



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO SOBRE LA ASOCIACION DE LA PARAOXONASA 1 CON LAS LIPOPROTEINAS DE ALTA DENSIDAD EN SUJETOS TRATADOS CON CIPROFIBRATO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA PRESENTA: MARIA CRISTINA MENDOZA MONTES



MEXICO, D.F.

2005



EXAMEN DE PROFESIONALES FAC. DE QUIMICA

m345269



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente Prof. Laura Peniche Villalpando

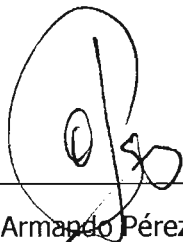
Vocal Prof. Graciela Nava Díaz

Secretario Prof. Óscar Armando Pérez Méndez

1er. Suplente Prof. Martha Leticia Jiménez Pardo

2º. Suplente Prof. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Departamento de Fisiología Área de Investigación
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"



Óscar Armando Pérez Méndez



María Cristina Mendoza Montes

ÍNDICE

I. Generalidades	
A. Lipoproteínas	1
B. Lipoproteínas de alta densidad	4
C. Aterosclerosis y HDL	6
1. Metabolismo de las HDL y el transporte reverso de colesterol.	9
2. Otros efectos anti-aterosclerosos de las HDL	11
3. Actividad antioxidante de las HDL: Paraoxonasa I (PON I)	12
D. Fibratos	15
E. Hipótesis	20
F. Objetivo	21
II. Metodología	22
III. Resultados	25
A. Discusión	32
IV. Bibliografía	36
V. Apéndices	41

I. Generalidades

A. Lipoproteínas

Las lipoproteínas son macromoléculas pseudomicelares (Fig. 1) formadas por:

- lípidos anfipáticos (fosfolípidos y colesterol libre) que se organizan en una monocapa en la superficie del complejo, y presentan sus grupos polares hacia el medio acuoso
- lípidos no polares (triacilgliceroles y ésteres de colesterol) se sitúan en el interior de las lipoproteínas
- proteínas, llamadas apolipoproteínas (apo), las cuales estabilizan la monocapa de fosfolípidos.

Con esta estructura se garantiza el transporte de colesterol y triacilgliceroles en la sangre.

Las lipoproteínas se clasifican de acuerdo a sus características fisicoquímicas:

1) Por su densidad:

- a) Qm: Quilomicrones $\rho < 0.94$ g/mL
- b) VLDL (Very Low Density Lipoproteins): Lipoproteínas de muy baja densidad 0.94 g/mL $< \rho < 1.006$ g/mL
- c) IDL (Intermediate Density Lipoproteins): Lipoproteínas de densidad intermedia 1.006 g/mL $< \rho < 1.019$ g/mL
- d) LDL (Low Density Lipoproteins): Lipoproteínas de baja densidad 1.019 g/mL $< \rho < 1.063$ g/mL
- e) HDL (High Density Lipoproteins). Lipoproteínas de alta densidad, que son separadas en 2 subclases:
 - i) HDL₂ 1.063 g/mL $< \rho < 1.120$ g/mL
 - ii) HDL₃ 1.120 g/mL $< \rho < 1.21$ g/mL

2) Por su movilidad electroforética:

- a) Lipoproteínas con movilidad α
- b) Lipoproteínas con movilidad β
- c) Lipoproteínas con movilidad pre β

3) Por contenido de apolipoproteínas:

- a) Las que contienen apo A-I: Lp A-I y Lp A-II. Aquí se localizan las HDL.
- b) Las que contienen apo B: Lp B, Lp B:E, Lp B:CIII y Lp B:CIII:E. Incluye VLDL, IDL y LDL.

También se pueden clasificar según su contenido de apo A-IV o de apo E. En el cuadro 1 se presentan las características de las lipoproteínas agrupadas según su densidad.

Las apolipoproteínas (apo) son unidades proteicas unidas por interacciones hidrofóbicas y por atracciones electrostáticas a los fosfolípidos de las lipoproteínas. Estas apolipoproteínas son de peso molecular variable, sus funciones son primordialmente estructurales, también fungen como ligandos de receptores y cofactores de enzimas del metabolismo de lípidos.

Lipo-proteína	ρ de flotación (g/mL)	Patrón de Migración Electroforética	Principales Apolipoproteínas	Diámetro (nm)	* proteína (%)	* fosfo-Lípidos (%)	* triacilgliceroles (%)	* coles-terol (%)
Qm	0.94	Origen	A-I A-IV B 48 C-I C-II C-III	> 70	1-2	3-6	90-95	1-3
VLDL	1.006	Pre β	B- 100 C-I C-II C-III E	30-70	6-10	15-20	45-65	4-8
IDL	1.019	β lenta	B-100 E	20-30	20	30	35	38
LDL	1.063	β	B-100 E	18-25	18-22	18-24	4-8	50
HDL 2	1.120	α	A-I	8-12				
HDL 3	1.210	Pre β	A-II A-IV C-I C-II C-III E	5-8	45-55	26-32	2-7	22

Cuadro 1. Lipoproteínas agrupadas de acuerdo a densidad de flotación.

*calculado con respecto a la masa seca expresada en mg. Qm: Quilomicrones. VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad. IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia. LDL: Lipoproteínas de baja densidad. HDL: Lipoproteínas de alta densidad.

B. Lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Las HDL, al igual que las demás lipoproteínas, son complejos macromoleculares pseudomicelares constituidas por lípidos anfipáticos (fosfolípidos y colesterol libre), lípidos no polares (triacilglicérolos y ésteres de colesterol) y por apolipoproteínas. (Fig. 1)

Las HDL son las lipoproteínas que contienen una mayor proporción proteica (45-55% de su masa seca) y es la apo A-I su apolipoproteína más abundante.

La apo A-I además de su función estructural en las HDL, es indispensable en el eflujo de colesterol, que es la primera etapa en el transporte reverso de colesterol (TRC). También desempeña la función de coenzima de la lecitina:colesterol acilo transferasa (LCAT), enzima clave en el metabolismo de las HDL, como se describe más adelante.

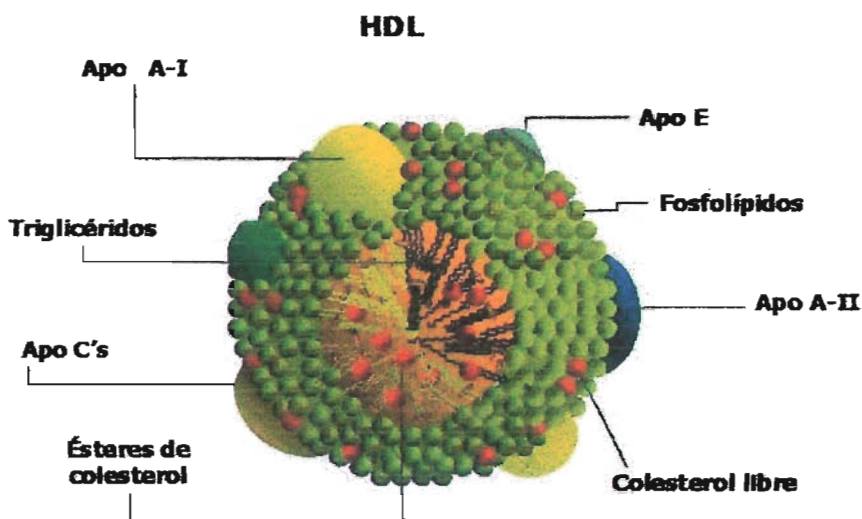


Fig. 1. Representación de la estructura de las HDL. En el núcleo se encuentran los lípidos hidrofóbicos. En la superficie están los lípidos anfipáticos y las apolipoproteínas. Las apolipoproteínas se unen por interacciones hidrofóbicas a los lípidos más externos y por atracciones electrostáticas con los fosfolípidos para estabilizar la pseudomicela lipídica.

En función de su densidad, las HDL se pueden subdividir en HDL₂ ($1.063 < \rho < 1.12$ g/mL) y HDL₃ ($1.12 < \rho < 1.21$ g/mL). Al separarse por tamaños, mediante electroforesis en gradiente de poliacrilamida, las dos clases de HDL (HDL₂ y ₃) se subdividen en: HDL_{2b} y HDL_{2a}, con diámetros de 8.8-9.7 nm y 9.7-12 nm respectivamente y en HDL_{3c} de 7.2-7.8 nm, HDL_{3b} 7.8-8.2 nm y HDL_{3a} 8.2-8.8 nm.¹ Las HDL migran en su mayoría dentro de la fracción α del plasma, por lo que algunos autores las identifican como α -lipoproteínas. Por su movilidad electroforética en combinación con su tamaño, se han descrito otras subfracciones de HDL entre las que destacan las partículas pre- β 1. Dichas partículas están compuestas esencialmente de fosfolípidos y apo A-I, y tienen una masa molecular de alrededor de 60 KD. Estas HDL desempeñan un papel muy importante en la captación de colesterol de las células periféricas.

La concentración plasmática de las HDL se estima generalmente por la medición del colesterol contenido en ellas (C-HDL). Este método no garantiza una medición exacta de la cantidad de partículas HDL ya que pueden existir pocas partículas HDL en circulación, pero enriquecidas en ésteres de colesterol, con lo que se puede sobrestimar su concentración. En estas circunstancias, un paciente con concentración plasmática de C-HDL "normal", no por el número de partículas HDL, sino por tener mucho colesterol en cada una, presenta un factor de riesgo a desarrollar aterosclerosis por la alteración en la composición de sus HDL (HDL no funcionales), como ocurre en la deficiencia de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP)^{2,3} o en el hipotiroidismo.⁴

C. Aterosclerosis y HDL

La enfermedad aterosclerosa coronaria, es la segunda causa de muerte en la población adulta de nuestro país y la primera causa de mortalidad en la mayoría de los países desarrollados.⁵ La OMS predice que las enfermedades cardiovasculares representarán la principal causa de morbilidad y mortalidad mundial antes del 2010.⁶

La aterosclerosis es el resultado de una respuesta inflamatoria de la pared vascular, que posee carácter crónico degenerativo, con formación de lesiones focales o placas, que en fases avanzadas pueden ocluir la luz de los vasos.⁷

La oxidación de las LDL es un factor fundamental en la etiopatogenia de la lesión aterosclerótica. Las LDL oxidadas participan en procesos clave durante la formación de la placa ateromatosa: pueden lesionar directamente el endotelio, alteran el tono vascular, aumentan la síntesis de moléculas de adhesión para monocitos en el endotelio, inducen la proliferación de las CMLV (células de músculo liso vascular) y la síntesis de factores quimiotácticos. Por efecto de estos factores quimiotácticos, los monocitos atraviesan el endotelio, y se diferencian a macrófagos. Los macrófagos captan masivamente a las LDL oxidadas gracias a un receptor *scavenger* y con ello se transforman en células espumosas, su acumulo origina la formación de la estría grasa.

En el proceso de aterogénesis intervienen múltiples factores de crecimiento, citocinas y otras sustancias producidas por las células endoteliales, las CMLV, los macrófagos y los linfocitos T. Al interactuar estos factores, producen una respuesta fibroproliferativa y la estría grasa evoluciona hasta una placa aterosclerótica más compleja (Fig. 2).

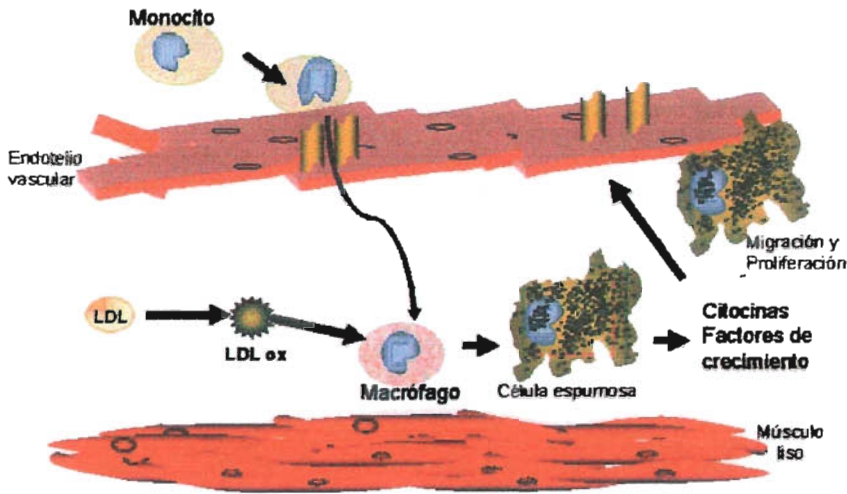


Fig. 2. Esquema de las primeras etapas en la formación de la placa aterosclerótica. En zonas donde existe disfunción endotelial se facilita la infiltración de LDL al espacio subendotelial, donde sufren procesos de modificación, generando LDL oxidadas (LDL_{ox}). Los monocitos se adhieren al endotelio activado que sobreexpresa moléculas de adhesión. Los monocitos circulantes, atraídos, penetran en la pared y son diferenciados a macrófagos, proceso en el que también intervienen las LDL_{ox}. Los macrófagos captan LDL_{ox} y se transforman en células espumosas. Las células musculares lisas (CMLV) de la media, activadas por citocinas y factores de crecimiento liberados en las lesiones, migran a la íntima y proliferan contribuyendo a la evolución de las lesiones.

Los estudios epidemiológicos han demostrado que los niveles bajos de C-HDL (hipoalfalipoproteinemia) son un factor de riesgo independiente de enfermedad aterosclerótica coronaria. De hecho el C-HDL es comúnmente el factor de riesgo lipídico que mejor correlaciona con el riesgo de aterosclerosis coronaria.⁸⁻⁹

La hipoalfalipoproteinemia se define como aquella alteración donde las concentraciones plasmáticas de C-HDL están por debajo de 40 mg/dL, según el último panel de expertos para el tratamiento de adultos (ATPIII) del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol (NCEP), de los Estados Unidos.¹⁰⁻¹¹

Individuos que poseen bajos niveles de C-HDL se han beneficiado en gran manera al ser tratados con fármacos hipolipemiantes como estatinas o fibratos. Varios estudios

revelan que hay una asociación significativa entre los cambios inducidos por los fármacos (fibrato o estatina) en el C-HDL y una reducción en la incidencia a EAC.¹ Por lo anterior, se puede afirmar que las HDL desempeñan un papel directo en la protección contra el proceso ateroscleroso.

Las bajas concentraciones de HDL pueden ser el resultado de una biosíntesis anormal de apo A-I, como en la deficiencia de hormona tiroidea, padecimiento que se asocia a un riesgo de aterosclerosis muy elevado. En este sentido, estudios de nuestro laboratorio han demostrado que en esa situación fisiopatológica las HDL se sintetizan más lentamente.⁴ Este patrón metabólico se acompaña de la presencia de partículas HDL de mayor tamaño, de tipo HDL_{2a} y HDL_{2b},⁴ respecto a los controles, afectando el transporte reverso de colesterol¹³ descrito más adelante. Estas anomalías metabólicas contribuyen a explicar el alto riesgo de EAC asociado al hipotiroidismo.⁴

Los niveles bajos de C-HDL no necesariamente son un factor de riesgo cardiovascular, ya que en casos aislados de hipoalfalipoproteínemias, éstas no se asocian a un riesgo elevado de enfermedad arterial coronaria (EAC).¹⁴⁻¹⁵ En estos sujetos, se ha determinado que el catabolismo de las HDL es muy elevado y se asocia con la generación de HDL tipo 3c, lo que sugiere una función acelerada o una eficiencia mayor de las HDL pequeñas como antiaterosclerosas. En este sentido, Kontush y cols.¹⁵ investigaron si las distintas subclases de HDL se podían diferenciar en base a su capacidad de proteger contra la oxidación de LDL. Demostraron que en sujetos normolipidémicos, las subespecies de HDL más pequeñas y densas presentan una mayor capacidad para proteger a las LDL de la oxidación *in vitro*. La protección contra la oxidación de LDL incrementa en relación inversa con el tamaño de las HDL.¹⁵

En otras palabras, la cantidad de HDL es importante, pero la eficacia de sus funciones lo es aún más. No obstante, se requieren otros estudios para poder discriminar entre una hipoalfalipoproteinemia proaterogénica de una que no lo es.

1. Metabolismo de las HDL y el transporte reverso de colesterol (TRC).

Uno de los mecanismos por medio del cual las HDL evitarían la formación de la placa ateromatosa (Fig. 3), es el TRC que se define como el regreso de colesterol proveniente de las células periféricas hacia el hígado para su excreción o reciclaje.¹⁶

La primera etapa del TRC es el eflujo de colesterol de las células por la subfracción pre- β 1 de las HDL. El eflujo de colesterol de las células hacia las HDL se lleva a cabo principalmente por una proteína de membrana denominada ABC-A1 (*ATP-binding cassette A1*), que utiliza ATP para bombear colesterol y fosfolípidos hacia el exterior de la célula.¹⁷ Las alteraciones en la estructura de esta proteína de membrana son causa de hipoalfalipoproteinemia aguda conocida como enfermedad de Tánquer. Esta enfermedad, en su forma homocigota, se manifiesta por una concentración muy baja de C-HDL, a veces indetectable, hipertriacilgliceridemia moderada y baja concentración plasmática de C-LDL. Estas anomalías se acompañan de hipertrofia de las amígdalas y hepatoesplenomegalia.

Después del eflujo, el colesterol captado por las partículas pre- β 1 es esterificado por la LCAT. Esta esterificación provoca que el colesterol pierda su condición anfipática, por lo que abandona la superficie de la lipoproteína y se sitúa en el interior de la partícula, aumentándola de tamaño. El colesterol esterificado puede ser intercambiado por triacilgliceroles provenientes de lipoproteínas que contienen apo B, principalmente VLDL e IDL. El intercambio de lípidos hidrofóbicos está facilitado por la CETP. Los triacilgliceroles de las HDL₂ son entonces hidrolizados por la lipasa hepática (LH). Esta hidrólisis, en asociación con la actividad de la proteína de transporte de fosfolípidos (PLTP), disminuye el tamaño de las HDL₂ transformándolas en HDL₃ y en partículas pre- β 1 que pueden iniciar nuevamente el ciclo de captación de colesterol.

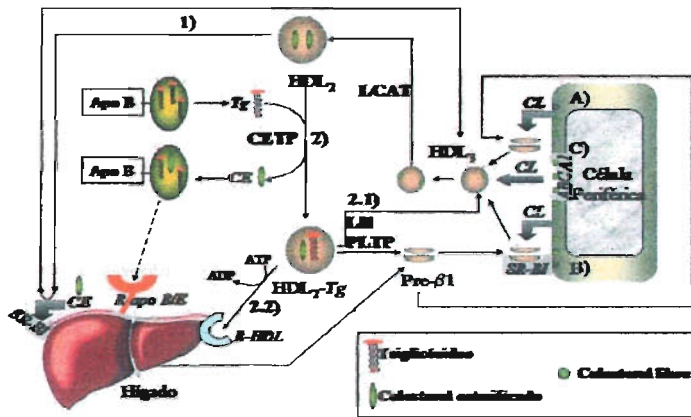


Fig. 3. Transporte reverso de colesterol (TRC). Los aceptores primarios (partículas pre-β1 o HDL₃ en menor proporción) captan el colesterol libre (CL) excedente de las células periféricas por: A) contacto simple con la membrana celular, B) por el receptor SR-BI. La incorporación de colesterol en los aceptores primarios de colesterol y la esterificación del mismo por la LCAT, originan aumentos progresivos en el tamaño de la lipoproteína (Lp), y generan sucesivamente HDL₃ y HDL₂. El colesterol esterificado (CE) puede seguir dos rutas: 1) eliminarse directamente de la lipoproteína por un mecanismo en el que interviene el SR-BI hepático, generando así HDL de menor tamaño capaces de reiniciar el ciclo y 2) por acción de la CETP, se intercambia por triacilglicerol (Tg) provenientes de las Lp que contienen apo B, principalmente VLDL e IDL, llegan así al hígado para su recidamiento o excreción, gracias al receptor hepático apo B/E. 2.1) La LH hidroliza los Tg de las HDL captados por la ruta 1). Esta hidrólisis en asociación con la actividad PLTP, regenera los aceptores primarios de colesterol. 2.2) La partícula completa puede ser internalizada al hepatocito a través del receptor hepático para HDL con generación de ADP.

El TRC concilia la mayor parte de los hallazgos en lo que atañe al metabolismo de lípidos y los resultados epidemiológicos, pero no alcanza a explicar por qué algunos sujetos con niveles extremadamente bajos de HDL, como los descritos previamente, no padecen de una aterosclerosis prematura.

2. Otros efectos antiaterosclerosos de las HDL.

En los últimos años se han investigado los procesos mediante los cuales las HDL inhiben la aterosclerosis (Fig. 4). Se han sugerido diferentes mecanismos, entre los que se incluye su participación en el TRC y la capacidad de proteger contra la peroxidación de lípidos. Más recientemente, se ha descrito su facultad de inhibir la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales,^{18,19} así como actividad profibrinolítica y antitrombótica.

Las moléculas de adhesión están implicadas en el reclutamiento de monocitos hacia la íntima arterial, paso clave en la iniciación de la aterosclerosis; la capacidad de las HDL para inhibir la expresión de estas moléculas, tiene claras implicaciones en contra el desarrollo de EAC.

Estudios epidemiológicos demuestran que las perturbaciones del balance entre los procesos de coagulación y fibrinólisis promueven el desarrollo de aterosclerosis. También se ha sugerido que ambos procesos son afectados por las HDL, promoviendo la fibrinólisis e inhibiendo la coagulación.²⁰

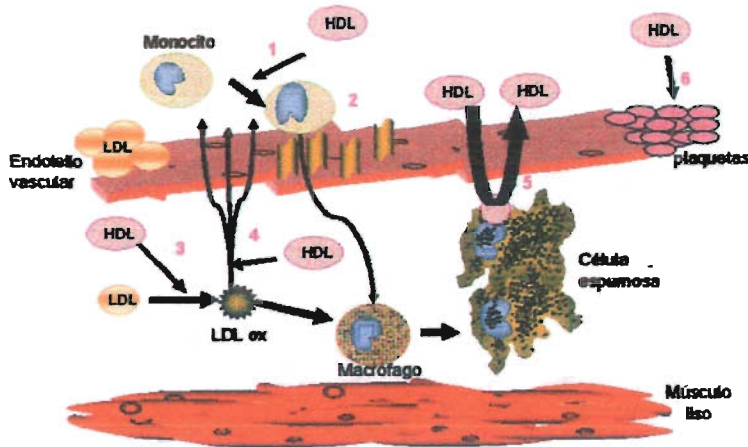


Fig. 4. Efectos antiaterogénicos de las HDL. 1) Inhibición de quimiotaxis promovida por las LDLox 2) Regulación en la síntesis de adhesinas en el endotelio vascular 3) Inhibición de la oxidación de LDL 4) Inhibición de la disfunción endotelial inducida por LDLox y apoptosis 5) Estimulación del eflujo de colesterol en el macrófago 6) Inhibición de la activación de plaquetas.

3. Actividad antioxidante de las HDL: Paraoxonasa 1 (PON 1)

Como se explicó, el inicio y la progresión de la placa ateromatosa en la pared arterial dependen de la oxidación de las LDL mediada por radicales libres, mientras que las HDL protegen a las LDL de la oxidación.⁷

Existen diversos elementos que participan en el papel antioxidante de las HDL, como la apo A-I y principalmente una enzima, la paraoxonasa (PON 1). (Fig. 5). La PON 1 pertenece a una familia de genes formada por tres miembros, PON 1, PON2 y PON3. Esta familia se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 entre q21.3 y q22.1.²¹ La PON 1 es la más estudiada y conocida, a la cual se le atribuye la capacidad de hidrolizar xenobióticos en el suero humano.

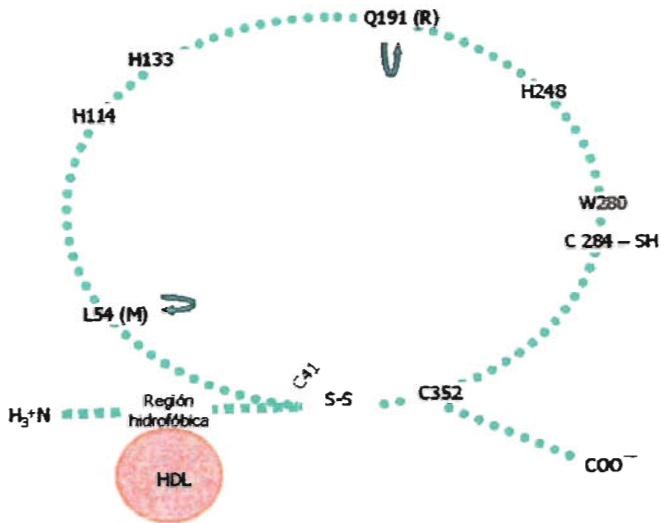


Fig. 5. Esquema de la estructura primaria de la PON 1 humana. La secuencia de aminoácidos incluye 2 sitios polimórficos, marcados con \curvearrowright . Se indican además, el puente disulfuro, el residuo sulfhidrilo libre, así como el sitio de unión de la PON 1 a las HDL.

La paraoxonasa está unida físicamente a las HDL²² a través de interacciones hidrofóbicas, y tiene la capacidad de hidrolizar compuestos organofosforados. Su nombre deriva de la capacidad que tiene para catalizar la hidrólisis del paraoxón, un potente inhibidor de las colinesterasas, empleado como insecticida.

Además de catalizar la hidrólisis de compuestos organofosforados, la PON 1 elimina los peróxidos lipídicos, y protege así contra la acumulación de LDL oxidadas (Fig. 4). Al catalizar la eliminación de los peróxidos asociados a lipoproteínas, la PON 1 da lugar a los alcoholes correspondientes, inactivos desde el punto de vista de la peroxidación, de la quimiotaxis y del proceso inflamatorio en general. La actividad paraoxonasa explica así, la relación inversa entre la paraoxonasa y la aterosclerosis, como lo han demostrado diversos estudios epidemiológicos.²³⁻²⁶

La PON 1 tiene 2 sitios de unión para calcio, uno de los cuales es necesario para su actividad hidrolítica. La quelación de calcio inactiva a la PON 1 y disminuye su estabilidad, pero no interfiere con la capacidad de inhibir la oxidación de LDL.²⁷

La actividad paraoxonasa y el riesgo de EAC, varía en la población debido a factores genéticos o fisiopatológicos; en el humano, la PON 1 presenta dos polimorfismos (Fig. 4), uno en la posición 54 (metionina/leucina; M/L) y la otra en la posición 191 (arginina/glutamina; R/Q).²¹ Estudios recientes sugieren que el polimorfismo de PON 1 influye el riesgo de padecer EAC. Ratones carentes de PON 1 son más susceptibles a la aterosclerosis.²⁸ Cuando hay una deficiencia de PON 1 combinada con deficiencia de apolipoproteína E (apo E), se observó un incremento en el desarrollo de aterosclerosis.²⁹ Por otro lado, la sobreexpresión de PON 1 redujo significativamente la lesión aterosclerótica de 2 a 4 veces en los ratones silvestres y en los deficientes de apo E.³⁰

Existe una correlación positiva entre la concentración de apo A-I y la actividad paraoxonasa.³² La cantidad de partículas HDL determina el número de moléculas de la enzima presente en plasma. Siendo la apo A-I un marcador excelente de la cantidad de partículas HDL, la correlación entre apo A-I plasmática y la actividad Paraoxonasa es de esperarse. Además, se ha observado que la cantidad de paraoxonasa presente en las HDL depende inversamente de la apo A-II, segunda proteína en abundancia de las HDL. Ratones transgénicos para apo A-II humana, expresan un tipo de HDL proinflamatorias y carecen de capacidad para inhibir la oxidación de las LDL debido a un bajo contenido de paraoxonasa.³³

La capacidad de las HDL para reclutar a la paraoxonasa de la membrana del hepatocito depende también del contenido de colesterol libre y fosfolípidos presentes en la lipoproteína³⁴, indicando que la tensión de superficie y la fluidez de la capa de fosfolípidos de las HDL son fundamentales para su asociación con la enzima. Estos resultados sugieren que no cualquier tipo de partícula HDL es capaz de transportar PON en plasma y conducirla al espacio subendotelial en donde desempeña su papel antiateroscleroso.

D. Fibratos

A pesar de las evidencias experimentales que apoyan las diferentes funciones antiaterogénicas de las HDL, no existe aún suficiente información para tratar farmacológicamente a la hipoalfalipoproteinemia en prevención primaria. En la prevención secundaria, la intervención farmacológica es recomendada, sobre todo si existen dislipidemias mixtas en el paciente. En esos casos, los fibratos son el tratamiento de elección.

Los fibratos son fármacos hipolipemiantes, considerados como antiaterosclerosos. Reducen la concentración de triacilgliceroles al aumentar su eliminación y disminuir la producción de algunas de las lipoproteínas que los transportan. Se asocian con una elevación en la concentración de C-HDL y una disminución en los niveles de C-LDL. Aunque la proporción en el cambio depende de la estructura química del fibrato, de las concentraciones iniciales de las lipoproteínas y de la etiología de la dislipidemia.³⁵

Los fibratos son agonistas de los PPAR α (receptor activado por proliferadores de los peroxisomas α), el cual pertenece a la superfamilia de receptores nucleares de hormonas. Estos factores de transcripción, modulan la expresión de genes, y sus ligandos naturales son diversos ácidos grasos y eicosanoides.

El mecanismo de activación de los PPAR α (Fig. 6) se da en 2 fases transcripcionales. Durante el primer estado, los agonistas activan a los PPAR α . El PPAR α activado por su ligando forma un heterodímero con otro receptor nuclear, el receptor del ácido 9-*cis* retinoico (RXR), activado por su ligando.

En la segunda fase de activación, el complejo PPAR α -RXR reconoce un elemento de respuesta para PPARs (PPRE), situado en los promotores de varios genes (en hepatocitos pueden ser hasta 80 diferentes). El complejo de PPAR α -RXR se une a PPRE vía un dominio de dedo de cinc de la proteína. Al unirse a esta secuencia de DNA (PPRE), que siempre es la misma (AGGTCAAnAGGTCA), activa la transcripción de diferentes genes, como el de la apo A-I, A-II, C-III y LPL.

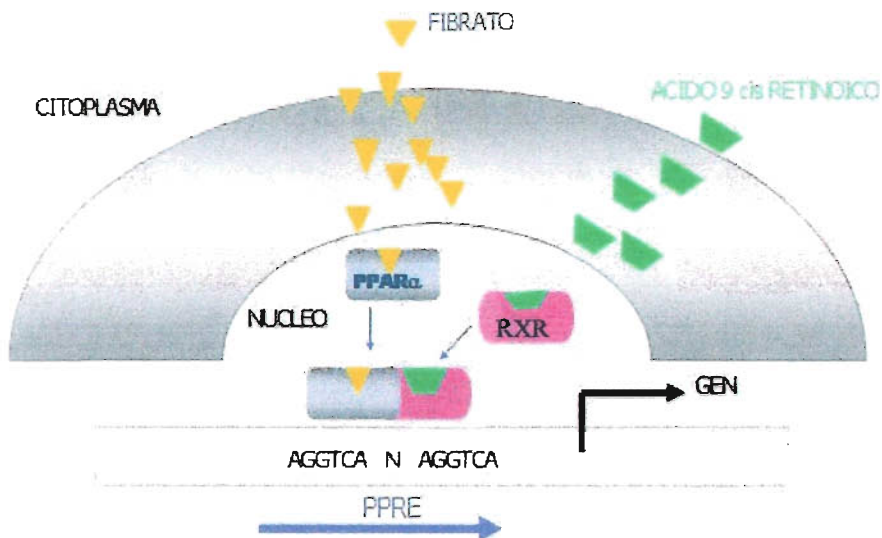


Fig. 6. Mecanismo molecular de los fibratos. El fibrato activa a los PPAR α , el PPAR α activado por su ligando forma un heterodímero con otro receptor nuclear, el 9-*cis*-del receptor de ácido retinoico (RXR), activado por su ligando. El complejo PPAR α -RXR reconoce al PPRE, situado en los promotores de distintos genes. Al unirse a esta secuencia de DNA (PPRE), AGGTCA α AGGTCA, activa la transcripción de diferentes genes.

El mecanismo de acción de los fibratos (Fig. 7) incluye 6 acciones diferentes:

1) Inducen la lipólisis de lipoproteínas ricas en triacilglicerol.

Estos fármacos aumentan la eliminación de los quilomicrones y sus remanentes, de las VLDL y de las IDL, los cuales transportan la mayoría de los triacilglicerol en el plasma. Esta acción la realizan al estimular la síntesis y el transporte a la superficie externa de las células endoteliales de la lipasa lipoproteica (LPL), enzima encargada de degradar los triacilglicerol contenidos en estas lipoproteínas. Los PPAR α promueven la disminución de la producción de apo C-III, proteína inhibidora de la actividad LPL, que se asocia con el

riesgo a padecer EAC. Además, promueven la síntesis y secreción de apo C-II, lo que se traduce en la reducción de su concentración en la superficie de las VLDL y facilita la acción de la LPL sobre las lipoproteínas ricas en triacilglicerol.

2) Inducen la captación de ácidos grasos por el hígado.

En roedores, aumentan la captación de ácidos grasos por el hígado y su transformación en acil Co-A. La activación de ácidos grasos en derivados Co-A es la etapa iniciadora de la oxidación de ácidos grasos por los peroxisomas en los roedores, y por las mitocondrias, en humanos.

3) Reducción de la síntesis hepática de triacilglicerol.

Al estimular la β -oxidación de los ácidos grasos hay una disminución en la biodisponibilidad de ácidos grasos para la síntesis de triacilglicerol.

4) Estimulación en la producción de HDL.

Como ya hemos mencionado, las apolipoproteínas A-I y A-II son estructurales de las HDL. Los fibratos aumentan la producción hepática de estas dos apolipoproteínas, por lo que se genera un aumento en las concentraciones de C-HDL circulante.

El tratamiento con ciprofibrato incrementa la actividad de la LPL, con lo que se libera la apo A-I y apo C's de los quilomicrones y VLDL, favoreciendo la formación de HDL.

5) Reducción del intercambio de lípidos neutros (CE y Tg) entre las VLDL y HDL.

En el plasma los triacilglicerol y los ésteres de colesterol sufren intercambios entre las lipoproteínas ricas en triacilglicerol (VLDL) y las proteínas ricas en colesterol (HDL). Este intercambio se facilita por la CETP. La disminución de los triacilglicerol circulantes se acompaña de una disminución proporcional en el intercambio de ésteres de colesterol entre estas lipoproteínas. Así los ésteres de colesterol se acumulan en las HDL, que aunado al incremento en las apolipoproteínas A-I y AII, elevan los niveles de HDL circulantes.

6) Mejoran la depuración de LDL

La hipertriacilglicerolemia se acompaña de una alteración en la estructura de LDL, donde éstas son pequeñas y densas.¹⁵ Los fibratos facilitan la eliminación de las lipoproteínas LDL debido a cambios en su conformación, hacia LDL de mayor tamaño y menor densidad, que favorece su unión al receptor-LDL

Estudios recientes en nuestro laboratorio, demuestran que el tratamiento con fibratos induce un incremento en el número de partículas HDL, principalmente, una elevación en la proporción de HDL de menor tamaño.⁴

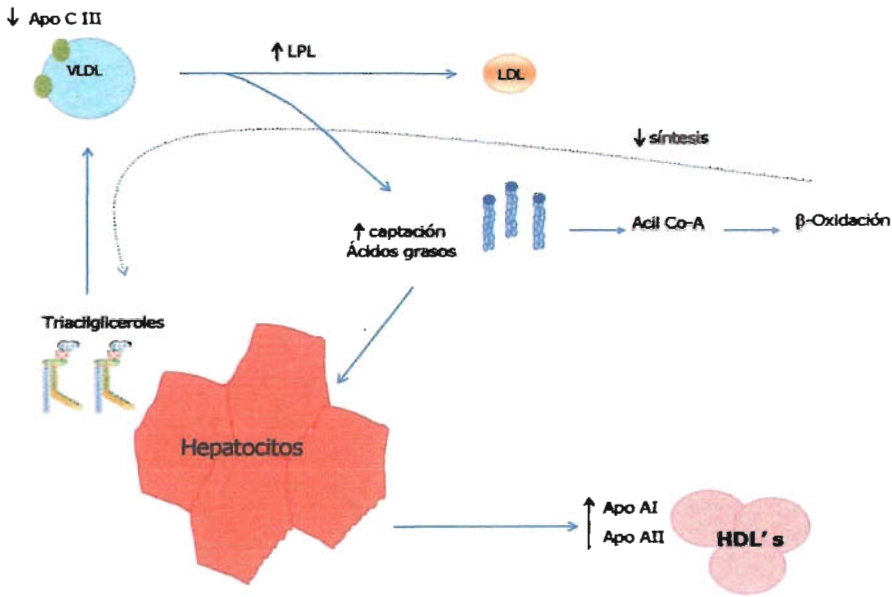


Fig. 7. Efectos anti-dislipidémicos de los fibratos. Inducen la lipólisis de lipoproteínas ricas en triacilglicerolos. Estimulan la síntesis y el transporte a la superficie externa de las células endoteliales de la lipasa lipoproteica (LPL). Los PPAR α promueven la disminución en la producción de apo C-III. Promueven la síntesis y secreción de apo C-II. Inducen la captación de ácidos grasos por el hígado. Reducen de la síntesis hepática de triacilglicerolos, al estimular la β -oxidación de los ácidos grasos. Estimulan la producción de HDL por un incremento en la producción hepática de apo A-I y apo A-II. Reducción del intercambio de lípidos neutros (CE y Tg) entre las VLDL y HDL. Así los ésteres de colesterol se acumulan en las HDL, que aunado al incremento en las apolipoproteínas A-I y AII, elevan los niveles de HDL circulantes. Mejoran la depuración de LDL.

En conclusión, las HDL poseen diferentes propiedades que confieren protección contra la aterosclerosis, entre las que destaca su actividad antioxidante. Las propiedades antioxidantes de las HDL dependen en gran medida de la PON 1 asociada a ellas y la asociación entre PON 1 y HDL depende a su vez de la tensión de superficie de estas lipoproteínas. De esta manera, las HDL pequeñas tipo 3c son las que tienen mayor capacidad de asociación con la PON 1. Por otra parte, los fibratos promueven la síntesis de HDL y además desplazan la distribución de tamaños hacia la formación de HDL_{3c}.

Todo lo anterior sugiere fuertemente que al existir un incremento de la cantidad de HDL totales y de la proporción de HDL_{3c}, la actividad paraoxonasa se verá incrementada en un tratamiento con fibratos, y este efecto es potencialmente antiateroscleroso.

F. Hipótesis:

El incremento de las HDL circulantes, en particular de las HDL de menor tamaño, inducido por el ciprofibrato, provocará un aumento de la actividad PON 1 en suero de los pacientes.

F. Objetivo:

Establecer si existen cambios en la actividad PON 1, en el suero de pacientes tratados con ciprofibrato.

II. Metodología

Se reclutaron 8 voluntarios, 6 mujeres y 2 hombres, con una edad promedio de 46 años.

Criterios de inclusión: concentración de Tg > 150 mg/dL, C-HDL < 40 mg/dL.

Criterios de exclusión: diabéticos, antecedentes de eventos coronarios previos, estar en tratamiento con hipolipemiantes o algún fármaco que afecte el metabolismo de lípidos.

A los pacientes se les administró 100 mg de Ciprofibrato/día durante 6 semanas.

Todos los pacientes aceptaron participar en el estudio y dieron su consentimiento informado por escrito. El protocolo fue revisado y aceptado por el comité de Ética del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

1) Toma de muestra

A los pacientes se les tomó una muestra de sangre venosa, después de un ayuno mínimo de 12 h, con tubos que contienen activador de coágulo y con tubos que contienen EDTA.

Se separó el plasma o suero por centrifugación a 3500 r.p.m. durante 15 minutos. Se hicieron alícuotas y se conservaron en refrigeración para la determinación del perfil de lípidos o en congelación (-70°C) para las demás determinaciones.

2) Determinación de lípidos.

Al plasma se le determinó el perfil de lípidos (colesterol total, C-HDL, triacilglicerol) y glucosa por métodos enzimáticos colorimétricos comerciales (Boehringer-Mannheim, Alemania; Menary, Italia). La concentración de C-LDL se determinó mediante la fórmula de Friedewald.

3) Aislamiento de lipoproteínas.

Se aislaron las lipoproteínas por ultracentrifugación secuencial a partir de un pool de plasmas normolipémicos para la calibración de la columna de cromatografía: VLDL (1.006 g/mL) seguidas por las LDL (1.019 g/mL), HDL₂ (1.120 g/mL) y HDL₃ (1.21 g/mL). Una vez separadas, las diferentes fracciones lipoproteicas se dializaron contra una solución amortiguadora de fosfatos (PBS). La técnica se describe a detalle en el apéndice I.

4) Cromatografía líquida por exclusión de tamaño (CLET).

Primero se hizo la calibración de la columna con las diferentes lipoproteínas aisladas, cada una de ellas se filtró a través de membranas MILLIPORE (0.45 μm), y se inyectaron por separado 300 μL del filtrado, a una columna BioPrep SE 1000/17 (BIO-RAD) acoplada a un sistema BioLogic Duo Flow (BIO-RAD) de alta presión. El cromatógrafo se maneja mediante el software BioLogic Duo flow. Con las fracciones obtenidas se determinaron los perfiles de elución de colesterol, actividad paraoxonasa y fosfolípidos de cada tipo de lipoproteína.

El suero fresco de los pacientes se filtró e inyectó en la columna como se hizo en la calibración. Se colectaron fracciones de 300 μL y se determinaron los perfiles de elución ya mencionados (apéndice II).

5) Determinación de la actividad PON 1.

A cada una de las muestras y de las fracciones se les determinó la actividad PON 1, usando dos diferentes sustratos, dietil p-nitrofenilfosfato (actividad paraoxonasa, PON) y fenilacetato (actividad arilesterasa, ARE), por métodos colorimétricos, antes y durante del tratamiento. La actividad PON 1 se reportó como μmol de p-nitrofenol formado/min/mL suero, en tanto que la actividad ARE se expresó en nmol de fenol formado/min/mL suero (apéndice III).

6) Perfil de elución de lípidos

A cada una de las fracciones separadas por CLET se le determinó la concentración de colesterol libre y fosfatidilcolina por métodos enzimáticos-colorimétricos comerciales, adaptados a placa de ELISA (96 pozos). La densidad óptica de las muestras se determinó en un lector de placas antes y durante del tratamiento.

7) Eflujo de colesterol.

El eflujo de colesterol se determinó con células en cultivo de hepatoma de rata (Fu5AH), según el procedimiento descrito por de la Llera Moya *et al*³⁶ (apéndice IV). Brevemente, se incorporó por adsorción ^3H -colesterol a la membrana citoplasmática de las células, se eliminó el colesterol no adsorbido, y posteriormente el cultivo se incubó

durante 4 horas con las muestras de suero de los pacientes. Al término de la incubación, se determinó la radiactividad presente en el medio de cultivo y en las células. Se reportó el porcentaje de marca presente en el medio (eflujo de colesterol) con respecto a la radiactividad total.

8) Análisis estadístico.

Se realizó mediante prueba t de Student, pareada. Consideramos estadísticamente significativo una $p < 0.05$. Los resultados se reportan como la media \pm desviación estándar.

III. Resultados

Perfil de lípidos.

El perfil de lípidos se presenta en el cuadro 2. El tratamiento con ciprofibrato produjo que las concentraciones de triacilglicérolos (Tg) disminuyeran en un 44.8% con significado estadístico ($p < 0.05$), la concentración del colesterol total disminuyó en 11.5% y el colesterol no-HDL (C-HDL) disminuyó en un 8.0%, éstos últimos con $p > 0.05$. Se hizo un estudio estadístico mediante la prueba de t de Student.

Cuadro 2. Perfil de lípidos y actividad PON antes y durante el tratamiento.

Los resultados se presentan como la media \pm desviación estándar. C= colesterol. C no-HDL= colesterol no HDL, p-NF= sustrato para-nitrofenol. Se realizó la prueba t de Student, $n=8$, $p < 0.05$.

Parámetro	Antes del tratamiento	Durante el tratamiento
	Promedio \pm DE	Promedio \pm DE
C-total (mg/dL)	210.3 \pm 41.6	186.1 \pm 35.7
C no-HDL (mg/dL)	129.0 \pm 41.6	118.6 \pm 29.2
Tg (mg/dL)	264.9 \pm 97.9	146.1 \pm 29.7
Actividad PON (nmol p-NF/min/mL suero)	182.1 \pm 58.7	196.9 \pm 46.8

La Fig. 7 representa el comportamiento individual del colesterol de HDL antes y durante el tratamiento. Como puede observarse seis de los pacientes aumentaron su concentración de C-HDL, uno se mantuvo con la misma concentración, mientras que uno disminuyó. En promedio, el C-HDL presentó una tendencia a aumentar, en un 13.5 %, de 38.8 ± 5.4 mg/dL a 44 ± 11.3 mg/dL ($p=0.055$).

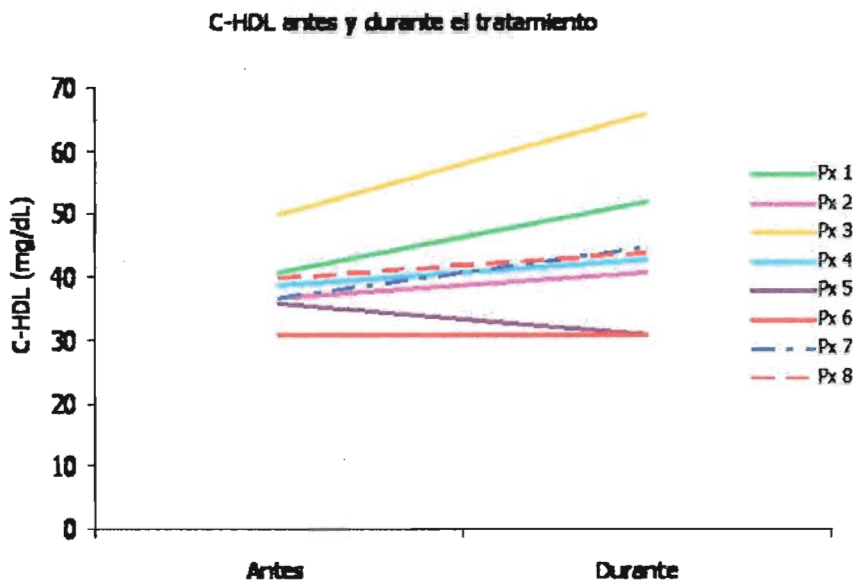


Fig. 7 Determinación de C-HDL antes y durante el tratamiento. Hubo una tendencia al incremento en la concentración promedio de C-HDL durante el tratamiento con ciprofibrato ($p>0.055$).

A nuestro conocimiento, en este trabajo se empleó por primera vez una columna BioPrep SE 1000/17 (BIORAD), que consiste en una columna de cromatografía líquida por exclusión de tamaño, para separar a las lipoproteínas. Por lo tanto en la primera etapa se realizó la calibración de la columna para determinar en qué fracciones eluyen las lipoproteínas. En la Fig. 8 se presentan los perfiles de elución de las lipoproteínas puras (VLDL, LDL, HDL) asociada a los diferentes volúmenes de elución. Se muestra en el eje de las ordenadas la densidad óptica a la longitud máxima de absorción, y en el eje de las abscisas se presentan las fracciones expresadas como volumen de elución en mililitros.

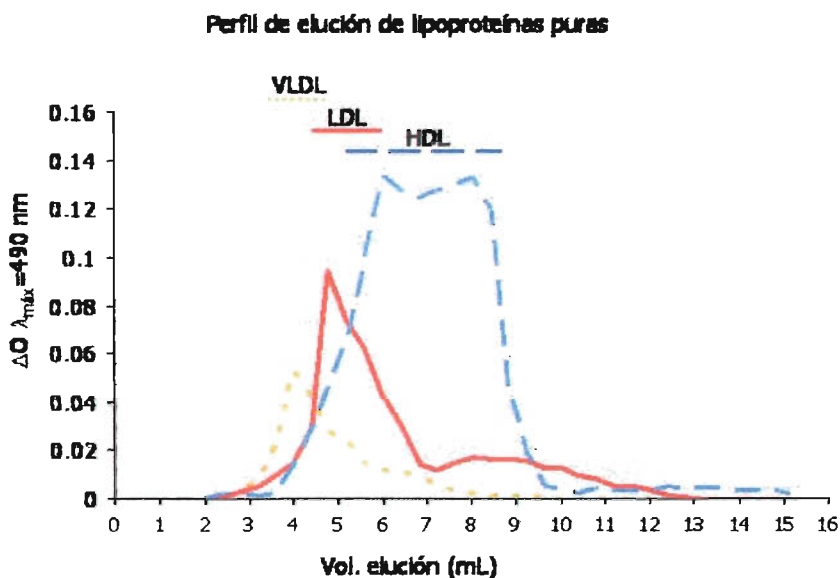


Fig. 8 Calibración CLET. Perfil de elución de las lipoproteínas puras. Los volúmenes de elución de las lipoproteínas fueron: VLDL 3.6-4.8 mL, LDL 4.4-6.0 mL y HDL 5.2-8.8 mL.

A las fracciones colectadas por CLET se les determinó la concentración de colesterol y como se puede observar, durante el tratamiento (Fig. 9) hay una disminución del 7.3 % en el promedio del colesterol de los 8 pacientes (3.2 ± 3.5 vs 2.9 ± 2.9 $p= 0.3$). Se nota una distribución diferente de este colesterol a lo largo de las distintas fracciones lipoproteicas, durante el tratamiento la cantidad de colesterol unido a las fracciones VLDL-LDL disminuyó, mientras que el colesterol unido a las fracciones correspondientes a las HDL se incrementó, como se había determinado en el perfil de lípidos.

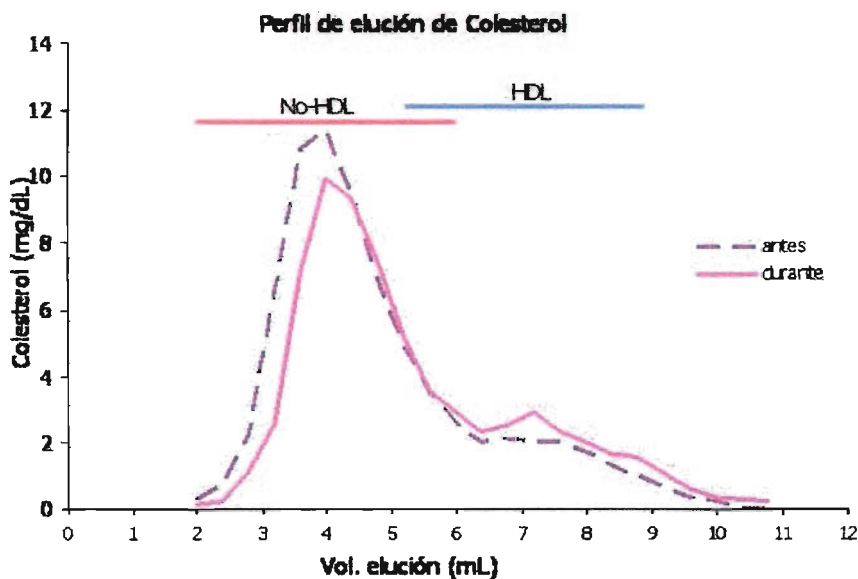


Fig. 9 Perfil de elución de colesterol promedio de los 8 pacientes antes y durante el tratamiento. El colesterol promedio disminuyó durante el tratamiento, pero la distribución es diferente en las distintas fracciones lipoprotéicas. Durante el tratamiento se observa una disminución del C no-HDL mientras que el colesterol que eluye en la fracción HDL tiende a aumentar.

Posteriormente se realizó la determinación de la concentración de fosfolípidos a lo largo de las diferentes fracciones. Antes del tratamiento hay una mayor concentración de fosfolípidos en las fracciones VLDL-LDL. Durante el tratamiento, la concentración de fosfolípidos se distribuye en las fracciones VLDL-LDL (Fig. 10).

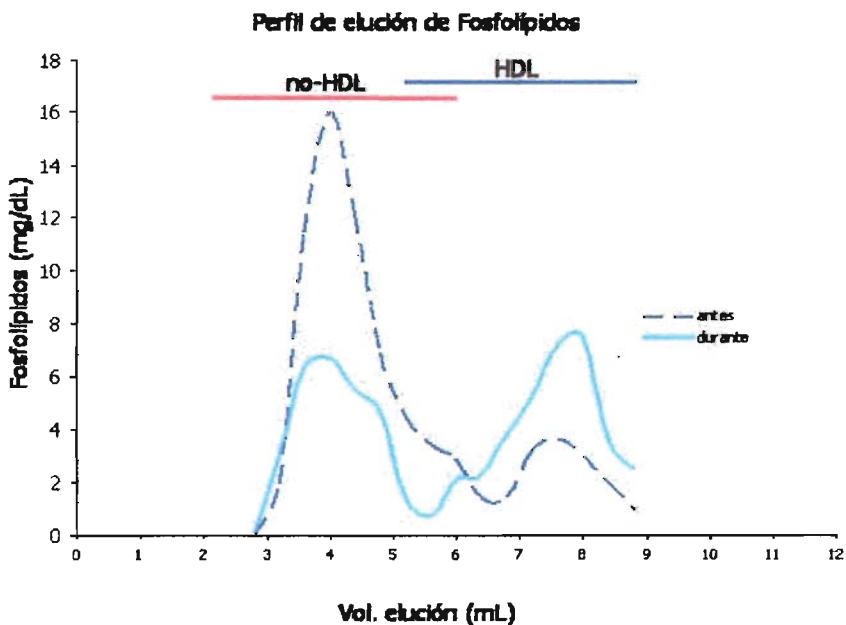


Fig. 10 Perfil de elución de fosfolípidos. Distribución de fosfolípidos, promedio de los 8 pacientes. Hubo un incremento en la proporción de fosfolípidos unida a las HDL durante el tratamiento con ciprofibrato.

Proporcionalmente el incremento de fosfolípidos en la fracción HDL es más importante que lo observado con el colesterol, por lo que se decidió realizar el flujo de colesterol. En el flujo de colesterol con las células Fu5AH en cultivo, se observó un incremento durante el tratamiento con ciprofibrato aunque no es significativo. Antes del tratamiento hubo un 14.7 ± 4.9 % de transferencia y durante el tratamiento 15.6 ± 5.5 %.

A continuación, determinamos la actividad enzimática. En el suero total antes del tratamiento la actividad ARE presentó una tendencia a disminuir. Antes del tratamiento hubo una actividad ARE de $125.2 \pm 46.8 \mu\text{mol fenol/ min/ mL suero}$ contra $95.4 \pm 34.4 \mu\text{mol fenol/ min/ mL suero}$ durante el tratamiento.

El suero de cada paciente fue separado por CLET y se le determinó la actividad ARE a las fracciones colectadas. Se observó una distribución irregular de la actividad a lo largo de las distintas fracciones lipoprotéicas, antes del tratamiento (Fig. 11).

Perfil de elución de actividad ARE antes del tratamiento.

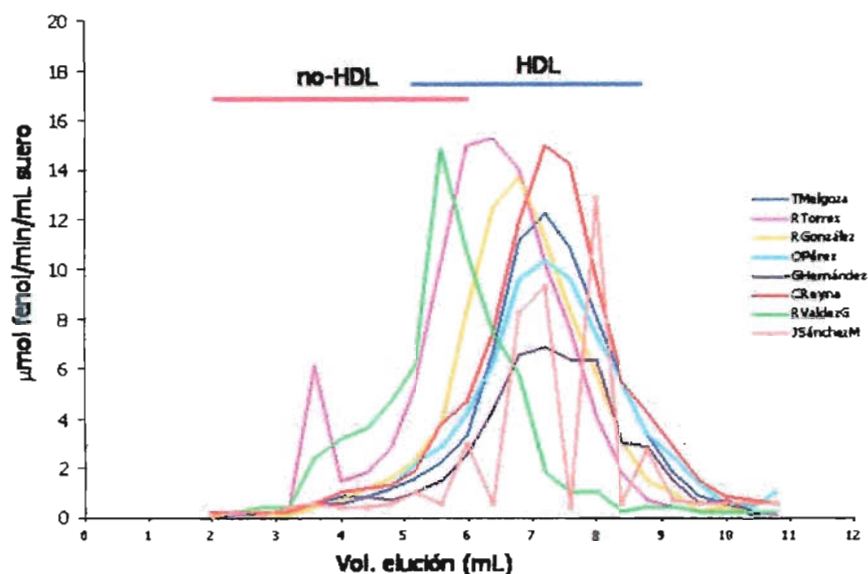


Fig. 11 Perfil de elución de actividad ARE antes del tratamiento. La actividad se encuentra distribuida de manera irregular a lo largo de las fracciones correspondientes a VLDL, LDL y HDL.

Durante el tratamiento se observa (Fig. 12) que existe una mayor asociación de la Paraoxonasa a las fracciones correspondientes a las HDL de menor tamaño. La distribución de la PON 1 se asocia únicamente a las fracciones correspondientes a las HDL.

Perfil de elución de actividad ARE antes del tratamiento

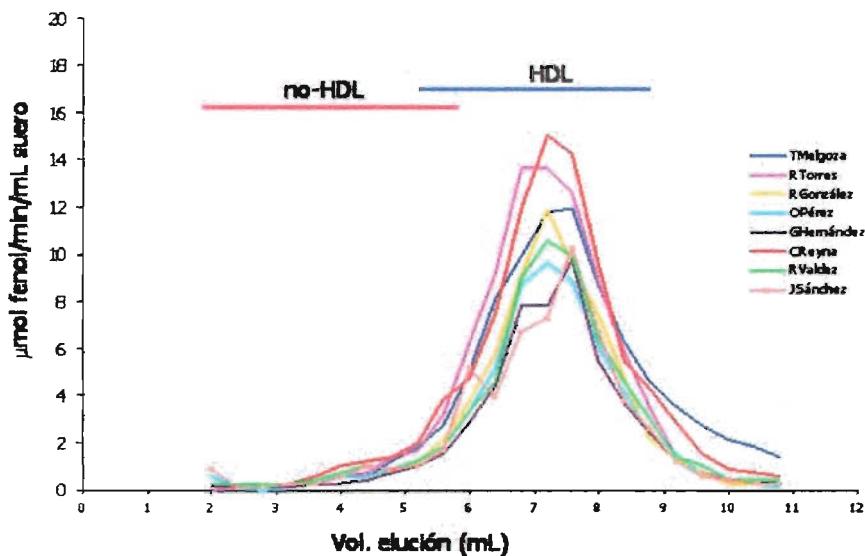


Fig. 12 Perfil de elución de la actividad ARE durante el tratamiento. Distribución de la actividad durante el tratamiento con ciprofibrato, la actividad PON 1 se asocia de manera homogénea a las fracciones HDL de menor tamaño.

A. Discusión

En el presente trabajo pusimos de manifiesto que el ciprofibrato induce una asociación preferencial de la enzima PON 1 a las HDL de menor tamaño, a pesar de que la actividad en suero de la enzima no se modifica por el tratamiento.

En la hipótesis del trabajo se propuso que el incremento que induce el ciprofibrato en la concentración de C-HDL⁴ tendría como consecuencia, un aumento en la actividad sérica de PON 1. Esta idea, se fundamentó en la capacidad que tienen las HDL de reclutar a la PON 1 de la membrana de los hepatocitos³⁴, la PON 1 se sintetiza en los hepatocitos y queda anclada a la membrana celular por medio interacciones hidrofóbicas³⁴ y es entonces captada específicamente por las HDL.²² Por lo tanto, esperábamos que al aumentar la concentración de partículas HDL por efecto del ciprofibrato, la PON 1 anclada a los hepatocitos sería captada en mayor proporción. Como consecuencia de un mayor reclutamiento de la enzima, aumentarían de manera significativa sus concentraciones plasmáticas.

Nuestros resultados indican que existe una tendencia a incrementar los niveles de C-HDL durante el tratamiento con ciprofibrato. A pesar de esta tendencia y de todas las evidencias antes descritas, el tratamiento no incrementó la actividad de la PON 1 circulante determinada con fenilacetato (actividad ARE) como sustrato y por el contrario, tuvo una tendencia a incrementar cuando se determinó por paraoxón (actividad PON). Sabiendo que la actividad de la PON 1 determinada con fenilacetato como sustrato es mejor indicador de la masa activa de la enzima que cuando se determina con paraoxón²⁴, asumimos a partir de nuestros resultados que el ciprofibrato tiende a disminuir la cantidad de PON 1 en circulación. Para tratar de explicar este resultado, planteamos tres posibles razones:

1) El aumento de C-HDL no se debe a un aumento en el número de partículas, sólo al contenido de colesterol en ellas durante el tratamiento. Al no haber un incremento en el número de partículasceptoras, no habrá un mayor reclutamiento de la enzima.

A partir de resultados de nuestro laboratorio que indican que el ciprofibrato aumenta el número de partículas HDL, podemos descartar esta posibilidad; el aumento de C-HDL se asocia a un incremento en la concentración de la apo A-I plasmática, pero además modifica la estructura de la partícula. Tales modificaciones se manifiestan por el

desplazamiento de la distribución de tamaños de las HDL hacia las partículas de menor tamaño, tipo 3c, en detrimento de las HDL_{2b}. Sabiendo que las HDL pequeñas se estructuran con 2 unidades de apo A-I³⁸ mientras que las partículas grandes se estructuran con al menos 4 unidades, se deduce que el ciprofibrato aumenta el número de partículas HDL.

2) Los hepatocitos no tienen una reserva de la enzima en su membrana ni sintetizan una mayor cantidad de PON 1³⁴. No existen datos acerca de que el gen PON 1 tenga en su secuencia reguladora elementos de respuesta para PPAR α . Por lo tanto, no existen argumentos para pensar que hay un incremento o disminución en la síntesis de la PON 1 por efecto directo del ciprofibrato.

Por lo tanto, si la reserva de PON 1 no existe, y además, no aumenta su síntesis con el ciprofibrato, entonces esto explicaría que no exista un incremento en la actividad PON 1 sérica durante el tratamiento.

Esta explicación sólo se puede rechazar a la luz de los estudios cinético-metabólicos que se discuten a continuación.

3) La PON 1 se recluta del hepatocito a mayor velocidad pero se incrementa su catabolismo.

Como ya mencionamos, el ciprofibrato aumenta la cantidad de partículas HDL, resultado del incremento de las apolipoproteínas A-I y A-II.³⁹ Por lo tanto, es posible pensar que hay un mayor reclutamiento de la PON 1 hepática, lo que correspondería a un aumento en el nivel de PON 1 circulante. Sin embargo, el ciprofibrato también incrementa el catabolismo de las HDL³⁹ y muy probablemente de la PON 1. Esta propuesta se fundamenta en las evidencias de que la PON 1 se asocia físicamente a las HDL y que las HDL se pueden catabolizar por internalización de la partícula completa al hepatocito⁴⁰ incluyendo la PON 1.

Es así que el hipermetabolismo de las HDL limitaría el incremento de la PON 1 circulante, que debería notarse, en el aumento de la síntesis de partículas HDL pequeñas durante el tratamiento con ciprofibrato. Esta propuesta es congruente con la tendencia que tiene la actividad PON 1 a disminuir con el fármaco, tanto en nuestro estudio como en reportes previos.⁴² Para comprobar la hipótesis de que existe un hipermetabolismo de la PON 1 durante el tratamiento con ciprofibrato, se pueden realizar los estudios cinético-metabólicos de la enzima.

Con base en nuestros resultados, podría argumentarse que el ciprofibrato no tiene efecto, o ejerce un efecto negativo en el poder antioxidante de las HDL por la tendencia a disminuir la actividad PON 1. Sin embargo, el hecho de que la PON 1 tenga una mayor tasa de recambio durante el tratamiento con el fibrato puede ser benéfico; a mayor tasa de recambio, menor es el tiempo de residencia de la PON 1 en plasma, y esto puede favorecer a la estabilidad de la enzima. Por su parte, la estabilidad de la enzima es un factor primordial en sus propiedades ateroprotectoras²⁷, y en ese sentido el ciprofibrato tendría efectos favorables. Estudios de estabilidad de la enzima a lo largo del tiempo demostrarían la veracidad de esta propuesta.

Otros resultados importantes de este trabajo son los que demuestran una mejor asociación de la PON 1 con las HDL de menor tamaño. Las determinaciones que se realizaron mediante CLET, nos permiten observar el comportamiento de la actividad PON 1; antes del tratamiento se distribuye de manera irregular, mientras que durante la administración del ciprofibrato, la actividad PON 1 se asocia de forma homogénea a las fracciones HDL de menor tamaño. Estos resultados son congruentes con reportes previos acerca del potencial antioxidante de las HDL; a menor tamaño, mayor la capacidad de evitar la oxidación de las LDL *in vitro*, reforzando de esta manera, la hipótesis de que las HDL pequeñas son las que tienen mayor poder antiateroscleroso.¹⁵

En cuanto a los fosfolípidos, proporcionalmente el incremento en la fracción HDL es más importante que lo observado con el colesterol, sugiriendo que las partículas se enriquecen en fosfolípidos después del tratamiento. En este sentido, Jian *et al*⁴³ han demostrado que los fosfolípidos-HDL aumentan la capacidad de la lipoproteína de captar el colesterol excedente de las células. Por lo anterior, decidimos realizar este ensayo.

Se ha descrito que las partículas HDL pequeñas son las fracciones que promueven mejor el eflujo de colesterol. En vista del incremento en la proporción relativa de HDL_{3c} reportado por nuestro laboratorio durante el tratamiento con ciprofibrato y de su enriquecimiento con fosfolípidos, esperábamos un incremento en el porcentaje de eflujo de colesterol de células en cultivo. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que durante el tratamiento hay un ligero incremento del 6% en el eflujo de colesterol de células Fu5AH, aunque éste, no tiene significado estadístico. En contraste, Guerin *et al*³⁷ encontraron un incremento significativo del 13 % en el

eflujo de colesterol durante el tratamiento con ciprofibrato. Las poblaciones incluidas en nuestro estudio y en el de Guerin son comparables a nivel de perfil de lípidos y porcentajes de cambios en el mismo durante el ciprofibrato. Existen algunas diferencias, como el género y la edad promedio de los pacientes. No obstante, estos parámetros no son suficientes para explicar la falta de significado estadístico en nuestros estudios de eflujo. Dentro de nuestro grupo de pacientes, dos de ellos no respondieron al tratamiento, manteniendo sus niveles basales e incluso en uno de ellos disminuyó el C-HDL, mientras que en el grupo de inclusión de Guerin *et al*, no se conoce si existe este fenómeno porque sólo reportan los promedios grupales

En resumen, en el presente trabajo demostramos que a pesar del incremento del C-HDL que induce el ciprofibrato, la actividad PON 1 tiende a disminuir durante el tratamiento. Este efecto se acompaña de una asociación más homogénea de la enzima a las HDL de menor tamaño. Los efectos pro- o anti-aterosclerosos de comportamiento de la PON 1 durante el tratamiento con ciprofibrato, deben ser explorados en estudios posteriores.

IV. Bibliografía

1. von Eckardstein A, Huang Y, Assmann G. Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. *Current Opinion in Lipidology* 1994; 5: 404-416.
2. Yamashita S, Maruyama T, Hirano KI, Sakai N, Nakajima N, *et al.* Molecular mechanisms, lipoprotein abnormalities and atherogenicity of hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis* 2000; 152: 271-285.
3. Barter PJ, Brewer HB, Chapman MJ, Hennekens CH, Rader DJ, *et al.* Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 160-167.
4. Huesca-Gómez C, Franco M, Luc G, Montañó LF, Pérez-Méndez O, *et al.* Chronic hypothyroidism induces abnormal structure of high-density lipoproteins and impaired kinetics of apolipoprotein A-I in the rat. *Metabolism* 2002; 51: 443-450.
5. INEGI, SSA/DGEI, 2002.
6. Chapman M John. Fibrates in 2003: therapeutic action in atherogenic dyslipidaemia and future perspectives. *Atherosclerosis* 2003; 171: 1-13.
7. Martínez-González J, Llorente-Cortés V, Badimon L. Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas. *Rev Esp Cardiol* 2001; 54: 218-231.
8. Moss AJ, Goldstein RE, Marder VJ, Sparks CE, Oakes D, *et al.* Thrombogenic factors and recurrent coronary events. *Circulation* 1999; 99: 2517-2522.
9. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, 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.
10. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285: 2486-2497.
11. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; 106: 3143-3421.

12. Pérez-Méndez O, Bruckert E, Franceschini G, Duhal N, Lacroix B, *et al.* Metabolism of apolipoproteins AI and AII in subjects carrying similar apoAI mutations, apoAI Milano and apoAI Paris. *Atherosclerosis* 1999; 148: 317-325.
13. Franco M, Catro G, Romero L, Huesca-Gómez C, Pérez-Méndez O, *et al.* Decreased activity of lecithin:cholesterol acyltransferase and hepatic lipase in chronic hypothyroid rats: Implications for reverse cholesterol transport. *Mol Cell Biochem* 2003; 246: 51-56.
14. Elkhail L, Majd Z, Bakir R, Pérez-Méndez O, Castro G, *et al.* Fish-eye disease: structural and *in vivo* metabolic abnormalities of high-density lipoproteins. *Metabolism* 1997; 46: 474-483.
15. Kontush A, Chantepie S, Chapman J. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1-8
16. Pérez-Méndez O, Luc G, Posadas-Romero C. Concentraciones bajas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en plasma y enfermedad arterial coronaria. *Arch Inst Cardiol Méx* 2000; 70: 312-321.
17. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, *et al.* Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 1999; 22: 336-345.
18. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expresión of endotelial cell adhesión molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15: 1987-1994.
19. Ashby DT, Rye KA, Clay MA, Vadas MA, Gamble JR, *et al.* Factors influencing the ability of HDL to inhibit expression of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18: 1450-1455.
20. Nofer J-R, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 161; 2002: 1-16.
21. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. The paraoxonase gene family and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13:357-362.
22. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, *et al.* Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998; 101: 1581-1590.

23. Ruiz J, Blanche H, James RW, Garin MC, Vaisse C, *et al.* Gln-Arg192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet* 1995; 346: 869-872.
24. Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest* 1995; 96: 3005-3008.
25. Odawara M, Tachi Y, Yamashita K. Paraoxonase polymorphism (Gln192-Arg) is associated with coronary heart disease in Japanese noninsulindependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2257-2260.
26. Anurag P, Anuradha CV. Metformin improves lipid metabolism and attenuates lipid peroxidation in high fructose-fed rats. *Diabetes Obes Metab* 2002; 4: 36-42.
27. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, *et al.* Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18:1617-1624.
28. Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li W-F, *et al.* Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 1998; 394: 284-287.
29. Shih DM, Xia YR, Wang YP, Miller E, Castellani LW, *et al.* Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem* 2000; 275: 17527-17535.
30. Tward A, Xia YR, Wang XP, Shi YS, Park C, *et al.* Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation* 2002; 106: 484-490.
31. Hedrick CC, Thorpe SR, Fu MX, Harper CM, Yoo J, *et al.* Glycation impairs highdensity lipoprotein function. *Diabetologia* 2000; 43: 312-320.
32. Cascorbi I, Laule M, Mrozikiewicz PM, Mrozikiewicz A, Andel C, *et al.* Mutations in the human paraoxonase 1 gene: frequencies, allelic linkages, and association with coronary artery disease. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 755-761.
33. Castellani LW, Navab M, Lenten BJ, Hedrick CC, Hama SY, *et al.* Overexpression of apolipoprotein AII in transgenic mice converts high density lipoproteins to proinflammatory particles. *J Clin Invest* 1997; 100: 464-474.

34. Deakin S, Leviev I, Gomasaschi M, Calabresi L, Franceschini G, *et al.* 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.
35. Fruchart JC. Statines et fibrates. Modes d'action moléculaires et importance dans la prévention des maladies cardiovasculaires. Éditions John Libbey EUROTEXT. Paris, 2000; 39-54.
36. de la Llera Moya M, Atger V, Fournier N, Moatti N, Giral P, *et al.* A cell culture system for screening human serum for ability to promote cellular cholesterol efflux. Relations between serum components and efflux, esterification, and transfer. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1056-1065.
37. Guerin M, le Goff W, Frisdal E, Schneider S, Milosavljevic D, *et al.* Action of ciprofibrate in type IIB hyperlipoproteinemia: modulation of the atherogenic lipoprotein phenotype and stimulation of high-density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(8): 3738-3746.
38. Colvin PL, Moriguchi E, Barrett PH, Parks JS, Rudel LL. Small HDL particles containing two apo A-I molecules are precursors *in vivo* to medium and large HDL particles containing three and four apo A-I molecules in nonhuman primates. *J Lipid Res* 1999; 40: 1782-1792.
39. Huesca-Gómez C, Luc G, Duhal N, Lacroix B, Pérez-Méndez O, *et al.* Ciprofibrate increases synthesis and catabolism of HDL apo A-I and A-II in patients with hyperlipidaemia. *Atherosclerosis* 2004; 5(1): 65
40. Martínez LO, Jacquet S, Esteve JP, Rolland C, Cabezón E, *et al.* Ectopic b-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* 2003; 421: 75-79.
41. Deakin S, Leviev I, Gomasaschi M, Calabresi L, Franceschini G, *et al.* 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.
42. Turay J, Gmriaková V, Valka J. Changes in paraoxonase and apolipoproteína AI, B, CIII and E in subjects with combined familiar hyperlipoproteinemia treated with ciprofibrate. *Drugs Exp Clin Res.* 2000; 26(3): 83-8.

43. Jian B, de la Llera-Moya M, Ji Y, Wang N, Phillips MC, *et al.* Scavenger receptor class B type I as a mediator of cellular cholesterol efflux to lipoproteins and phospholipid acceptors. *J Biol Chem.* 273: 10 5599-606

V. Apéndices

Apéndice I

Aislamiento de lipoproteínas mediante ultracentrifugación secuencial.

Plasma fresco, que se obtuvo después de un ayuno de al menos 12 horas, en tubos con K₂EDTA de 7.2 mg. (BD Vacutainer) con capacidad para 4 mL.

Equipo y material:

- ◆ Ultracentrífuga Beckman Optima™ TLX 120 000 r.p.m.
- ◆ Rotor para ultracentrífuga Beckman TLA 110, 110 K r.p.m.
- ◆ Tubos para centrífuga de policarbonato Beckman 13X 56 mm, con capacidad para 3.2 mL.

Reactivos:

- ◆ KBr en cristales (Técnica Química).
- ◆ Soluciones de KBr de diferentes densidades, $\delta = 1.006$, $\delta = 1.019$, $\delta = 1.063$, $\delta = 1.21$, $\delta = 1.25$ g/mL.
- ◆ Amortiguador de fosfatos (PBS).

Procedimiento:

1. El plasma fresco obtenido del tubo correspondiente se ajusta con KBr sólido a las diferentes densidades, según la lipoproteína que se desee aislar.
2. Se colocan aproximadamente 2.3 mL de plasma ajustado a la densidad requerida, en los tubos de policarbonato y se lleva a volumen con la solución de densidad correspondiente a la lipoproteína a aislar.
3. Se centrifuga a 110 000 r.p.m. a 10°C, el tiempo es de acuerdo a la lipoproteína que se vaya a aislar.
4. Las lipoproteínas aisladas flotan y se recuperan por aspiración.
5. Se lavan con la solución de densidad indicada, según la lipoproteína. Y se centrifugan.
6. Una vez lavadas, se recuperan y se transfieren a una membrana de diálisis (Spectra/Por®).

9. Las lipoproteínas se dializan contra amortiguador PBS, durante 3 días (cambiar la solución cada 8 h aproximadamente).

lipoproteína	δ * flotación	δ sin. KBr	δ sin. KBr de lavado	t ⁵ centrifugación
VLDL	0.94 < δ < 1.006	1.006	1.006	105
LDL	1.006 < δ < 1.019	1.019	1.019	105
IDL	1.019 < δ < 1.063	1.063	1.063	130
HDL ₂	1.063 < δ < 1.120	1.12	1.21	155
HDL ₃	1.120 < δ < 1.210	1.21	1.25	155

*La densidad se expresa en g/mL. ⁵El tiempo se expresa en minutos.

Preparación de soluciones y amortiguadores:

- Amortiguador de fosfatos 10 mM, pH=7.4

NaH₂PO₄⁻ 0.287 g

NaHPO₄⁼ 1.122 g

NaCl 8.76 g

H₂O cbp 100 mL

- Soluciones de KBr de diferentes densidades, pH=7.4

Todas contienen 0.1 g/L EDTA, y se disuelven en 1 L de H₂O (desionizada)

solución	g KBr cristal
1.006	9.0 * de NaCl
1.019	27.86
1.063	94.26
1.12	184.46
1.21	337.36
1.25	409.84

Para pasar un plasma de δ_1 a una δ_2 , se le añade KBr sólido, según los gramos que se calculen mediante la fórmula. Nota: la condición es que $\delta_1 < \delta_2$.

$$g \text{ KBr} = \frac{\text{Volumen inicial}(\delta_2 - \delta_1)}{1 - (\delta_2 \times 0.312)}$$

Para pasar de un plasma de una δ_1 a una δ_2 , el volumen de solución diluyente se calcula con la fórmula. Nota: la condición es que $\delta_2 > \delta_1$, siendo δ_1 la densidad del plasma o solución y δ_2 la densidad del plasma o solución deseada.

$$\text{Vol. sol. diluyente} = \frac{\text{Volumen inicial}(\delta_2 - \delta_1)}{\delta_{\text{sol. Diluyente}} - \delta_2}$$

La solución diluyente, es una solución de NaCl de $\delta = 1.006 \text{ g/mL}$.

Apéndice II

Calibración de la columna de cromatografía líquida por exclusión de tamaño (CLET).

La muestra es suero fresco y filtrado.

Equipo y material:

- ◆ Filtros Swinnex-13 de MILLIPORE
- ◆ Membranas tipo HV para filtro MILLIPORE de 0.45 μm .
- ◆ Sistema de cromatografía Bio Logic Duo Flow de BIO RAD (Fig. 13).
 - Columna Bio-Prep SE1000/17, Pmax 430 P.S.I./30 Bar

Reactivos y amortiguadores:

- ◆ Amortiguador ARE para CLET

Procedimiento:

1. Se inyectan 300 μL la muestra en la válvula de entrada del CLET.
2. La muestra pasa por la columna y luego al colector que la dispensa fraccionada.
3. Las fracciones se colectan en tubos Eppendorff para su tratamiento.

Preparación del amortiguador ARE

	Conc. (mM)	Masa (g)
Tris	10	0.303
CaCl ₂	2	0.074
NaCl	1000	14.63
H ₂ O	cbp 250 mL	

Ajustar el pH con HCl, hasta tener un pH=8.

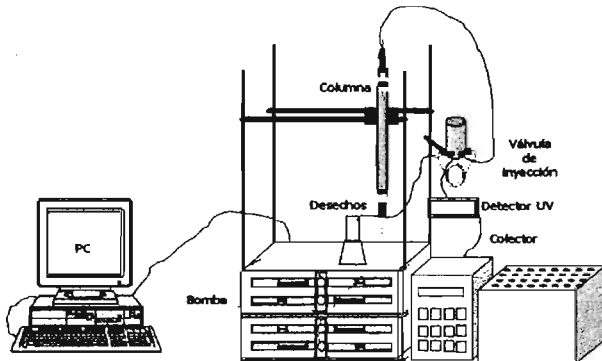


Fig. 13 Diagrama de CLET.

Apéndice III
Determinación de actividad PON y ARE

La muestra es suero fresco o congelado a -70°C . A la muestra se le harán diluciones diferentes de acuerdo al tipo de sustrato.

Equipo y material:

- ◆ Espectrofotómetro UNICAM
- ◆ Celdas (policarbonato y cuarzo)

Soluciones y amortiguadores:

- ◆ Amortiguador PON
- ◆ Amortiguador PON-NaCl
- ◆ Amortiguador ARE
- ◆ Dietil p-nitrofenil fosfato
- ◆ Fenilacetato

Procedimiento:

1. Preparar los sustratos.
2. Hacer la dilución correspondiente a las muestras:

Diluir la muestra 1:2 con eserina 10^{-5}M para actividad PON y PON NaCl, excepto cuando la muestra proviene de las fracciones de suero de la columna CLET, la muestra se añade sin dilución.

Diluir la muestra 1:4 en buffer ARE, excepto cuando son fracciones de la columna CLET, la muestra se diluye 1:2 con buffer ARE.

ACTIVIDAD PON BASAL

Poner $25\mu\text{L}$ de la muestra (previamente diluida) en 1 mL de sustrato PON

Mezclar y calibrar a cero, esperar 1 minuto para iniciar la cinética.

Seguir la cinética c/30 seg. por 3 minutos a $\lambda=412\text{ nm}$

ACTIVIDAD PON-NaCl

Poner $25\mu\text{L}$ de la muestra (previamente diluida) en 1 mL de sustrato PON-NaCl

Mezclar y calibrar a cero, esperar 1 minuto para iniciar la cinética.

Seguir la cinética c/30 seg. por 3 minutos a $\lambda=412\text{ nm}$

ACTIVIDAD ARE

Poner 10 μ L de la muestra (previamente diluida) en 1 mL de sustrato ARE

Mezclar y calibrar a cero, esperar 1 minuto para iniciar la cinética.

Seguir la cinética c/30 seg. por 3 minutos a $\lambda=270$ nm

*usar celda de cuarzo

Preparación de amortiguadores y sustratos:

- Amortiguador PON

Glicina	50 mM	0.375 g
CaCl ₂	1 mM	0.011 g
H ₂ O		cbp 100 mL

Ajustar a pH=10 con NaOH

- Amortiguador PON-NaCl

Glicina	50 mM	0.375 g
CaCl ₂	1 mM	0.011 g
NaCl	1 M	5.844 g
H ₂ O		cbp 100 mL

Ajustar a pH=10 con NaOH

- Amortiguador ARE

Tris	20 mM	0.315 g
CaCl ₂	0.9 mM	0.010 g
H ₂ O		cbp 100 mL

Ajustar a pH= 8 con HCl

Nota: Los sustratos se prepararán 15 min. antes de realizar la determinación. Mantener en frío ($\approx 4^\circ$ C) y proteger de la luz.

- Sustrato PON basal

Agregar 3 μ L de paraoxon en 10 mL de buffer PON

- Sustrato PON-NaCl

Agregar 3 μ L de paraoxon en 10 mL de buffer PON –NaCl

- Sustrato de ARE

Agregar 1.27 μ L de fenilacetato en 10 mL de buffer ARE

Cálculos de la actividad enzimática

Actividad PON y PON-NaCl (nmol p-nitrofenol/min/mL suero)

ϵ paraoxon= 18 290 M⁻¹cm⁻¹

$$\text{Actividad} = \frac{(4.1 (\Delta \text{DO}))}{\epsilon} \times 10^7 \times \text{dilución muestra}$$

Actividad ARE (μ mol fenol/min/mL suero)

ϵ fenilacetato=1310 M⁻¹cm⁻¹

$$\text{Actividad} = \frac{(1.01 (\Delta \text{DO}))}{\epsilon} \times 10^5 \times \text{dilución muestra}$$

dilución muestra, es el inverso de la dilución tal que, si la muestra se diluyó 1:5, se tomará como factor 5, y de la misma forma en las diferentes diluciones.

Nota: La muestra del suero se diluyó 1:2.

Apéndice IV

EFLUJO DE COLESTEROL

La muestra puede ser suero o plasma diluido al 2.5 % v/v con MEM(Medio mínimo esencial de Eagle).

Equipo y material:

- ◆ Campana de flujo laminar (marca)
- ◆ Placas para ELISA de 96 pozos
- ◆ Micropipetas

Reactivos:

- ◆ HDL₃ (100 µg/mL)
- ◆ Buffer HEPES o PBS
- ◆ Tripsina
- ◆ Azul de Tripiano
- ◆ 1^a,2^a(n)-³H colesterol con actividad específica de 40-60 Ci/mmol
- ◆ Etanol
- ◆ NaOH 0.1 M
- ◆ Medio completo
- ◆ Línea celular Fu5AH
- ◆ SBF (Suero Bovino Fetal)

Procedimiento:

1. Marcar las células Fu5AH.

Colocamos ½ µCi/pozo de 1^a,2^a(n) ³H-Colesterol para las cajas de 24 pozos en tubos de vidrio estériles

- El ³H Colesterol es evaporado con N₂
- Añadir 1 mL de etanol en la campana y cerrar con tapón estéril
- Poner 45 a 60 min en baño María 60 °C
- Evaporar con N₂
- Añadir 50µL de etanol en la campana
- Poner 15 a 30 min. en baño maría a 60 °C

- Preparar el volumen SBF necesario para una concentración final del 5% en el medio marcado y diluirlo a la mitad con MEM (1 mL caja 24 pozos)
- Añadir el SBF al 50% en el tubo conteniendo los 50 μL de etanol y el ^3H colesterol.
- Agitar, y dejar 30 min. en baño María a 37°C
- Aforar enseguida con MEM para alcanzar el volumen final deseado
- Distribuir el medio radiactivo sobre las células a razón de 1mL/pozo
- Dejar el medio marcado por 3 días.

2. Preparación de las células para el eflujo.

24h antes del eflujo quitar el medio radiactivo y lavar 3 veces las células con 1mL de HEPES, poner MEM+ ASB (albúmina sérica bovina) a 0.5% (1 mL por pozo).

3. Eflujo

- Quitar el MEM+ ASB a 0.5%.
- Lavar las células con HEPES (1 mL/pozo)
- Incubar las muestras diluidas a razón de 1 mL/pozo para las cajas de 24 pozos.
- Colocar un testigo negativo (MEM)
- Colocar un testigo positivo (con HDL₃ 100 μg de proteína/mL)
- Colocar un testigo interno (un pool de plasma humano normolipidémico)
- Colocar un testigo de carga o tiempo 0.
- Incubar 4 horas
- Recuperar el medio
- Lavar 3 veces las células con HEPES (1 mL/pozo)
- Recuperar las células con 1mL de NaOH 0.1M por pozo.

La mitad de los volúmenes (500 μL) de medio y 500 μL de células son puestos en frascos y se les agrega 3 mL de líquido de centelleo.

Cálculo del % de eflujo de colesterol.

$$\frac{\text{cpm en el medio} \times 100}{\text{cpm (medio+células)}}$$

Donde c.p.m. son las cuentas por minuto.

Preparación del medio:

MEM 95%

SBF 7.5%

Glutamina 2 mM

Penicilina 100 U/mL

Estreptomicina 100 µg/mL

Bicarbonato 2 g/L

Cultivo y mantenimiento de las células Fu5AH:

A partir de un frasco de mantenimiento a confluencia

Resembrar según la necesidad:

25 000 células /mL con 1mL de medio por pozo para las botellas de 24 pozos de 10mm de diámetro (la confluencia es obtenida 3 días después).

-Es necesario saber que, en general, una botella de mantenimiento tiene 20 000 000 de células.

“El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir”

Albert Einstein

Gracias a Dios por permitirme dar este paso, y también por dejarme descubrirlo cada día.

“No existe el amor, sino las pruebas de amor, y la prueba de amor a aquel que amamos es dejarlo vivir libremente”

Anónimo

A José, Mary y Alba: gracias por darme tantas pruebas de amor. Los amo.

“El amor es lo único que crece cuando se reparte”

Antoine de Saint-Exupery

A Conchis y Chanita, mis abuelas, por repartir su amor con nosotros.

“La idiotez es una enfermedad extraordinaria, no es el enfermo el que sufre por ella, sino los demás”

François M A Voltaire

Oscar, Claus, y Ely, principalmente ustedes que han sufrido por la enfermedad... y además quiero agradecerles por brindarme su amistad y compartir sus conocimientos.

También gracias a todos los que de una u otra forma participaron para realizar este proyecto, compañeros, vecinos de laboratorio, técnicos y gente de intendencia.

“Escribe en la arena las faltas de tu amigo”

Pitágoras de Samos

A todos mis amigos, espero que si no es en la arena, escriban mis faltas en el hielo... los quiero, a pesar del tiempo. Y los que ya no están en este mundo, seguirán en mi corazón.

“La verdad es que amamos la vida, no porque estemos acostumbrados a ella, sino porque estamos acostumbrados al amor”

Friedrich W. Nietzsche.

A toda mi familia, y a los que no siendo de mi sangre, han sido como de mi familia.