sincera amistad y más que nada porque juntos marcamos el comienzo de esta aventura inolvidable.

A todas mis amigas y amigos de la Facultad: Adry, Jacque, Tere, Pina, Carmen, Beto, Pinki, Rulo y todos aquellos con los que compartí momentos agradables dentro y fuera de los salones de clase.....  
¡Gracias por ser parte de mi mundo!!



- Ne vous laissez pas corrompre par le scepticisme stéril et déprimant ; ne perdez pas l'haleine devant la tristesse des certaines heures que traversent les nations.

Vivez dans la paix sereine des laboratoires et bibliothèques. Demandez-vous d'abord : Qu'est-ce-que j'ai fait pour m'instruire? Et après, quand vous progressez, Qu'est-ce-que j'ai fait pour ma patrie? Jusqu'à-ce que arrive le jour où vous pouvez sentir la satisfaction intérieure de penser que de certaine manière vous avez contribué au progrès et le bien être de l'humanité.

- Louis Pasteur.

---

# CONTENIDO

---

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
LÍPIDOS PLASMÁTICOS	3
Colesterol	3
Triglicéridos	4
Fosfolípidos	5
APOLIPOPROTEÍNAS	5
LIPOPROTEÍNAS	7
Clases de lipoproteínas	8
METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS QUE CONTIENEN APO B	10
Quilomicrones	10
Transporte de Ácidos Grasos	11
Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)	12
Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL)	14
Lipoproteínas de baja densidad (LDL)	15
METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS QUE CONTIENEN APO AI	17
Lipoproteínas de alta densidad (HDL)	17
Subclases de HDL	17
Principales proteínas asociadas a HDL: apolipoproteína AI	20
Apolipoproteína AII	23
Lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT)	24
TRANSPORTE REVERSO DEL COLESTEROL (TRC)	26
LIPOPROTEÍNAS Y ATEROSCLEROSIS	29
Infiltración y atrapamiento de las LDL	30
Modificación de las LDL	31
Formación de células espumosas	31
Patogénesis de la placa aterosclerosa	32
Papel de las HDL	33
Papel de la LCAT en el TRC	34
LCAT y aterosclerosis	34
JUSTIFICACIÓN	36
HIPÓTESIS	38
OBJETIVOS	39
PARTE EXPERIMENTAL	40
Población de estudio	40
Determinación del perfil de lípidos	41
Separación de HDL	41
Caracterización de subpoblaciones HDL	42
Purificación de apo AI	43
Preparación del sustrato	43

Reacción LCAT	44
RESULTADOS	47
Estandarización de la reacción LCAT	47
Variabilidad intra e inter- ensayo	48
Sujetos de estudio	49
DISCUSIÓN	60
CONCLUSIONES	68
BIBLIOGRAFÍA	69

### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las lipoproteínas	6
Tabla 2. Clasificación de las apolipoproteínas	9
Tabla 3. Características de proteínas asociadas a HDL	19
Tabla 4. Efecto de la cantidad de sustrato y el tiempo de incubación	47
Tabla 5. Variabilidad inter- ensayo	48
Tabla 6. Perfil de lípidos, características antropométricas y actividad LCAT de los sujetos EAC+ y EAC-	49
Tabla 7. Análisis t- Student entre sujetos EAC+ y EAC- por sexo	50
Tabla 8. Perfil de lípidos, características antropométricas y actividad LCAT en niños y adultos EAC-	51
Tabla 9. Correlación entre el perfil de lípidos y las características antropométricas con la actividad LCAT	52
Tabla 10. Correlación las subpoblaciones HDL con la actividad LCAT	57

### ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del par de hélices de de la apo AI	21
Figura 2. Modelo de la estructura secundaria de la apo AI	22
Figura 3. Reacción catalizada por la LCAT	26
Figura 4. Transporte reverso del colesterol	28
Figura 5. Modelo propuesto para el transporte reverso del colesterol en sujetos EAC-	67a
Figura 6. Modelo propuesto para el transporte reverso del colesterol en sujetos EAC+	67b

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1a. Colesterol HDL en los diferentes terciles de LCAT de sujetos EAC+ y EAC-	53
Gráfico 1b. Colesterol HDL en los diferentes terciles de LCAT de sujetos EAC-	54
Gráfico 1c. Colesterol HDL en los diferentes terciles de LCAT de sujetos EAC+	54
Gráfico 2. Distribución de subpoblaciones HDL en sujetos EAC+ y EAC-	55
Gráfico 3a. Correlación entre %HDL 2b en función de la actividad LCAT	57
Gráfico 3b. Correlación entre %HDL 2a en función de la actividad LCAT	58
Gráfico 3c. Correlación entre %HDL 3a en función de la actividad LCAT	58
Gráfico 3d. Correlación entre %HDL 3b en función de la actividad LCAT	59
Gráfico 3e. Correlación entre %HDL 3c en función de la actividad LCAT	59

## TABLA DE ABREVIATURAS.

aa aminoácidos  
apo apolipoproteína  
bp pares de bases  
CE colesterol esterificado  
CETP cholesterol ester transfer protein (proteína transportadora de ésteres de colesterol)  
CL colesterol libre o no esterificado  
DNAC complementary deoxyribonucleic acid (ácido desoxiribonucleico complementario)  
FED enfermedad de ojo de pescado  
FLD deficiencia familiar de LCAT  
HDL high density lipoprotein (lipoproteína de alta densidad)  
IDL lipoproteína de densidad intermedia  
kd kilodaltons  
LCAT lecitina colesterol acilo transferasa  
LDL low density lipoprotein (lipoproteína de baja densidad)  
LH lipasa hepática  
LP lipasa pancreática  
Lp AI lipoproteínas que sólo contienen apo AI  
Lp AI/ AII lipoproteínas que contienen apo AI y apo AII  
LPL lipoproteína lipasa  
LTFI lipid transfer inhibitor protein (proteína inhibidora de la transferencia de lípidos)  
PLTP phospholipid transfer protein (proteína transportadora de fosfolípidos)  
RNAm messenger ribonucleic acid (ácido ribonucleico mensajero)  
RER retículo endoplásmico rugoso  
SER retículo endoplásmico liso  
TRC transporte reverso del colesterol  
VLDL very low density lipoprotein (lipoproteínas de muy baja densidad)

**INFORMACIÓN**

---

En la actualidad, la enfermedad arterial coronaria (EAC) es la segunda causa de muerte en nuestro país, por lo que se han realizado numerosos esfuerzos para ser frente a las complicaciones de esta enfermedad, que produce innumerables daños individuales, familiares, sociales y económicos. Además de avances diagnósticos y terapéuticos diseñados para enfrentar a la aterosclerosis, en los últimos años se ha desarrollado un esfuerzo progresivamente mayor para tratar de disminuir la prevalencia de la enfermedad y por tanto, sus complicaciones.<sup>1</sup>

Fisiopatológicamente, la EAC resulta de diversas alteraciones del metabolismo de lipoproteínas, ya sea en un aumento o disminución de la concentración plasmática de las mismas. La importancia clínica de estos trastornos radica principalmente en la tendencia de los sujetos afectados a desarrollar prematuramente aterosclerosis y sus complicaciones;<sup>2</sup> por lo cual, el presente trabajo da la pauta a realizar diagnósticos futuros más finos a edades tempranas en personas predispuestas a la enfermedad.

Dentro de este marco, se elige a la lecitina colesterol acilo transferasa (LCAT) por ser la enzima clave en el transporte reverso del colesterol, siendo responsable de la regulación de casi todo el colesterol esterificado que se encuentra en el plasma humano;<sup>3</sup> dando origen así al planteamiento del objetivo principal de este trabajo: determinar la influencia de la actividad enzimática de la LCAT en el metabolismo de lipoproteínas de alta densidad de sujetos que han desarrollado enfermedad aterosclerosa y en sujetos sin diagnóstico ni predisposición a la enfermedad

**Marisela Sánchez Solorio**

**Facultad de Química. UNAM**

mediante un método experimental ya existente y adaptable a las instalaciones y equipo de los laboratorios de metabolismo de lípidos y endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

**ANTECEDENTES.**

---

**LÍPIDOS PLASMÁTICOS.**

La naturaleza y las funciones de los lípidos sugieren una definición útil de los mismos: los lípidos son moléculas orgánicas naturales, que se aíslan de células y tejidos por extracción con solventes orgánicos no polares. Debido a que generalmente tienen grandes porciones de hidrocarburos en sus estructuras, los lípidos son insolubles en agua pero solubles en solventes orgánicos. Los lípidos se definen por sus propiedades físicas (solubilidad) más que por su estructura. Pueden clasificarse en dos tipos generales: aquellos que como las grasas y las ceras, contienen enlaces éster hidrolizables y aquellos otros que, como el colesterol y otros esteroides, carecen de enlaces éster y no pueden hidrolizarse. Los principales lípidos del plasma humano son el colesterol, los ésteres de colesterol, los triglicéridos, los fosfolípidos y los ácidos grasos no esterificados. Los lípidos son transportados en el plasma y otros compartimientos extracelulares del cuerpo por medio de las lipoproteínas.

**COLESTEROL.**

El colesterol es un alcohol esteroide no saturado, el cual posee una estructura cíclica de los derivados del ciclopentanoperhidrofenantreno. Es esencial para el funcionamiento normal del organismo, ya que es un componente importante en la estructura de las membranas celulares. Además, es un precursor obligado para la biosíntesis de ácidos biliares y hormonas esteroideas incluyendo las hormonas sexuales y adrenales. El organismo humano



normal contiene aproximadamente dos gramos de colesterol por kilogramo de peso corporal. Una gran parte de esta cantidad se encuentra en intercambio constante con el colesterol plasmático y está en todas las lipoproteínas plasmáticas. Dos tercios del colesterol en el plasma están esterificados con cadenas largas saturadas y ácidos grasos no saturados, y un tercio existe en forma de colesterol no esterificado. Los ésteres de colesterol en el plasma se hallan en constante movimiento debido a un proceso continuo de hidrólisis y resíntesis. La hidrólisis de estos ésteres se lleva a cabo en el hígado, pero su síntesis tiene lugar principalmente en el plasma mediante la transferencia de un residuo de ácido graso desde la lecitina al colesterol libre. En los seres humanos, del 60% al 70% del colesterol es transportado por las LDL, del 20% al 35%, por las HDL y del 5% al 12% por las VLDL.<sup>5</sup>

### **TRIGLICÉRIDOS.**

Los triglicéridos representan la subclase más abundante de glicéridos neutros en la naturaleza y su función primaria consiste en proporcionar energía a las células. La célula consume ácidos grasos para transformarlos por combustión en  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , a expensas del oxígeno molecular. El organismo humano almacena una gran cantidad de ácidos grasos en uniones éster con el glicerol en el tejido adiposo. Constituyen alrededor de un 25% del peso del tejido adiposo y son la forma principal de almacenamiento de lípidos en los seres humanos. Esta forma de almacenamiento de energía de reserva es altamente eficaz debido a la magnitud del intercambio de energía libre que se produce cuando los ácidos grasos son catabolizados. Químicamente, son ésteres formados por glicerina y ácidos grasos de cadena larga, habitualmente están presentes tres ácidos grasos diferentes y en mayor parte son transportados en

el plasma, por los quilomicrones y las VLDL, pero también están presentes en cantidades menores en LDL y HDL.<sup>6</sup>

### **FOSFOLÍPIDOS.**

Al igual que el colesterol y los triglicéridos, los fosfolípidos son componentes estructurales importantes para la formación de las membranas celulares y para su mantenimiento. Están caracterizados por la presencia de cadenas laterales hidrofóbicas y de grupos cefálicos hidrofílicos. Esta organización química convierte a estos compuestos en elementos apropiados para actuar como constituyentes principales al nivel de las interfases biológicas, como las membranas.<sup>7</sup> Los fosfolípidos tienen una tendencia a poseer ácidos grasos saturados en la posición 1 e insaturados y poliinsaturados en la posición 2.<sup>4,5</sup> Químicamente, son ésteres de glicerina que contienen dos ácidos grasos y un ácido fosfatídico. Los fosfolípidos principales del plasma son la esfingomiélin, la lecitina y las cefalinas. Constituyen alrededor del 25% de la masa de las LDL (lecitina: esfingomiélin= 2:1) y alrededor del 30% de la masa de HDL (lecitina: esfingomiélin= 5:1). La lecitina parece ser el fosfolípido más importante desde un punto de vista cuantitativo, tanto en los sistemas de membrana como en los mecanismos de transporte de lípidos.

### **APOLIPOPROTEÍNAS.**

La parte proteica de las lipoproteínas está compuesta de varias proteínas específicas denominadas apolipoproteínas. Cada lipoproteína tiene una composición particular y relativamente constante. Estas apolipoproteínas

localizadas en la superficie de las lipoproteínas cumplen varias funciones importantes:

- Son necesarias para la síntesis y secreción de lipoproteínas específicas.
- Actúan para estabilizar la superficie de la lipoproteína y en consecuencia toda la partícula lipoproteica.
- Son cofactores de la activación de enzimas que modifican las lipoproteínas.
- Pueden interactuar con receptores específicos en la superficie de las células.

Tabla 1. CLASIFICACIÓN DE LAS APOLIPOPROTEÍNAS.<sup>5</sup>

APOLIPOPROTEÍNA	PESO MOLECULAR (kd).	ORIGEN	LIPOPROTEÍNAS
A1	28	Intestino, hígado.	HDL, Qm.
AII	17	Intestino, hígado.	HDL, Qm.
AIV	46	Intestino.	HDL, Qm.
B48	264	Intestino.	Qm.
B100	550	Hígado.	VLDL, IDL, LDL.
CI	5.8	Hígado.	Qm, VLDL, IDL, HDL.
CII	9.1	Hígado.	Qm, VLDL, IDL, HDL.
CIII	8.75	Hígado.	Qm, VLDL, IDL, HDL.
E2	35.0	Hígado, tejidos periféricos.	Qm, VLDL, IDL, HDL.
E3	35.0	Hígado, tejidos periféricos.	Qm, VLDL, IDL, HDL.
E4	35.0	Hígado, tejidos periféricos.	Qm, VLDL, IDL, HDL.

Varían de una lipoproteína a otra, y en gran medida, dirigen la función de toda la lipoproteína. De las cuatro categorías principales de apolipoproteínas, las de mayor peso molecular son las apo B. La apo B48, producida por el intestino, se encuentra en los quilomicrones, mientras que la apo B100, sintetizada por el hígado es un constituyente del revestimiento

superficial de las VLDL, IDL, y LDL. Por otra parte, las apo A son elaboradas por el hígado y el intestino, se encuentran en los quilomicrones y las HDL. Las apo C se sintetizan en el hígado; en la circulación son transportadas por los quilomicrones, VLDL, IDL y HDL. Las tres isoformas de apo E tienen un peso molecular de 35 kD, y difieren solamente por los aminoácidos en las posiciones 112 y 158. Son sintetizadas principalmente en el hígado, pero pequeñas cantidades pueden ser elaboradas por otros tejidos. Las apo E se encuentran en el suero sobre los quilomicrones, VLDL, IDL y HDL.<sup>9</sup>

### **LIPOPROTEÍNAS.**

Como se mencionó anteriormente, los lípidos son insolubles en el medio acuoso, incluyendo el plasma. Sólo cuando los lípidos hidrófobicos se encuentran fijados a proteínas son capaces de solubilizarse en la circulación sanguínea. Generalmente las lipoproteínas son consideradas como una clase de macromoléculas asociadas con el transporte de los lípidos.<sup>7</sup> La estructura básica de todas las lipoproteínas es semejante, ya que todas ellas contienen un núcleo formado por ésteres de colesterol y triglicéridos, un revestimiento superficial de colesterol no esterificado, fosfolípidos y apolipoproteínas. El revestimiento superficial sirve como interfase entre el plasma acuoso y el núcleo lipídico no polar. Esta superficie polar hace así posible el transporte de los ésteres de colesterol y de los triglicéridos en el plasma. Las proteínas y los fosfolípidos confieren solubilidad a los lípidos, que de otro modo serían insolubles. La fijación de los lípidos internos a la capa de los fosfolípidos y proteínas es no covalente y se produce principalmente a través de las uniones de hidrógeno y las fuerzas de Van der Waals. La

proteína libre de lípidos se denomina apolipoproteína. Los lípidos que están débilmente fijados a las proteínas y fosfolípidos, se hallan unidos de una manera suficientemente laxa como para permitir el rápido intercambio de los lípidos entre las lipoproteínas séricas. La unión de las lipoproteínas séricas es suficientemente firme como para permitir su separación en los sistemas analíticos que son empleados para aislarlas y clasificarlas.<sup>10</sup>

### **CLASES DE LIPOPROTEÍNAS.**

El nombre de las cinco clases principales de lipoproteínas (Tabla 1) proviene de su densidad de flotación, su diferencia en tamaño, composición química, características fisicoquímicas y movilidad electroforética. Los quilomicrones son lipoproteínas sintetizadas por el intestino, muy ricas en triglicéridos de origen exógeno, pobres en colesterol libre y fosfolípidos y contienen de 1% a 2% de proteínas. Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) son sintetizadas por el hígado, al ser sometidas a electroforesis presentan una movilidad pre- $\beta$ . Tienen una proporción lípido: proteína más baja que los quilomicrones. Los triglicéridos de VLDL son de origen endógeno, principalmente hepático y constituyen alrededor de la mitad de la masa de las partículas. El colesterol y los fosfolípidos constituyen alrededor del 40% de las partículas, y alrededor del 10% de la masa es proteína (principalmente apo B y apo C, pero también algo de apo E). Hay un amplio margen de tamaño de partículas de VLDL con una variación de la composición química; las partículas mayores son más ricas en triglicéridos y en apo C, mientras que las partículas menores son más pobres en estos componentes. Las partículas pequeñas, con depleción de triglicéridos y de material superficial, son resultado de la hidrólisis de las VLDL por la lipoproteína lipasa (LPL). A menudo se denominan VLDL residuales o lipoproteínas de densidad intermedia

(IDL). Estas últimas son producidas por el catabolismo de VLDL.<sup>4</sup> Las lipoproteínas de baja densidad (LDL), se derivan del catabolismo de IDL. Son las principales lipoproteínas transportadoras del colesterol en el suero; al ser sometidas a electroforesis presentan movilidad beta. Las LDL constituyen alrededor del 50% de la masa total de lipoproteínas en el plasma humano. Las partículas LDL son mucho más pequeñas que las lipoproteínas ricas en triglicéridos. El colesterol, en su mayor parte esterificado, representa alrededor de la mitad de la masa de las LDL. Aproximadamente el 25% de la masa de LDL es proteína (principalmente apo B 100 con indicios de apo C's).<sup>6</sup>

Tabla 2. CLASIFICACION DE LAS LIPOPROTEÍNAS.<sup>4</sup>

LIPOPROTEÍNA	DIAMETRO (Å)	MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA	DENSIDAD DE FLOTACIÓN (g/mL)	ORIGENES
Qm	750-12000	Origen	Menor de 0.94	Intestino
VLDL	300-700	pre-β	0.940-1.006	Hígado
IDL	Aprox. 300	Beta	1.006-1.019	Catabolismo de las VLDL
LDL	180-280	Beta	1.019-1.063	Catabolismo de IDL
HDL	70-120	Alfa	1.063-1.210	Hígado e intestino.
Subclases:				
HDL <sub>2</sub>			1.063-1.120	
HDL <sub>3</sub>			1.120-1.210	

Por último, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) presentan una movilidad alfa. Es una pequeña partícula que consta de un 50% de proteína (sobre todo apo AI y apo AII, pero también algo de apo C's, apo E y apo AIV), el 20% colesterol (en su mayor parte esterificado), un 30% de fosfolípidos y sólo indicios de triglicéridos. Las HDL pueden separarse en dos subclases principales HDL<sub>2</sub> Y HDL<sub>3</sub>, que varían en cuanto a su densidad, tamaño de partícula, composición y posiblemente papel fisiológico.<sup>11,12</sup>

**METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS QUE CONTIENEN APO B****(VÍAS EXÓGENA Y ENDÓGENA).**

Las lipoproteínas que contienen apo B forman un sistema dinámico que asegura el transporte y la distribución de grasas de origen exógeno y endógeno en el organismo. Dos órganos implicados en la biosíntesis y secreción de lipoproteínas con apo B son el intestino y el hígado. En el primero, se lleva a cabo la síntesis de quilomicrones y en el segundo se sintetizan las VLDL.<sup>13</sup>

**QUILOMICRONES.**

El transporte del colesterol desde el intestino al hígado se realiza a través de las lipoproteínas denominadas quilomicrones. Estas lipoproteínas que se sintetizan en las células de la pared intestinal están compuestas principalmente por triglicéridos derivados de las grasas ingeridas en la dieta. Durante la digestión, la grasa ingerida es emulsionada e hidrolizada en el lumen del duodeno mediante las acciones combinadas de la lipasa pancreática (LP) y de las secreciones biliares. Los ácidos grasos de menos de 10 carbonos son transportados a través de la circulación portal directamente hacia el hígado. Otros productos de degradación, principalmente monoglicéridos o ácidos grasos libres de más de 10 carbonos, ingresan a las células de la mucosa intestinal y sirven como precursores en la síntesis de triglicéridos. Los triglicéridos resintetizados se combinan con colesterol y pequeñas cantidades de fosfolípidos y apolipoproteínas para formar las partículas de quilomicrones. La principal apolipoproteína estructural de los quilomicrones es la apo B 48, que aparentemente es necesaria para su síntesis. Las apolipoproteínas de la serie A (AI, AII y AIV) también son

secretadas con los quilomicrones. Al entrar los quilomicrones en el plasma, adquieren apo E y las apo C necesarias para su metabolismo.<sup>14</sup>

Estas lipoproteínas son secretadas en primer lugar en la linfa y a continuación, entran en la circulación sistémica a través del conducto torácico. Al pasar a la circulación periférica, entran en contacto con la LPL, que está localizada sobre la superficie de las células endoteliales capilares. Esta enzima hidroliza los triglicéridos de los quilomicrones, liberando ácidos grasos libres en la circulación, junto con las apo A y apo C. Una vez que se han hidrolizado la mayor parte de los triglicéridos, la lipoproteína regresa a circulación como remanente, conteniendo principalmente ésteres de colesterol en su núcleo. Esta lipoproteína es rápidamente eliminada por el hígado.<sup>15</sup> Así, durante el catabolismo de los quilomicrones, se liberan los ácidos grasos de los triglicéridos dietéticos en la circulación periférica. Esto contrasta con el colesterol dietético que termina en el hígado como ésteres de colesterol y los quilomicrones remanentes.

### **TRANSPORTE DE ÁCIDOS GRASOS.**

Cuando las lipoproteínas ricas en triglicéridos, tales como los quilomicrones, interactúan con la LPL que es activada por la apo CII, los ácidos grasos liberados durante la lipólisis se fijan inmediatamente a la albúmina circulante y como resultado son retenidos en solución. Los ácidos grasos pueden tener tres destinos:<sup>16</sup>

- Pueden ser captados por los músculos u otros tejidos, y ser utilizados para producir energía.
- Pueden ser captados por el tejido adiposo donde serán resintetizados en triglicéridos para su almacenamiento. Cuando se necesita combustible,



estos triglicéridos son sometidos a lipólisis por la lipasa del tejido adiposo y de nuevo se liberan ácidos grasos en la circulación.

- Pueden ser captados por el hígado donde servirán como fuente de combustible o para ser resintetizados en triglicéridos, que se utilizarán en la formación de VLDL.

### **LIPOPROTEÍNAS DE MUY BAJA DENSIDAD (VLDL).**

Las principales lipoproteínas sintetizadas por el hígado son las VLDL. Estas lipoproteínas ricas en triglicéridos son de menor tamaño que los quilomicrones. Su principal apolipoproteína estructural es la apo B100, aunque contiene también apo C's (CI, CII y CIII) y apo E provenientes de las HDL. Los principales lípidos componentes del núcleo no polar de la VLDL son los triglicéridos pero también están presentes en pequeñas cantidades ésteres de colesterol. Además de la apolipoproteínas, el revestimiento superficial contiene colesterol no esterificado y fosfolípidos.<sup>7</sup> La apo B100 se sintetiza en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso (RER). El componente triglicérido de las lipoproteínas, junto con pequeñas cantidades de éster de colesterol, es sintetizado por las enzimas que se fijan a la membrana localizadas en el retículo endoplásmico liso (SER). Al emigrar las apo B100 (y posiblemente las apo E) hacia el SER, se unen con los triglicéridos y los ésteres de colesterol en la unión del RER y del SER, formándose partículas de VLDL naciente.<sup>17</sup> Las partículas de la lipoproteína pasan a través del SER hacia el aparato de Golgi donde las vesículas secretoras que contienen grandes cantidades de partículas VLDL, las cuales brotan y migran hacia la superficie de la célula. Estas vesículas se funden entonces con la membrana de la superficie celular liberando partículas de VLDL naciente en la circulación.<sup>6</sup> El núcleo de las VLDL nacientes está formado casi exclusivamente

por triglicéridos; hay muy poco éster de colesterol presente. El revestimiento superficial de las VLDL nacientes contiene apo B100 y posiblemente apo E. Al circular, las VLDL se transforman en VLDL maduras. Esta transformación se produce mediante la adquisición de ésteres de colesterol y apolipoproteínas CII y CIII, y quizás de más apo E, las cuales son transferidas desde las HDL. Las VLDL maduras interaccionan con la LPL sobre la superficie de las células endoteliales capilares, liberando ácidos grasos en la circulación. Por otra parte los fosfolípidos, en su mayor parte apo C's, y algunas apo E abandonan el revestimiento superficial de las VLDL y son transferidos a las HDL. Las VLDL remanentes, producidas a partir de VLDL por la LPL, regresan a la circulación. El núcleo de las VLDL remanentes se enriquece con ésteres de colesterol, tanto en términos relativos como absolutos, debido a la hidrólisis de los triglicéridos y a la adquisición de ésteres de colesterol a partir de HDL.<sup>18</sup> Las VLDL remanentes pueden tener dos destinos: son captadas por el hígado o transformadas en LDL. Normalmente entre el 60% y el 70% de las VLDL remanentes son directamente eliminadas de la circulación por las células hepáticas, a través de receptores específicos localizados sobre la superficie de las células. Un tipo de receptor hepático es el receptor LDL; estos receptores están concentrados en áreas específicas de la superficie celular denominadas depresiones revestidas. Los receptores LDL reconocen tanto a la apo B100 como la apo E, por lo que se le han denominado receptores apo B/E. Aparentemente las VLDL remanentes no eliminadas por el hígado pueden interactuar con la lipasa hepática (LH), una enzima localizada en la superficie de las células hepáticas.<sup>15</sup> Esta enzima hidroliza los triglicéridos restantes de las VLDL remanentes, produciendo las LDL ricas en colesterol. Durante la hidrólisis de los triglicéridos de las

VLDL remanentes, se liberan ácidos grasos junto con las restantes apolipoproteínas solubles (apo E y pequeñas fracciones de apo C's). Normalmente, entre 30% y 40% de todas las VLDL remanentes son convertidos a LDL.<sup>19</sup>

### **LIPOPROTEÍNAS DE DENSIDAD INTERMEDIA (IDL).**

Por lo general esta partícula transitoria está presente en muy bajas concentraciones en el plasma humano. Las IDL, como ya hemos visto son proteínas derivadas del catabolismo de las VLDL. Las partículas HDL interactúan con la enzima plasmática lecitina: colesterol acilo transferasa (LCAT), que esterifica el exceso de colesterol libre de las HDL con ácidos grasos de la posición 2 de la lecitina o fosfatidilcolina, el fosfolípido más importante del plasma. El colesterol esterificado recientemente sintetizado es transferido de vuelta a las partículas IDL por acción de la CETP. El resultado neto de ambas reacciones, lipólisis e intercambio, es el reemplazo de la mayor parte del núcleo original triglicérido de VLDL por el éster de colesterol.<sup>20</sup> Después de la lipólisis, las partículas IDL son liberadas de la pared capilar dentro de la circulación. Experimentan entonces una conversión ulterior en la cual son removidos todos los triglicéridos restantes y se pierden todas las apolipoproteínas excepto la apo B. La partícula resultante, que contiene en el centro ésteres de colesterol casi puro y en la superficie apo B, es la LDL. Se desconoce el sitio de la conversión final de IDL a LDL, pero se especula que tiene lugar en los sinusoides hepáticos. Durante esta conversión es removida una porción del éster de colesterol de la IDL. Adicionalmente, algunas partículas IDL son catabolizadas por el hígado sin ser convertidas a LDL.<sup>5</sup>

**LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL).**

Las lipoproteínas transportadoras de colesterol en el plasma son las LDL, consisten de un núcleo lipídico compuesto casi exclusivamente por ésteres de colesterol. El revestimiento superficial de la LDL contiene colesterol no esterificado y fosfolípidos, con apo B100.<sup>19</sup> Las LDL circulantes pueden ser eliminadas de la corriente sanguínea por medio del hígado o de los tejidos extrahepáticos. Aproximadamente, un 75% de las LDL séricas son depuradas por el hígado, mientras que el 25% restante es eliminado por tejidos extrahepáticos. La captación de LDL tanto por el hígado como por los tejidos extrahepáticos puede producirse mediante receptores y vías mediadas por receptores. Estas últimas son vías mal definidas y no específicas que depuran proteínas plasmáticas en general. Aparentemente entre dos tercios y tres cuartos del total de las LDL circulantes son eliminadas por medio de receptores, mientras que entre un cuarto y un tercio son eliminadas a través de vías no mediadas por receptores. Por término medio, entre un 30% y un 40% de las LDL plasmáticas totales son eliminadas diariamente.<sup>21</sup> El receptor LDL es una molécula con un peso molecular de 120 kD que contiene aproximadamente 820 aminoácidos.<sup>22</sup> Estos receptores son transportados a la superficie de las células desde donde migran a unas regiones especiales de la superficie celular denominadas depresiones revestidas, donde se agregan y esperan la llegada de las partículas de LDL. Cuando los receptores de LDL fijan las LDL circulantes (o las VLDL remanentes), los complejos receptor- ligando se internan y se fusionan en los lisosomas. Después, los receptores se disocian de las LDL y son reciclados a la superficie de la célula para ser utilizados de nuevo. Los ésteres de colesterol de LDL se hidrolizan en colesterol no esterificado y la apo B100 se degrada en aminoácidos. El colesterol no

esterificado derivado de los ésteres de colesterol puede tener varios destinos: puede servir como constituyente de las membranas celulares, puede ser esterificado nuevamente para su almacenamiento o puede abandonar la célula. En el caso de las células hepáticas, el colesterol puede salir a la bilis en camino hacia la excreción final en las heces. La cantidad de colesterol que entra en la célula regula también la actividad de la HMG-CoA reductasa y la tasa de síntesis de los receptores LDL.<sup>22,23</sup> El número de receptores LDL sintetizados por una célula está regulado por la cantidad de colesterol en la célula. De acuerdo con el mecanismo postulado de regulación de síntesis de receptores, una pequeña parte del colesterol celular parece convertirse a la forma activa, muy probablemente un oxi-esterol que entra con más facilidad en el núcleo de la célula. Este colesterol activo interactúa con una proteína o proteínas de regulación, que a su vez suprimen la actividad del gen codificador de los receptores LDL afectando a la región promotora del gen. Cuando el contenido celular de colesterol aumenta, el número de receptores disminuye. Este sistema regulador fuertemente controlado funciona para mantener el contenido celular óptimo de colesterol dentro de un estrecho intervalo.<sup>23</sup> El precursor de las LDL son las VLDL. La cantidad de LDL producidas depende de dos factores:

- La cantidad de VLDL producidas por el hígado.
- La fracción de VLDL remanentes eliminadas directamente por el hígado.

Este último está determinado en parte por el número de receptores LDL, dado que las VLDL remanentes pueden ser eliminadas por los receptores LDL. La concentración de LDL está determinada por su tasa de eliminación de la circulación, ya sea por el hígado o por los tejidos extrahepáticos. De nuevo, los receptores LDL son los principales responsables de la eliminación de las

LDL séricas. Así pues, el número de receptores LDL es un regulador clave de las concentraciones de las LDL séricas al afectar tanto a la tasa de formación como a la tasa de eliminación de las LDL.<sup>24</sup>

## **METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS QUE CONTIENEN APO AI.**

### **LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL).**

Las HDL son las lipoproteínas con mayor proporción proteica (55-60% de su masa seca), siendo las apo AI su apolipoproteína más abundante. La apo AI, aparte de su función estructural, es indispensable para el eflujo de colesterol en las células periféricas,<sup>25</sup> que representa la primera etapa del transporte reverso del colesterol, descrita en la siguiente sección. Además, las HDL contienen pequeñas cantidades de proteínas apo C (apo CI, apo CII y apo CIII), apo E y apo AIV; así como cantidades mínimas asociadas a CETP, PLTP, y LCAT. Estos componentes proteicos menores juegan un papel importante en la regulación de HDL y el metabolismo lipoproteico. Las HDL también contienen varios componentes de función desconocida, como apo D y apo J (o clusterina), apo SAA (un reactante de fase aguda) y fosfolipasa D específica de PI-glicano. En la tabla 3 se presentan las propiedades y funciones de las proteínas y apolipoproteínas que se encuentran asociadas a las HDL.

### **SUBCLASES DE HDL.**

Se han descrito varias subclases de HDL basándose en ciertas características fisicoquímicas y funcionales. Una clasificación con base en la densidad de flotación, las distingue en HDL<sub>2</sub> y HDL<sub>3</sub>, cuyas densidades se ubican entre 1.063 a 1.125 y entre 1.125 a 1.210 g/mL, respectivamente. Las HDL<sub>2</sub> son ricas en lípidos hidrofóbicos y aproximadamente entre un 60% y un

40% de proteínas, mientras que las HDL<sub>1</sub> están formadas por fosfolípidos aproximadamente en un 45% y proteínas en un 55% principalmente.<sup>26</sup> Por su movilidad electroforética y tamaño, se han descrito otras subfracciones de HDL entre las que destacan las partículas pre- $\beta$ 1 ó nacientes.<sup>27</sup> Estas partículas están compuestas esencialmente de fosfolípidos y apo AI; tanto el hígado como el intestino delgado sintetizan estas partículas. Tienen una masa molecular aparente alrededor de 60 kD y flotan a la densidad de las HDL<sub>1</sub>. Desempeñan un papel muy importante en la captación de colesterol de las células periféricas. Las HDL se pueden clasificar basándose en su tamaño molecular por medio de electroforesis no desnaturalizante en gel de poliacrilamida (PAGGE)<sup>28</sup> o por filtración en gel. Las HDL, considerando su tamaño, corresponden a dos clases de densidades que subdividen a las HDL<sub>2</sub> en HDL<sub>2b</sub> y HDL<sub>2a</sub>, con diámetros de 9.7- 12.0 nm y 8.8- 9.7 nm respectivamente, y tres subclases de HDL<sub>1</sub> con diámetros de 7.2- 7.8 nm (HDL<sub>1c</sub>), 7.8- 8.2 nm (HDL<sub>1b</sub>) y 8.2- 8.8 nm (HDL<sub>1a</sub>) respectivamente.<sup>2,26</sup>

Tabla 3. CARACTERÍSTICAS DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A HDL.<sup>30</sup>

PROTEÍNA	ESTRUCTURA	SITIO DE SÍNTESIS	FUNCION
Apo AI	243 aa	Hígado, intestino delgado	Activación LCAT, receptor HDL, estimulación del eflujo de colesterol, antioxidación de LDL
Apo AII	77 aa	Hígado	Receptor HDL.
Apo AIV	376 aa	Intestino delgado	Activación LACT, modulación LPL, receptor HDL, eflujo del colesterol, estimulación, factor de saturación.
Apo CI	57 aa	Hígado	Activación LCAT, activación de fosfolipasa A2, inhibe la captura hepática de partículas ricas en triglicéridos
Apo CII	79 aa	Hígado	Activación LCAT, activación LPL, inhibe la captura hepática de partículas ricas en triglicéridos
Apo CIII	79 aa	Hígado	Inhibición de LPL, modulación LCAT, inhibe la captura hepática de partículas ricas en triglicéridos
Apo D	169 aa	Hígado, intestino delgado, placenta, cerebro, bazo, células adrenales.	Transporte de lípidos, esteroides, bilirrubina.
Apo E	299 aa	Hígado, macrófagos, órganos esteroidogénicos	Ligando de receptores apo E y apo B/E, promotor del eflujo de colesterol.
Apo F	30 kDa	No se conoce.	No se conoce.
Apo G	54 kDa	No se conoce.	No se conoce.
Apo H	326 aa	Hígado	Unión con fosfolípidos, inhibidor de la activación de la coagulación.
Apo J	$\alpha$ 205 aa $\beta$ 221 aa	Hígado, testículos, ovarios, cerebro, corazón, pulmón, bazo.	Inhibición de la citólisis de la fracción terminal del complemento C5b-9
LCAT*	440 aa	Hígado, testículos, cerebro	Esterificación del colesterol, remodelación de HDL.
CETP*	476 aa	Hígado, bazo, intestino delgado, macrófagos,	Transferencia de lípidos entre lipoproteínas, remodelación de HDL
PLTP*	476 aa	Endotelio	Transferencia de fosfolípidos, reestructuración de HDL
LTIP*	29 kDa	No se conoce	Antagonista de CETP
Paraoxonasa	359 aa	Hígado.	Arilesterasa, lipoperoxidasa

\* Ver tabla de abreviaturas.



**PRINCIPALES PROTEÍNAS ASOCIADAS CON HDL: APOLIPOPROTEÍNA AI.**

El gen de la apo AI está localizado en el brazo largo del cromosoma 11 en la región q23, tiene una longitud de 1.863 bp y comprende cuatro exones y tres intrones.<sup>31</sup> Es la principal apolipoproteína de las HDL y corresponde a un 65% de su masa proteica total; aunque también está presente en pequeñas cantidades en los quilomicrones y las VLDL. En el hombre, la cantidad de apo AI varía en función de la población estudiada y de la metodología utilizada. La concentración plasmática habitual está comprendida entre 1.2 y 1.8 g/L. La apo AI posee un interés particular a causa del papel antiaterogénico demostrado por numerosos estudios epidemiológicos.<sup>32</sup> La apo AI se sintetiza formando un puente polipeptídico con un prepéptido de 18 aminoácidos separados de forma contraducciona por las membranas microsomales. La secuencia de la apolipoproteína fue confirmada por secuenciación directa del DNAc.<sup>33</sup> En el centro de la apo AI existen secuencias repetitivas de 22 aminoácidos.<sup>34</sup> Hoy en día, ninguna lipoproteína ha sido cristalizada de forma completa; sin embargo, el empleo de algoritmos matemáticos permite predecir las estructuras secundarias y terciarias a partir de estructuras primarias. Con tales métodos la apo AI puede dividirse en 13 segmentos de 11 a 22 residuos.<sup>35</sup> Por una aproximación inmunoquímica, Marcel YL y col<sup>36</sup> establecen un modelo de la estructura secundaria de la apo AI (Figura 2), la cual se caracteriza por la presencia mayoritaria de hélices anfipáticas. La mayor parte de las hélices anfipáticas no contienen residuos polares en una faz o no polares sobre otra faz de forma exclusiva. Por consiguiente, una sola representación gráfica no permite localizar la interfase entre el costado hidrófobo y el costado hidrófilo. La estructura más probable de un par de

hélices de la apo, corresponde a una orientación casi paralela de las hélices, existiendo un ángulo de  $20^\circ$  entre ellas (Figura 1).<sup>17</sup>

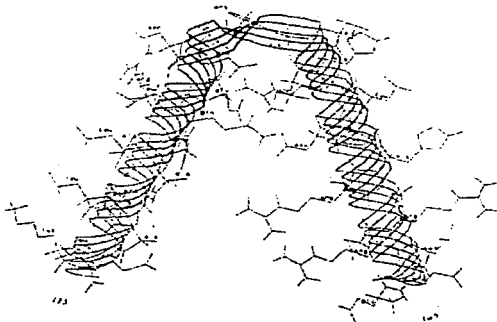


Figura 1. ESTRUCTURA DEL PAR DE HÉLICES DE LA APO AI.<sup>36</sup>

Las hélices anfipáticas de la apo AI son caracterizadas por la presencia de segmentos de 17 aminoácidos separados por segmentos de 5 residuos incluyendo una prolina. El ensamble de la secuencia de una hélice anfipática está hecha de 22 residuos. El segmento que contiene la prolina, separa dos hélices que contiene 5 residuos, dos de cada lado de la prolina. Estos segmentos adoptan una conformación de codo beta. El costado apolar de cada hélice es orientado hacia la fase lipídica, mientras que la fase polar es orientada hacia la fase acuosa.<sup>38</sup> Existe una cooperación entre los segmentos helicoidales de apolipoproteínas que contribuyen a su estabilidad, ya que se produce una interacción entre hélices por la formación de pares de iones entre los residuos cargados de las hélices contiguas.<sup>15</sup> Por los extremos

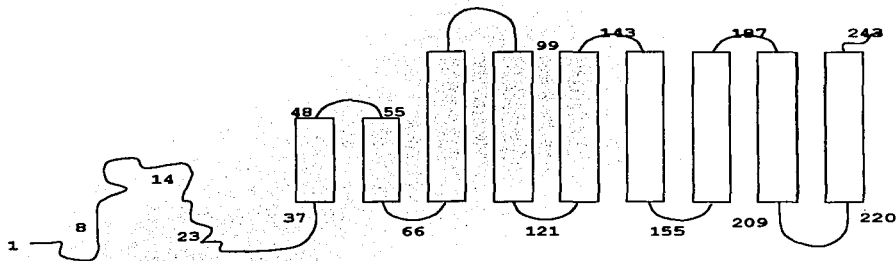


Figura 2. MODELO DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LA APO AI. Los rectángulos representan las alfa hélices de la proteína.<sup>35</sup>

esta cooperatividad afecta las propiedades de las apolipoproteínas dentro del papel de cofactor de enzimas y también dentro de la fijación de lípidos. La apo AI posee tres tipos de dominios funcionales:

- Las regiones de la proteína que participan en la interacción con los fosfolípidos de las lipoproteínas.<sup>39</sup>
- Los dominios que facilitan la simulación de la actividad LCAT que están asociados con las partículas lipoproteicas.
- Los dominios que intervienen dentro de la unión de la apo AI con los receptores en la superficie de las membranas celulares.

Las dos últimas definiciones son fundamentales para la comprensión del papel de la apo AI dentro del proceso del transporte reverse del colesterol. La determinación de los niveles plasmáticos del colesterol de LDL y de HDL ha mejorado la discriminación entre sujetos en alto riesgo y sujetos con menor riesgo de aterosclerosis. Sin embargo, tal discriminación sigue siendo poco

satisfactoria. La apo AI se ha encontrado en niveles significativamente más bajos en los sujetos con infarto de miocardio que en sujetos testigo.<sup>40,41</sup> Por otra parte, los animales transgénicos que sobreexpresan la apo AI humana se ven protegidos contra la aterosclerosis.<sup>42</sup> Estos resultados se pueden explicar por un incremento del número de partículas HDL plasmáticas que favorecen la eliminación de una cantidad mayor de colesterol de los tejidos periféricos (ver más adelante). Además, ha sido demostrado que la apo AI posee un poder antioxidante intrínseco, aumentando la resistencia de las LDL a la oxidación *in vitro*.<sup>43</sup>

#### **APOLIPOPROTEÍNA AII.**

La lipoproteína apo AII es la segunda lipoproteína estructural de HDL más abundante representa del 20% al 30% de la masa proteica de las HDL. El gen de la apo AII se encuentra en el brazo largo del cromosoma 1 (q21- 23). Su concentración plasmática media en varones está comprendida entre 0.33 g/L y en mujeres 0.36 g/L.<sup>39</sup> El producto primario de la traducción del gen de la apo AII es un péptido de 23 aminoácidos. La cadena de polipéptidos de la proteína madura contiene 77 aa.<sup>44,45</sup> Dentro del plasma humano, la apo AII existe como un homodímero, gracias a un puente disulfuro entre los residuos de cisteína en posición 6 del monómero maduro.<sup>46</sup> No obstante, esta formación dimérica sólo ha sido observada en el hombre y en los simios superiores, mientras que en otras especies que poseen apo AII, la proteína no presenta la unión covalente en el puente. Por tanto, en estas mismas especies, la apo AII presenta una zona muy hidrofóbica puede conducir a un ensamble estable de dos péptidos. De esta manera la apo AII se encuentra siempre en forma dimérica. Por otra parte, como la apo AI, la apo AII posee una gran afinidad por los

lípidos gracias a su estructura en hélice anfipática; esta afinidad más importante de que la apo AII puede desplazar a la apo AI de la superficie de la HDL.<sup>11</sup>

#### **LECITINA COLESTEROL ACILO TRANSFERASA (LCAT).**

La lecitina colesterol acilo transferasa (LCAT, EC 2.3.1.43), es la enzima que produce más ésteres de colesterol en el plasma humano y es clave principal en el transporte reverso del colesterol. Se sabe que la actividad LCAT es necesaria para la maduración y remodelación de HDL, ya que interviene en la maduración de HDL nacientes y dentro de la transformación del tamaño de las HDL. Pertenece a la clase de las enzimas hidrolíticas de tipo serina-esterasas.<sup>3</sup> Tradicionalmente a la actividad LCAT se le atribuye un papel antiaterogénico, ya que el colesterol esterificado aparentemente crea un gradiente necesario para el flujo de colesterol no esterificado de los tejidos al plasma. El gen humano de la LCAT se sitúa en el cromosoma 16 (posición 16q 22) y consta de 6 exones.<sup>47</sup> La expresión del ARNm se realiza esencialmente dentro del hígado.<sup>48</sup> La enzima madura de 63 kD contiene 416 aminoácidos y 4 sitios de glucosilación.<sup>49</sup> La apo AI es un cofactor indispensable para la LCAT, sin embargo, también la apo AIV estimula la actividad de esta enzima.<sup>50</sup> Se localiza esencialmente sobre las HDL<sub>2</sub>. Fielding y cols.<sup>51</sup>, muestran que la LCAT esta regulada negativamente por el colesterol esterificado. La LCAT es secretada por los hepatocitos y liberada al plasma en una estrecha relación a las HDL grandes. Esta unión se ve influenciada más por los lípidos que por la composición de proteínas de las lipoproteínas del plasma.<sup>51</sup> Gracias a la transferencia de un grupo acilo de un ácido graso preferentemente de la posición 2 de la lecitina (fosfatidilcolina) al grupo

3-hidroxiolo del colesterol, la reacción enzimática produce ésteres de colesterol y lisolecitina (liso fosfatidilcolina).

La reacción LCAT ocurre en las siguientes etapas:

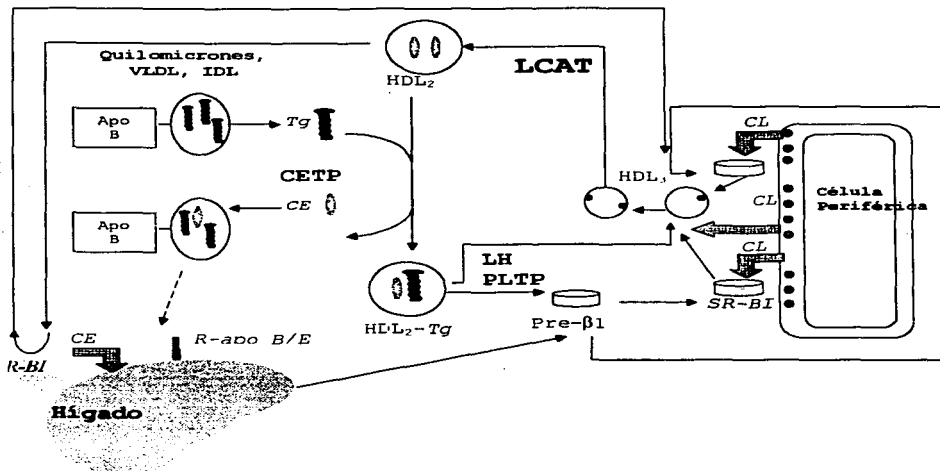
1. Activación de la bicapa de fosfolípidos y colesterol, regulada específicamente por dominios de la apo AI (alfa hélice o residuos carboxi terminales) que son responsables de la unión con los lípidos.<sup>52</sup> Uno con otro tienen fluidez en la bicapa de fosfolípidos y colesterol, dependiendo del largo y saturación de los grupos acilo de la lecitina<sup>52,53</sup> o varias proporciones de colesterol, lecitina u otros fosfolípidos como la esfingomielina,<sup>9,54</sup> afectan la conformación del complejo apo AI- lípido y que se regulan por la actividad LCAT. De esta manera, la reactividad óptima de los complejos de la bicapa, apo AI- LCAT están influenciadas por el tamaño y carga de partículas HDL específicas. En las HDL pequeñas, caracterizadas por su talla específica (HDL<sub>3b,c</sub>), forma (ej. discoidal) carga y contenido de apo AI, el rango de esterificación es alto.<sup>55</sup>

2. Un ácido graso es liberado siguiendo la hidrólisis de la lecitina (mayoritariamente en la posición 2) debido a la actividad fosfolipasa de la LCAT. La tasa de hidrólisis de la lecitina a la lisolecitina depende, como se mencionó antes, de la composición de lisolecitina, particularmente de la longitud de la cadena del grupo acilo, el grado de saturación y la fluidez óptima de la bicapa de fosfolípidos. Los grupos acilo pueden liberarse de otras posiciones que no sean la 2, dependiendo de la composición del ácido graso de la lecitina.<sup>56</sup> Una reacción reversa de la LCAT resulta de la acilación de la lisolecitina a lecitina, donde el donador es la lecitina que es de menor importancia fisiológica.<sup>56</sup>



regreso de colesterol proveniente de las células periféricas hacia el hígado para su excreción o reciclaje. La primera etapa del TRC es el eflujo del colesterol a las células. En los mamíferos, la parte principal de la síntesis de colesterol corporal se produce en los tejidos periféricos. Las HDL, particularmente la subfracción pre- $\beta_1$ ,<sup>27</sup> captan el colesterol de la membrana celular. Entre los mecanismos postulados de eflujo de colesterol celular se encuentra el ABCA1, la difusión pasiva y la eliminación mediada por el receptor SR-B1, pero cualesquiera que estos sean, la evidencia es que *in vitro* las HDL captan este colesterol celular (Figura 4). El colesterol captado por las partículas pre- $\beta_1$ , es enseguida esterificado por la LCAT. Esta esterificación hace que el colesterol pierda su carácter anfipático transformándose en una molécula hidrofóbica. En consecuencia, los ésteres de colesterol abandonan la superficie de la lipoproteína que lo transporta para situarse en el interior de la partícula, aumentando el tamaño de la misma, transformando las partículas de forma de disco en esferas. La forma esférica más pequeña de HDL se denomina HDL<sub>3</sub>. Sin embargo, la HDL<sub>3</sub> continúa captando más colesterol libre, que a su vez se esterifica a través de la acción de la LCAT, agrandando todavía más la lipoproteína y produciendo en consecuencia HDL<sub>2</sub>. En el suero normal, existen dos o tres partículas de HDL<sub>3</sub> por cada partícula de HDL<sub>2</sub>. Parece que existe una interconversión entre las distintas formas de HDL; en primer lugar, las HDL<sub>3</sub> se transforman en HDL<sub>2</sub>, mediante la adquisición de ésteres de colesterol. Por último, las HDL<sub>2</sub> se convierten en





**Figura 4. TRANSPORTE REVERSO DEL COLESTEROL.**<sup>3</sup> Las partículas pre- $\beta$ 1 o HDL3 captan el colesterol libre (CL) excedente de las células periféricas por contacto simple con la membrana celular o por medio del receptor SR-BI. La incorporación de colesterol en estas partículas y la esterificación del mismo por la LCAT, dan origen a aumentos progresivos del tamaño de la lipoproteína, generando sucesivamente HDL3 y HDL2. El colesterol esterificado (CE) puede seguir dos rutas: por acción de la CETP es intercambiado por triglicéridos (Tg) provenientes de las lipoproteínas que contienen apo b, principalmente VLDL e IDL llegando así al hígado para su reciclamiento o excreción, gracias al receptor hepático B/E o, es eliminado directamente de la lipoproteína por un mecanismo en el que interviene el receptor hepático SR-BI, generando así HDL de menor tamaño capaces de reiniciar el ciclo. La LH hidroliza los triglicéridos de las HDL captados por la primera ruta. Esta hidrólisis en asociación con la actividad PLTP, regenera los aceptores primarios de colesterol.

HDL<sub>2</sub>, intercambiando ésteres de colesterol por triglicéridos provenientes de lipoproteínas que contienen apo B, principalmente VLDL e IDL, que a cambio reciben ésteres de colesterol de las HDL. El intercambio de lípidos hidrofóbicos está facilitado por la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP).<sup>49</sup> Este ciclo puede ser importante en la transferencia de colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado. Los triglicéridos de las HDL<sub>2</sub>, provenientes de las lipoproteínas ricas en triglicéridos, son hidrolizados por la lipasa hepática. Esta hidrólisis, en asociación con la actividad PLTP, disminuye el tamaño de las HDL<sub>2</sub> transformándolas en HDL<sub>1</sub> y en partículas pre- $\beta$  que pueden reiniciar el ciclo de captación de colesterol.<sup>50</sup> Otra vía de eliminación de colesterol plasmático es el receptor SR-BI (por sus siglas en inglés Scavenger Receptor, class B, type I). Se trata de una glicoproteína palmitilada de superficie que fija lipoproteínas HDL, LDL y colesterol libre a altas concentraciones, no asociado a lipoproteínas.<sup>56</sup> Se une con gran afinidad a las lipoproteínas y, por un mecanismo mal conocido, internaliza únicamente el colesterol dejando el resto de la lipoproteína intacta. De esta manera se regeneran las partículasceptoras de colesterol que pueden comenzar nuevamente el ciclo del TRC. Por este mecanismo se elimina una buena proporción del colesterol libre circulante.<sup>58</sup>

## LIPOPROTEÍNAS Y ATROSCLEROSIS.

El colesterol sérico juega un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis. La mayoría de los investigadores creen que el colesterol transportado de las LDL es cuantitativamente la forma más aterogénica del colesterol sérico. Sin embargo, muchos autores creen que las VLDL remanentes

son también aterogénicas, y los mecanismos básicos por los que las VLDL remanentes contribuyen a la aterosclerosis son probablemente similares a los de las LDL.<sup>60</sup> En primer lugar, las LDL (y/o las VLDL remanentes) se filtran en la pared arterial y quedan atrapadas en la íntima donde experimentan una modificación química. Esto conduce a la captación de las LDL modificadas por los macrófagos para producir células espumosas. La acumulación de éstas células en la íntima da como resultado la formación de estrias grasas. Estas últimas se convierten gradualmente en placas fibrosas mediante un mecanismo similar a la formación de cicatrices. Por último, las placas fibrosas pueden transformarse en las lesiones ateroscleróticas complicadas que subyacen bajo la mayoría de los sucesos clínicos.<sup>61</sup>

#### **INFILTRACION Y ATRAPAMIENTO DE LAS LDL.**

Las partículas de LDL circulantes se filtran a través del endotelio de la pared arterial y penetran hasta la capa íntima. Este proceso puede acelerarse debido a lesiones endotelíacas, que eliminan una barrera natural a la entrada de lipoproteínas en la pared de la arteria. Una parte de las partículas LDL pasan completamente a través de la capa íntima y vuelven a entrar en la circulación a través de los *vasa vasorum*. Para esto, una parte de las LDL quedan atrapadas en la íntima. Se cree que el atrapamiento se produce mediante la interacción de las LDL con los componentes de las sustancias básicas de la íntima, en su mayor parte glicoaminoglicanos (GAGs), que parecen tener una alta afinidad por la apo B100 (esto es, LDL, IDL, VLDL) tienen potencial para producir aterosclerosis. Una excepción serían los quilomicrones remanentes ricos en colesterol que contienen apo B48. En contraste, las HDL, que no contienen ninguna forma de apo B, no son aterogénicas.<sup>62</sup>

**MODIFICACIÓN DE LAS LDL.**

Una vez atrapadas en la íntima arterial, las LDL comienzan a sufrir una modificación. Se han identificado dos tipos de modificaciones; una de ellas es la oxidación. Se sabe que los macrófagos en la pared arterial secretan superóxido, presumiblemente como parte de su función fagocítica. Este superóxido puede atacar a las apo B100 y degradarlas mediante oxidación. Como la apo B100 se degrada, la partícula de LDL comienza a perder su integridad, quedando así lista para su absorción por los macrófagos. Alternativamente, las apo B100 de las LDL pueden ser modificadas. Se han postulado varias explicaciones, una de ellas es la adhesión de una molécula de malonaldehído a la apo B, mientras que otra posibilidad es la glucosilación de apo B. Al igual que las LDL oxidadas, las partículas de LDL "abatidas" están sujetas a ser fagocitadas por macrófagos.<sup>63</sup>

**FORMACIÓN DE CÉLULAS ESPUMOSAS.**

La célula espumosa es la marca de lesión aterosclerosa. Actualmente se cree que la mayoría de las células espumosas se derivan de los macrófagos, aunque algunas pueden provenir de las células del músculo liso. El paso clave en el desarrollo de células espumosas está en la ingestión de LDL modificadas. Cuando las LDL normales son captadas por vía del receptor LDL, el colesterol liberado de las LDL actúa para inhibir la síntesis de nuevos receptores LDL, por lo tanto, no puede acumularse exceso de colesterol en la célula. En otras palabras, la formación de células espumosas no se produce a través de la vía del receptor LDL. En efecto, los macrófagos poseen también receptores inespecíficos que reconocen las LDL modificadas. Cuando las LDL entran en la célula a través de este mecanismo, no existe control sobre la formación de nuevos receptores; y así, los receptores de las LDL modificadas

continúan captando partículas de LDL modificadas con independencia en la cantidad de colesterol que se acumule en las células. Esto conduce a la formación de numerosas gotas de gran tamaño de éster de colesterol que dan a la célula un aspecto espumoso, de donde proviene el nombre de célula espumosa.<sup>21</sup>

#### **PATOGENESIS DE LA PLACA ATEROSCLEROTICA.**

La filtración de las lipoproteínas a través del endotelio luminal o de los *vasa vasorum* hacia la pared arterial parece ser el primer paso. Algunas lipoproteínas son atrapadas en la sustancia basal íntima, modificadas e ingeridas por macrófagos para producir células espumosas. La infiltración de lipoproteínas puede resultar acelerada por las lesiones endotélicas, que eliminan una barrera natural a la entrada de lipoproteínas en la pared de una arteria. Pueden formarse trombos plaquetarios sobre la superficie expuesta que se encuentra por debajo del área de lesión endotélica. Tanto las células espumosas como las plaquetas liberan factores de crecimiento que causan la proliferación de las células del músculo liso y la deposición de los elementos del tejido conjuntivo. El agrandamiento de las células espumosas con lípidos aparentemente causa necrosis celular y la aparición de ésteres de colesterol desde las células espumosas para producir el núcleo lipídico. La destrucción de los *vasa vasorum* puede interferir con la salida de lípidos de la placa. Todos esos cambios preparan el escenario de las complicaciones finales: hemorragia en la placa a causa de la ruptura, trombosis y oclusión vascular.<sup>34</sup>

#### **PAPEL DE LAS HDL.**

Hay un gran número de indicios que sugieren que la oxidación de LDL está implicada en la aterogénesis. LDL ampliamente oxidadas pueden ser

reconocidas por receptores de macrófagos y promover la producción de células espumosas de ateroma, o puede ser citotóxica para el endotelio u otras células. Las LDL mínimamente oxidadas también tienen importantes propiedades biológicas que pueden estar implicadas en la aterogénesis. Experimentos in vivo indican que las HDL pueden inhibir muchos de los efectos de la oxidación de LDL. Parthasarathy y cols,<sup>65</sup> han sugerido que la HDL puede jugar un papel protector en la aterogénesis al prevenir la generación de LDL modificadas por la oxidación; además, las HDL inhiben la estimulación quimiotáctica de macrófagos inducida por LDL mínimamente modificadas en cocultivos de macrófagos y células endoteliales. Mientras que las HDL inhiben la citotoxicidad mediada por LDL del músculo liso vascular y de las células endoteliales.<sup>41</sup> Existen varios mecanismos potenciales por los que las HDL pueden modificar la formación o las propiedades de LDL oxidada. Estos son:

- Un intercambio de productos de peroxidación entre HDL y LDL, con un secuestro de lípidos oxidados de apo B y limitación de la modificación de apo B.<sup>65</sup>
- Enlace por apo A de metales de transición que favorecen la oxidación, y
- La HDL contiene actividad paraoxonasa, que puede ser capaz de inhibir la generación de lípidos oxidados.<sup>66</sup> La paraoxonasa reside en una fracción de HDL que contiene apo AI y apo J.

En el plasma fresco, las HDL transportan la mayoría (85%) de los lípidos oxidados del núcleo. Los lípidos podrían ser captados de las HDL por los hepatocitos, lo que lleva a la posibilidad de un rápido aclaramiento hepático de los peróxidos de CE en HDL pudieran mejorar la formación de lípidos oxidados en LDL.<sup>60</sup> Aunque apoyada por considerables pruebas

experimentales, la hipótesis de que HDL protege frente a modificaciones oxidativas de LDL o a sus consecuencias carece por el momento de pruebas relevantes *in vivo*.<sup>67</sup>

#### EL PAPEL DE LA LCAT EN EL TRC.

El concepto de transporte reverso de colesterol establecido por Glomset<sup>68</sup>, basado principalmente en estudios *in vitro*, es usado para explicar las propiedades protectoras de las HDL. Como ya se ha establecido, el transporte reverso del colesterol comienza con la transferencia de CL de las membranas de las células a las HDL nacientes, el cuál es esterificado por la LCAT. Después se intercambian los ésteres de colesterol de las partículas HDL por triglicéridos de las partículas VLDL y LDL vía CETP. Finalmente es captado por el receptor hepático apo B/E. La esterificación del colesterol libre está muy asociado con la remodelación de las subpoblaciones de las HDL y con la formación de partículas HDL grandes a las que se les reconoce como protectoras de la enfermedad arterial coronaria (EAC). Este concepto asume que la mayoría del colesterol libre de la superficie de las HDL y que sirve como sustrato para la LCAT es de origen celular.<sup>69</sup>

#### LCAT Y ATEROSCLEROSIS.

Pacientes con una deficiencia parcial o total de LCAT pueden desarrollar enfermedad renal, anemia y opacidad corneal, pero raramente sufren de enfermedad arterial coronaria (EAC).<sup>70</sup> Las contradicciones en el concepto de eflujo de colesterol no esterificado de origen celular,<sup>20</sup> son aumentadas por la esterificación en HDL del plasma. Un desequilibrio completo en la deficiencia de LCAT impide el eflujo de colesterol.<sup>71</sup> Mutaciones en el gen humano de la LCAT dan origen a dos patologías, la deficiencia familiar de

LCAT (FLD) y la enfermedad de ojo de pescado (FED). En ambos genotipos clínicos, la esterificación de colesterol en las HDL se ve deteriorada. En los pacientes con el síndrome FLD, pueden tener partículas HDL nacientes de forma discoidal, y los pacientes con FED presentan HDL de forma normal, pero en una cantidad muy reducida. Pueden establecerse diversas explicaciones para la aparente falta de EAC prematura en síndromes de deficiencia de LCAT: el transporte reverso del colesterol es parcialmente deteriorado sólo en pacientes con FED, mientras que la esterificación en LDL esta intacta. Sin embargo, no es el caso en los pacientes con FLD; la hipótesis<sup>60</sup> de que las HDL nacientes en FLD son buenos aceptores de CL celular no está bien confirmada.<sup>60</sup> Estudios cinéticos de las subfracciones de HDL *in vivo*.<sup>72</sup> demostraron un catabolismo de las lipoproteínas que sólo contienen apo AI (Lp AI) ya que poseen un potencial antiaterogénico que es demasiado lento en comparación con las lipoproteínas que contienen AI/AII (Lp AI/AII).<sup>73</sup> Esto sugiere que una alta proporción de Lp AI por cada Lp AI/AII corresponde a una total reducción del riesgo de EAC. Sin embargo, ya que ambas Lp AI y Lp AI/AII son pobres aceptores de colesterol para las células espumosas,<sup>74</sup> y en este proceso es dependiente la LCAT, es poco probable que sea un mecanismo efectivo.<sup>75</sup>



## JUSTIFICACIÓN

La cardiopatía isquémica es un problema de salud pública en México. La mayoría de los casos es consecuencia de la aterosclerosis, síndrome causado por un daño crónico en el endotelio vascular. Las etiologías conocidas de la aterosclerosis son múltiples.<sup>16</sup> Entre las causas más importantes se encuentran la diabetes mellitus, la hipertensión arterial, las dislipidemias, el tabaquismo, el proceso de envejecimiento, la menopausia precoz no tratada y la hiperhomocisteinemia.<sup>5</sup> Es frecuente que varias de ellas coexistan en un mismo individuo, aumentando las posibilidades de padecer aterosclerosis; aunque también en un porcentaje importante de casos los individuos no presentan ninguna de las causas descritas.<sup>61</sup>

A principios de la década de los noventa, diversas organizaciones propusieron la medición de lípidos séricos.<sup>16</sup> Estos han demostrado ser factores de riesgo independientes para el desarrollo de complicaciones vasculares y cuya medición es lo suficiente fácil y económica como para recomendarla. Mientras tanto, un gran número de sujetos normolipémicos desarrollan EAC, y muchos otros dislipidémicos nunca presentan los síntomas de la enfermedad.

Por lo anterior, es prioritario desarrollar nuevas determinaciones de laboratorio que contribuyan a predecir de manera precoz y evaluar mejor el riesgo que tiene cualquier persona de desarrollar EAC. Cuando se cuenta con métodos de diagnóstico precoz más finos, los programas de prevención primaria tendrán un mejor efecto en la población general.

De esta manera, por el carácter asintomático de estas patologías y por la alta prevalencia de complicaciones cardiovasculares en la población mexicana, el empleo del pronóstico primario es una medida recomendable en el manejo individual de los casos. Su relación costo- beneficio será aún mayor si se seleccionan los casos de mayor riesgo cardiovascular.

El presente trabajo se enmarca en la implementación de un método enzimático para medir la actividad de la LCAT y poder compararla entre diferentes individuos con enfermedad arterial coronaria (EAC) y sujetos sin diagnóstico, ni antecedentes de la enfermedad.

A esta enzima se le atribuye un papel central dentro del TRC debido a que podría alterar el papel antiaterogénico de las HDL.<sup>3</sup> En consecuencia, se puede pensar en la implementación futura de esta metodología como alternativa en el pronóstico primario de aterosclerosis junto con el perfil de lípidos. Además, el contribuir a demostrar la utilidad de esta determinación es razón suficiente para haber realizado el presente trabajo.

## HIPÓTESIS.

---

- Existe una asociación entre la actividad LCAT, el perfil de lípidos y subpoblaciones de partículas HDL dentro del transporte reverso del colesterol.
- Dichas asociaciones serán diferentes en los sujetos EAC+ en comparación con los sujetos EAC-.
- De esta manera, la distribución de las subpoblaciones de partículas HDL se verán afectadas al existir algún tipo de alteración en la actividad LCAT.

## OBJETIVOS.

---

### OBJETIVO GENERAL.

- Determinar si existe diferencia en la actividad LCAT sobre el perfil de lípidos y subpoblaciones de partículas HDL, en pacientes con Enfermedad Arterial Coronaria (EAC+) y en sujetos sin manifestaciones clínicas ni antecedentes familiares de enfermedad (EAC-).

### OBJETIVOS PARTICULARES.

- Aplicar el método de sustrato exógeno a las condiciones necesarias para medir la actividad de la Lecitina colesterol acilo transferasa (LCAT) en el laboratorio.
- Estandarizar el método de sustrato exógeno a las condiciones necesarias para medir la actividad LCAT dentro del laboratorio.
- Medir la actividad enzimática de la LCAT en plasmas de individuos EAC+ y EAC-, realizando una comparación entre ambos grupos.
- Determinar el tamaño de las partículas HDL en ambos grupos de estudio.
- Medir las concentraciones de lípidos y efectuar comparaciones con los diferentes parámetros de ambos grupos de estudio.
- Determinar la influencia de la edad sobre la actividad LCAT en los sujetos de estudio.

PARTE EXPERIMENTAL.

---

**POBLACIÓN DE ESTUDIO.**

Se analizaron a 151 sujetos, agrupados en dos categorías, sujetos con enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC+) y sujetos sin manifestaciones clínicas de la enfermedad (EAC-). Posteriormente se incluyó un grupo de adolescentes para determinar la influencia de la edad en la actividad de la enzima. Estos sujetos acudieron a diferentes Departamentos del Instituto con distintos fines. Al momento de su admisión se les realizó una historia clínica en la cual se incluyen las características antropométricas con el fin de excluir sujetos no acorde a las características de este estudio. Los criterios de selección para cada uno de los grupos, son los siguientes:

• **SUJETOS EAC-.**

Se seleccionaron 86 sujetos donadores voluntarios del Banco de Sangre del Instituto. Sus edades fueron comprendidas entre los 16 y 69 años, son normotensos, no presentan padecimientos crónicos y no poseen antecedentes clínicos ni familiares de EAC.

• **SUJETOS EAC+.**

Se seleccionaron 50 sujetos de forma aleatoria del Programa de Educación Preventiva del Departamento de Endocrinología del Instituto. Los sujetos que integran este programa sufrieron al menos un infarto agudo de miocardio por isquemia aterosclerosa coronaria y comprendían edades entre los 34 y 73 años.

• **SUJETOS ADOLESCENTES.**

Se cuenta con 30 sujetos, los cuales contaban con edades entre los 12 y 16 años, siendo donadores voluntarios de diferentes escuelas secundarias para el Departamento de Endocrinología del Instituto. Son sujetos normotensos, no presentan padecimientos crónicos y no poseen antecedentes clínicos ni familiares de EAC.

**DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE LÍPIDOS.**

El colesterol total, los triglicéridos y el colesterol HDL (CHDL) se determinaron mediante métodos enzimáticos (Boehringer- Mannheim, Alemania). El colesterol LDL (CLDL), es calculado mediante la ecuación de Friedelwald<sup>17</sup>:

$$\text{CLDL} = \text{Colesterol total} - \text{CHDL} - (\text{Triglicéridos} / 5.0)$$

Dónde las concentraciones se expresan en mg/dL.

**SEPARACIÓN DE HDL.**

Las HDL fueron separadas por ultracentrifugación secuencial (Beckman Optima TLX). Se aislaron las lipoproteínas que contienen apo B del plasma ajustado a la densidad de 1.063 g/mL con KBr y ultracentrifugando por 2.16 horas a 110,000 rpm en tubos de policarbonato. Se elimina el sobrenadante de cada tubo, el cual contiene las lipoproteínas ricas en apo B, y se ajusta el plasma restante a 1.210 g/mL con KBr y se realiza la segunda ultracentrifugación por 2.5 horas a 110,000 rpm y separar las HDL de la superficie de cada tubo.

Se verifica por electroforesis PAGE SDS, la pureza y de apo AI, confirmando que en estas condiciones se recuperó del 80% a 85% de la apo AI de las HDL del plasma total, sin contaminación de apo B.

## CARACTERIZACIÓN DE SUBPOBLACIONES HDL.

Después de llevar a cabo la separación de partículas HDL por el método de ultracentrifugación, se realizó una diálisis exhaustiva con buffer TBE (Tris 0.09 M, Borato 0.08 M, EDTA 3 mM, a pH= 8.4). De inmediato, se llevó a cabo una cuantificación de proteínas para establecer la cantidad de muestra que se depositó en cada pozo del gel (método de Lowry). Se realizó el cálculo considerando 1  $\mu$ L de buffer de muestra (sacarosa-azul de bromofenol al 0.05% en buffer TBE) por cada 10  $\mu$ g de proteína tomando como base el depósito de 30  $\mu$ g de proteína con buffer de muestra en cada pocillo del gel.

Para determinar la homogeneidad de los diámetros de las HDL, se realizaron los geles para condiciones no desnaturizantes (PAGE) en gradiente del 4% al 30%.

Posteriormente, se montó la electroforesis y se llevó a cabo una recorrida del gel a 20 voltios por 15 minutos en buffer TBE, se depositaron las muestras de cada sujeto de estudio y los marcadores de peso molecular (proteínas globulares: tiroglobulina 17 nm, ferritina 12.2 nm, catalasa 10.4 nm, lactato deshidrogenasa 8.2 nm y albúmina 7.1 nm) Kitt Pharmacia, Uppsala, Suecia, en cada pocillo.

Se corrió la electroforesis a 70 voltios por 15 minutos y posteriormente se dejó por 20 horas a 165 voltios; después del tiempo establecido, se detiene la electroforesis y se tiñen las bandas de proteína HDL con azul de Coomassie R250.

Por último, se realizó el análisis densitométrico del gel (Molecular Analyst Software Versión 1.1, 1994 Bio- Rad) para determinar el porcentaje de subpoblaciones HDL en cada sujeto de estudio, tomando como base el área total bajo la curva del densitograma de los marcadores de peso molecular.

## PURIFICACIÓN DE APO AI.

Las HDL ya separadas y purificadas por ultracentrifugación secuencial, se dislipidaron realizando lavados con etanol-éter 2:1 (v/v) por 12 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se eliminó el solvente con  $\text{N}_2$  y se congeló la parte proteica a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Esta fracción fue disuelta en amortiguador Tris HCl 30 mM Urea 6 M,  $\text{pH} = 8.0$ . La apo AI se purificó por cromatografía de intercambio iónico usando una columna UNO- Q1 acoplada a un sistema de cromatografía Bio-Rad Dou Flow. La elución de proteínas se realizó con un gradiente lineal del mismo buffer conteniendo NaCl 100 mM. Se colectaron fracciones de 250  $\mu\text{L}$  y se seleccionaron las que solo contenían apo AI, comprobando por PAGE SDS en un gradiente del 4% al 21%. Las fracciones de cada apo AI se dializaron contra bicarbonato de amonio 5 mM y posteriormente se liofilizaron. La concentración de apo AI fue estimada por espectrofotometría asumiendo un coeficiente de extinción molar de 1.13  $\text{mL/mg}\cdot\text{cm}$ .<sup>57</sup>

Por medio de un análisis densitométrico del gel de apo AI, teñido con azul de Coomassie R250, se determinó una pureza del 98%.

## PREPARACIÓN DEL SUBSTRATO.

Los proteoliposomas son partículas discoidales que simulan HDL nacientes y a partir de estas se determinó *in vitro* el metabolismo HDL.

En un tubo de ensaye se agregó 870  $\mu\text{L}$  de lecitina 10  $\text{mg/mL}$  (Sigma, St. Louis MO), 205  $\mu\text{L}$  de colesterol libre 1  $\text{mg/mL}$  (Cholesterol Sigma, St. Louis MO) y 20  $\mu\text{L}$  de  $^3\text{H}$ -Colesterol no esterificado 48  $\text{Ci/mmol}$  en tolueno (Amersham Pharmacia Biotech). Se evaporó el disolvente orgánico con  $\text{N}_2$ .

En otro tubo se adicionó 1.7 mL de buffer Tris- HCl 10 mM  $\text{pH} 7.4$ , 1 mL de apo AI (1  $\text{mg/mL}$ ) y 340  $\mu\text{L}$  de solución de colato 0.725 M disueltos en el



mismo buffer Tris. Se mezcló y se agitó vigorosamente el contenido de ambos tubos. Posteriormente se llevó a cabo una diálisis por 3 días con buffer Tris con el fin de eliminar el colato excedente.

Se ajustó a un volumen final de 4.5 mL y se realizaron alicuotas de 100  $\mu$ L de la suspensión de proteoliposomas. El substrato se mantiene estable al menos por 6 semanas a  $-20^{\circ}$  C.

### REACCIÓN LCAT.

A un tubo de ensaye se le adicionó buffer 235  $\mu$ L Tris-HCl, 125  $\mu$ L de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos al 2% (w/v, Sigma Chemical St, Louis MO) y 100  $\mu$ L de la suspensión de proteoliposomas. Se realizó una preincubación a  $37^{\circ}$ C y se adicionaron 15  $\mu$ L del plasma problema con el fin de llevar a cabo la reacción de esterificación de la LCAT. Se dejó incubar la reacción por 1 hora exactamente a  $37^{\circ}$ C, deteniéndola por adición de 3.75 mL de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 1:2 (v/v) con 4  $\mu$ L de estándares de colesterol libre (cholesterol; Sigma, St. Louis MO) y colesterol esterificado 1 mg/mL (Cholesteryl myristate; Sigma, St. Louis MO), respectivamente. Se realizó un lavado posterior con 1.25 mL de  $\text{CHCl}_3$  a la fase orgánica y con 1.25 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  a la fase acuosa con el fin de realizar una extracción más cuantitativa de colesterol esterificado y no esterificado. La fase acuosa se desechó, mientras que el disolvente de la fase orgánica se evaporó con N<sub>2</sub> hasta concentrar el colesterol total (esterificado y no esterificado) en un volumen mínimo.

Se llevó a cabo la separación y cuantificación del colesterol marcado mediante cromatografía en capa fina, utilizando placas de poliéster cubiertas de gel de sílice (Aldrich, Milwaukee WI) y empleando como eluyente éter de

petróleo, éter etílico y ácido acético en proporción 90:10:5; la placa se reveló utilizando yodo sublimado (I<sub>2</sub>) como cromógeno, identificando los Rf del colesterol esterificado y no esterificado de las muestras al compararlas con los estándares (Rf de 0.15 y 0.8 respectivamente).<sup>57</sup>

Estas manchas fueron recortadas y raspadas, introduciendo su contenido en viales, adicionando 4 mL de líquido de centelleo (CytoScint, ICN Costa Mesa, CA) para su lectura en el contador de radiación beta (Liquid Scintillation Analyzer TRI- CARB 2200CA, Packard), el cual detecta las cuentas por minuto (cpm) como medida de radioactividad, siendo proporcionales a la cantidad de colesterol libre ó colesterol esterificado presente en cada muestra problema. A partir de estos datos se calculó el porcentaje de colesterol esterificado y la actividad de la enzima en nanomoles de colesterol esterificado por mililitro de plasma en una hora de reacción, de la siguiente manera:

**% de Esterificación:** A partir de las lecturas de cpm obtenidas de cada muestra, se eliminó el ruido de fondo del disolvente (blanco de líquido de centelleo) y se obtuvieron las lecturas reales de colesterol libre y esterificado. A partir de estos resultados se realizó la adición de ambos colesteroles para obtener el colesterol total marcado en cada muestra. Es importante señalar que cada muestra se realizó por duplicado. Ejemplo:

Muestra (cpm)	CE	CL	CE real	CL real	C total
1	6501.0	35545.0	6486.6	35530.6	42017.2
2	8737.6	45042.0	8723.2	45027.6	53750.8

Para determinar el porcentaje de esterificación, se establece la relación de las cpm de colesterol esterificado real por el 100 de esterificación total,

entre las cpm de colesterol total marcado. Después se realiza el cálculo del promedio de esterificación de las dos muestras:

% CE.	Promedio
15.44	15.83
16.23	

Actividad de la LCAT en nmol/ml/h: Estableciendo que el valor del porcentaje de esterificación equivale a los nanomoles de colesterol esterificado en cada muestra, se tiene:

$$15.83\% / 100 = 0.16 \text{ nmol de CE}$$

Además, como existe un factor de corrección por lote de proteoliposomas (ver resultados), se multiplica por este valor, el cual corresponde al valor promedio del % de esterificación de todos los controles que se corrieron para verificar la viabilidad de cada lote de proteoliposomas realizado.

$$0.16 \text{ nmol de CE} \times 11.5 = 1.82 \text{ nmol de CE}$$

Después se toma en cuenta el volumen de muestra adicionada en la reacción:

$$1.82 \text{ nmol de CE} \times (1,000 \mu\text{L} / 15 \mu\text{L de plasma}) = 121.33 \text{ nmol/ mL}$$

Como la reacción ocurre exactamente en una hora:

$$\text{Actividad LCAT} = 121.33 \text{ nmol/mL/ h}$$

## RESULTADOS

## ESTANDARIZACIÓN DE LA REACCIÓN LCAT.

## EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN Y DE LA CANTIDAD DE SUBSTRATO.

Para estas pruebas se determinó la actividad enzimática a dos diferentes tiempos de incubación, así como la cantidad de proteoliposomas (sustrato exógeno) en el medio de reacción, con el fin de corroborar las condiciones óptimas de la cinética enzimática ya establecida. Se utilizó, para todos los ensayos, un mismo lote de plasma control conservado a  $-70^{\circ}\text{C}$ ; además, se realizaron 5 repeticiones para cada ensayo. En la tabla 4 se muestran los resultados de la reacción LCAT, reportando los promedios y desviaciones estándar de cada ensayo:

Tabla 4. EFECTO DE LA CANTIDAD DE SUBSTRATO Y DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN.

	Efecto del tiempo de incubación		Efecto de la cantidad de sustrato	
	30 min.	1 h.	50 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
MEDIA (nmol/mL/h)	139.76	139.04	59.83	146.34
D.S. (nmol/mL/h)	23.02	12.45	8.21	15.93

La temperatura de incubación para todos los ensayos fue de  $37^{\circ}\text{C}$ . En el efecto del tiempo de reacción se utilizaron 100  $\mu\text{L}$  de proteoliposomas. Para observar el efecto de la cantidad de sustrato, sólo se varió la cantidad de proteoliposomas en el medio de reacción, dejando incubar por una hora.

A partir de las mediciones realizadas, el tiempo de incubación elegido para llevar a cabo la reacción LCAT es el de 1 hora, ya que se obtiene una desviación estándar menor en comparación con la obtenida en los treinta

minutos de reacción. Al variar la cantidad de sustrato se obtiene una mejor reproducibilidad al tener una mayor cantidad de proteoliposomas en el medio de reacción en comparación con el otro volumen. Por tanto, el volumen elegido de proteoliposomas es de 100  $\mu\text{L}$ .

#### VARIABILIDAD INTRA E INTER- ENSAYO.

Para observar la variabilidad inter-ensayo, se realizó la cuantificación de la actividad LCAT con las condiciones establecidas anteriormente. Se realizaron 10 repeticiones en cuatro días, utilizando diferente lote de plasma control cada día; a continuación se reportan las medias, desviaciones estándar y coeficientes de variación que resultaron de cada ensayo (Tabla 5).

Tabla 5. VARIABILIDAD INTER- ENSAYOS.

Día	1 N= 10	2 N= 10	3 N= 10	4 N= 10
Media	166.02	196.51	99.21	111.96
DS	7.00	9.48	4.59	4.69
CV	4.22	4.83	4.62	4.19

En cuanto a la variabilidad intra- ensayos, se obtuvo una media de  $143.43 \pm 6.44$  con un coeficiente de variación de 4.46%. Como se puede observar, existe un coeficiente de variación aceptable entre los intra e inter- ensayos, por lo que se establece que la metodología llevada a cabo para validar la reacción se encuentra en las condiciones adecuadas para llevar a cabo el análisis de los sujetos involucrados en el estudio.

Se puede observar que la actividad LCAT difiere de lote a lote, por lo que se decide ajustar los datos de todos los pacientes analizados con el

valor promedio del % de esterificación de todos los lotes de proteoliposomas verificados con el control para probar la viabilidad de cada lote preparado.

### SUJETOS DE ESTUDIO.

Para determinar el posible impacto que tiene la actividad LCAT sobre la incidencia de EAC, estudiamos un grupo de 50 pacientes con diagnóstico de la enfermedad (grupo EAC+) y 86 sujetos sin historia clínica, ni familiar de EAC (grupo EAC-), según se describe en la parte experimental. El perfil lipídico, características antropométricas y actividad LCAT de estas dos poblaciones se detallan en la tabla 6. El colesterol total, CLDL y triglicéridos son más elevados en los sujetos con EAC+ en comparación con los sujetos EAC-. El CHDL, así como la actividad LCAT expresada como actividad específica o porcentaje de esterificación, si bien tienden a ser más elevados en el grupo EAC-, las diferencias no son estadísticamente significativas.

Tabla 6. PERFIL DE LÍPIDOS, CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS Y ACTIVIDAD LCAT DE LOS SUJETOS EAC+ Y EAC-.

	CON EAC n= 50		SIN EAC n= 86		P*
C Total (mg/dl)	194.8	± 38.4	173.9	± 40.4	0.003
CHDL (mg/dl)	36.9	± 9.6	39.1	± 10.6	0.244
CLDL (mg/dl)	127.7	± 39.1	113.6	± 37.3	0.041
TRIG (mg/dl)	209.9	± 101.4	127.9	± 63.2	0.000
EDAD (años)	56.6	± 8.9	38.3	± 10.6	0.000
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	27.9	± 3.8	26.9	± 4.0	0.095
Act LCAT (nmol/h/L)	118.1	± 39.7	122.8	± 50.3	0.567
Esterificación (%)	15.4	± 5.2	16.0	± 6.5	0.544

\* Análisis t- Student entre los grupos EAC- y EAC+.

El nivel plasmático de lípidos y lipoproteínas está íntimamente relacionado con la edad y el sexo del sujeto, y en consecuencia pueden actuar como variable confusora al evaluar el impacto de la LCAT sobre el perfil lipídico. Para establecer si estos factores afectan nuestro estudio

estadístico, realizamos un nuevo análisis de varianza separando ambas poblaciones por sexo (Tabla 7).

Observamos que efectivamente existen diferencias importantes entre hombres y mujeres; en los sujetos EAC-, el CHDL es menor comparado con las mujeres del mismo grupo. Además, los hombres presentan niveles de triglicéridos plasmáticos más elevados que las mujeres en ese mismo grupo. En el grupo EAC+, se observan las mismas tendencias al comparar hombres y mujeres; sin embargo, las diferencias no alcanzan significado estadístico, probablemente debido al bajo número de mujeres incluidas en este grupo. Al comparar el subgrupo de hombres EAC+ (n= 40) con los EAC- (n= 45), las diferencias son las mismas que las observadas con el grupo completo, sugiriendo que el sexo tiene un impacto menor en las diferencias observadas entre EAC+ y EAC- de la tabla 6. En cuanto a la actividad LCAT, ésta tiende a ser menor en los sujetos de sexo masculino, independientemente del grupo al que pertenezcan. Es remarcable que el CHDL tiene exactamente la misma tendencia. A pesar de que dichas tendencias no alcanzan significado estadístico, sugieren una relación entre la actividad LCAT y CHDL que se explorará más adelante.

Tabla 7. ANALISIS t- STUDENT ENTRE SUJETOS EAC+ Y EAC- POR SEXO.

	HOMBRES CON EAC n=40		MUJERES CON EAC n=10		HOMBRES SIN EAC n=45		MUJERES SIN EAC n=41	
	C Total (mg/dl)	194.9 ± 38.7 <sup>a</sup>	38.7	194.6 ± 39.1	39.1	171.1 ± 42.0	42.0	176.9 ± 38.9
CHDL (mg/dl)	36.7 ± 9.3	9.3	38.3 ± 10.8	10.8	34.9 ± 9.8 <sup>b</sup>	9.8	43.6 ± 9.6	9.6
CLDL (mg/dl)	126.6 ± 36.1 <sup>a</sup>	36.1	132.3 ± 51.5	51.5	109.9 ± 38.4	38.4	117.6 ± 36.1	36.1
TRIG (mg/dl)	216.2 ± 105.5 <sup>a</sup>	105.5	184.7 ± 82.9 <sup>b</sup>	82.9	147.7 ± 70.5 <sup>c</sup>	70.5	106.2 ± 45.6	45.6
EDAD (Años)	56.6 ± 8.7 <sup>a</sup>	8.7	56.2 ± 10.4 <sup>b</sup>	10.4	38.4 ± 12.6	12.6	38.2 ± 8.1	8.1
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	28.0 ± 3.4	3.4	27.6 ± 5.5	5.5	27.1 ± 4.0	4.0	26.8 ± 4.0	4.0
Act LCAT (nmol·h/mL)	109.6 ± 40.9	40.9	114.5 ± 48.6	48.6	111.5 ± 53.1	53.1	123.9 ± 45.9	45.9

- a. p menor a 0.05 entre hombres con y sin EAC.  
 b. p menor a 0.05 entre mujeres con y sin EAC.  
 c. p menor a 0.05 entre hombres y mujeres con EAC.  
 d. p menor a 0.05 entre hombres y mujeres sin EAC.

La edad es otro de los parámetros principales que determina el nivel de lípidos y lipoproteínas plasmáticas y no se puede descartar la posibilidad de que también afecte la actividad LCAT. En la tabla 5 se puede apreciar que ambos grupos difieren en la edad promedio. Para establecer la posible dependencia de la actividad LCAT de la edad, incluimos en el estudio un tercer grupo de estudio integrado por niños cuyas edades fluctúan entre 12 y 16 años, y se comparó en perfil lipídico y actividad LCAT con los sujetos EAC- (Tabla 8). El LDL y los triglicéridos son significativamente menores en el grupo de niños, mientras que el CHDL es mayor aproximadamente en un 17%. Asimismo, la actividad LCAT es 55% mayor en los niños comparados con el grupo EAC-. Estos resultados demuestran por una parte que la actividad LCAT depende de manera inversa de la edad al igual que el CHDL. Por esta razón, realizamos un análisis de covarianza ajustando por la edad de los grupos EAC+ y EAC-. En este nuevo análisis, se observó nuevamente la ausencia de diferencia significativa entre los valores de esterificación de los grupos EAC+ y EAC- ( $p = 0.18$ ), incluso después de ajustar por CHDL e índice de masa corporal ( $p = 0.412$ ).

Tabla 8. PERFIL DE LÍPIDOS, CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS Y ACTIVIDAD LCAT EN NIÑOS Y ADULTOS EAC-.

	SIN EAC n=86		NIÑOS n=30		P*
C- Total (mg/dl)	173.9 ± 40.4		159.9 ± 34.5		0.073
CHDL (mg/dl)	39.1 ± 10.6		45.8 ± 11.2		0.006
CLDL (mg/dl)	113.6 ± 37.3		99.7 ± 31.4		0.052
TRIG (mg/dl)	127.9 ± 63.2		83.1 ± 28.7		0.000
EDAD (años)	38.3 ± 10.6		13.8 ± 1.1		0.000
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	26.9 ± 4.0		21.4 ± 2.7		0.000
Act. LCAT (nmol·h/mL)	122.8 ± 50.3		190.1 ± 231.6		0.124
Esterificación (%)	16.0 ± 6.5		24.8 ± 30.2		0.125

\* Análisis t- Student en niños y adultos EAC-.

La actividad LCAT es el eje sobre el que se articula el metabolismo de la HDL. Su actividad permite el flujo centripeto de colesterol hacia su



destino final, el hígado, en donde es transformado en sales biliares o es directamente excretado hacia el intestino en el jugo biliar. En consecuencia, planteamos la posibilidad de que esta enzima tuviera una relación con los niveles plasmáticos del colesterol total, del CHDL y/o del CLDL, en todos los casos, suponiendo una actividad CETP que no actúe como factor limitante. Para explorar esta posibilidad, realizamos un análisis de correlación de la actividad enzimática con las variables lipídicas y antropométricas (Tabla 9). Solo se observaron pequeñas correlaciones significativas entre la LCAT y el índice de masa corporal en el grupo EAC-. Asimismo, se observó una ligera correlación entre la edad y la actividad de la enzima en el grupo integrado por los niños y los sujetos EAC-. Estos resultados demuestran claramente que pese a ser una enzima clave en el metabolismo de colesterol, la LCAT no tiene un impacto directo sobre el perfil de lípidos.

No obstante la falta de correlación con el perfil lipídico, los valores de CHDL y LCAT simultáneamente más elevados en el grupo de niños respecto a los sujetos adultos sin enfermedad aterosclerosa (Tabla 8), sugieren que pueda existir una relación directa entre ambas variables.

Tabla 9. CORRELACIONES ENTRE EL PERFIL DE LÍPIDOS Y CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO CON LA ACTIVIDAD LCAT.

	CON EAC n=50		SIN EAC n=88		NIÑOS n=30		SIN EAC y NIÑOS n=116		TODOS n=166	
	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r
C-T (mg/dl)	0.499	-0.098	0.062	0.202	0.914	0.021	0.896	-0.010	0.727	0.033
CHDL (mg/dl)	0.209	0.181	0.198	0.140	0.708	-0.071	0.250	0.090	0.467	0.068
CLDL (mg/dl)	0.528	0.091	0.130	0.165	0.709	0.071	0.798	0.020	0.682	0.038
TRIG (mg/dl)	0.072	-0.257	0.689	-0.044	0.668	-0.082	0.071	-0.141	0.247	-0.108
EDAD (años)	0.711	0.054	0.188	0.143	0.729	-0.066	0.047	-0.154	0.127	0.143
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	0.964	0.007	0.025	0.244*	0.605	-0.098	0.196	-0.101	0.322	-0.093

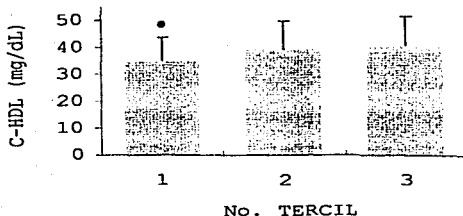
\*p menor a 0.05

r = coeficiente de correlación de Pearson

Para explorar esta posibilidad, agrupamos a todos los sujetos adultos por terciles de LCAT (Gráfico 1a). Se observa que los sujetos agrupados en el primer tercil presentan niveles de CHDL menores que los agrupados en el segundo o tercer tercil. Esta tendencia se mantiene al analizar

exclusivamente a los sujetos EAC-, aunque no se alcanza diferencia estadísticamente significativa entre el primero y tercer tercil (Gráfico 1b). Por último, en el grupo de cardiópatas únicamente se observa una tendencia similar, pero que carece de significado estadístico, probablemente por el número de sujetos incluidos en este subgrupo (Gráfico 1c).

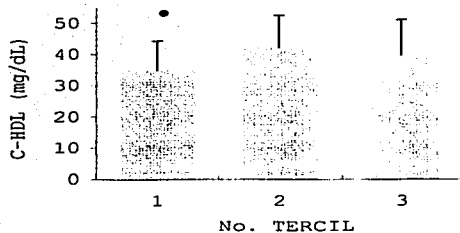
Gráfico 1 a. COLESTEROL HDL EN LOS DIFERENTES TERCILES DE LCAT DE SUJETOS EAC+ Y EAC-



•  $p = 0.023$  entre 1 vs 2 y 3.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Gráfico 1 b. COLESTEROL HDL EN LOS DIFERENTES TERCILES DE LCAT DE SUJETOS EAC-



•  $p = 0.035$  entre 1 vs 2.

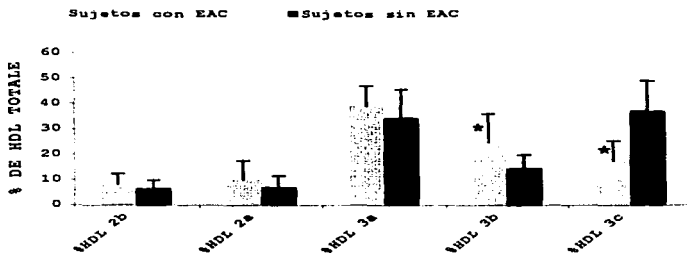
Gráfico 1 c. COLESTEROL HDL EN LOS DIFERENTES TERCILES DE LCAT DE SUJETOS EAC+



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

La actividad descrita para la LCAT y los resultados anteriores sugieren que la enzima está efectivamente relacionada con el metabolismo de las HDL, sin necesariamente afectar los niveles de CHDL. ¿A qué nivel interviene esta

Gráfico 2. DISTRIBUCIÓN DE SUBPOBLACIONES HDL EN SUJETOS EAC+ Y EAC-.



enzima? La respuesta más probable es la regulación de los tamaños de las HDL. Para establecer este posible mecanismo de regulación, se determinó la distribución de tamaños de las HDL por electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando condiciones no desnaturalizantes de las lipoproteínas separadas previamente por ultracentrifugación secuencial, según se describe en la sección de métodos. Seleccionamos un subgrupo de sujetos con enfermedad aterosclerosa y otro de los sujetos EAC-, de quienes se conservaba aún una alícuota suficiente de plasma para este análisis. Los resultados se pueden observar en el gráfico 2. Las diferencias más importantes entre ambos subgrupos se presentaron en las proporciones de HDL3c

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

y HDL3b. En el caso de las HDL3c, los sujetos EAC- poseen una proporción de más de dos veces la de los sujetos EAC+ ( $37.2 \pm 11.8$  vs.  $17.7 \pm 8.0\%$ ,  $p < 0.001$ ).

En lo que concierne las HDL3b, se observó una situación inversa, la proporción de esta subclase de HDL en los sujetos EAC+ es de un 70% mayor que en los sujetos EAC- ( $24.9 \pm 11.2$  vs.  $14.6 \pm 5.2$ ; para los sujetos EAC+ y EAC-, respectivamente,  $p < 0.001$ ). Estos resultados sugieren una alteración en la interconversión de HDL hacia tamaños menores o viceversa, una mayor conversión hacia HDL de mayor tamaño en detrimento de las partículas pequeñas mediado por la LCAT. Para tratar de establecer cuál es el posible mecanismo, realizamos un estudio de correlación entre las actividades LCAT y los tamaños HDL y el perfil lipídico del subgrupo de sujetos EAC+ y EAC- (Tabla 10).

En este análisis, observamos que el patrón de correlación es diferente en los sujetos con cardiopatía en comparación con los sujetos sin enfermedad. Por una parte, en los sujetos cardiopatas existe una correlación positiva, estadísticamente significativa, con la proporción de HDL2b (Fig. 3a). Esta correlación implica que la conversión de las HDL hacia tamaños grandes está determinada por la actividad LCAT en los sujetos con cardiopatía aterosclerosa. En contraste, los sujetos sin diagnóstico de la enfermedad no presentan la correlación entre la LCAT y las HDL2b. Además, en este grupo se observa una correlación negativa con las HDL2a (Fig 3a), lo que significa que a mayor actividad LCAT, menor proporción de HDL2a en los sujetos EAC-. Existe por otra parte, una correlación positiva entre la LCAT y las HDL3b. Tomando ambas correlaciones simultáneamente, la interpretación es que en los sujetos EAC-, a mayor esterificación de colesterol, más HDL3b se forman en detrimento de las HDL2a.

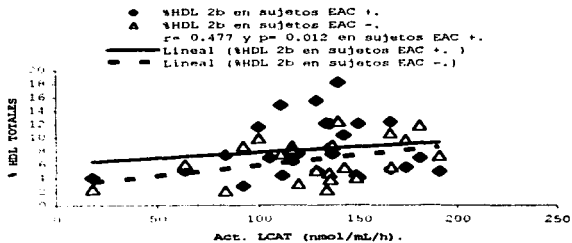
Tabla 10. CORRELACIONES ENTRE LA ACTIVIDAD LCAT Y SUBPOBLACIONES HDL.

	CON EAC n=27		SIN EAC n=22		AMBOS n=49	
	p	r	p	r	p	r
%HDL 2b	0.012	0.477*	0.586	0.123	0.005	0.396**
%HDL 2a	0.587	0.109	0.019	-0.496*	0.775	0.042
%HDL 3a	0.972	-0.007	0.087	-0.374	0.751	-0.047
%HDL 3b	0.429	-0.159	0.049	0.425*	0.108	0.233
%HDL 3c	0.503	-0.140	0.135	0.329	0.061	-0.276

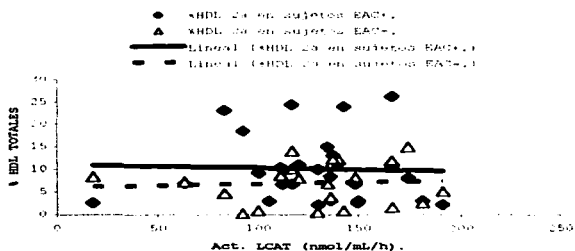
\*p menor a 0.05

\*\*p menor a 0.01

Gráfico 3a. CORRELACIONES ENTRE %HDL 2b EN FUNCION DE LA ACTIVIDAD LCAT EN SUJETOS EAC+ Y EAC-.



**Gráfico 3b. CORRELACIONES ENTRE %HDL 2a EN FUNCION DE LA ACTIVIDAD LCAT EN SUJETOS EAC+ Y EAC-.**



**Gráfico 3c. CORRELACIONES ENTRE %HDL 3a EN FUNCION DE LA ACTIVIDAD LCAT EN SUJETOS EAC+ Y EAC-.**

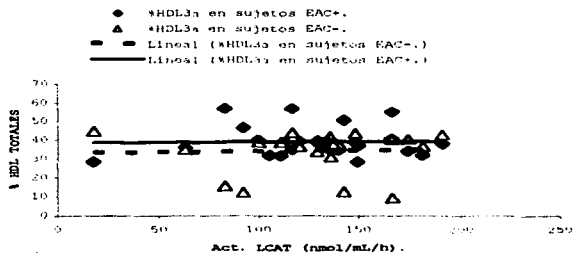


Gráfico 3d. CORRELACIONES ENTRE %HDL 3b EN  
FUNCIÓN DE LA ACTIVIDAD LCAT EN SUJETOS  
EAC+ Y EAC--.

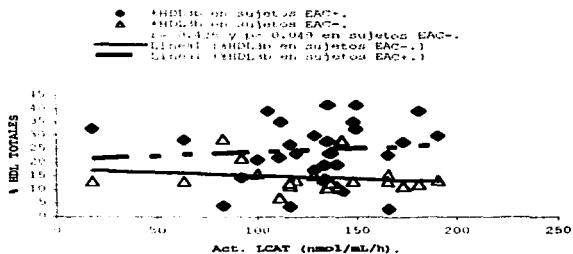
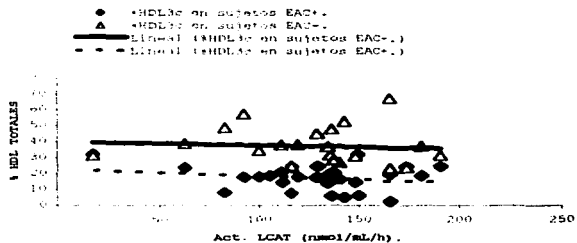


Gráfico 3e. CORRELACIONES ENTRE %HDL 3c EN  
FUNCIÓN DE LA ACTIVIDAD LCAT EN SUJETOS  
EAC+ Y EAC--.





## DISCUSIÓN

---

Los estudios epidemiológicos tradicionalmente han demostrado que el CT, el LDL y los triglicéridos son factores de riesgo de desarrollar EAC.<sup>78</sup> Asimismo, está perfectamente establecida una correlación negativa entre el riesgo de desarrollar enfermedad aterosclerosa coronaria y la concentración plasmática de las HDL. En nuestro país, la dislipidemia más frecuente es la hipoalfalipoproteinemia<sup>76</sup> (CHDL < 36 mg/dl), lo que representa un factor de riesgo de desarrollar cardiopatía aterosclerosa. El estudio de las causas metabólicas que originan la hipoalfalipoproteinemia en nuestra población, es de gran interés para establecer las estrategias de combate a este factor de riesgo. Dentro de los factores metabólicos, candidatos a determinar los niveles de CHDL plasmático, se encuentra la LCAT. En este trabajo, se ha adaptado un método radiactivo para la determinación de la actividad LCAT que correlaciona con la masa de la enzima en plasma.<sup>77</sup> Se ajustó el tiempo de incubación y la concentración de sustrato para obtener los valores de esterificación más grandes y con la menor variabilidad. A partir de este método, se determinó la actividad de la LCAT en un grupo de sujetos con enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC+) y se comparó con la actividad obtenida de un grupo integrado por sujetos sin historia clínica ni familiar de la enfermedad (EAC-).

En el análisis de varianza se observan en los sujetos con cardiopatía, los factores lipídicos de riesgo comúnmente reportados por los estudios epidemiológicos:<sup>79</sup> colesterol total, triglicéridos y LDL más altos en comparación con el grupo sin historia de la enfermedad. Estas observaciones

hacen al grupo EAC+ representativo de sujetos de su condición. Otro hallazgo frecuente en la aterosclerosis es la hipoalfalipoproteinemia. En el grupo de pacientes EAC+, se observa una tendencia a valores más bajos de CHDL en comparación con los sujetos EAC-, pero esta diferencia no alcanza significado estadístico. La falta de significado estadístico se puede atribuir a dos factores; por una parte, la intervención farmacológica con estatinas, fibratos o antagonistas de calcio que comúnmente recibe el paciente con infarto previo. Estos fármacos alteran el perfil lipídico y muy particularmente producen incrementos en el CHDL. De esta manera, los sujetos EAC+ con tratamiento farmacológico aumentan sus niveles de CHDL y aumentan tanto los valores medios del grupo, como la dispersión de los valores, dando como resultado la falta de significado estadístico entre el CHDL de los sujetos EAC- y los sujetos EAC+. Por otra parte, los sujetos que integran el grupo EAC+ pertenecen al programa de educación preventiva secundaria. El objetivo de este programa es aumentar los conocimientos de la enfermedad en el paciente para crear una conciencia de profiláctica. Por tanto, estos individuos tienen actitudes higiénicas (ejercicio programado, hábitos alimenticios, profilaxis farmacológica estricta) que podrían favorecer los incrementos de los niveles plasmáticos de CHDL y dispersión de los datos.

Se puede argumentar que la diferencia de edad entre ambos grupos actúa como variable confusora e impide establecer si existen diferencias entre los grupos EAC+ y EAC- en actividad LCAT. Para establecer si en la edad tiene alguna influencia en la actividad de la enzima, se incluyó un grupo de niños cuyas edades fluctúan entre 12 y 16 años y se compararon con el grupo EAC-. Por una parte, en el análisis de varianza destacaron las diferencias en todas las variables lipídicas. Esta dependencia entre las concentraciones

plasmáticas de lípidos y la edad, es conocida,<sup>76</sup> los triglicéridos, colesterol total y LDL aumentan con la edad. Sin embargo, se observa una media de CHDL mayor para los niños, y de acuerdo a los datos reportados por Aguilar-Salinas C,<sup>76</sup> el CHDL no varía con la edad. Una primera explicación posible sería que el grupo de estudio no es representativo de los niveles de CHDL en la población. Esta posibilidad puede ser descartada ya que el valor promedio de CHDL del grupo EAC- está situado entre la percentelia 50 y 90 de la población mexicana ajustados por edad,<sup>76</sup> indicando que se trata de una muestra representativa de la población. En consecuencia, los resultados sugieren que el CHDL declina entre la segunda y la cuarta década de la vida. Este hecho no ha sido aún reportado en nuestra población. Esta posibilidad explicaría la diferencia de CHDL entre el grupo de niños y el de sujetos EAC- y debe ser explorada en estudios epidemiológicos futuros.

En lo que respecta a la actividad LCAT, los valores medios son menores en los EAC- comparados con los niños. El argumento puede ser similar que en el caso del CHDL: un decremento de la actividad entre la segunda y cuarta década de la vida. No existe dependencia estadísticamente significativa de la actividad LCAT y la edad en los diferentes grupos de estudio, ni de manera independiente, ni cuando se reúnen todos los sujetos en un solo grupo. Lo anterior sugiere que los valores elevados de actividad LCAT en el grupo de niños no se asocian a la edad, sino a otros factores involucrados en el desarrollo físico de los individuos. Además, se ha sugerido la existencia de genes que pueden controlar la expresión de las HDL y de la LCAT de manera simultánea, sin que exista interdependencia entre estas últimas,<sup>79</sup> lo que contribuiría a explicar algunas situaciones en las que se observa aumento o

disminución simultánea de HDL y LCAT<sup>40,41,42</sup> sin incrementos o decrementos extraordinarios de la actividad de la enzima.

Cualquiera que sea la explicación, la observación fundamental es el incremento simultáneo de los niveles de CHDL y de las actividades LCAT elevados en el grupo de niños en comparación con los sujetos EAC-, sugiriendo una interacción en ambos parámetros. En este sentido, los sujetos con deficiencia de actividad LCAT, presentan niveles muy bajos de CHDL.<sup>43</sup> Además, la transgenesis del gen LCAT humano en conejos o ratones aumenta los niveles de CHDL,<sup>44,47,45</sup> mientras que la intervención con ingesta moderada de alcohol,<sup>46</sup> terapia estrogénica de reemplazo<sup>42</sup> o un programa de ejercicio en humanos,<sup>41</sup> resulta en incrementos simultáneos de la actividad LCAT y del CHDL. Todas estas evidencias, al analizarlas de manera conjunta, sugieren un papel determinante de la LCAT sobre los niveles de CHDL; es decir, a más actividad LCAT, más CHDL en plasma. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo y los de otros autores<sup>46,47,58</sup> no han podido demostrar una correlación directa entre CHDL y la actividad LCAT.

Esta aparente paradoja puede tener solución en el planteamiento de "umbrales" de actividad LCAT. En efecto, los niveles bajos de CHDL en sujetos con deficiencia LCAT, se manifiestan cuando las actividades de la enzima se encuentran en valores por debajo del 50% de los valores normales.<sup>44</sup> En los animales transgénicos con el gen LCAT, para lograr un incremento del CHDL al doble se requiere una sobreexpresión de la actividad LCAT de 35 veces la observada en los animales normales.<sup>44</sup> De tal manera que la LCAT tenga un efecto sobre los niveles de CHDL, la actividad enzimática debe estar fuertemente abatida o excesivamente expresada.

Los resultados, agrupando a los sujetos por terciles, apoyan el "efecto umbral" de la LCAT sobre los niveles de CHDL: en el primer tercil de actividad LCAT, el promedio de CHDL es menor que en cualquiera de los otros dos terciles. Además, entre el segundo y tercer tercil de LCAT los valores de CHDL son muy similares. A partir de cierto nivel de actividad LCAT, esta enzima pierde su papel como factor determinante de los niveles del CHDL y entonces, otros factores toman el control de los niveles plasmáticos de estas lipoproteínas. En un trabajo previo<sup>89</sup> quedó demostrado que existe una correlación entre la actividad LCAT y los niveles de CHDL. Esta asociación no apoya la propuesta de la actividad "umbral" de la LCAT. Además, en la población de estudio no se encontró ninguna correlación entre las partículas HDL y la LCAT. La diferencia fundamental con el presente trabajo es el tipo de población estudiada. En efecto, mientras que al incluir sujetos con valores medios de 210 mg/dL y de 128 mg/dL de triglicéridos para los sujetos EAC+ y EAC- respectivamente, Tato y cols,<sup>86</sup> demostraron una correlación positiva entre la LCAT y las HDL en sujetos con niveles plasmáticos de triglicéridos de  $331 \pm 166$  y de  $353 \pm 255$  mg/dL para los sujetos EAC+ y EAC-, respectivamente. Al parecer, no existen otros estudios previos acerca de los efectos de las variaciones fisiológicas de la actividad de la enzima sobre los niveles de CHDL, sin embargo, es posible que variaciones en la actividad LCAT tengan una influencia mayor en el CHDL cuando se trata de sujetos hipertriglicéridémicos que en sujetos normales.<sup>90</sup>

De esta manera, el efecto de "umbral" LCAT sobre los niveles de CHDL sería aplicable a los sujetos normotriglicéridémicos, mientras que en sujetos hipertriglicéridémicos la LCAT sería un factor que explica hasta un 10% los

niveles de CHDL y cuyo efecto se mantiene a cualquier nivel de actividad de la enzima."

En la práctica clínica, el CHDL se considera un indicador del número de partículas HDL. No obstante, este parámetro está lejos de indicar el número y sobre todo el tipo de partículas HDL que existen en el plasma de un sujeto. Debe enfatizarse que la estructura de las HDL determina su función, tanto de captar colesterol, como de antioxidante. Este concepto es de relevancia si se considera que la LCAT modifica la estructura de las HDL; al esterificar el colesterol, éste pierde su carácter anfipático y migra al centro de la lipoproteína, aumentando su tamaño y disminuyendo su densidad. En este orden de ideas, es bien sabido que las partículas HDL pequeñas tienen mayor capacidad de captar colesterol que las HDL de mayor tamaño." A este nivel la LCAT parece desempeñar un papel fundamental. Los resultados demuestran que los sujetos con enfermedad aterosclerosa coronaria presentan un 50% menos de partículas pequeñas (HDL3c) en comparación con los sujetos EAC-, sugiriendo una captación menor de colesterol a partir de los tejidos periféricos en los cardiopatas. El menor número de partículas pequeñas asociada a la cardiopatía aterosclerosa, puede tener su origen en una síntesis abatida de HDL" o en una deficiencia en la remodelación de las HDL por la PLTP y la LH."

Una vez que la LCAT ha esterificado el colesterol provocando la conversión de HDL pequeñas (HDL3a) a HDL de mayor tamaño (probablemente HDL3b). Éstas últimas tendrían una ruta metabólica alternativa (Fig 5) que podría ser el enriquecimiento con apo E" y la consecuente eliminación de la partícula completa vía el receptor apo B/E hepático." De acuerdo a los resultados, esta alternativa metabólica para las HDL estaría limitada en la enfermedad aterosclerosa, provocando el incremento relativo de las partículas

HDL3b que se observa en estos sujetos. En consecuencia, la salida metabólica principal para las HDL3b en el sujeto cardiópata es a través de la esterificación por la LCAT. Una vez que las HDL se han enriquecido con ésteres de colesterol, éste puede ser intercambiado por triglicéridos provenientes de las lipoproteínas que contienen la apo B100. Las HDL pueden además ser remodeladas en especies de menor tamaño por interacción con el receptor SRBI (Fig 5). Al ser depletadas de los ésteres de colesterol se transforman en partículas más pequeñas que pueden seguir captando colesterol de los tejidos periféricos. En función de la correlación inversa que observamos entre la LCAT y la proporción de las HDL2a en los sujetos EAC-, se propone que la remodelación de las HDL vía el receptor SRBI es muy importante. Lo anterior implica que, entre más esterificación de colesterol, más partículas del tipo HDL2a (por las cuáles el receptor SRBI podría tener mayor afinidad) pueden ser depletadas vía el SRBI y experimentar una reducción de tamaño. El balance final se traduce en una gran disminución de población HDL2a entre más actividad LCAT exista. De esta manera se explicaría la correlación inversa entre la LCAT y las HDL2a en los sujetos EAC-. A la luz de esta propuesta, la ausencia de tal correlación en los sujetos EAC+ tendría su origen en alteraciones de la eliminación de colesterol vía el receptor SRBI (Fig 6). Este receptor puede, en efecto, asociarse al desarrollo de aterosclerosis<sup>44</sup> y al eliminar selectivamente el colesterol de las HDL,<sup>45</sup> sería un generador de partículas HDL más pequeñas. Al ser menos eficiente en los sujetos EAC+, las HDL2a pueden seguir incrementando su tamaño por la acción conjunta de la LCAT y probablemente de la CETP (Fig 6). De esta manera, la población de HDL2b se vería favorecida tal como lo

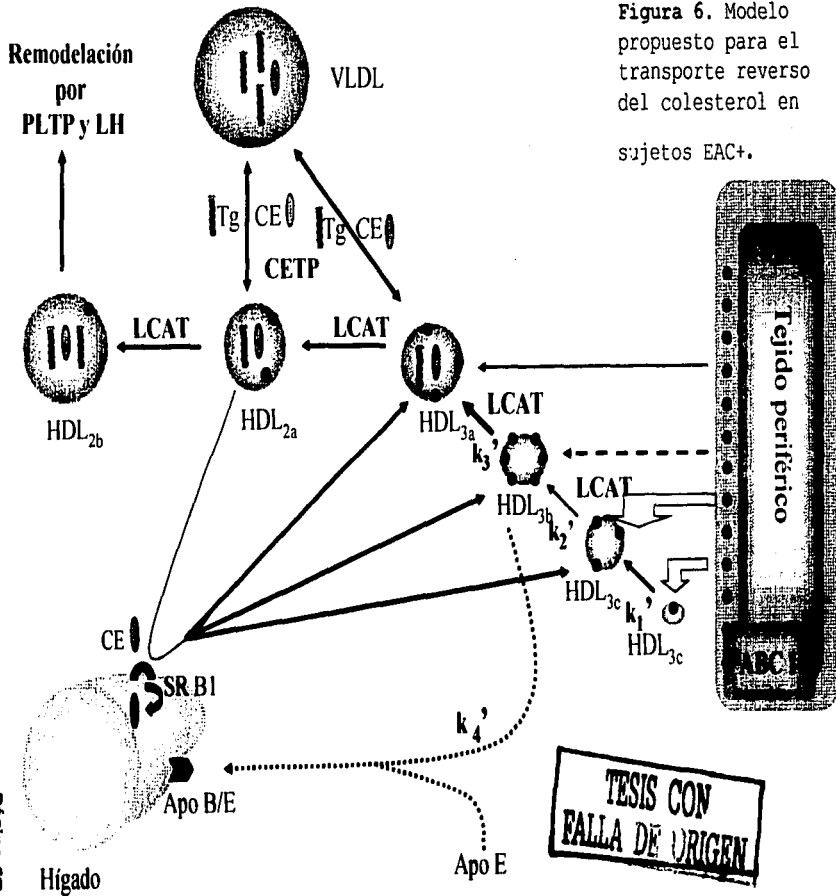
demuestran los resultados, explicando así la correlación directa entre LCAT y HDL2b únicamente en los sujetos EAC+.

En resumen, la LCAT es una enzima que tiene un efecto umbral y limitado sobre los niveles de CHDL en la población estudiada. Pese a tener poca influencia sobre los niveles de CHDL, el efecto de la actividad LCAT es determinante en la distribución de subpoblaciones de HDL. A este nivel, los sujetos con diagnóstico de enfermedad aterosclerosa coronaria tienen un comportamiento muy diferente a los sujetos sin diagnóstico de la enfermedad. El efecto dicotómico de la LCAT en sujetos con o sin aterosclerosis sobre el metabolismo de la HDL puede tener su origen en alteraciones en otras rutas metabólicas de las HDL (receptor hepático apo B/E, receptor SRBI). De esta manera la interconversión de partículas de tamaño pequeño a partículas más grandes se vuelve fuertemente dependiente de la LCAT en el paciente con aterosclerosis.





Figura 6. Modelo propuesto para el transporte reverso del colesterol en sujetos EAC+.



## CONCLUSIONES.

---

De acuerdo a los objetivos planteados al inicio del presente proyecto, se establece que el método para medir la actividad LCAT dentro del Laboratorio de Metabolismo de Lípidos y Aterosclerosis del INC se encuentra en las condiciones adecuadas para su utilización en la medición de la actividad de esta enzima.

La LCAT, a pesar de ser el eje sobre el que se articula el metabolismo de las HDL, tiene un impacto muy limitado sobre los niveles plasmáticos de CHDL. Este efecto se observa cuando la actividad LCAT está por debajo del primer tercil de en este estudio y solo en sujetos con EAC. Asimismo, existe una asociación entre la edad y los niveles de CHDL cuando se comparan los grupos de niños y EAC-. Sin embargo, este estudio no pudo probar una relación causal entre edad-LCAT y CHDL. No obstante, de acuerdo a estos resultados, la LCAT tiene una influencia muy importante al nivel de la remodelación asociada a la LCAT es diferente en sujetos sin diagnostico de EAC y los sujetos con EAC.

Para establecer si estas diferencias en la remodelación de las lipoproteínas de alta densidad, mediadas por la LCAT, contribuyen al desarrollo de la enfermedad, se requiere de estudios ulteriores para evaluar la funcionalidad de las diferentes subpoblaciones HDL.

**FALLA DE ORIGEN**

BIBLIOGRAFIA.

---

01. de Salud S. (2001). Dirección General de Epidemiología. México.
02. Ahumada AM. (1989). Metabolismo de Lipoproteínas. En Prevención de la aterosclerosis en México. Cueto GL. Ed AMPAC México. D.F.
03. Pérez-Méndez O. Luc G. Posadas-Romero C. (2000). Concentraciones bajas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en plasma y enfermedad arterial coronaria. Arch Inst Cardiol Méx 70: 312.
04. Bachorick PS, Levy RI, Rifkind BM (1993). Lípidos y Dislipoproteinemias. En Diagnóstico y Tratamiento Clínico por el Laboratorio. Henry JB. Ed Salvat. 9ªed. 195.
05. Naito HK (1992). Trastornos del metabolismo, en Kaplan LA. Química Clínica. Ed Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina Pp 646.
06. Austin MA (1991). Plasma triglyceride and coronary heart disease. Arterioscler Thromb 11: 2.
07. Brunzell JD, Chait A, Bierman EL (1978). Pathophysiology of lipoprotein transport. Metabolism 27: 1109.
08. Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL (1981). Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptor. Science, 212: 628.
09. Bolin DJ, Jonas A (1996). Sphingomyelin inhibits the lecithin-cholesterol acyltransferase reaction with reconstituted high density lipoproteins by decreasing enzyme binding. J Chem 271: 19152.
10. Scheidt S, Devereux R, Kligfield P (1981). A Cornell University Postgraduate Course on Hyperlipidemia. Med Inc New York.



11. Eisenberg S (1984). High density lipoprotein metabolism. J Lip Res 25: 1017.
12. Blanche PJ, Gong EL, Forte TM, Nichols AV (1981). Characterization of humans high density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. Biochim Biophys Acta 665: 408.
13. Havel RJ (1987). Origin metabolic fate an metabolic function of plasma lipoprotein. En Contemporary Issues in endocrinology and metabolism. Steinberg D, Olefsky JM. Hypercholesterolemic and atherosclerosis. Churchill livingstone. Vol 3. Pp 117.
14. Norum KR, Berg T, Helgerud P, Devron CA (1983). Physiol Rev 30: 1343.
15. Olivecrona T, Bengtsson OG (1993). Lipoprotein lipase and hepatic lipase. Curr Op Lipidol 4: 187.
16. Schaeffer TE, Lodish HF (1994). Expression cloning and characteristic of a novel adipocyte lung chain fatty acid transport protein. Cell 79: 427.
17. Cohn JS, Mc Namara JR, Cohn SD, Ordovas J, Schaefer EJ (1988). Plasma apolipoprotein change in the triglyceride rich lipoprotein fraction of human subjects fed a fat rich meal. J Lip Res 29: 925.
18. Hamilton RL, Morehouse A, Havel RJ (1991). Isolation and propeties of nascients lipoproteins from highly purified rat hepatocytic Golgi fraction. J Lipid Res 32: 529.
19. Chen GC, Zhu S, Hardman DA (1989). Structural domains of human apolipoprotein B100. Diferential accessibility to limited proteolysis of B100 in low density and very low density lipoproteins. J Biol Chem 264: 14369.

TRABAJOS  
FALLA DE ORIGEN

20. Gregg RE, Brewer HB Jr (1988). The role of apolipoprotein E and lipoprotein receptor in modulating the in vivo metabolism of apolipoprotein B containing lipoprotein in humans. Clin Chem 34: 28.
21. Havel RJ (1984). The formation of LDL: mechanism and regulation. J Lip Res 25: 1570.
22. Yamamoto T, Davies CG, Brown MS (1984). The human LDL receptor: A cysteine rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. Cell 39: 27.
23. Brown SM, Goldstein JL (1985). The receptor model for transport of cholesterol in plasma. Ann NY Acad Sci 454: 178.
24. Goldstein JL, Brown MS (1990). Regulation of the mevalonate pathway. Nature 343: 425.
25. Phillips MC, Rothblat GH (1997). HDL and cholesterol efflux. Atherosclerosis. 134: 114.
26. Williams PT, Vranizan KM, Austin MA, Krauss RM (1993). Association of age, adiposity, alcohol intake, menstrual status and estrogen therapy with high density lipoprotein subclasses. Arterioscler Throm. 13: 1654.
27. Castro GR, Fielding CJ (1988). Early incorporation of cell derived cholesterol into pre beta migrating high density lipoprotein pathway. Biochemistry 27: 25.
28. Doviasova M. Regulation of endogenous transport of cholesterol. (1983). En: Advances in lipid research, Kritchevsky RD. Ed Academic Press, New York. Pp. 109.
29. Nichols AV, Kraus RM, Musliner TA (1986). Nondenaturing Polyacrilamide Gradient Gel Electrophoresis. Methods enzymol. 128: 417.



30. Von Eckardstein A, Huang Y, Assmann G, (1994). Physiological role and clinical relevance of high density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipid*. 15: 404.

31. Brewer HB Jr, Fairwell T, Laure A, Ronan R, Houser A, Bronzert TJ (1978). The sequence of human apo AI and apolipoprotein isolated from high density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 80: 625.

32. Luc G, Bard JM, Evans A, Arveiler D, Ruidavets JB, Amouyel P, Ducimetiere P (2000). The relationship between apolipoprotein AI containing lipoprotein fractions and environmental factors: the prospective epidemiological study of myocardial infarction (PRIME study). *Atherosclerosis*. 152: 399.

33. Li WH, Tanimuro M, Luo CH, Datta S, Chun L (1988). The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure function relationships an evolution. *J Lipid Res*. 29: 245.

34. Dayhoff MO, Baker WC, Hunt LT (1983). Establishing homologies in protein sequences. *Methods enzymol* 91: 524.

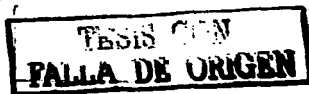
35. Rosseneu M, Van loo B, Lins L, De Pauw M, Ruyschaert JM, Brasseur R (1992). Analysis of the primary an of the secondary structure of apolipoproteins. En structure an function of apolipoproteins. Ed. CRC Press. Inc Florida.

36. Marcel YL, Provost PR, Koa H, Raffai E, Vu Dac N, Fruchart JC, Rassart E (1991). The epitopes of apolipoprotein AI define distinct structural domains including a mobile middle region. *J Biol Chem*. 266: 3644.

37. Bachorick PS, Kwiterovich POJ (1988). Apolipoprotein measurements in clinical biochemistry and their utility vis-a-vis conventional assays. *Chim Acta* 178: 1.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

38. Laccotripe M, Makrides SC, Jonas A, Zannis VI (1997). The carboxyl terminal hydrophobic residues of apolipoprotein AI affect it's rate of phospholipid binding and it's association with high density lipoprotein. *J Biol Chem* 272: 17511.
39. Edelstein C, Gordon JI, Toscas K, Sim HF, Strauss AW (1983). In vivo conversion of proapoprotein AI to aprotein AI. *J Biol Chem* 258: 11430.
40. De Backer G, Rosseneu M, Deslypere TP (1982). Discriminative value of lipids and apolipoproteins in coronary disease. *Atherosclerosis*, 42: 197.
41. Franzen J, Fex G (1986). Low serum lipoprotein AI in acute myocardial infraction survivors with normal HDL cholesterol. *Atherosclerosis* 59: 37.
42. Rubin EM, Krauss R, Spangler E, Verstuyft S, Clift S (1991). Inhibitions of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI *Nature* 353: 265.
43. Hayec T, Oiknine J, Danker G, Brook JG, Aviram M (1995). HDL apolipoprotein AI attenuates oxidative modification of low density lipoprotein: studies in transgenic mice. *Eur J Clin Chem* 33: 721.
44. Gordon JI, Sims HF, Lentz SR, Edelstein C, Scanu AM, Strauss AW (1983). Proteolytic processing of human preproapolipoprotein AI. A proposed defect in the conversion of pro AI to AI in Tangiers disease. *J Biol Chem* 258: 4037.
45. Gordon JI, Sims HF, Lentz SR, Edelstein C, Scanu AM, Strauss AW (1985). Extracellular processing of proapolipoprotein AII in Hep G2 cell cultures is mediated by S4-kDa protease immunologically related to cathepsin B. *J Biol Chem*. 260: 14824.
46. Breslow JL (1988). Apolipoprotein genetic variation and human disease. *Physiol Re* 68: 85.





47. Mc Lean J, Fielding C, Drayana D, Dieplinger H, Baer B, Kohr W (1986). Cloning and expression of human lecithin cholesterol acyltransferase DNAC. Proc Natl Acad Sci. 83: 335.
48. Mc Lean J, Wion K, Drayna D, Fielding C, Lawn R (1986). Human lecithin cholesterol acyltransferase gene: complete gene sequence and sites of expression. Nucleic Acid Res. 14: 9397.
49. Brasseur R, Lins L, Van Loo B, Ruyschert JM, Rosseneu M (1992). Molecular modeling of the amphiphatic helices of the plasma apolipoproteins. Proteins: structure, function and genetics. 13: 246.
50. Duverger N, Ghalim N, Theret N, Fruchart JC, Castro G (1994). Lipoprotein containing apolipoprotein AIV: composition and relation to cholesterol esterification. Biochim Biophys Acta 1211: 23.
51. Fielding CJ, Fielding PE (1995). Molecular physiology of reverse cholesterol transport. J Lipid Res. 36: 211.
52. Sparks DL, Frank PG, Neville TA (1998). Effect of the surface lipid composition of reconstituted LPAI on apolipoprotein AI structure and lecithin cholesterol acyltransferase activity. Biochim Biophys Acta 1390: 160.
53. Parks JS, Gebre AK (1997). Long chain polyunsaturated fatty acid in the sn-2 position of phosphatidylcholine decrease the stability of recombinant high density lipoprotein apolipoprotein AI and the activation energy of the lecithin cholesterol acyltransferase reaction. J Lipid Res. 38: 266.
54. Rye KA, Hime NJ, Barter PJ (1996). The influence of sphingomyelin on the structure and function of reconstituted high density lipoproteins. J Biol Chem. 271: 4243.

55. Doviasova M, Stribrna J, Pritchard P, Frohlich J, (1992). Cholesterol esterification rate in plasma depleted of very low and low density lipoprotein is controlled by the proportion of HDL2 and HDL3 subclasses: study in hypertensive and normal middle aged and septuagenarian men. *J Lipid Res* 33: 1411.
56. Subbaiah PV, Albers JJ, Chen CH, Bagdade JD (1980). Low density lipoprotein activated lysolecithin acylation by human plasma lecithin cholesterol acyltransferase. Identity of lysolecithin acyltransferase and lecithin cholesterol acyltransferase. *J Biol Chem.* 255: 9275.
57. Gillet MPT y Owen JS (1992). Cholesterol esterifying enzymes lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) and acyloenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT). En *Lipoprotein analysis a practical approach.* Converse CA, Skinner ER. Oxford University Press. Inglaterra. Pp 187.
58. Brites FD, Bonavita CD, De Geitere C, Cloes M, Delfly B, Yael MJ, Fruchart J, Wikinski RW, Castro GR (2000). Alterations in the main steps of reverse cholesterol transport in male patients with primary hypertriglyceridemia and low HDL- cholesterol levels. *Atherosclerosis* 152: 181.
59. Stragl H, Cao G, Wyne KL, Hobbs HH (1998). Scavenger receptor Class B, type I dependent stimulation of cholesterol esterification by high density lipoprotein, low density lipoprotein and nonlipoprotein cholesterol. *J Biol Chem.* 273: 31002.
60. Brown SM, Goldstein JL (1986). A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

61. Libby P (1999). Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med* 247: 349.
62. Ross R (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801.
63. Miller NE (1987). High density lipoprotein: A major risk factor for coronary atherosclerosis. *Bailleres Clin Endocrinol Metab* 1: 603.
64. Kugiyam K, Kerns SA, Morrisett JD, Roberts R, Henry PD (1990). Impairment of endothelium- dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low density lipoproteins. *Nature* 344: 160.
65. Parthasarathy S, Barnett J, Fong LG (1990). High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1044: 275.
66. Mackness MI, Durrington PN (1992). Lipoprotein separation and analysis for Clinical Studies. En: *Lipoprotein analysis a practical approach*. Converse CA, Skinner ER. Oxford University Press. Inglaterra. Pp 1.
67. Brousseau ME, Kauffman RD, Herderick EE, Demosky SJ, Evans W, Marcovina S, Santamarina FS, Brewer HB, Hoeg JM (2000). LCAT modulates atherogenic plasma lipoproteins and the extent of atherosclerosis only in the presence of normal LDL receptors in transgenic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.20: 450.
68. Glomset JA, Norum KR, King W (1970). Plasma lipoprotein in familial lecithin cholesterol acyltransferase deficiency: lipid composition and reactivity in vitro. *J Clin Invest*. 49: 1827.
69. Jonas A (2000). Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta*. 1529: 245.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

70. Assmann G, Schulte H (1992). Relation of high density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). Prospective Cardiovascular Munster Study. *Am J Cardiol* 70: 733.
71. Kuivenhoven JA, Pritchard H, Hill J, Frohlich J, Assmann G, Kastelein J (1997). The molecular pathology of lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes. *J Lipid Res* 38: 191.
72. Rader DJ, Ikewaki K, Duverger N, Schmidt H, Pritchard H, Frohlich J (1994). Markedly accelerated catabolism of Apo AII and high density lipoproteins containing Apo AII in classic lecithin cholesterol acyltransferase deficiency and fish eye disease. *J Clin Invest* 93: 21.
73. Parra HJ, Arveiler D, Evans AE, Cambou JP, Amouyel P, Bingham A (1992). A case control study of lipoprotein particles in two populations at contrasting risk for coronary heart disease. The ECTIM Study. *Arterioscler Thromb.* 12: 701.
74. Oikawa S, Mendez A, Oram J, Bierman E, Cheung M. (1993). Effects of high density lipoprotein particles containing Apo AI, with or without apo AII on intracellular cholesterol efflux. *Biochim Biophys Acta* 1165: 327.
75. Ohta T, Nakamura R, Ikeda Y, Shinohara M, Miyazaki A, Horiuchi A (1992). Differential effect of subspecies of lipoprotein containing apolipoprotein AI on cholesterol efflux from cholesterol loaded macrophages: functional correlation with lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta.* 1165: 119.
76. Aguilar SC, Olaiz G, Valles V, Rios TJM, Gómez PFJ, Rull JA, Rojas R, Franco A, Sepulveda J (2001). High prevalence of low HDL cholesterol

concentrations and mixed hiperlipidemia in Mexican nation-wide survey. J Lipid Res. 42: 1298.

77. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS (1972). Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem 18: 499.

78. Miller KW, Small DM (1987). Structure of triglyceride rich lipoproteins: En analysis of core and surface phases. En Gotto AM, Ed Plasma Lipoproteins: New Comprehensive Biochem.

79. Mehrabian M, Castellani LW, Wen FZ, Wong J, Rithaporn T, Hama SY, Hough GP, Johnson D, Albers JJ, Mottino GA, Frank JS, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ (2000). Genetic control of HDL levels and composition in an interspecific mouse cross (CAST/Ei x C57BL/6J) J Lipid Res 41: 1936.

80. Serdyuk AP, Metelskaya VA, Ozerova IN, Kovaltchouk NV, Olferiev AM, Bubnova MG, Perova NV, Jauhialainen M, Lasselin C, Castro G (2000). Effects of alcohol on the major steps of reverse cholesterol transport. Biochemistry. 65: 1310.

81. Lehmann R, Engler H, Honegger R, Riesen W, Spinaz GA (2001). Alterations of lipolytic enzymes and high density lipoprotein subfractions induced by physical activity in type 2 diabetes mellitus. Eur J Clin Invest. 31: 37.

82. Ulloa N, Verdugo C, Rios M, Sepulveda J, Sepulveda S, Naveas R, Calvo C (1998). Increased activity of lecithin cholesterol acyltransferase during short-term oral estrogen progestin replacement therapy in a group of postmenopausal women. Metabolism 47: 297.

83. Elkhailil L, Majd Z, Bakir R, Perez-Mendez O, Castro G, Poulain P, Lacroix B, Duhal N, Fruchart JC, Luc G (1997). Fish eye disease: Structural and in

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

vivo metabolic abnormalities of high density lipoproteins. *Metabolism* 46: 474.

84. Mehlum A, Gjernes E, Solberg LA, Hagve TA, Prydz H (2000). Overexpression of human lecithin cholesterol acyltransferase in mice offers no protection against diet induced atherosclerosis. *APMIS* 108: 336.

85. Foger B, Chase M, Amar MJ, Vaisman BL, Shamburek RD, Paigen B, Fruchart NJ, Paiz JA, Koch CA, Hoyt RF, Brewer HB, Santamarina FS (1999). Cholesteryl ester transfer protein corrects dysfunctional high density lipoproteins and reduces aortic atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase transgenic mice. *J Biol Chem* 274: 36912.

86. Tato F, Vega GL, Grundy SM (1997). Determinants of plasma HDL cholesterol in hypertriglyceridemic patients. Role of cholesterol ester transfer protein and lecithin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 56.

87. Ruhling K, Lang A, Richard F, Van Tol A, Eisele B, Herzberg V, Till U (1999). Net mass transfer of plasma cholesteryl esters and lipid transfer proteins in normolipidemic patients with peripheral vascular disease. *Metabolism*. 48: 1361.

88. Idzior WB (2001). Familial LCAT deficiency. *Przegl Lek* 58: 919.

89. Skinner ER (1994). High-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol*. 5: 241.

90. Dullart RFP, Gansevoort RT, Dikkischei BD, De Zeeuw D, De Jong PE, Van Tol A, (1993). Role of elevated lecithin: cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein activities in abnormal lipoproteins from proteinuric patients. *Kidney Int* 44: 91.

ESTADO DE GUATEMALA  
FACULTAD DE QUÍMICA  
**FALLA DE ORIGEN**  
ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

91. Huesca-Gómez C, Franco M, Luc G, Montano LF, Masso F, Posadas-Romero C, Perez-Mendez O (2002). Chronic hypothyroidism induces abnormal structure of high-density lipoproteins and impaired kinetics of apolipoprotein AI in the rat. *Metabolism*. 51: 443.
92. Jiang XC (2002). The effect of phospholipid transfer protein on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Front Biosci* 1: 1634.
93. Lie J, de Crom R, Jauhainen M, van Gent T, van Haperen R, Scheek L, Jansen H, Ehnholm C, van Tol A (2001). Evaluation of phospholipid transfer protein and cholesteryl ester transfer protein as contributors to the generation of pre beta high density lipoproteins. *Biochem J*. 360: 379.
94. Braun A, Trigatti BL, Post MJ, Sato K, Simons M, Edelberg JM, Rosenberg RD, Schrenzel M, Krieger M (2002). Loss of SR-BI expression leads to the early onset of occlusive atherosclerotic coronary artery disease, spontaneous myocardial infarctions, severe cardiac dysfunction, and premature death in apolipoprotein E deficient mice. *Circ Res* 90: 270.
95. De La Llera MM, Connelly MA, Drazul D, Klein SM, Favari E, Yancey PG, Williams DL, Rothblat GH (2001). Scavenger receptor class B type I affects cholesterol homeostasis by magnifying cholesterol flux between cells and HDL. *J Lipid Res* 42: 1969.
96. Assmann G, Von Eckerdstein A, Funke H (1991). Lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency and fish eye disease. *Curr Opin Lipidol* 2: 110.
97. Cheung MC, Alberts JJ (1977). The measurement of apolipoprotein AI and AII levels in men and woman by immunoassay. *J Clin Invest* 60: 43.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

98. Doviassova M, Frohlich J (1999). Advances in understanding of the role of lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) in cholesterol transport. *Clinica Chimica Acta* 286: 257.
99. Fitch WM. (1977). Phylogenies constructed by the cross-over process as illustrated by human hemoglobin and thirteen-cycle eleven aminoacid repeat in human apolipoprotein AI *Genetics* 86: 623.
100. Glomset JA (1970). Physiological role of lecithin cholesterol acyltransferase. *Am J Clin Nutr* 23: 1129.
101. Gordon JI, Budellier KA, Sims HF, Edelsten C, Scanu AM, Strauss AW (1983). Biosynthesis of human preproapolipoprotein AII. *J Biol Chem* 258: 14054.
102. Gordon JI, Smith DP, Andy R, Alpers DH, Schonfeld G, Strauss AW (1982). The primary translation product to rat intestinal apolipoprotein AI RNA is unusual preprotein. *J Biol Chem* 257: 971.
103. Guerin M, Lassel TS, Le Goff W, Farnier M, Chapman MJ (2000). Action of atorvastatin in combined hyperlipidemia: preferential reduction of cholesteryl ester transfer from HDL to VLDL1 particles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 189.
104. Kane JP, Hardman DA, Paulus HE (1980). Heterogeneity of apolipoprotein B: Isolation of a new species from human chylomicrons. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2465.
105. Kunitake ST, Kane JB (1982). Factors affecting the integrity of high density lipoprotein in the ultracentrifuge. *J Lipid Res.* 23: 936.



106. Zannis VI, Karathasis SK, Keutmann H, Goldberger G, Breslow JL (1983). Intracellular and extracellular processing of human apo AI. Secreted apo AI isoprotein is a propeptide. Proc Natl Acad Sci. 80: 2574.
107. Nofer JZ, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G, Von Eckardstein A (2002). HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. Atherosclerosis. 161: 1.
108. Ochoa SCE, Posadas RC (1992). Dislipoproteinemias en México. En Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares en México. Sánchez TG. Ed Sociedad Mexicana de Cardiología. Pp 17.
109. Ohta T, Nakamura R, Ikeda Y, Frohlich J, Takata K, Saito Y (1994). Evidence for impaired cellular cholesterol removal mediated by apo AI containing lipoproteins in patients with familial lecithin cholesterol acyltransferase deficiency. Biochim Biophys Acta. 1213: 295.
110. Pagnan A, Havel RJ, Kane JP (1977). Characterization of human very low density lipoproteins containing two electrophoretic populations: double pre beta lipoproteinemia and primary dysbetalipoproteinemia. J Lipid Res. 18: 613.
111. Qu SJ, Fan HZ, Blanco VF, Pownall HJ (1993). Effects of site directed mutagenesis on the N-glycosylation sites of human lecithin cholesterol acyltransferase. Biochemistry. 32: 8732.
112. Rye KA, Clay MA, Barter PJ (1999). Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. Atherosclerosis. 145: 227.
113. Scanu AM, Byrne RE, Mihovilovic M. (1982). Functional roles of plasma high density lipoproteins. Crit Rev Biochem 13: 109.

114. Sviridov D, Nestel P (2002). Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis* 161: 245.

115. Wang X, Sato R, Brown MS, Hua X, Goldstein JL (1994). SREBP-1 a membrane bound transcription factor released by sterol regulated proteolysis. *Cell*. 77: 53.

116. Yang CY, Manogian D, Pao Q, Lee FS, Knapp RD, Gotto Jr. AM (1987). Lecithin cholesterol acyltransferase. Functional regions and a structural model of the enzyme. *J Biol Chem*. 262: 3086.

117. Young SG, Berties SJ, Scott TM, Dubois BW, Curtiss LK, Witztun JL (1986). Parallel expression of the MB19 genetic polymorphism apolipoprotein B100 and apoprotein B48. Evidence that both apoproteins are products of the same gen. *J Biol Chem*. 261: 2995.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**- No os dejéis corromper por un escepticismo estéril y deprimente; no os desalentéis ante la tristeza de ciertas horas que pasan sobre las naciones. Vivid en la serena paz de los laboratorios y las bibliotecas. Preguntáos primero: ¿Qué he hecho por instruirme? Y, después, al ir progresando: ¿Qué he hecho por mí patria? Hasta que llegue el día en que podáis sentir la íntima satisfacción de pensar en que de alguna manera habéis contribuido al progreso y bienestar de la humanidad. Louis Pasteur.**