

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE LA PIOGLITAZONA SOBRE EL
METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA
DENSIDAD (HDL)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA

JUANA ELIZABETH CARREÓN TORRES

DIRECTOR DE TESIS
DR. ÓSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ

MÉXICO, DF.



FEBRERO, 2005.

m340938



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

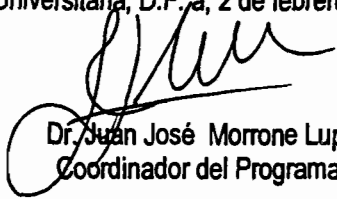
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 8 de noviembre del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) Carreón Torres Juana Elizabeth con número de cuenta 95578880, con la tesis titulada: "Efecto de la Pioglitazona sobre el Metabolismo de las Lipoproteínas de Alta Densidad (HDL)", bajo la dirección del(a) Dr. Oscar Armando Pérez Méndez.


Presidente:	Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo
Vocal:	Dr. Carlos Alberto Aguilar Salinas
Secretario:	Dr. Oscar Armando Pérez Méndez
Suplente:	Dr. José Pedraza Chaverri
Suplente:	Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a, 2 de febrero del 2005


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a distribuir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo académico.
NOMBRE: Carreón Torres Juana Elizabeth
FECHA: 10-FEBRERO-2005
FIRMA: 

COMITÉ TUTORAL

DR. ÓSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ

DR. GUILLERMO CELESTINO CARDOSO SALDAÑA

DR. MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

ÁREA DE INVESTIGACIÓN INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"

Agradezco al consejo nacional de ciencia y tecnología (**CONACyT**) por la beca otorgada para obtención del grado de Maestría.

Número de registro de becario **172703**

A mi madre y abuela doy gracias por el apoyo que me han brindado para lograr esta meta en mi vida.

Agradezco a cada una de las personas, familia y amigos que estuvieron a mi lado e hicieron posible este trabajo.

Al Dr. Guillermo Cardoso y Dr. Marco Antonio Juárez, agradezco su tiempo, consejos e ideas que aportaron a esta tesis.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Óscar Pérez por su confianza y apoyo que me brindó durante todo este tiempo en el laboratorio. Gracias por compartir su sabiduría y experiencia.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	7
ANTECEDENTES.....	9
I. LIPOPROTEÍNAS.....	9
I.1 COMPONENTES DE LAS LIPOPROTEÍNAS.....	10
A. LÍPIDOS.....	10
B. APOLIPOPROTEÍNAS.....	10
I.2 CLASIFICACIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS.....	11
I.3 METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS.....	13
I.3.1. VÍA EXÓGENA.....	15
I.3.2. VÍA ENDÓGENA.....	16
I.3.3 TRANSPORTE REVERSO DEL COLESTEROL: METABOLISMO DE LAS HDL.....	17
II. ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA Y HDL.....	19
III. TIAZOLIDINEDIONAS.....	20
III.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS TIAZOLIDINEDIONAS.....	21
JUSTIFICACIÓN.....	24
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVO GENERAL.....	26
OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
ANIMALES.....	27
RECOLECCION DE MUESTRAS.....	27

ANÁLISIS DE LABORATORIO.....	27
DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE PIOGLITAZONA.....	28
AISLAMIENTO Y MARCAJE DE LA APO A-I DE CONEJO.....	29
CINÉTICA METABÓLICA DE LA APO A-I DE LAS HDL.....	30
AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE SUBPOBLACIONES DE LAS HDL.....	31
DETERMINACIÓN DE ENZIMAS Y PROTEÍNAS.....	31
a) ACTIVIDAD LCAT.....	31
b) ACTIVIDAD CETP.....	32
c) ACTIVIDAD PLTP.....	32
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	32
RESULTADOS.....	34
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIÓN.....	50
PERSPECTIVAS.....	51
BIBLIOGRAFÍA.....	52

ABREVIATURAS

ABCA-1:	Transportador de membrana dependiente de ATP
Apo:	Apolipoproteínas
CETP:	Proteína de transferencia de ésteres de colesterol
C-HDL:	Colesterol de HDL
C-LDL:	Colesterol de LDL
CT:	Colesterol total
EAC:	Enfermedad aterosclerosa coronaria
FCR:	Tasa de catabolismo fraccional
HDL:	Lipoproteínas de alta densidad
IDL:	Lipoproteínas de densidad intermedia
LCAT:	Lecitina colesterol acilo transferasa
LDL:	Lipoproteínas de baja densidad
LH:	Lipasa hepática
Lp:	Lipoproteínas
LPL:	Lipoproteína lipasa
PAGE:	Electroforesis en gradiente de poliacrilamida
PLTP:	Proteína de transferencia de fosfolípidos
PON:	Paraoxonasa
PPAR:	Receptor activado por proliferador de peroxisomas
PPRE:	Elemento de respuesta a proliferadotes de peroxisomas
PR:	Tasa de producción
SR-BI:	Receptor scavenger clase B tipo I
Tg:	Triacilgliceroles
TRC:	Transporte reverso del colesterol
VLDL:	Proteínas de muy baja densidad

RESUMEN

En las últimas décadas, la enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC), es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en México.

Estudios epidemiológicos han demostrado una correlación inversa entre las concentraciones de colesterol de HDL (C-HDL) y la incidencia de desarrollar EAC. Ésta relación inversa se ha tratado de explicar por el papel que juegan las HDL en el transporte reverso del colesterol (TRC) y sus propiedades antiaterogénicas que se le han atribuido. Sin embargo, los mecanismos moleculares aún no han sido bien establecidos.

La pioglitazona un sensibilizador de la insulina y agonista de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR γ), es capaz de elevar el C-HDL, sugiriendo que existe un efecto sobre la síntesis y catabolismo de estas lipoproteínas. Sin embargo, tal efecto no ha sido aún demostrado. Para determinar si la pioglitazona tiene un impacto directo sobre el metabolismo, composición y estructura de las HDL. El fármaco se administró vía oral a dosis de 0.6, 1.75 ó 2.6 mg/Kg durante 6 semanas a conejos macho (3.5-4.0 kg), de raza Nueva Zelanda. Los resultados muestran que el tratamiento con pioglitazona incrementa los niveles plasmáticos del C-HDL hasta en un 26.8% (17.0 ± 4.8 vs 13.4 ± 6.0 mg/dL; $p < 0.05$) en comparación con el grupo control. Se realizó una cinética metabólica de A-I de HDL, utilizando un marcaje exógeno con yodo (^{125}I). Éste estudio mostró que el tratamiento con pioglitazona incrementa la tasa de catabolismo fraccional (FCR) en un 119% (0.025 ± 0.005 vs 0.049 ± 0.010 h $^{-1}$; $p < 0.01$) y la tasa de producción (PR) en un 126% (0.53 ± 0.17 vs 1.14 ± 0.40 mg/kg*h, $p < 0.001$) en comparación con el grupo control. La separación por tamaños de HDL a través de electroforesis en gradiente de poliacrilamida 3-30% (PAGE), mostró un aumento hasta del 170% (4.9 ± 2.0 vs 14.2 ± 2.7 , $p < 0.001$) en la proporción de partículas pequeñas HDL $_{3C}$ en comparación con el grupo control. La proporción de HDL $_{3C}$ correlacionó con la FCR,

sugiriendo que el tamaño de las HDL es un factor determinante en la velocidad de catabolismo de la apo A-I de las HDL. Estos resultados, se asocia a un enriquecimiento en el contenido de apo E y colesterol esterificado, así como a una disminución en el contenido de triacilglicérolos de las HDL. La pioglitazona también modifica las enzimas y proteínas involucradas en el TCR; incrementa la actividad de proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), actividad de proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP) y disminuye la actividad de la lecitina colesterol acilo transferasa (LCAT). En resumen, el tratamiento con pioglitazona modifica el tamaño y composición de las HDL, e incrementa la tasa de catabolismo y producción de la apo AI, generando una mayor proporción de partículas pequeñas. Estas modificaciones en el metabolismo sugieren que las propiedades antiaterogénicas de estas lipoproteínas se pueden modificar y que existen otros factores que determinan la estructura y funcionalidad de las HDL. Esto da lugar a estudios posteriores.

ANTECEDENTES

I. LIPOPROTEÍNAS

Los lípidos son moléculas relativamente insolubles en agua. En consecuencia, estas moléculas para ser transportadas en la sangre, desde su lugar de síntesis hasta su destino final, tienen que formar complejos macromoleculares y pseudomicelares con proteínas. A estos complejos se les llama lipoproteínas (Lp).

Las lipoproteínas (Fig.1) básicamente están constituidas de un núcleo de lípidos no polares (triacilgliceroles y ésteres de colesterol), rodeadas de una mezcla de lípidos anfipáticos, (fosfolípidos y colesterol libre) y por proteínas llamadas apolipoproteínas que estabilizan al complejo macromolecular.

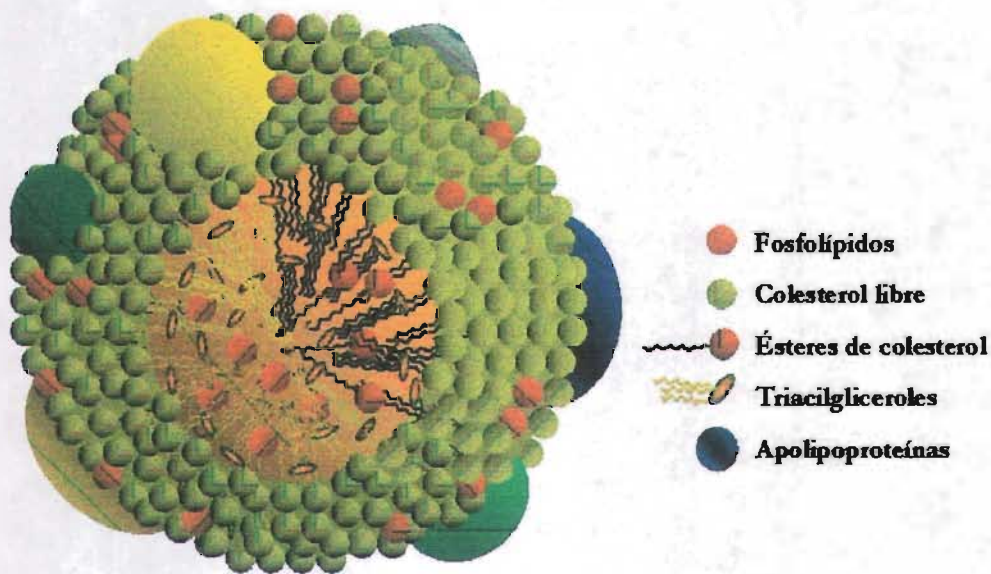


Fig. 1. Esquema general de la composición de las lipoproteínas. Se muestran los lípidos hidrofóbicos del núcleo, en su superficie los lípidos anfipáticos y las apolipoproteínas que estabilizan a la lipoproteína.

I.1 COMPONENTES DE LAS LIPOPROTEÍNAS

A. LÍPIDOS

Los lípidos son moléculas que están conformadas por una región hidrofílica y una porción hidrocarbonada apolar, que presentan gran diversidad de estructuras y funciones, forman parte de las lipoproteínas plasmáticas y de las membranas. Éstos pueden participar como cofactores enzimáticos, agentes emulsionantes, como fuente de energía y formar parte de la estructura de hormonas y de mensajeros intracelulares. Los principales lípidos en el plasma humano son el colesterol, fosfolípidos, triacilgliceroles y ácidos grasos.

B. APOLIPOPROTEÍNAS

Las apolipoproteínas, son unidades proteicas que se unen por interacciones hidrofóbicas a los lípidos y por atracciones electrostáticas a los fosfolípidos de las lipoproteínas, estabilizando a la pseudomicela lipídica. Estos polipéptidos son de peso molecular variable y sus funciones son estructurales, actúan como ligandos de receptores y como cofactores de enzimas del metabolismo de los lípidos. Las diferentes apolipoproteínas y sus principales características se resumen en el Cuadro 1.

Cuadro 1. CARACTERÍSTICAS DE LAS APOLIPOPROTEÍNAS ¹

Apo	PM	P.I.	Localización	Sitio de síntesis	Conc. plasmática (mg/dL)	Función
A-I	29,016	5.9-5.4	HDL, Qm	Intestino Hígado	100-150	Principal componente de las HDL, activador de LCAT, estimula el eflujo del colesterol.
A-II	14,414	5.0	HDL	Intestino Hígado	30-50	Principal proteína componente de HDL, inhibidor de LH y de la LCAT.
A-IV	44,465	5.5	HDL, Qm	Intestino	15	Activador de LCAT, modulador de LPL y estimula el eflujo de colesterol.
B-100	512,723	-	VLDL, LDL	Hígado	80-100	Ligando para receptor de LDL
B-48	240,800	6.8	Qm	Intestino	-	Proteína estructural de los Qm.
C-I	6,630	7.5	HDL, VLDL, Qm	Hígado	4-6	Activador de LCAT, inhibe la captación hepática de Tg.
C-II	8,900	4.9	HDL, VLDL, Qm	Hígado	3-5	Activador LPL, inhibición de la captación hepática de Lp-apo B-100.
C-III _{0,1,2}	8,800	4.5-5.0	HDL, VLDL, Qm	Hígado	12-14	Inhibidor de la LPL
E _{2,3,4}	34,145	6.0-5.7	VLDL, HDL	Hígado	3-5	Ligando de receptor de LDL y de residuos de Qm, estimula el eflujo de colesterol.

Lp: Lipoproteína, Tg: Triacilglicerol, HDL: Lipoproteínas de alta densidad, Qm: Quilomicrones, LDL: Lipoproteínas de baja densidad, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, LCAT: Lecitina: colesterol aciltransferasa, LPL: Lipoproteína lipasa, LH: Lipasa hepática.

I.2. CLASIFICACIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS

Las lipoproteínas se han clasificado de acuerdo a su densidad de flotación, a su movilidad electroforética y a su contenido en apolipoproteínas.

La clasificación es por orden creciente de densidad y decreciente de tamaño. (Cuadro 2)

a) Clasificación de acuerdo a su densidad, se conocen cinco clases:

- Quilomicrones (Qm): Son partículas de mayor tamaño y las menos densas; $d < 0.94$ g/mL, con respecto al resto de las otras lipoproteínas. Tienen un alto contenido en triacilglicerol y sus apolipoproteínas son B-48, A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E.

- Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, Very Low Density Lipoproteins); $0.94 < d < 1.006$ g/mL. Contienen principalmente triacilgliceroles, apo B-100, C-I, C-II, C-III y E.
- Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, Intermedie Density Lipoproteins); $1.006 < d < 1.019$ g/mL. Estas partículas contienen colesterol y triacilgliceroles, apo B-100, C-I, C-II, C-III y E.
- Lipoproteínas de baja densidad (LDL, Low Density Lipoproteins); $1.019 < d < 1.063$ g/mL. Tienen un alto contenido en colesterol y apo B-100.
- Lipoproteínas de alta densidad (HDL, High Density Lipoproteins), $1.063 < d < 1.210$ g/mL. Estas partículas tienen un alto contenido en proteínas y fosfolípidos, contienen colesterol. Su apolipoproteína principal es A-I, además contiene A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E. Las HDL, a su vez, pueden ser separadas en 2 subpoblaciones:

- HDL₂: $1.063 < d < 1.120$ g/mL.

- HDL₃: $1.120 < d < 1.210$ g/mL.

b) Clasificación de acuerdo a su migración electroforética, tenemos tres tipos:

Las lipoproteínas se pueden clasificar en α , β y pre- β .

c) Clasificación de acuerdo a su contenido en apolipoproteínas, se conocen dos poblaciones:

- ◆ Las lipoproteínas que contienen apo A-I: Lp A-I y Lp A-II: En esta clasificación podemos encontrar a las HDL.
- ◆ Las lipoproteínas que contienen apo B: Lp B; Lp B: E; Lp B: C-III y Lp B: C-III: E. En esta clasificación podemos encontrar a las VLDL, IDL, LDL y los Qm.

Cuadro 2. PROPIEDADES DE LAS LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS ²

Lp	Mov. Electroforética	Tamaño (nm)	Cont. de Prot. (%)	Cont. de Plp (%)	Cont. de Tg (%)	Cont. de Col. Libre Esterificado (%)	
Qm	Origen	>70	1-2	3-6	90-95	1-3	2-4
VLDL	Pre-beta	30-70	6-10	15-20	45-65	4-8	5
IDL	Pre-beta beta	20-30	20	30	35	35	
LDL	Beta	18-30	18-22	18-24	4-8	6-8	45-50
HDL	Alfa	5-12	45-55	26-32	2-7	3-5	15-20

Qm: Quilomicrones, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia, LDL: Lipoproteínas de baja densidad, HDL: Lipoproteínas de alta densidad, Plp: fosfolípidos, Triacilgliceroles, Prot: proteína, Col: colesterol.

I.3. METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS

La composición de las lipoproteínas plasmáticas se modifica continuamente, como resultado del intercambio dinámico y la transferencia de lípidos que existen entre ellas durante su metabolismo intravascular. Una gran variedad de enzimas, proteínas y algunos receptores de membrana como el receptor scavenger clase B tipo I (SR-BI), el transportador de membrana dependiente de ATP (ABCA-1), CD36, receptor para apolipoproteínas B/E (re-apoB/E) están involucrados en este metabolismo; éstas influyen en la concentración de los lípidos favoreciendo el transporte (proteínas de transferencia), o la hidrólisis de los mismos (enzimas hidrolíticas). En el Cuadro 3 se presentan algunas características destacables de las enzimas y proteínas de transporte que interviene en el metabolismo de las lipoproteínas.

Cuadro 3. ENZIMAS Y PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS ^{1,3}

NOMBRE	FUNCIÓN	ORIGEN
LCAT	Cataliza la transferencia de un ácido graso proveniente de la lecitina o fosfatidilcolina, al colesterol libre que se encuentra presente en las HDL y en las LDL. Contribuye a la maduración de HDL.	Hepático
LH	Hidroliza los triacilgliceroles y fosfolípidos de HDL, IDL y LDL. Es cofactor de SR-BI para una captación selectiva, así como la generación de apo A-I libre de lípidos.	Hepático
LPL	Hidroliza los triacilgliceroles de VLDL y Qm utilizando C-II como cofactor. Favorece la generación de precursores de HDL.	Tejido adiposo y muscular, Pared endotelial, Pulmón.
CETP	Intercambia ésteres de colesterol por triacilgliceroles entre las HDL ₂ y las lipoproteínas que contienen apo B	Tejido adiposo, Hepático, Intestino delgado
RECEPTORES Y PROTEÍNAS DE MEMBRANA		
SR-BI	Receptor para las HDL para intercambiar colesterol entre los hepatocitos y las células	Hepatocito, macrófagos
ABCA-1	Modulación del eflujo de colesterol y fosfolípidos. Favorece a la maduración de HDL.	Hígado, macrófagos e intestino
APO B/E-R	Receptor para lipoproteínas que contienen apo B y E. Incrementa el eflujo de colesterol vía los hepatocitos.	Hígado

LCAT: Lecitina colesterol aciltransferasa; LH: Lipasa hepática; LPL: Lipasa lipoprotéica; CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol. PLTP: Proteína de transferencia de fosfolípidos, SR-BI: Receptor scavenger BI, ABCA-1: Transportador de membrana dependiente de ATP, Qm: Quilomicrones, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia, VLDL: Lipoproteínas de baja densidad, HDL: Lipoproteínas de alta densidad.

Los principales lípidos que favorecen la remodelación de las lipoproteínas son el colesterol, triacilgliceroles y fosfolípidos. Existen al menos tres mecanismos por los que se modula el tráfico intracelular de estos lípidos: La vía exógena, a partir de los lípidos aportados por la dieta, en donde intervienen los quilomicrones. La vía endógena, a partir de la síntesis hepática de VLDL. El transporte reverso del colesterol, donde participan las HDL.

I.3.1 VÍA EXÓGENA.

La incorporación de los lípidos exógenos se efectúa en tres fases: digestión, absorción y transporte. Las grasas contenidas en los alimentos no pueden ser absorbidas por el intestino, por lo que al llegar al duodeno son catabolizadas. La vesícula biliar libera al intestino ácidos biliares conjugados, lecitina y colesterol formando así micelas más pequeñas. El páncreas produce tres enzimas hidrolíticas que son: la enzima colesterol esterasa, la lipasa pancreática y fosfolipasa A₂. La lipasa actúa sobre los triacilgliceroles para liberar ácidos grasos monoglicéridos, diglicéridos y glicerol. La colesterol esterasa rompe enlaces éster y genera ácidos grasos y colesterol libre; la fosfolipasa A₂ hidroliza los fosfolípidos exógenos. En la etapa de absorción el mecanismo de transporte de lípidos depende del tipo de molécula que se transporta. Por ejemplo, los ácidos grasos pasan a los enterocitos del intestino delgado donde son esterificados con glicerol formando triacilgliceroles, los cuales se ensamblan con pequeñas cantidades de colesterol junto con apolipoproteínas B-48, A-I, A-IV y fosfolípidos para formar los quilomicrones que son liberados a la linfa mesentérica y finalmente a la circulación. En el plasma, los quilomicrones intercambian componentes de superficie como fosfolípidos y apo A-I por apo C-II, apo A-IV, apo-E y ésteres de colesterol con las HDL. La lipoproteína-lipasa hidroliza los triacilgliceroles de los quilomicrones dando lugar a remanentes de éstos. Estas partículas, en las que la apo C ha sido reemplazada por la apo E, son rápidamente capturadas por el hígado a través del receptor apo-B/E. Los remanentes de quilomicrones son enriquecidos, por la acción de la CETP, con ésteres de colesterol que provienen de las HDL, éstos son captados por los receptores hepáticos y una fracción convertida dentro del hígado en ácidos biliares. ^{4,5} (Fig. 2)

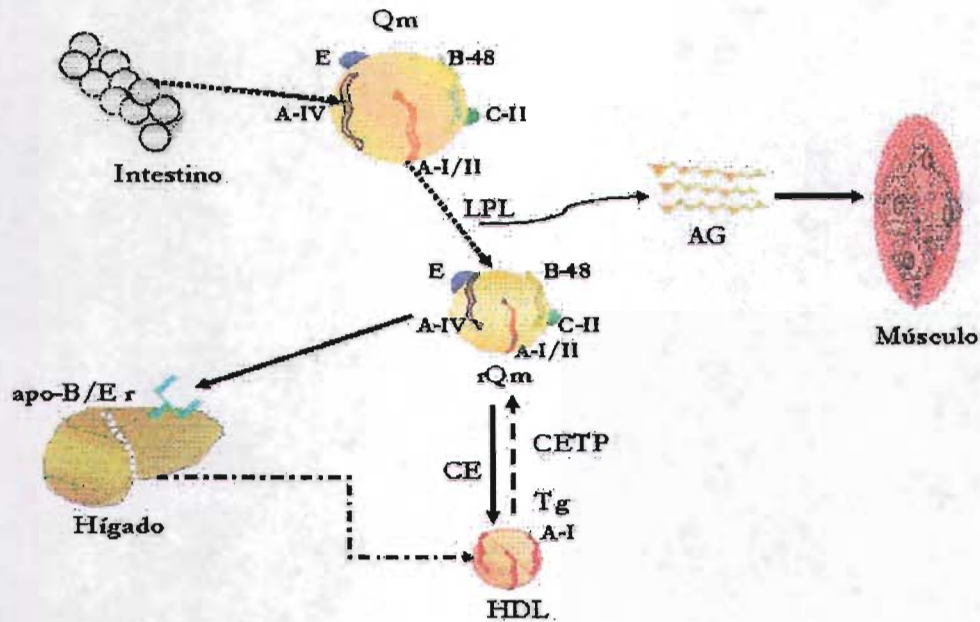


Fig. 2 Vía Exógena. Vía por la cual el colesterol de la dieta es llevado al hígado y tejidos periféricos. AG: ácidos grasos. CE: colesterol esterificado, Tg: Triacilgliceroles, LPL: Lipoproteína lipasa, Qm: quilomicrones, rQm: remanentes de quilomicrón. Lipoproteínas de alta densidad (HDL: High Density Lipoproteins). CETP: Proteína transportadora de ésteres de colesterol.

1.3.2. VIA ENDÓGENA.

Las VLDL son sintetizadas en el aparato de golgi de los hepatocitos a partir del ensamblaje de ácidos grasos, glicerol, y una baja cantidad de colesterol, proveniente de la lipólisis del tejido adiposo. Estas son liberadas hacia la circulación, donde maduran al captar ésteres de colesterol, apo B-100, C-II, C-III y E, cedidas estas últimas por las HDL. Las partículas VLDL posteriormente interactúan con la lipoproteína-lipasa del endotelio, que utiliza apo C-II como cofactor para hidrolizar esta lipoproteína, liberando así ácidos grasos a partir de triacilgliceroles y a su vez se transfiere apo C y apo E a las HDL, para transformarse en IDL. Estas pueden seguir tres caminos: a) pueden ser captadas por el hígado a través del receptor apo-B/E; b) pueden seguir disminuyendo su tamaño, ya que sufren hidrólisis de sus triacilgliceroles restantes hasta convertirse en LDL pequeñas y densas y c) pueden ser fagocitadas por macrófagos y monocitos.^{4,5} (Fig. 3)

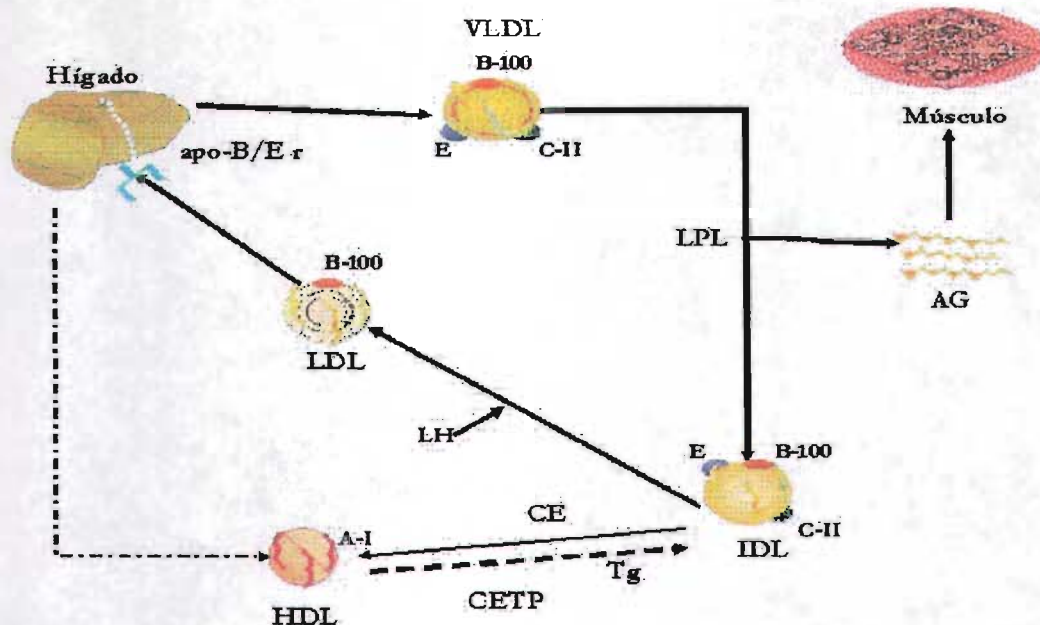


Fig. 3 Vía Endógena. Vía por la cual el colesterol es removido del hígado hacia los tejidos periféricos y regresar al mismo hígado. Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL: Very Low Density Lipoproteins), Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL: Intermedie Density Lipoproteins), Lipoproteínas de baja densidad (LDL: Low Density Lipoproteins), Lipoproteínas de alta densidad (HDL: High Density Lipoproteins). LPL: Lipoproteína lipasa, LH: Lipasa hepática, CE: Colesterol esterificado, CL: Colesterol libre, Tg: Triacilglicerol, CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol, AG. Ácidos grasos.

I.3.3. TRANSPORTE REVERSO DEL COLESTEROL (TRC): METABOLISMO DE LAS HDL

Las HDL han sido catalogadas como partículas antiaterogénicas, ya que evitan la formación de placa ateroma tosa, a través de varios mecanismos entre los que se encuentra el TRC, que se define como el regreso de colesterol proveniente de las células periféricas hacia el hígado para su excreción o reciclaje.⁶

La primera etapa del TRC es el eflujo de colesterol a través de diversos mecanismos de las células hacia las HDL pequeñas, tipo pre- β o HDL₃. Una vez en las HDL, el colesterol se esterifica por la enzima plasmática lecitina: colesterol O-aciltransferasa (LCAT), dando origen a HDL de mayor tamaño y menos densas, tipo HDL₂. A partir de ahí, este colesterol ya esterificado puede tomar dos caminos: 1) Puede ser eliminado directamente de la lipoproteína por un mecanismo en el cual

interviene el receptor hepático SR-B1, generando así partículas pequeñas, HDL₃, capaces de reiniciar el ciclo de captación de colesterol y 2) por medio de diversas reacciones de transferencia, en las que intervienen la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) el colesterol de las HDL₂ es intercambiado por los triacilgliceroles con lipoproteínas ricas en apo B como VLDL e IDL, por una parte y por la otra, la apo-C y E pasan a los quilomicrones y VLDL. La lipasa hepática (LH) hidroliza los triacilgliceroles de las HDL₂ y en asociación con la actividad de la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP) remodelan los remanentes de HDL en partículas pre-β y HDL₃, ambas con la capacidad de iniciar el ciclo. Es así como el colesterol de los tejidos periféricos llega al hígado para ser reciclado y excretado a través de las vías biliares.⁷ (Fig. 4)

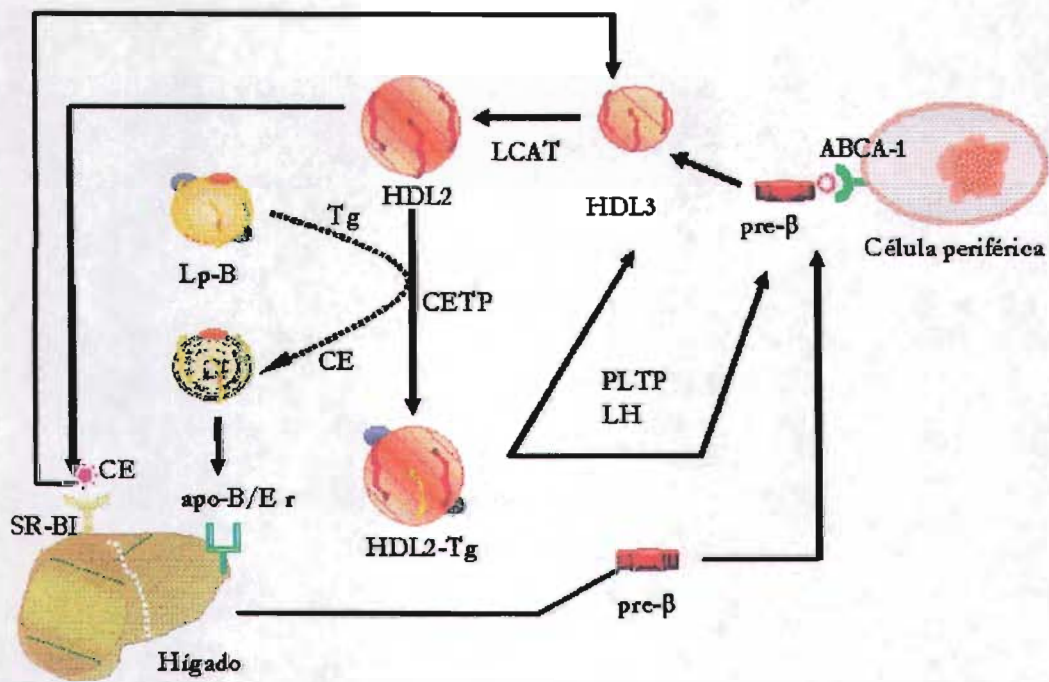


Fig. 4. Transporte Reverso del Colesterol. Mecanismo por el cual las lipoproteínas de alta densidad (HDL) transportan el colesterol excedente de las células periféricas al hígado. Lp- B: Lipoproteínas ricas en apo B (VLDL; lipoproteínas de muy baja densidad, LDL; lipoproteínas de baja densidad y Qm; Quilomicrones). LCAT: Lecitina colesterol aciltransferasa; LH: Lipasa hepática; CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol. PLTP: Proteína de transferencia de fosfolípidos, SR-B1: Receptor scavenger BI, ABCA-1: Transportador de membrana dependiente de ATP.

II. ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA Y HDL

La enfermedad arterial coronaria (EAC), es una enfermedad de la capa íntima de las arterias de mediano y gran calibre, caracterizada por proliferación de células de músculo liso vascular (CMLV) y depósito de lípidos que conforman la placa.⁸

La EAC puede iniciar con la infiltración de lipoproteínas de baja densidad (LDL) al espacio subendotelial en donde encuentran un ambiente de estrés oxidativo, dando lugar a la peroxidación de sus lípidos y modificaciones estructurales. Las LDL oxidadas (LDLox) son factores quimiotácticos para monocitos circulantes, que atraviesan el endotelio vascular y se transforman en macrófagos, capaces de fagocitar a las LDLox. La falta de maquinaria enzimática suficiente para degradar los lípidos y lipoperóxidos, tiene como consecuencia un cúmulo de éstos en el citoplasma del macrófago, al cual se le denomina célula espumosa. Antes de morir, las células espumosas liberan una gran cantidad de citocinas que estimulan al endotelio vascular para que sintetice más adhesinas, exacerbando así el proceso inflamatorio. Se ha observado que la evolución de las placas hacia procesos trombóticos depende más de la composición de la placa (tipo de placa) que del grado de estenosis (tamaño de la placa).⁹

Existen varios factores de riesgo asociados al desarrollo de EAC, entre los que encontramos edad, sexo, factores genéticos, hipertensión, obesidad, dislipidemias, resistencia a la insulina y diabetes¹⁰. Entre las dislipidemias que se asocian a esta enfermedad encontramos a la hipoalfalipoproteínemia (C-HDL < 40 mg/dL); de acuerdo con los estudios epidemiológicos existe una relación inversa entre los niveles plasmáticos de C-HDL y el riesgo de desarrollar EAC.^{11,12} Lo anterior se puede atribuir a que las HDL, y su apolipoproteína principal, la apo A-I, presentan características antiaterogénicas; son anti-inflamatorias, anti-oxidantes, anti-trombóticas, pro-fibrinolíticas, además de participar en el TRC.¹³ Sin embargo, modificaciones en las concentraciones de colesterol de HDL (C-HDL) no siempre se asocian a cambios inversos sobre el desarrollo de aterosclerosis. Una explicación para ello

es que las HDL sufren una remodelación por las diferentes enzimas y proteínas que participan en el TRC. Estos factores remodelan continuamente a las HDL generando una gran heterogeneidad de partículas que difieren en tamaño, densidad y composición y muy probablemente en funcionalidad. Como se mencionó, se conocen diversos métodos para subclasificar a la población de HDL, entre las que destacan inmunoafinidad, electroforesis bidimensional y la ultracentrifugación secuencial en combinación con electroforesis en gradiente de poliacrilamida (PAGE). A partir de la combinación de estos dos métodos las HDL₂ se dividen en dos subclases HDL_{2a}, HDL_{2b} y las HDL₃ en tres subclases; HDL_{3a}, HDL_{3c} y HDL_{3b}.^{1,14}

El papel cardioprotector de las subclases de HDL es controvertido. Lamarche *et. al.*¹⁵ sugieren que las HDL₂ tienen un efecto cardioprotector, ya que ellos demuestran que cuando las HDL_{2b} disminuyen con relación a las HDL_{3c} y HDL_{3b} se incrementa el riesgo de desarrollar EAC. Sin embargo, otros estudios cinético-metabólicos en sujetos con hipoalfalipoproteínemia, sugieren que cuando hay hipercatabolismo se generan partículas pequeñas, pero no se asocia a un aumento en el riesgo de desarrollar EAC.^{16,17}

III. TIAZOLIDINEDIONAS

Las Tiazolidinedionas (TZD), son antidiabéticos orales que actúan disminuyendo la resistencia a la insulina y baja los niveles de ácidos grasos por un incremento en la β -oxidación y un incremento en la captación en el hígado. En estudios epidemiológicos se ha reportado que las TZD inducen incrementos en los niveles plasmáticos de C-HDL, sugiriendo que estos fármacos afectan el metabolismo de las HDL.^{18,19}

Las más utilizadas en la clínica son pioglitazona y rosiglitazona.

III.1. MECANISMO DE ACCION DE LAS TIAZOLIDINEDIONAS

Las tiazolidinedionas son ligandos sintéticos de una subclase de receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs), los PPAR γ . Los PPAR son factores de transcripción dependientes de ligando. Se han determinado tres genes diferentes α , β/δ , γ . Las tiazolidinedionas actúan activando a la isoforma γ que además, tiene ligandos naturales como los ácidos grasos poliinsaturados y sus derivados, así como las prostaglandinas D2 y sus derivados (15-deoxi- Δ -^{12,14}-prostaglandinas J₂:15d-PGJ₂), 9 y 13(S)-ácido hidroxioctadecadinoico (9 y 13-HODE).^{20, 21}

Los PPAR γ se expresan principalmente en tejido adiposo, hepatocitos, células endoteliales, macrófagos y CMLV.

En el núcleo de la célula (Fig. 5), los PPARs activados por su ligando forman un heterodímero con el receptor del ácido retinóico (RXR). Una vez formado, el heterodímero (PPAR: RXR), se une a elementos de respuesta específicos (secuencias de DNA), llamados elementos de respuesta a la proliferación de peroxisomas (PPER). Los elementos de respuesta están constituidos por uno o dos nucleótidos que actúan como secuencias de regulación de la expresión de ciertos genes.²¹

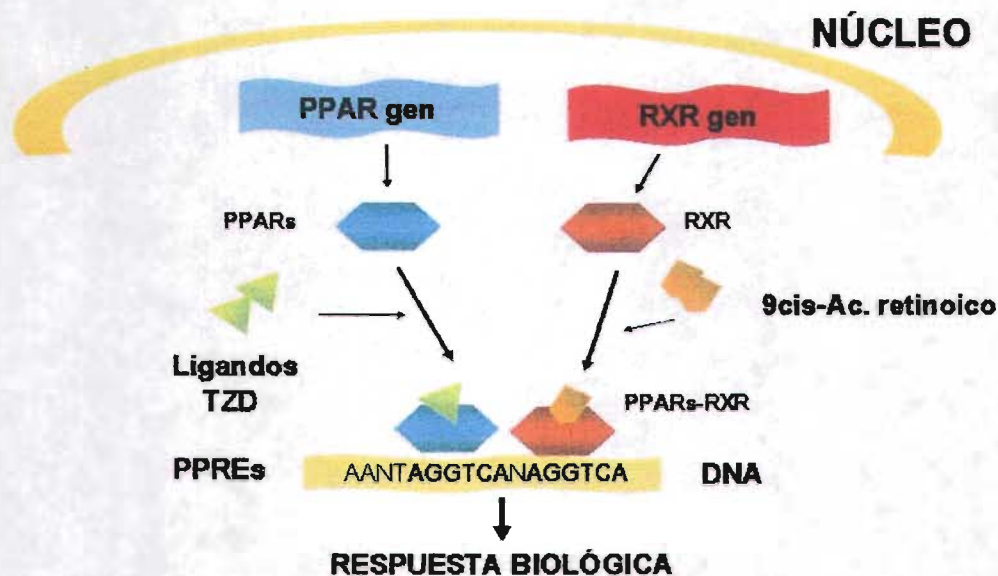


Fig.5. Mecanismo de acción de los PPARy. TZD: Tiazolidinedionas, PPAR: Receptor activado por proliferador de peroxisomas; RXR: Receptor del 9-cis ácido retinoico.

Entre los genes que regulan las tiazolidinedionas vía los PPARy, se encuentran los que controlan la homeostasis de la glucosa; en particular, incrementando la expresión del receptor GLUT-4.²²

Además, las TZD activan la expresión de genes relacionados con la inflamación vascular; incrementa la expresión del receptor CD36, receptor para las LDLox; atenúa la expresión del receptor CCR-2, receptor para la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1), además de regular la expresión de citocinas, tales como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y las interleucinas 1- β y 6; la expresión de la óxido nítrico sintetasa y las metaloproteínas de matriz-9 (MMP-9).^{23,24,25} Como consecuencia, las TZD regulan la expresión de moléculas de adhesión de células vasculares (VCAM-1, E-Selectina). También antagonizan la acción de otras clases de factores de transcripción, tales como el activador de proteína-1 y el factor nuclear NF- κ B.^{25,26}

Las TZD regulan la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos entre los que encontramos al de la lipoproteína lipasa (LPL), estimula la expresión del receptor SR-BI, incrementa

JUSTIFICACIÓN

Las tiazolidinedionas, son sensibilizadores de la insulina, han demostrado tener efectos antiaterosclerosos en modelos experimentales. La pioglitazona, a diferencia de la rosiglitazona, induce incrementos en las concentraciones plasmáticas de colesterol de HDL (C-HDL). Este efecto puede explicar en parte la capacidad antiaterogénica de este fármaco. Sin embargo, el mecanismo por el cual el C-HDL incrementa no se conoce con precisión.

La síntesis y el catabolismo de las partículas HDL son factores importantes que puede determinar las concentraciones plasmáticas del C-HDL, la capacidad antiaterogénica de estas partículas, y ser el resultado de modificaciones en el tamaño y composición. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio con ratas hipotiroideas demuestran que las partículas grandes de tipo HDL_{2b}, HDL_{2a} se catabolizan más lento que las partículas pequeñas de tipo HDL_{3c}. Además, los fibratos, fármacos que han probado su efecto antiateroscleroso y que incrementan el C-HDL, producen un aumento en el catabolismo de las HDL en asociación con un aumento en la proporción de partículas pequeñas, tipo HDL_{3c}.

Por lo anterior, establecer el mecanismo metabólico que da origen al incremento del C-HDL durante el tratamiento con pioglitazona, contribuirá a explicar la relación que existe entre el metabolismo, la composición y tamaño de las partículas HDL. Estas modificaciones en el metabolismo de las HDL se podrían volver un objetivo terapéutico para el desarrollo de nuevos tratamientos.

HIPÓTESIS

Considerando que la pioglitazona incrementa las concentraciones plasmáticas de C-HDL, tal incremento será el resultado de un aumento en la tasa de producción de estas lipoproteínas, disminución en su tasa de catabolismo o ambas situaciones simultáneamente. Si se verifica que el catabolismo disminuye entonces se generaran partículas HDL grandes.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar el mecanismo cinético-metabólico que da origen al aumento de C-HDL cuando se administra pioglitazona.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar el perfil de lípidos en los modelos animales con y sin tratamiento con pioglitazonas.
- Determinar el efecto de la pioglitazona sobre la cinética metabólica (síntesis y catabolismo) de la apo AI de las HDL, utilizando isótopos radiactivos como marcadores proteicos.
- Establecer las modificaciones en las enzimas y proteínas involucradas en el TRC al administrar pioglitazona.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron conejos macho, raza Nueva Zelanda de 3.5-4,0 Kg de peso. Se formaron 4 grupos de estudio, todos recibieron alimentación *ad libitum* diariamente (Lab rabbit diet, purina). El grupo control (n=8) recibió 1 mL de agua como vehículo del fármaco. Los 3 grupos bajo tratamiento (n=8, cada grupo) recibieron pioglitazona (Zactos, Eli Lilly de México) en suspensión acuosa, en dosis de 0.6, 1.75 y 2.6 mg/Kg. El tratamiento se administró vía oral, diariamente, durante 6 semanas.

Recolección de muestras

Las muestras sanguíneas se obtuvieron por punción de la vena marginal de las orejas, después de un ayuno de 12 h, en tubos con heparina (Sol. Inyectable, 1000 UI/mL, PISA, 10 µL/mL). El plasma se separó centrifugando a 2,500 rpm durante 15 min. Las muestras de plasma se almacenaron a -70°C hasta su análisis. Las HDL se separaron utilizando plasma fresco.

Análisis de laboratorio

La concentración de colesterol total, triacilgliceroles, fosfolípidos, colesterol libre, se determinó mediante métodos enzimáticos-colorimétricos (Boehringer-Mannheim, Germany). El colesterol HDL se determinó en el sobrenadante, después de precipitar las apo B con una solución de sulfato de dextrán/magnesio (Ciba-Corning Diagnostics, 100 µL/mL de plasma). La determinación de proteínas totales se realizó por el método de Lowry.²⁸ La concentración de ésteres de colesterol se calculó con la siguiente fórmula.²⁹

Colesterol esterificado (mg/dL) = (Colesterol total (mg/dL) - Colesterol libre (mg/dL)) x 1.68.

La cuantificación de la apo A-I se realizó por inmunonefelometría usando anticuerpos anti-apo A-I. Una mezcla de sueros de conejos sanos se usó como referencia. Las concentraciones de insulina en plasma fueron determinadas mediante radioinmunoanálisis (Coat-a-count; Diagnostic Products, los Ángeles, CA) ³⁰.

El análisis de estos parámetros se realizó antes y después del tratamiento con pioglitazona.

Determinación de las concentraciones plasmáticas de la pioglitazona

Las concentración de pioglitazona en plasma se determinó una hora después de administrar el fármaco vía oral a los grupos bajo tratamiento, en tres diferentes dosis (0.6, 1.75 y 2.6 mg/Kg), se tomó una muestra sanguínea de la vena marginal de la oreja. El plasma se separó centrifugando a 2,500 rpm durante 15 min. La pioglitazona se extrajo del plasma a través de columnas de fase sólida C-18 mediante el método descrito por Zhong y Williams.³¹ La rosiglitazona se utilizó como estándar interno a una concentración final de 0.8 µg/mL en plasma. La separación se realizó en una columna de fase reversa (Lichrosorb RP18, 5 µm, 250X4 mm, LKB, Bromma, Sweden) utilizando una fase móvil de acetonitrilo: agua (40:60, v/v) con 3 mL de ácido acético por litro ajustado a pH= 5.5 con hidróxido de amonio. Se eluyó a un flujo isocrático de 1.2 mL/min (Beckman modelo 110A) y la densidad óptica se registró continuamente con un detector ultravioleta (Wilson, 112 254 nm UV/VIS) a 254 nm. La concentración de pioglitazona se determinó a partir de una curva estándar de 0 a 3 µg/mL de plasma, el cual se extrajo de la misma manera que las muestras.

Aislamiento y marcaje de apo A-I de conejo.

Las HDL de conejos se aislaron por centrifugación secuencial, ajustando el plasma a una densidad= 1.21 g/mL con KBr sólido, posteriormente se dializaron con bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3 , 5 mM, 3 días). Las HDL aisladas se deslipidaron con una mezcla etanol-éter (2:1, v/v). Se extrajo la parte proteica y ésta se disolvió en una solución amortiguadora de Tris-HCl 30 mM y Urea 6 M a pH=8.0; esta mezcla se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico, usando una columna UNO™ Q1 (Bio-Rad) acoplada a un sistema de cromatografía Bio-Rad Duo Flow. La elusión de proteínas se realizó con un gradiente lineal de NaCl 0.1 M en la misma solución amortiguadora. Se colectaron fracciones de 250 μL y se seleccionaron solo aquellas que contenían apo A-I; posteriormente se dializaron con bicarbonato de amonio 5 mM. La presencia de apo A-I se verificó realizando una electroforesis en gradiente de poliacrilamida 4-21% con SDS 10% y tiñendo las bandas con azul de Coomassie. La pureza obtenida fue del 98%. La concentración de apo A-I fue estimada por espectrofotometría, usando un coeficiente de extinción molar de $1.13 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

El marcado de la apo A-I se llevó a cabo por el método de monocloruro de yodo modificado por Bilheimer *et. al.*³² que consistió en mezclar 1 mg de proteína con 1 mCi de Na^{125}I (Amersham Biosciences, IMS30: IMS300) e ICl. La proteína marcada fue separada del yodo libre pasando la mezcla a través de una columna de Sephadex G-25 1.0x10.0 cm (Pharmacia Fine Chemicals, 50-150 μ). La proteína marcada, ^{125}I -apo A-I, fue reincorporada a las HDL obtenidas de conejos normales, incubando esta mezcla 1 h a 37°C. Para separar la ^{125}I -apo A-I que no se incorporó a las HDL, se realizó una ultracentrifugación ajustando la mezcla con KBr sólido a una densidad=1.25 g/mL. Las ^{125}I -HDL, se dializaron con una solución de NaCl 0.15 M. La solución se esterilizó usando filtros de 0.22 μm (Millipore, Bedford, MA) y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Cinética metabólica de la apo A-I de las HDL

Los animales en estudio, tratados y no tratados, previo a la cinética se les mantuvo en ayuno de 12 h. El estudio cinético se llevó a cabo después de seis semanas de tratamiento. Este consistió en administrar en las venas marginales de la oreja, un bolo de ^{125}I -HDL, conteniendo 1.75 mg de proteína equivalente a 7×10^7 cpm de ^{125}I , en un volumen total de 500 μL . A continuación se obtuvieron muestras de sangre de 3 mL de la vena marginal opuesta, a diferentes tiempos: a los 10 min, y posteriormente a 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 h, después de la aplicación de las ^{125}I -HDL. De cada una de estas muestras se separó una alícuota de 500 μL de plasma y se analizaron en un contador de radiación gamma durante 1 min. Las cuentas (cpm) fueron corregidas por el decaimiento de radiactividad natural del yodo, basándose en la siguiente fórmula:

donde:

$$N = N_0 * e^{-\lambda t}$$

N_0 = actividad inicial, para $t=0$

N = actividad al tiempo t

λ = Constante de decaimiento (60 días)

Las curvas de decaimiento, ^{125}I , fueron construidas, considerando el 100% de radiactividad, a las cuentas obtenidas en la muestra tomada a los 10 min. Los porcentajes de la cinética de radiactividad fueron adaptados a una función biexponencial usando un programa de computadora SAAM II, de donde se obtuvo la tasa de catabolismo fraccional (FCR, h^{-1}).³³ Para calcular la tasa de producción (PR, mg/Kg/h) se utiliza la siguiente fórmula:³⁴

$$\text{PR} = \frac{\text{FCR} \times \text{Conc. Plasmática de apo A-I} \times \text{Vol. plasmático total}}{\text{Peso del animal}}$$

Aislamiento y análisis de subpoblaciones de HDL

Las HDL fueron separadas por ultracentrifugación secuencial (Beckman Optima TLX) en tubos de policarbonato. Se aislaron en primer lugar las lipoproteínas que contienen apo B a una densidad < 1.063 g/mL, ajustando con KBr sólido, a 110,000 rpm durante 2 h 16 min. posteriormente se aislaron las HDL, ajustando con KBr sólido, a una densidad = 1.25 g/mL, a 110,000 rpm durante 2 h 30 min, en estas condiciones del 80% a 85% de la apo A-I del total del plasma se recupera en las fracciones de las HDL. Estas HDL se dializaron en una solución amortiguadora de TBE (Tris-Borato-EDTA, pH=8.4)

Para determinar la estructura, homogeneidad y diámetro de las HDL, se realizó una electroforesis en condiciones nativas en gradiente de poliacrilamida 3-30%, utilizando como referencia marcadores de proteínas de alto peso molecular (tiroglobulina, 17 nm; ferritina, 12.2 nm; catalasa, 10.4 nm; lactato deshidrogenasa, 8.2 nm; y albúmina, 7.1 nm. Kit Pharmacia, Uppsala, Suecia).³⁴ Las bandas se tiñeron con azul de Coomassie y finalmente se analizaron por densitometría (Molecular Analyst Software Versión 1.1, 1994 Bio-Rad) para determinar los diámetros de las HDL (HDL_{2b} 10.58-12.36 nm, HDL_{2a} 9.94-10.58 nm, HDL_{3a} 6.98-9.94 nm, HDL_{3b} 8.45-8.98 nm, HDL_{3c} 7.90-8.45 nm).³⁵

Determinación de actividad de enzimas y proteínas

a) ACTIVIDAD LCAT

La actividad de LCAT se determinó de acuerdo al método descrito por Chen y Alberts³⁶ con modificaciones realizadas en nuestro laboratorio. Se formaron liposomas que contenían colesterol marcado con tritio (³H), fosfatidilcolina y apo A-I, que se incubaron con el plasma durante 1 hora a 37°C. La reacción se detiene y se extraen los lípidos mediante una mezcla de disolventes orgánicos (CHCl₃-MeOH; 2:1). El colesterol libre se separó del esterificado mediante cromatografía de capa

fin a y se midió la radiactividad de las diferentes fracciones en un contador de radiación beta. Los resultados se expresan como porcentaje de colesterol esterificado.

b) ACTIVIDAD CETP

La actividad de CETP se determinó de acuerdo a método descrito por Tollefson JH³⁷ con modificaciones realizadas en nuestro laboratorio. El colesterol esterificado, marcado con tritio (³H), se incorporó a partículas HDL. Las partículas HDL marcadas se mezclaron con LDL, esta mezcla se incubó con el plasma en estudio (que contienen a la CETP) durante 16 h a 37°C; posteriormente se separaron las HDL de las LDL por precipitación, en la fracción sobrenadante se midió la radiactividad en un contador de radiación beta. Los resultados se expresan en porcentaje de transferencia de colesterol esterificado.

c) ACTIVIDAD PLTP

La actividad de PLTP se determinó por el método descrito por Lagrost *et al.*³⁸ con modificaciones realizadas en nuestro laboratorio. Se utilizaron liposomas que contenían fosfatidilcolina marcados con tritio (³H), se incubaron con el plasma en estudio (PLTP), por precipitación se obtienen las HDL y se mide la cantidad de fosfatidilcolina marcada que se transfirió. Los resultados son expresados en porcentaje de fosfolípidos transferidos.

Análisis estadístico

Los datos están expresados como la media \pm DE. Las diferencias significativas entre las medias se evaluaron utilizando la prueba paramétrica t de Student no pareada. La comparación entre los grupos

con diferentes dosis se evaluó con una prueba de ANOVA y LDS. La asociación entre los diferentes parámetros se determinó por un análisis de correlación de Pearson. Cada uno de los parámetros que se estudiados fueron determinados antes y después del tratamiento con pioglitazona. Un valor de $p < 0.05$, se consideró significativo.

RESULTADOS

IV. Efecto de la pioglitazona sobre el perfil de lípidos y el control glucémico.

En el Cuadro 4 se presentan peso y concentraciones plasmáticas de C-Total, C-HDL y triacilgliceroles de los 4 grupos en estudio, antes y después de 6 semanas de tratamiento con pioglitazona. El tratamiento con pioglitazona en 1.75 y 2.6 mg/Kg, aumentó los niveles de C-HDL 71.8% y 45.3%, respectivamente ($p < 0.05$).

Cuadro 4. Peso y concentraciones plasmáticas de lípidos de los grupos en estudio.

	Control n = 23	Pioglitazona				
		0.6 mg/Kg		1.75 mg/Kg		2.6 mg/Kg
		antes n = 8	después	antes n = 8	después	después n = 8
Peso (g)	3834.6±340	3897±621	3833±714	3843±387	3919±476	4107±608
Colesterol-Total (mg/dL)	25.7±10.7	28.6±10.2	26.1±6.1	21.0±8.5	28.1±12.1	23.3±6.8
C-HDL (mg/dL)	11.7±4.8	12.4±4.2	14.0±5.6	12.5±6.8	20.1±5.5†	17.0±4.8*
Triacilgliceroles (mg/dL)	45.8±7.7	45.7±9.3	41.0±6.8	40.8±11.	40.8±12.6	50.1±9.7

ANOVA. Los valores están expresados como Media ±DE. *Sin análisis pre-tratamiento.

* $p < 0.05$, † $p < 0.001$ vs grupo control

Las modificaciones en el C-HDL sólo se presentaron cuando se administró pioglitazona a dosis de 1.75 y 2.6 mg/Kg, sin observar un efecto dependiente de la dosis, por lo que se determinaron las concentraciones plasmáticas de la pioglitazona. Los resultados muestran que no hay diferencias significativas entre las dosis de 1.75 y 2.6 mg/Kg. Sin embargo, existe una diferencia de 2.3 y 2.7 veces mayor con respecto a la dosis de 0.6 mg/Kg, respectivamente. Los resultados se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Concentraciones plasmáticas de insulina y pioglitazona de los grupos en estudio.

	Control	Pioglitazona		
	n = 23	0.6 mg/Kg n = 8	1.75 mg/Kg n = 8	2.6 mg/Kg n = 8
Glucosa (mg/dL)	120.4±11.0	115.1±15.4	114.0±11.7	116.8±6.9
Insulina (μU/mL)	10.7±6.3	9.0±5.8	9.5±3.6	10.9±6.0
Pioglitazona (μg/mL)	---	0.86±0.04	1.98±0.04‡	2.39±0.39‡

ANOVA. Los valores expresan Media ±DE.

‡ p<0.001 vs grupo de pioglitazona 0.6 mg/Kg

Las concentraciones de glucosa presentan un decremento del 10% en las tres dosis utilizadas, (NS) con respecto al grupo control. El tratamiento con pioglitazona no modifica las concentraciones plasmáticas de insulina (NS), pese a que las concentraciones plasmáticas de pioglitazona son significativamente mayores cuando se administra 1.75 y 2.6 mg/Kg del fármaco por vía oral.

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

El aumento de las HDL en el plasma puede ser el resultado de un aumento relativo en su síntesis o una disminución en su catabolismo. A través de estudios cinéticos, podemos evaluar parámetros como el catabolismo, FCR (fractional catabolic rate, h⁻¹), así como la tasa de producción absoluta, PR (production rate, mg*Kg⁻¹*h⁻¹), que refleja el metabolismo de las lipoproteínas. En la Fig.6 se presentan las gráficas de decaimiento radiactivo de la apo A-I de las HDL, el análisis matemático de esta curva permite calcular la FCR de la apo A-I.

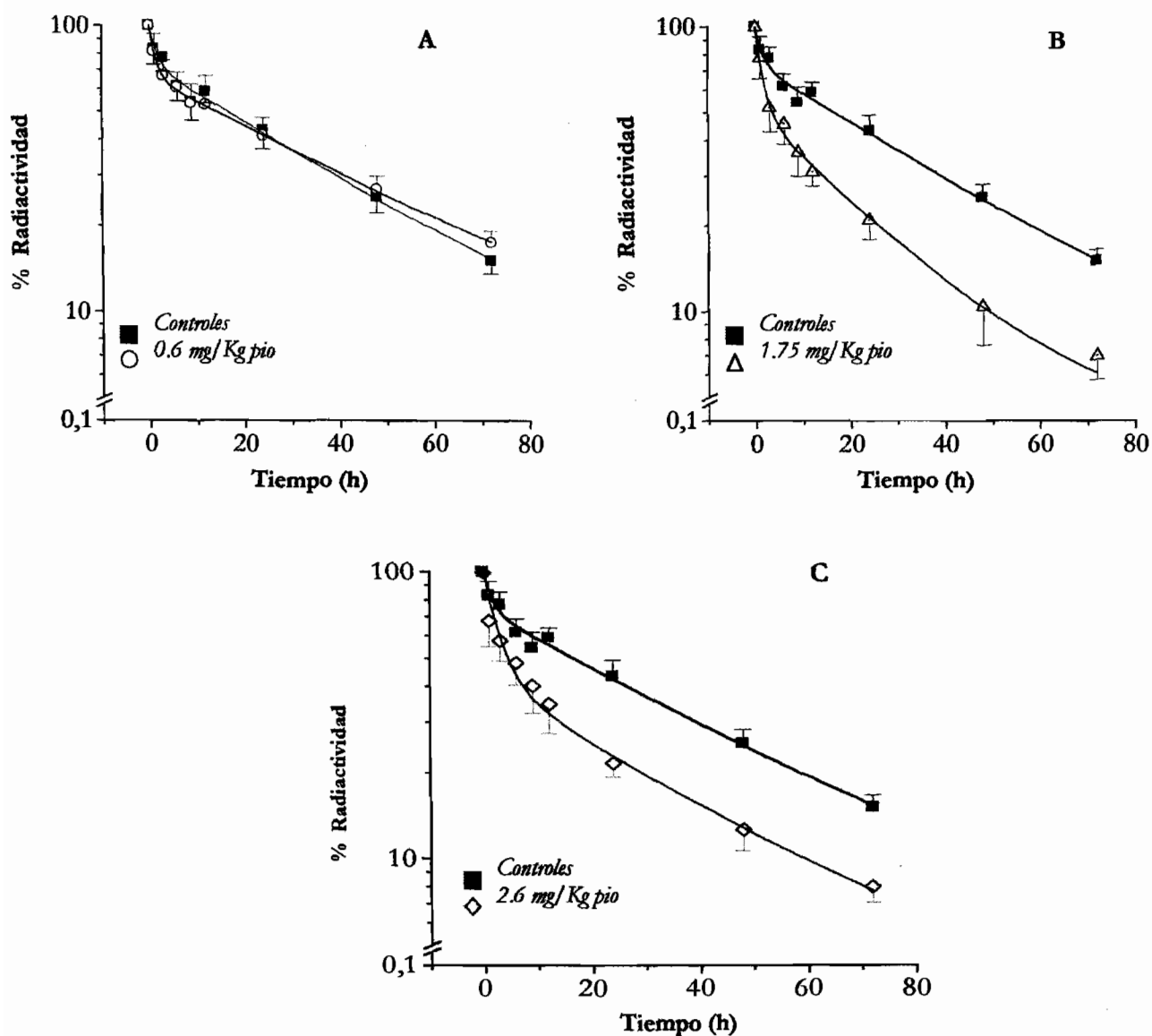


Fig. 6 Curva de % de radiactividad de la ^{125}I -apo A-I de las HDL. A. Grupo tratado con pioglitazona (0.6mg/Kg) vs el grupo control. (n=8, por grupo). B. Grupo tratado con pioglitazona (1.75 mg/Kg) vs el grupo control. (n=8, por grupo). C. Grupo tratado con pioglitazona (2.6 mg/Kg) vs el grupo control. (n=8, por grupo). Los datos se expresan como la media \pm DE. La radiactividad fue normalizada en funci3n del resultado al tiempo de 10 min.

En el Cuadro 6 se muestra que el tratamiento con pioglitazona a dosis de 1.75 y 2.6 mg/Kg incrementó 88% y 119% la tasa de catabolismo, respectivamente, comparado con el control. La tasa de producción también se incrementa 107% y 126%, respectivamente, al compararlo con el control.

Cuadro 6. FCR y PR de ¹²⁵I-apo A-I de las HDL de los grupos en estudio.

	Control	Pioglitazona		
	(n=12)	0.6 mg/kg (n=8)	1.75 mg/kg (n=8)	2.6 mg/kg (n=7)
FCR (h⁻¹)	0.025±0.005	0.024±0.007	0.057±0.014†	0.049±0.010†
PR (mg/kg/h)	0.53±0.17	0.47±0.08	1.24±0.62†	1.14±0.40*
apo A-I (mg/dL)	63.8±13.8	63.0±15.7	63.4±18.2	71.9±20.8

FCR = Tasa de catabolismo; PR= Tasa de producción.

ANOVA. Los valores están expresados como Media±DE.

*p<0.05, † p<0.001 *vs* grupo control.

VI. Efecto de la pioglitazona sobre las subclases de las HDL

Los cambios estructurales y de composición en las partículas HDL podrían explicar los cambios que se presentan en el catabolismo de estas partículas. Por lo tanto es importante determinar en este estudio los posibles cambios estructurales y de composición.

En el Cuadro 7 se muestra que el tratamiento con 1.76 y 2.6 mg/Kg de pioglitazona favorece la distribución hacia partículas pequeñas de tipo HDL_{3c} en un 171% y 162%, respectivamente y como consecuencia una disminución en la distribución de partículas grandes de tipo HDL_{2a}. Sin embargo, a dosis bajas el desplazamiento no es tan grande, pero se genera un aumento en la distribución de partículas de tamaño intermedio de tipo HDL_{3a}.

Cuadro 7. Distribución relativa de las subclases de HDL (% de proteína de HDL total) de los grupos en estudio.

	Control	Pioglitazona		
	(n=12)	0.6 mg/kg (n=8)	1.75 mg/kg (n=8)	2.6 mg/kg (n=7)
HDL2b	43.4±8.4	35.7±9.0*	35.0±3.1*	36.0±4.9*
HDL2a	22.4±6.7	13.2±4.2†	12.3±1.4†	17.5±3.7*
HDL3a	22.3±4.2	33.3±7.8†	27.7±3.4 *	23.4±3.3
HDL3b	6.8±3.7	9.3±2.8	12.9±2.4†	8.7±1.7
HDL3c	4.9±2.0	8.2±2.4*	12.0±1.9†	14.2±2.7†

ANOVA. Los valores están expresados como Media ±DE.

*p<0.05, † p<0.001 vs grupo control

En la Fig. 7 se muestran el análisis de densitometría de los geles nativos de las HDL. Las HDL del grupo control muestran una distribución de tipo Gaussiana, con un pico máximo a 9.81 ± 0.14 nm el cual se fue desplazando hacia 9.49 ± 0.12 , 9.26 ± 0.13 y 8.67 ± 0.22 nm cuando se administra la pioglitazona en dosis de 0.6, 1.75 y 2.6 mg/Kg respectivamente ($p < 0.05$ vs controles).

En la Fig. 8 se muestra la correlación positiva que existe entre los parámetros cinéticos (tasa de producción y catabolismo) y la presencia de partículas pequeñas tipo HDL_{3c}.

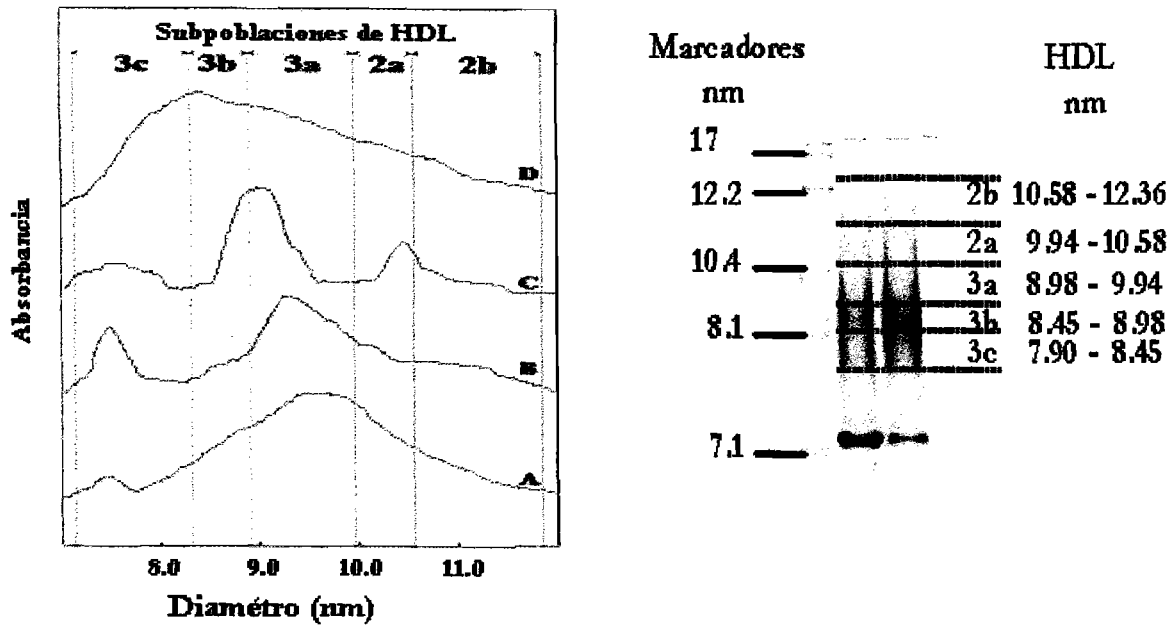


Fig. 7 Distribución de las subpoblaciones de HDL. Los resultados representan la distribución promedio de cada grupo conejos obtenida del densitograma. A. Controles. Los animales que recibieron pioglitazona a diferentes dosis B. 0.6 mg/Kg C. 1.75 mg/Kg y D. 2.6 mg/Kg.

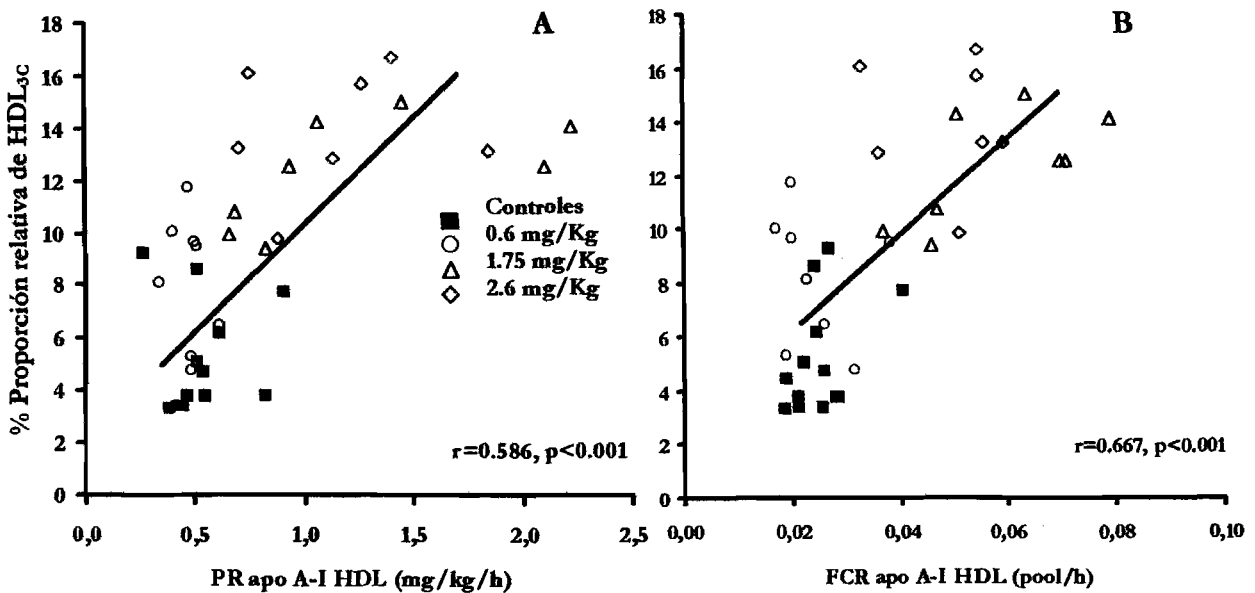


Fig. 8 Correlación de Pearson. A. Correlación entre la PR y el % de la proporción de las HDL_{3c} de los cuatro grupos en tratamiento. B. Correlación entre la FCR y el % de la proporción de las HDL_{3c} de los cuatro grupos en tratamiento.

La composición química de las HDL es un factor importante para su metabolismo y muy probablemente para su funcionalidad de estas partículas, por lo que se determinó la composición de lípidos y apolipoproteínas porcentual. Los resultados se presentan en el Cuadro 8. El tratamiento con pioglitazona enriquece de colesterol esterificado, así como disminuye el contenido de triacilgliceroles de las HDL. Con respecto a la composición de apolipoproteínas, encontramos que incrementa la proporción de apo E y apo AIV.

Cuadro 8. Composición porcentual en lípidos y apolipoproteínas del total de las partículas HDL de los grupos en estudio.

	Control	Pioglitazona		
	n=12	0.6 mg/kg n=8	1.75 mg/kg n=8	2.6 mg/kg n=7
Colesterol libre (%)	1.2±1.0	0.7±0.5	4.68±1.7†	0.5±0.3
Colesterol esterificado (%)	14.9±3.8	24.7±5.1*	22.5±4.9*	33.7±8.8†
Triacilgliceroles (%)	9.9±5.5	7.0±3.1	4.6±2.7*	6.6±3.4
Fosfolípidos (%)	17.3±3.7	13.6±5.4	17.9±4.7	17.4±5.9
Proteína (%)	58.1±7.1	53.7±7.2	50.1±5.6*	41.6±8.2†
A-IV (%)	12.5±6.5	15.2±5.9	18.7±3.2	22.9±7.9*
E (%)	13.9±7.1	16.1±4.2	20.3±3.8	26.7±11.0†
A-I/A-II (%)	63.4±12.9	57.7±11.9	53.4±4.9	41.5±13.8*
*C's (%)	10.5±7.4	12.2±2.8	7.6±2.1†	8.3±4.0†

ANOVA. Los valores están expresados como Media ±DE.

*p<0.05, † p<0.001 vs grupo control.

* Representa el % de la proteína total de las HDL.

VII. Efecto de la pioglitazona sobre las enzimas y proteínas que intervienen en el TRC.

La composición de las HDL se modifica continuamente, como resultado del intercambio dinámico y la transferencia de lípidos que existe entre ellas, este intercambio se lleva a cabo por enzimas, proteínas involucradas en el TRC, por lo que fue importante su determinación. En el cuadro 9 se muestran algunas de las enzimas y proteínas involucradas en el metabolismo intravascular de las HDL.

Cuadro 9. Enzimas y proteínas involucradas en la remodelación de las HDL de los grupos en estudio.

	Control	Pioglitazona		
	n=12	0.6 mg/kg n=8	1.75 mg/kg n=8	2.6 mg/kg n=7
LCAT (%)	4.8±1.4	5.8±1.5	4.6±2.1	3.3±1.5*
CETP (%)	20.0±4.7	23.3±6.8*	24.9±4.6*	24.0±1.6*
PLTP (%)	2.8±1.4	2.7±1.6	3.3±1.3*	4.1±1.9*

LCAT= Lecitina colesterol acilo transferasa; CETP= Proteína de transferencia de ésteres de colesterol; PLTP= Proteína de transferencia de fosfolípidos.

ANOVA. Los valores están expresados como Media ±DE.

*p<0.05, † p<0.001 vs grupo control.

El tratamiento de pioglitazona modificó las actividades de la enzima LCAT, la proteína CETP y PLTP. La actividad LCAT disminuyó en un 31% con la dosis 2.6 mg/Kg, (p<0.05). La actividad de CETP se incrementó con el tratamiento en un 16.5%, 24.5% y 20.0% con 0.6 mg/Kg, 1.75 mg/Kg y 2.6 mg/Kg, respectivamente (p<0.05). La actividad PLTP también se incrementó un 17% y 46% con 1.75 mg/Kg y 2.6 mg/Kg, respectivamente (p<0.05).

DISCUSIÓN

Existe controversia en los efectos que tienen las tiazolidinedionas sobre los efectos en las concentraciones plasmáticas de lípidos^{39, 40}, pero se ha puesto de manifiesto que la pioglitazona produce incrementos del C-HDL.^{18, 22,41} Los resultados del presente trabajo de investigación contribuyen a comprender en parte los efectos de la pioglitazona sobre el metabolismo y estructura de las HDL. Demostramos que la pioglitazona a dosis de 2.6 mg/Kg y de 1.75 mg/Kg incrementa las concentraciones plasmáticas del C-HDL, produce un aumento en la tasa de catabolismo fraccional (FCR) y en la tasa de producción (PR) de la apo A-I de las HDL, en un modelo animal. Estas modificaciones se observaron con dosis de pioglitazona equivalentes a 4 y 6 veces la posología habitual en el humano. Con las tres dosis utilizadas, la pioglitazona también provocó incremento en la proporción de partículas pequeñas de tipo HDL_{3C}, generó partículas ricas en colesterol esterificado y con un menor contenido de triacilgliceroles, modificó las actividades de LCAT, CETP y PLTP. Todos estos efectos en los parámetros cinéticos, no tienen una respuesta dependiente de la dosis. Esto se podría explicar por las concentraciones plasmáticas alcanzadas de pioglitazona; con la dosis oral de 2.6 mg/Kg tan solo es del 20% más que con la dosis de 1.75 mg/Kg y no del 50%, como se esperaba.

La pioglitazona, vía la activación de los PPAR γ , regula la expresión de genes que controlan la homeostasis de la glucosa, aumentando la sensibilidad celular a la insulina.¹⁸ Por lo tanto, los efectos de la pioglitazona sobre el perfil de lípidos pueden ser secundarios a las variaciones de concentración plasmática de insulina. Sin embargo, las dosis utilizadas en este estudio, 0.6, 1.75 y 2.6 mg/Kg, no modificaron las concentraciones plasmáticas de insulina. Esto sugiere que todos los efectos observados por el tratamiento con pioglitazona se deben sólo al efecto del fármaco sobre el

metabolismo de las HDL y no a modificaciones en el metabolismo de las lipoproteínas por un aumento de la sensibilidad a la insulina.

Las modificaciones en las concentraciones plasmáticas de C-HDL, en el metabolismo y estructura de las HDL debidas al tratamiento con pioglitazona a dosis de 1.75 y 2.6 mg/Kg podría tener su origen en un aumento del número de partículas HDL, en un incremento del contenido de colesterol por partícula HDL o en ambas. Las tiazolidinedionas regulan la expresión de genes que están involucrados en el metabolismo y estructura de las HDL, como la proteína de membrana ABCA-1 (ATP binding cassette type 1).²⁷ Por lo anterior, el incremento del C-HDL, podría explicarse, por un aumento en la expresión del ABCA-1; esta proteína de membrana lleva a cabo el eflujo de colesterol de las células hacia las HDL, utilizando ATP para bombear colesterol y fosfolípidos de manera activa hacia el exterior de la célula. Las mutaciones en el gen de esta proteína de membrana son causa de hipoalfalipoproteinemia, conocida como enfermedad de Tángier.^{42,43} Los sujetos heterocigotos para la mutación del ABCA-1 presentan en promedio concentraciones de C-HDL y de apo A-I alrededor de 29 y de 92 mg/dL respectivamente, lo que equivale a un 60% de los niveles observados en familiares no afectados por la mutación. Por lo tanto, si en nuestro estudio la pioglitazona indujo un incremento de la expresión del gen ABCA-1, el flujo de colesterol hacia las HDL incrementaría y, daría como resultado un aumento en la cantidad de colesterol contenida en las HDL. Nuestros resultados demuestran que la proporción relativa de colesterol en las HDL aumenta significativamente con la pioglitazona. Por lo anterior, el efecto de la pioglitazona sobre el C-HDL plasmático, puede explicarse por un enriquecimiento de las partículas HDL con colesterol, resultado de una mayor expresión del gen ABCA-1. Esta explicación debe demostrarse por medio de la determinación de la masa de ABCA-1 expresada en las células de este modelo animal.

Con respecto a la expresión del gen de la apo A-I, éste es regulado por los PPAR α , pero la pioglitazona también lo puede estimular por una reacción cruzada de baja afinidad con los PPAR α .⁴⁴

Esto explicaría porque sólo se incrementa la tasa de producción de la apo A-I en las HDL en las dosis de 1.75 y 2.6 mg/Kg y no en la de 0.6 mg/Kg. A pesar de la posible estimulación del promotor del gen apo A-I por la pioglitazona, el aumento de la tasa de síntesis de la apo AI no explica el aumento de C-HDL, porque la tasa de catabolismo aumenta en una proporción similar. Esto demuestra un equilibrio entre ambos parámetros cinéticos que dan como resultado que las concentraciones plasmáticas de apo A-I se mantengan similares a los valores basales, sugiriendo que el número de partículas HDL circulantes se mantiene constante después del tratamiento con pioglitazona.

Además del aumento del C-HDL, el incremento en la tasa de catabolismo de la apo A-I de las HDL inducido por la pioglitazona puede también estar relacionado con las propiedades antiaterogénicas del fármaco; algunos pacientes con niveles de C-HDL por debajo de 10 mg/dL y que no tienen historia familiar ni personal de EAC, se caracterizan por catabolizar rápidamente la apo AI de las HDL.^{17, 45} Así mismo, los fibratos, fármacos agonistas de los PPAR α cuyas propiedades antiaterogénicas han sido demostradas^{46,47}, inducen un aumento del catabolismo de la apo AI de las HDL.⁴⁸ La pioglitazona, como lo demuestran nuestros resultados, tiene este mismo efecto.

El fundamento metabólico del por qué el hipercatabolismo de las HDL es potencialmente cardioprotector, no ha sido bien elucidado pero puede estar relacionado con el tamaño de la partícula; los análisis de correlación muestran que el FCR de la apo A-I de las HDL se asocia directamente con la proporción relativa de partículas pequeñas, HDL_{3C}. Por otra parte, estudios previos realizados en nuestro laboratorio con ratas hipotiroideas demuestran que las partículas grandes de tipo HDL_{2b}, HDL_{2a} se catabolizan mas lento, que las partículas pequeñas de tipo HDL_{3C}.¹⁶ Con base en estas observaciones, postulamos que el hipercatabolismo de la apo A-I de las HDL es el resultado de una reducción del tamaño de estas lipoproteínas. Nuestro postulado se basa en que el sitio catabólico para las HDL/apo A-I se ubica en las células epiteliales del tubo proximal de los

riñones.⁴⁹ Así, las partículas HDL pequeñas, con tamaño <8 nm son más fácilmente filtrables en el glomérulo y alcanzan en consecuencia con mayor facilidad sus sitios catabólicos.

A su vez, las partículas HDL pequeñas pueden tener su origen en el aumento de la síntesis de la apo A-I; la tasa de producción de la apo A-I de las HDL correlacionó con el incremento en la proporción de partículas pequeñas (HDL_{3C}). Las HDL se sintetizan como partículas pequeñas de forma discoidal, pobres en lípidos que son capaces de llevar a cabo el eflujo de colesterol.⁷ Esto es consistente con los análisis de correlación entre la PR de la apo A-I de las HDL y la proporción relativa de las HDL_{3C}.

Otra explicación al aumento de la proporción relativa de HDL_{3C} podría darse por el SR-BI, que es otro factor que está regulado por las tiazolidinedionas e interviene en el metabolismo de las HDL. Estudios realizados en ratones transgénicos para SR-BI, han demostrado que la estimulación de este receptor se asocia a la producción de partículas pequeñas y densas, mientras que el tamaño de partícula incrementa cuando disminuye la expresión del SR-BI.⁵⁰ El colesterol contenido en la partícula HDL después de ser esterificado por la acción de la LCAT puede ser removido selectivamente por el receptor SR-BI localizado en el hígado, lo que resulta en la formación de partículas pequeñas.⁵¹ En nuestro estudio la pioglitazona incrementó la proporción de partículas pequeñas HDL_{3C} probablemente a través de la sobreexpresión del SR-BI y del aumento de la PR de la apo A-I. En consecuencia, estas partículas podrían ser filtradas más fácil y alcanzar así más rápidamente su sitio catabólico, dando como resultado un incrementando en el FCR.

Autores como Ovalle F *et al.*⁵² y Freed MI *et al.*⁵³ han reportado el incremento del colesterol en la fracción HDL₃ con troglitazona mientras que la rosiglitazona incrementa tanto la concentración plasmática de las HDL₂ como de las HDL₃ en sujetos diabéticos. A diferencia de estos estudios, en nuestro modelo animal, el aumento de la proporción de partículas HDL_{3C} es independiente del nivel de sensibilidad a la insulina. Además, nuestro método para estimar la proporción de las subclases HDL consiste en determinar la proporción de proteína-HDL relativa a la proteína-HDL total,

mientras que el método VAP-II⁵² determina la concentración absoluta en plasma del colesterol en las subfracciones HDL₂ y HDL₃. En este sentido, cuando se calcula la proporción relativa de colesterol en las diferentes subclases, respecto al C-HDL en el estudio de Ovalle, prácticamente no hay cambios por efecto de las TZD utilizadas (77.7% *vs* 79.3% HDL₃; rosiglitazona *vs* control). Por último, los efectos de las TZD (rosiglitazona, troglitazona y pioglitazona) sobre el perfil de lípidos no son iguales entre sí⁵⁴ a pesar de que éstas moléculas pertenecen a la misma familia de fármacos. Por lo tanto, el efecto que tiene la rosiglitazona sobre el tamaño de las HDL no se puede extrapolar a los efectos de la pioglitazona y ser comparados con los reportados en estudios previos.

No podemos descartar a otros factores como LCAT, CETP y PLTP que participan en el metabolismo de las HDL, como el origen de las modificaciones estructurales y de los parámetros cinéticos. Estas proteínas plasmáticas también pueden modificar el tamaño y composición de las HDL sintetizadas por el hígado. La LCAT es una enzima que esterifica el colesterol libre derivado de la superficie de las células, de donde es captado por las HDL. Esta enzima contribuye de una manera importante a determinar la estructura y composición de las HDL y se ha considerado como la etapa importante en el TRC.³⁵ Estudios previos reportan que la deficiencia de LCAT resulta en una disminución en las concentraciones plasmáticas de C-HDL, pero sin incrementar el riesgo de EAC.⁵⁵ En sujetos deficientes de esta enzima, las HDL se mantienen de forma discoidal, lo que sugiere, que la LCAT es indispensable en la remodelación de estas partículas. Con base en la disminución o el aumento de la LCAT producido por la pioglitazona, es posible que estos cambios contribuyan a la generación de partículas HDL pequeñas.

El colesterol después de ser esterificado por la LCAT puede ser removido por acción de la proteína de transporte de ésteres de colesterol (CETP), que promueve la transferencia de lípidos del centro entre HDL y lipoproteínas ricas en triacilgliceroles (Quilomicrones y VLDL), reduciendo los ésteres de colesterol de las HDL y enriqueciéndolas con triacilgliceroles.⁵⁶ Sin embargo, la pioglitazona

estimula la expresión de la LPL¹⁸ y en consecuencia, las VLDL en el plasma son transformadas más rápidamente a las lipoproteínas de densidad intermedia, IDL (remanentes de VLDL), que pueden ser captadas por el hígado para ser degradadas, o seguir siendo hidrolizadas por la lipasa hepática para dar como resultado lipoproteínas de baja densidad (LDL). Al incrementar la expresión de la LPL, aumenta el catabolismo de las VLDL, por lo que la disponibilidad de intercambiar triacilgliceroles por colesterol esterificado con las HDL vía la CETP disminuye.^{57, 58} Lo anterior podría contribuir a explicar en parte el efecto observado en el C-HDL asociado a un aumento en el contenido de colesterol esterificado de las partículas HDL.

Por otra parte, nuestros resultados demuestran un incremento de la actividad CETP después del tratamiento. El aumento en la actividad CETP, favorece una mayor proporción de partículas grandes de tipo HDL₂.³⁵ No obstante, nuestros resultados muestran que el incremento en la actividad CETP se asocia a la presencia de partículas pequeñas. No debemos descartar que el tratamiento con pioglitazona estimule la expresión de otros receptores como se mencionó anteriormente el ABCA-1 y el SR-BI, que también contribuyen a la remodelación de las HDL, generando partículas pequeñas que son catabolizadas más rápidamente. Esto sugiere que podría existir un equilibrio entre los factores intravasculares que participan en el TRC y las proteínas de membrana, para remodelar a las partículas HDL. Por lo tanto, el aumento de la actividad CETP por efecto de la pioglitazona no es incompatible con la presencia de partículas HDL pequeñas.

Las partículas HDL después de ser enriquecidas en triacilgliceroles por acción de la CETP, son remodeladas por la acción de la PLTP. Las evidencias *in vitro* sugieren que la PLTP facilita la transferencia de fosfolípidos entre las HDL y lipoproteínas que contienen apo B. La conversión de las HDL mediada por la PLTP *in vitro* da lugar a la formación de partículas pequeñas pobres en lípidos y un alto contenido en apo A-I, sugiriendo que la PLTP tiene un papel antiaterogénico.⁵⁹ Sin embargo, otros estudios reportan que la deficiencia de la PLTP reduce el riesgo de desarrollar

enfermedad arterial coronaria.⁶⁰ En nuestro estudio, la pioglitazona indujo un incremento en la actividad PLTP y esto puede contribuir a explicar la presencia de una mayor proporción de HDL_{3C} y en incremento del FCR de la apo A-I. Sin embargo, estos resultados no aportan argumentos que apoyen el papel pro- o anti-aterogénico de la PLTP. Se requieren estudios específicos que permitan confirmar el papel de la PLTP en la cinética metabólica de las HDL y en la génesis del ateroma.

El tamaño de la partícula HDL no es el único factor a tener en cuenta para explicar el aumento del catabolismo de la apo A-I. El contenido de lípidos y lipoproteínas, composición química, de las HDL es otro factor que puede ser importante para modificar los parámetros cinéticos de estas lipoproteínas; como mencionamos anteriormente, partículas pequeñas, pobres en triacilglicerol se catabolizan más rápido que las partículas de mayor tamaño.⁶¹ En nuestro estudio, las HDL fueron enriquecidas con ésteres de colesterol, apo E y su contenido en triacilglicerol es menor después del tratamiento con pioglitazona, teniendo una relación directa con la tasa de catabolismo de la HDL. Lo anterior puede explicarse ya que la vía del receptor apoB/E se ve favorecida. Es decir, las partículas HDL por esta vía son depletadas de colesterol, modifican su estructura y generan partículas de menor tamaño que pueden ser capaces de captar el colesterol excedente de las células o bien ser catabolizadas más rápidamente.

En resumen, el tratamiento con pioglitazona da origen a un hipercatabolismo de la apo A-I de las HDL, asociado a una mayor proporción de HDL pequeñas, enriquecidas en ésteres de colesterol y pobres en triacilglicerol. La trascendencia de estos hallazgos se ubica en la capacidad antiaterogénica de las HDL generadas durante el tratamiento con pioglitazona; se ha sugerido que el potencial antiaterogénico de las HDL no está relacionado con los niveles plasmáticos de C-HDL, sino con la cantidad y capacidad de ciertas subclases de HDL presentes en plasma. Argmann *et al.*⁶² propone que las partículas pequeñas como las HDL_{3C}, son partículas que pueden funcionar como buenos aceptores del colesterol excedente de las células y transportarlo hacia el hígado donde va a ser

excretado o reciclado, optimizan el TRC.⁶³ Además, estudios recientes han demostrado que las HDL pequeñas poseen un potencial antioxidante superior al resto de las subclases de HDL, y esto se asocia a una disminución en la oxidación de las LDL.⁶⁴ Estudios en nuestro laboratorio (datos no publicados) demuestran que la subclases de de HDL_{3c} posee un mayor potencial antioxidante, que se puede explicar en parte porque estas partículas son aceptores primarios de paroxonasa (PON1). Esta selectividad se basa en el hecho de que la PON1 se sintetiza en el hígado y permanece anclada en la membrana del hepatocito, que para ser liberada de ella, se necesita una partícula con alta tensión superficial (HDL_{3c}) que favorezca las interacciones con la membrana citoplasmática y con la región hidrofóbica de la enzima.⁶⁵

Sin pretender extrapolar estos resultados al humano, nuestro modelo experimental nos permitió explicar y determinar las acciones de pioglitazona sobre el metabolismo de las HDL. Estos efectos se lograron con dosis relativamente bajas (0.6, 1.75, 2.6 mg/Kg) que equivalen a 1, 2.6 y 4 veces la dosis de 30 mg/Kg en humanos, respectivamente. Estos resultados sugieren que con dosis terapéuticas *in vivo* podríamos tener resultados importantes en este sentido.

CONCLUSIONES

El tratamiento con pioglitazona modifica el metabolismo, tamaño y composición de las HDL. Estas modificaciones demuestran que existe una relación entre el metabolismo y tamaño de las partículas HDL. Es decir, las partículas de pequeñas, tipo HDL_{3c}, se asocian a un catabolismo rápido

Este estudio fortalece la idea de que la síntesis y el catabolismo de estas partículas son factores importantes que determinan las concentraciones plasmáticas del C-HDL. Además este estudio nos permite postular que las propiedades antiaterogénicas de las HDL no sólo dependen de las concentraciones plasmáticas del C-HDL si no de las diferentes subclases de HDL. El posible incremento en el potencial antiaterogénico de las HDL generadas durante el tratamiento con pioglitazona, deberá ser analizado en estudios posteriores.

PERSPECTIVAS

Los resultados de este trabajo han dado lugar a nuevas preguntas de investigación, entre las que destacan:

- ◆ ¿Las HDL pequeñas generadas por el tratamiento, como las HDL_{3c} tienen mejores propiedades antiaterogénicas que el resto de las subclases de HDL?
- ◆ ¿La composición de lípidos y lipoproteínas de las HDL será otro factor importante para determinar la función antiaterosclerosa de estas partículas?
- ◆ ¿El equilibrio entre factores intravasculares, receptores y proteínas de membrana determinan son determinantes para la estructura y funcionalidad de las HDL?

BIBLIOGRAFIA

1. Von Eckardstein A, Huang Y, Assmann G. Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol*. 1994; 5; 404-416.
2. Aguilar-Salinas C, Gómez-Pérez F. Lipoproteínas y aterogénesis. 1. Metabolismo normal de las lipoproteínas. *Revista del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán*. 1989; 2: 22-28.
3. Von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. HDL and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21: 13-27.
4. Hernández-Mijares A, Morillas-Ariño C, Martínez-Triguero ML. Metabolismo de las lipoproteínas. *Endocrinol Nutr*. 2003; 50: 16-23.
5. Ochoa-Sosa CA. Metabolismo de las lipoproteínas. En Posadas-Romero C. *Dislipidemias y Aterosclerosis*. 1era. Ed. Interamericana – McGraw-Hill. México. 1995; 43-54.
6. Von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21:13-27.
7. Sviridov D, Nestel P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2002; 161: 245-254.
8. Aldons JL. Atherosclerosis. *Nature*. 2000; 407:233-241.
9. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; 420: 868-874.

10. Aguilar-Salinas CA, Vázquez-Chávez C, Gamboa-Marrufo R, García-Soto N, de Jesús Ríos-González J, Holguín R, Vela S, Ruiz-Álvarez F, Mayagoitia S. Obesity, diabetes, hypertension, and tobacco consumption in an urban adult Mexican population. *Arch Med Res.* 2001; 32: 446-53.
11. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, and Huang Y. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk: the PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis.* 1996; 124: S11-S20.
12. Prediman KS, Sanjay K, Jan N, and Bojan C. Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins an idea whose time for testing is coming, part I. *Circulation.* 2001; 104: 2376-2386.
13. Nofer JR, Beat K, Manfred F, Bodo L, Assmann G, Von Eckardstein A. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis.* 2002; 161: 1-16.
14. Skinner ER. High-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol.* 1994; 5: 241-247.
15. Lamarche B, Uffelman KD, Steiner G, Barrett PH, Lewis GF. Analysis of particle size and lipid composition as determinants of the metabolic clearance of human high density lipoproteins in a rabbit model. *J Lipid Res.* 1998; 39: 1162-1172.
16. Huesca-Gómez C, Franco M, Luc G, Montañó L, Massó F, Posadas-Romero C, Pérez-Méndez O. Chronic hypothyroidism induces abnormal structure of high-density lipoproteins and impaired kinetics of apolipoprotein A-I in the rat. *Metabolism.* 2002; 51: 443-450.
17. Pérez-Méndez O, Castro G, Fruchart JC, Luc G. Kinetic and metabolic studies of apo A-I and Apo-II in an hypoalphalipoproteinemic patient. *Eur J Neurology.* 1995; 2: 77.

18. Barbier O, Torra IP, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart JC, Glineur C, Staels B. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 717-726.
19. Reginato MJ, Lazar MA. Mechanisms by which thiazolidinediones enhance insulin action. *Trends Endocrinol Metab.* 1999; 10: 9-13.
20. Vosper H, Guennadi AK, Tracey L, Graham, Colin NA. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists, hyperlipidemia, and atherosclerosis. *Pharma and Therap.* 2002; 95: 47-62.
21. Marx N, Duez H, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. *Circ Res.* 2004; 94: 1168-1178.
22. Gegick CG, Altheimer MD. Thiazolidinediones: comparison of long-term effects on glycemic control and cardiovascular risk factors. *Curr Med Res Opin.* 2002; 18: 363-370.
23. Klappacher WG, Glass C. Roles of peroxisome proliferators-activated receptor γ in lipid homeostasis and inflammatory responses of macrophages. *Curr Opin Lipidol.* 2002; 13: 305-312.
24. Minako I, Kensuke E, Ken-ichi H, Shujiro I, Weihua N, Qingwei Z, Makoto U, Shiro T, Toshihiro I, Akira T. Antiinflammatory and antiarteriosclerosis effects of pioglitazone. *Hypertension* 2002; 40: 287-293.
25. Jawahar LM, Bo H, Jiawei C, Dayuan L. Pioglitazone inhibits LOX-1 expression in human coronary artery endothelial cells by reducing intracellular superoxide radical generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 2203-2208.

26. Marx N, Schonbeck U, Lazar MA, Libby P, Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Cir Resech.* 1998; 83: 1097-1103.
27. Akiyama TE, Sakai S, Lambert G, Nicol ChJ, Matsususe K, Pimprale S, Lee YH, Ricote M, Glass ChK. et al. Conditional distribution of the peroxisomes proliferator-activated receptor g gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apo E in macrophages and reduced cholesterol efflux. *Mol Cel Biol.* 2002; 22: 2607-2619.
28. Lowry OH, Rosebrough HJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-275.
29. Tailleux A, Torpier G, Caron B. Immunological properties of apo B-containing lipoprotein particles in human atherosclerotic arteries. *J Lipid Res.* 1993; 34: 719-728.
30. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and B-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985; 28: 412-419.
31. Zhong WZ, Williams MG. Simultaneous quantitation of pioglitazone and its metabolites in human serum by liquid chromatography and solid phase extraction. *J Pharm Biomed Anal.* 1996; 14: 465-473.
32. Bilheimer DW, Eisenberg D, Levy RI. The metabolism of very low density lipoproteins. Preliminary in vitro and in vivo observations. *Biochim Biophys Acta.* 1972; 260: 212-221.
33. Lewis GF, Lamarche B, Uffelman KD, Heatherington AC, Honig MA, Szeto LW, Barrett PH. Clearance of postprandial and lipolytically modified human HDL in rabbits and rats. *J Lipid Res* 1997; 38: 1771-1778.

34. Williams PT, Krauss RM, Nichols AV, Vranizan KM, Wood PD. Identifying the predominant peak diameter of high-density and low-density lipoproteins by electrophoresis. *J Lipid Res* 1990; 31: 1131-1139.
35. Huesca-Gómez C, Carreón-Torres E, Nepomuceno-Mejía T, Sánchez-Solorio M, Galicia-Hidalgo M, Mejía AM, Montaña LF, Franco M, Posadas-Romero C, Pérez-Méndez O. Contribution of cholesteryl ester transfer protein and lecithin: cholesterol acyltransferase to HDL size distribution. *Endocrin Res* 2004; 30: 403-415.
36. Chen C, Albers JJ. Characterization of proteoliposome containing apolipoprotein A-I: a new substrate for the measurement of lecithin cholesterol acyltransferase activity. *J Lipid Res* 1982; 23: 680-691.
37. Tollefson HJ, Albers JJ. Isolation, characterization and assay of plasma lipid transfer proteins. In Albers JJ, Segrest JP, Eds. *Methods in enzymology*. New York: Academic Press Inc, 1994; 797-781.
38. Lagrost L, Athias A, Herbeth B, Guyard-Dangremont V, Artur Y, Paille F, Gambert P, Lallemand C. Opposite effects of cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein on the size distribution of plasma high density lipoprotein. *J Biol Chem*. 1996, 271: 19058-19065.
39. Van Wijk JP, De Koning EJ, Martens EP, Rabelink TJ. Thiazolidinediones and blood lipids in type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 1744-1749.
40. King KM A .History of insulin: from discovery to modern alternatives *Br J Nurs*. 2003; 12: 1137-41.
41. Lawrence JM, Reid J, Taylor GJ, Stirling Ch, Reckless JPD. Favorable effects of pioglitazone and metformin compared with gliclazide on lipoprotein subfractions in overweight patients with early type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27: 41-46.

42. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouelette BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJ, Hayden MR: Mutations in ABCA1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet.* 1999; 22: 336-345.
43. Clee SM, Kastelein JJ, van Dam M, Marcil M, Roomp K, Zwarts KY, Collins JA, Roelants R, Tamasawa Stulc NT, Suda T, Ceska R, Boucher B, Rondeau C, DeSouich C, Brooks-Wilson A, Molhuizen HO, Frohlich J, Genest J, Hayden MR. Age and residual cholesterol efflux affect HDL cholesterol levels and coronary artery disease in ABCA1 heterozygotes. *J Clin Invest.* 2000; 106: 1263–1270.
44. Sakamoto J, Kimura H, Moriyama S, Odaka H, Momose Y, Sugiyama H. Activation of human peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR) subtypes by pioglitazone. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 278: 704-711.
45. Pérez-Méndez O, Bruckert E, Franceschini G, Duhal N, Lacroix B, Bonte JP, Sirtori C, Fruchart JC, Turpin G, Luc G. Metabolism of apolipoproteins A-I and A-II in subjects carrying similar apo A-I mutations, apo A-I Milano and apo A-I Paris. *Atherosclerosis.* 2000; 148: 317-326.
46. Rubins HB, Robins SJ, Collins D. Gemfibrozil for the secondary prevention of CAD in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol: Veterans affairs high-density lipoprotein cholesterol intervention trial study group. *N Engl J Med.* 1999; 341: 410-418.
47. Bloomfield RH, Davenport J, Babikian V, Brass LM, Collins D, Wexler L, Wagner S, Papademetriou V, Rutan G, Robins SJ: Reduction in stroke with gemfibrozil in men with coronary heart disease and low HDL cholesterol: The Veterans Affairs HDL Intervention Trial (VA-HIT). *Circulation.* 2001; 103: 2828-2833.

48. Huesca-Gómez C, Luc G, Fruchart JC, Pérez Méndez O. Ciprofibrate increases synthesis and catabolic rates of HDL apo A-I and apo A-II in patients with hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis*. 2004. Publicación en redacción.
49. Rashid S, Barrett PH, Uffelman KD, Wattanabe T, Adeli K, Lewis GF. Lipolytically modified triglyceride-enriched HDLs are rapidly cleared from the circulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22: 483-487.
50. Webb NR, Cai L, Ziemba KS, Yu J, Kindy MS, van der Westhuyzen DR, de Beer FC. The fate of HDL particles in vivo after SR-BI-mediated selective lipid uptake. *J Lipid Res*. 2002; 43: 1890-1898.
51. de Beer MC, Durbin DM, Cai L, Jonas A, de Beer FC, van der Westhuyzen DR. Apolipoprotein A-I conformation markedly influences HDL interaction with scavenger receptor BI. *J Lipid Res*. 2001; 42: 309-313.
52. Ovalle F and Bell DS. Effect of thiazolidinediones on high-density lipoprotein subfractions. *Endocr Pract*. 2002; 8: 102-104.
53. Freed MI, Rather R, Marcovina SM, Kreider MM, Biswas N, Cohen BR, Brunzell JD. Effects of rosiglitazone alone and in combination with atorvastatin on the metabolic abnormalities in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol*. 2002; 90: 947-952
54. Ovalle F and Bell DS. Lipoprotein effects of different thiazolidinediones in clinical practice. *Endocr Pract*. 2002; 8: 406-410.
55. Brousseau ME, Santamarina-Fojo S, Zech LA, Berard AM, Vaisman BL, Meyn SM, Powell D, Brewer HB Jr, Hoeg JM. Hyperalphalipoproteinemia in human lecithin cholesterol acyltransferase transgenic rabbits. In vivo apolipoprotein A-I catabolism is delayed in a gene dose-dependent manner. *J Clin Invest*. 1996; 97: 1844-1851.
56. Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Lip Res*. 1993, 34: 1255-1274.

57. Winkler K, Konrad T, Füllert S, Friedrich I, Destani R, Baumstark MW, Krebs K, Wieland H, and März W. Pioglitazone reduces atherogenic dense LDL particles in nondiabetic patients with arterial hypertension. A double-blind, placebo-controlled study. *Diabetes Care*. 2003; 26: 2588-2594.
58. Cottrell DA, Marshall BJ, Falko JM. Therapeutic approaches to dyslipidemia in diabetes mellitus and metabolic syndrome. *Curr Opin Cardiol*. 2003; 18: 301-308.
59. Yatsuya H, Tamakoshi K, Hattori H, Otsuka R, Wada K, Zhang H, Mabuchi T, Ishikawa M, Murata C, Yoshida T, Kondo T, Toyoshima H. Serum phospholipid transfer protein mass as a possible protective factor for coronary heart diseases. *Circ J*. 2004; 68: 11-16.
60. Yan D, Navab M, Bruce C, Fogelman AM, Jiang XC. PLTP deficiency improves the anti-inflammatory properties of HDL and reduces the ability of LDL to induce monocyte chemotactic activity. *J Lipid Res*. 2004; 45: 1852-8.
61. Lewis GF, Lamarche B, Uffelman KD, Heatherington AC, Honig MA, Szeto LW, Barrett PH. Clearance of postprandial and lipolytically modified human HDL in rabbits and rats. *J Lipid Res*. 1997; 38: 1771-1778.
62. Argmann C.A, Sawyez C.J, McNeil C.J, Hegele R.A, Huff M.W. Activation of peroxisoma proliferator –activated receptor gamma and retinoid X receptor results in net depletion of cellular cholesteryl esters in macrophages exposed to oxidized lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 475-482.
63. Chiesa G, Parolini C, Canavesi M, Colombo, Sirtori CR, Fumagalli R, Franceschini G, Bernini F. Human apolipoproteins A-I and A-II in cell cholesterol efflux. Studies with transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18: 1417-1423.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

64. Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, Dense HDL Particles Exert Potent Protection of Atherogenic LDL Against Oxidative Stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1881-1888.
65. Deakin S, Leviev I, Gomaraschi M, Calabresi L, Franceschini G, James RW. Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. *J Biol Chem.* 2002; 277: 4301-4308.