



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

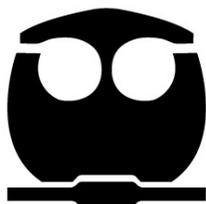
**ESTUDIO DE LOS FACTORES DE REMODELACIÓN
DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD:
EFECTO DE LOS AGONISTAS PPAR γ**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

MARIANA MONTER GARRIDO



MÉXICO, D.F.

2007



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 Profa. Graciela Evangelina Nava Díaz
Vocal Profa. María Eugenia Torres Márquez
Secretario Prof. Óscar Armando Pérez Méndez
1er. Suplente Profa. María del Socorro Cecilia Reyna Rodríguez
2º. Suplente Profa. Nora Andrea Gutiérrez Nájera

Sitio en donde se desarrolló el tema: Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, Departamento de Fisiología

Dr. Óscar Armando Pérez Méndez
Asesor del tema

Mariana Monter Garrido
Sustentante

ESTE PROYECTO FUE FINANCIADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) No. 47275. AGRADEZCO ADEMÁS LA BECA OTORGADA DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO.

A la memoria de mis abuelos, Hazael, Chucha y Sofía.

A mi familia, por todo su apoyo y ser un ejemplo.

A mis amigos (esperando no tener omisiones, en estricto orden de aparición) Dorrita, Pau, Octa, Miry, Mo, Nandito, Paola, por su cariño, compañía y apoyo incondicional.

Óscar y Eli, gracias por compartir su conocimiento y experiencia conmigo, su confianza, consejos y amistad.

A todas las personas que han participado de alguna manera en mi formación tanto académica como personal.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	6
ANTECEDENTES.....	8
1. Lipoproteínas.....	8
1.1 Clasificación de las lipoproteínas.....	10
2. Lipoproteínas de alta densidad (HDL).....	12
3. Metabolismo de las lipoproteínas.....	12
3.1 Metabolismo de las HDL.....	14
4. Enfermedad aterosclerosa coronaria y HDL.....	15
4.1 Actividad antioxidante de las HDL.....	17
5. Tiazolidinedionas.....	17
5.1 Mecanismo de acción de las tiazolidinedionas.....	18
5.2 Pioglitazona vs Rosiglitazona.....	19
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVO GENERAL.....	22
OBJETIVOS PARTICULARES.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
Animales.....	23
Recolección de muestras.....	23
Análisis de laboratorio.....	23
Aislamiento y análisis de subpoblaciones de HDL.....	24
Determinación de actividad de enzimas y proteínas.....	24
a) Actividad LCAT.....	24
b) Actividad CETP.....	25
c) Actividad PLTP.....	25
d) Actividad paraoxonasa.....	25
Análisis estadístico.....	26
RESULTADOS.....	27
1. Perfil de lípidos y glucosa.....	27

2. Distribución de tamaños de HDL.....	28
3. Composición química y de apolipoproteínas de las HDL.....	32
4. Actividad de los factores plasmáticos que intervienen en el TRC.....	35
5. Efecto sobre la actividad paraoxonasa.....	36
DISCUSIÓN.....	38
BIBLIOGRAFÍA.....	43
ANEXO 1.....	49
ANEXO 2.....	51
ANEXO 3.....	52
ANEXO 4.....	53

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
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
SR-BI:	Receptor scavenger clase B tipo I
Tg:	Triacilgliceroles
TRC:	Transporte reverso del colesterol
VLDL:	Lipoproteínas de muy baja densidad

RESUMEN

La enfermedad aterosclerosa coronaria es la primera causa de mortalidad en los países desarrollados y la segunda en nuestro país. Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que existe una correlación inversa entre los niveles de colesterol de HDL (C-HDL) y el riesgo de desarrollar aterosclerosis. Esta relación inversa se ha tratado de explicar por el papel que juegan las HDL en el transporte reverso de colesterol (TRC), además de sus propiedades antiaterogénicas, como su capacidad antioxidante, debida a su asociación con la enzima paraoxonasa 1 (PON). Sin embargo los mecanismos moleculares no han sido bien establecidos.

La rosiglitazona y la pioglitazona, son agonistas de una clase de receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), específicamente de la isoforma γ . Se han reportado diversos efectos de estos fármacos sobre el C-HDL, mostrando que la pioglitazona incrementa estos niveles, mientras que la rosiglitazona no los afecta. Tales observaciones sugieren que ambos fármacos tienen efectos diferenciales sobre el metabolismo de las HDL. Dentro de las proteínas cuya expresión podría ser modificada por las tiazolidinedionas están las que participan durante el TRC, la lecitina:colesterol acil transferasa (LCAT), y las proteínas de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) y fosfolípidos (PLTP).

Para determinar si los agonistas PPAR γ tienen efectos sobre la distribución de tamaños composición y propiedades antiaterogénicas de las HDL, se administraron ambos rosiglitazona o pioglitazona por vía oral a conejos Nueva Zelanda. Nuestros resultados muestran que la rosiglitazona incrementa los niveles plasmáticos de triacilgliceroles y la pioglitazona aumenta los de C-HDL. En cuanto a la distribución de tamaños de HDL, ambos fármacos aumentan la proporción de la subpoblación 3c aproximadamente en un 120%; la rosiglitazona incrementa las partículas 3b aproximadamente en un 200% mientras que la pioglitazona lo hace 4 veces menos. La subpoblación 2a sufre una disminución significativa con pioglitazona, mientras que la rosiglitazona disminuye la proporción de la subpoblación 2b del 50.6% al 38.9%. Asociados a los cambios en la distribución de tamaños, se presentan efectos diferenciales sobre la composición de las HDL, particularmente en el porcentaje de fosfolípidos; la rosiglitazona lo incrementa, mientras

que la pioglitazona causa una disminución tanto de fosfolípidos como de proteína total. La composición de apolipoproteínas se ve modificada únicamente con rosiglitazona, aumentando la proporción de apo AI y disminuyendo la de apo C's. En cuanto a los factores plasmáticos de remodelación de las HDL, no se ven modificados con ninguno de los dos fármacos, sugiriendo que no son el origen de los cambios en cuanto a estructura y composición de estas lipoproteínas. Finalmente, en este estudio se demostró que la rosiglitazona incrementa aproximadamente un 22% la actividad de la PON, mientras que la pioglitazona no tiene efectos en este parámetro. En resumen, los agonistas PPAR γ afectan de manera diferencial la distribución de tamaños, composición y asociación de paraoxonasa a las HDL. Sin embargo, pero estos cambios no tienen origen en modificaciones de los factores de remodelación intravascular, LCAT, CETP y PLTP. En consecuencia, existen otros factores, posiblemente receptores celulares, cuya expresión se modifique por efecto de las tiazolidinedionas, y esto sea el origen de los cambios en la estructura y funcionalidad de las HDL descritos en el presente trabajo.

ANTECEDENTES

1. Lipoproteínas.

Los lípidos son moléculas relativamente insolubles en medios acuosos, y para ser transportadas en el plasma deben formar complejos macromoleculares y pseudomicelares con proteínas. A estos complejos se les llama lipoproteínas.

Las lipoproteínas (Fig. 1) se encuentran formadas básicamente por una monocapa de lípidos anfipáticos (fosfolípidos y colesterol libre) que presentan sus grupos polares hacia el medio acuoso. Esta monocapa se encuentra estabilizada por proteínas que reciben el nombre de apolipoproteínas (apo). En el interior de las lipoproteínas se encuentran los lípidos no polares (triacilgliceroles y ésteres de colesterol), evitando así la interacción con el medio acuoso.

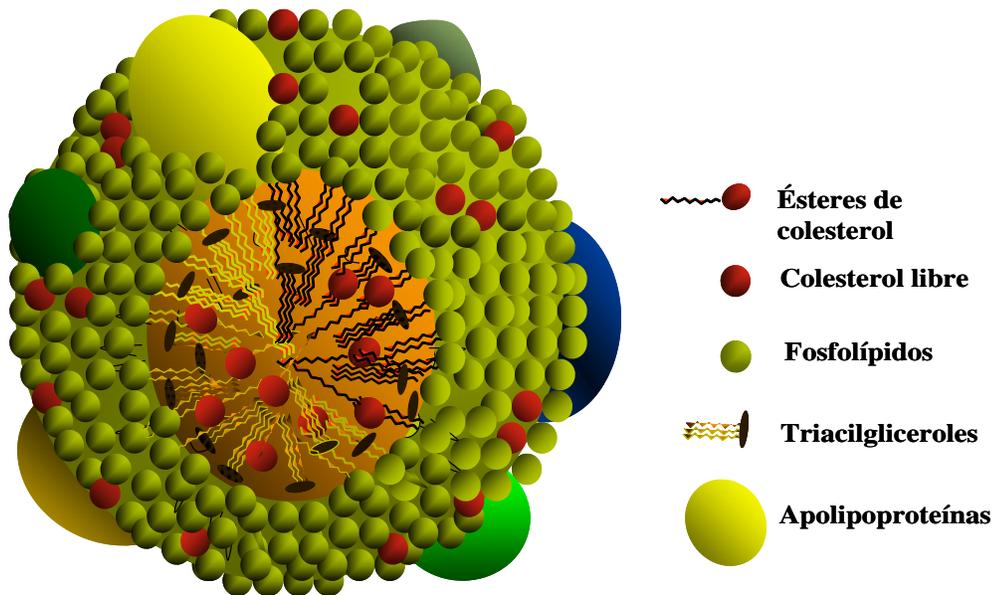


Fig. 1. Composición general de las lipoproteínas. Se muestran los lípidos hidrofóbicos del núcleo, en su superficie los lípidos anfipáticos y las apolipoproteínas que estabilizan a la lipoproteína.

En el Cuadro 1 se presentan las características más importantes de algunas apolipoproteínas.

Cuadro 1. Características de las apolipoproteínas ¹.

Apo	P.M.	pI	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	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.

Apo: Apolipoproteína, P.M: Peso molecular, pI: Punto isoelectrico, 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.

1.1 Clasificación de las lipoproteínas.

Las lipoproteínas se pueden clasificar en base a diferentes propiedades, tales como su densidad de flotación, movilidad electroforética y contenido de apolipoproteínas.

a) De acuerdo a su densidad se conocen cinco clases:

- Quilomicrones: Son las lipoproteínas de mayor tamaño y densidad menor a 0.94 g/mL. Tienen un alto contenido en triacilgliceroles 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): $0.94 < \text{densidad} < 1.006$ g/mL. Contienen principalmente triacilgliceroles, apo B-100, C-I, C-II, C-III y E.
- Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, Intermedie Density Lipoproteins): $1.006 < \text{densidad} < 1.019$ 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): $1.019 < \text{densidad} < 1.063$ g/mL. Tienen un alto contenido en colesterol y apo B-100.
- Lipoproteínas de alta densidad (HDL, High Density Lipoproteins): $1.063 < \text{densidad} < 1.210$ g/mL. Estas partículas tienen un alto contenido en proteínas y fosfolípidos, además de colesterol. Su principal apolipoproteína es la A-I, además contienen A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E. Las HDL, a su vez, pueden ser separadas en dos subpoblaciones:

- HDL₂: $1.063 < \text{densidad} < 1.120$ g/mL.

- HDL₃: $1.120 < \text{densidad} < 1.210$ g/mL.

- b) Por su migración electroforética se distinguen tres tipos de lipoproteínas: α , β y pre- β .
- c) De acuerdo al contenido en apolipoproteínas se conocen dos poblaciones: las lipoproteínas que contienen apo B, (VLDL, IDL y LDL); y las que contienen apo A-I, donde se clasifican las HDL.

En el Cuadro 2 se resumen algunas de las características de las diferentes lipoproteínas.

Cuadro 2. Propiedades de las lipoproteínas plasmáticas²

Lp	Mov. Electroforética	Tamaño (nm)	Cont. de Prot. (%)	Cont. de Plp (%)	Cont. de Tg (%)	Cont. de CL (%)	Cont. de CE (%)
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, Tg: Triacilglicerolos, Prot: proteína, CL: colesterol libre; CE: colesterol esterificado.

2. Lipoproteínas de alta densidad (HDL).

Las HDL son las lipoproteínas que contienen 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.

En función de su tamaño, las dos poblaciones, HDL₂ y HDL₃, se subdividen en: HDL_{2b} con diámetros de 9.7-12 nm, HDL_{2a}, de 8.8-9.7 nm, HDL_{3a} 8.2-8.8 nm, HDL_{3b} 7.8-8.2 nm y HDL_{3c} de 7.2-7.8 nm¹.

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 kDa. Estas HDL son sintetizadas en el hígado, desempeñan un papel muy importante en la captación de colesterol de las células periféricas como se describe más adelante.

3. Metabolismo de las lipoproteínas.

La composición de las lipoproteínas plasmáticas se modifica continuamente como resultado del intercambio dinámico de lípidos que existen entre ellas durante su metabolismo intravascular. Una gran variedad de enzimas, como la LCAT; proteínas, como la proteína de transporte de ésteres de colesterol (CETP) y la de transporte de fosfolípidos (PLTP) (denominados factores plasmáticos de remodelación intravascular) están involucrados en este metabolismo, influyendo en la concentración de los lípidos y favoreciendo el transporte, o la hidrólisis de los mismos. Asimismo, algunos receptores de membrana como

el receptor scavenger clase B tipo I (SR-BI), el transportador A1 de membrana dependiente de ATP (ABCA-1), el CD36 y el receptor para apolipoproteínas B/E (apo-B/E r) participan en el metabolismo y remodelación de lipoproteínas. En el Cuadro 3 se presentan algunas características destacables de las enzimas y proteínas de transporte que intervienen en el metabolismo de las lipoproteínas.

Cuadro 3. Enzimas y proteínas involucradas en el metabolismo de las lipoproteínas ^{2,3}

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 triacilglicerolos 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 triacilglicerolos 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 triacilglicerolos 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 acilo-transferasa; 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, los triacilgliceroles y los 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 ingeridos en la dieta, en donde intervienen los quilomicrones; la vía endógena, a partir de la síntesis hepática de VLDL; y finalmente el transporte reverso del colesterol (TRC), donde participan las HDL.

3.1 Metabolismo de las HDL

El transporte reverso del colesterol (TRC) se define como el regreso del exceso de colesterol proveniente de las células periféricas hacia el hígado para su excreción o reciclaje, mecanismo en el cual participan las HDL, confiriéndoles propiedades antiaterogénicas, ya que por medio de este pueden evitar la formación de la placa ateromatosa³.

La primera etapa del TRC (Fig. 2) es el eflujo de colesterol a través de diversos mecanismos de las células hacia las HDL pequeñas, tipo pre- β o HDL₃. Una vez que el colesterol se encuentra en las HDL es esterificado por la enzima plasmática LCAT y posteriormente se internaliza, dando origen a HDL de mayor tamaño y menos densas, tipo HDL₂. A partir de ahí, el colesterol esterificado puede tomar dos caminos: 1) Puede ser eliminado directamente de la lipoproteína por un mecanismo en el cual interviene el receptor hepático SR-BI, que remueve de manera selectiva los ésteres de colesterol, generando 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 CETP el colesterol de las HDL₂ es intercambiado por triacilgliceroles con lipoproteínas ricas en apo B como VLDL e IDL, por una parte y por la otra, las apos C's y E pasan a los quilomicrones y VLDL. Los triacilgliceroles captados por las HDL₂ son hidrolizados por la lipasa hepática (LH), y en asociación con la actividad de la PLTP los remanentes de HDL son remodelados 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 o excretado a través de las vías biliares⁴ (Fig. 2).

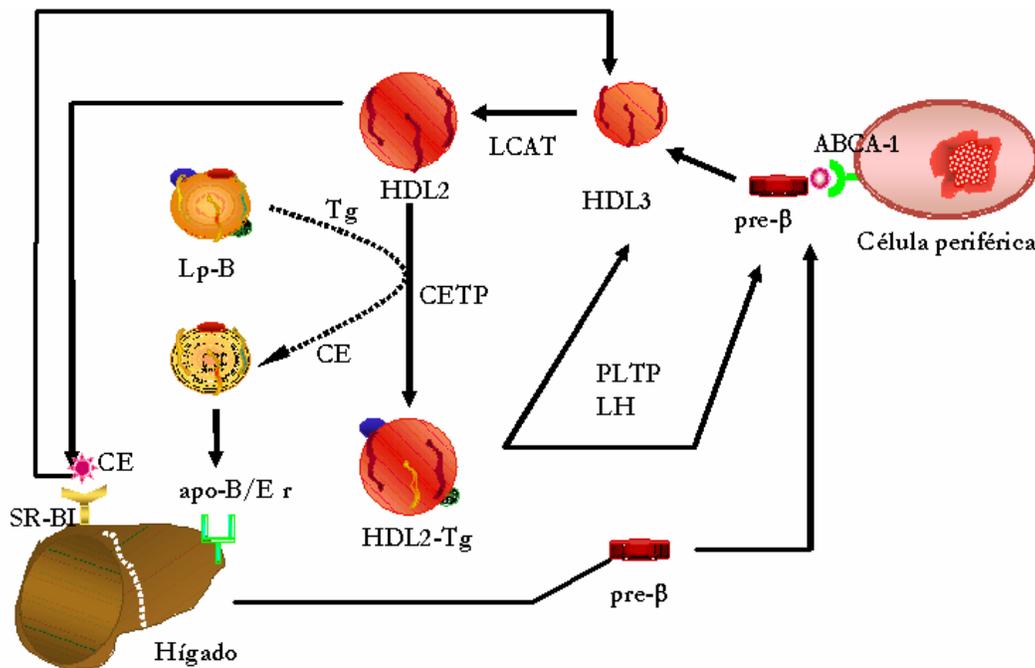


Fig. 2. Transporte Reverso del Colesterol. Lp-B: Lipoproteínas que contienen apo B (VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad, LDL, lipoproteínas de baja densidad y Qm, Quilomicrones). Tg: triacilglicerol; LCAT: Lecitina colesterol acilo transferasa; LH: Lipasa hepática; CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol; PLTP: Proteína de transferencia de fosfolípidos; SR-BI: Receptor scavenger BI; ABCA-1: Transportador de membrana dependiente de ATP.

4. Enfermedad aterosclerosa coronaria y HDL.

La enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC) es la primera causa de mortalidad en los países desarrollados y es la segunda causa de muerte en la población adulta en nuestro país, después de la diabetes mellitus (DM) ⁵. Por lo tanto, el estudio de su diagnóstico y tratamiento es prioritario para combatir este mal.

La EAC puede comenzar con la infiltración de lipoproteínas de baja densidad (LDL) al espacio subendotelial en donde, al existir un ambiente de estrés oxidativo, ocurre una peroxidación de los lípidos contenidos en las LDL. Las LDL oxidadas son factores quimiotácticos para monocitos circulantes, que atraviesan el endotelio vascular y se transforman en macrófagos, que son capaces de fagocitar las LDL oxidadas a través de receptores denominados “scavenger”. La falta de maquinaria enzimática suficiente para degradar los lípidos y lipoperóxidos, tiene como consecuencia un acúmulo 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. Las células espumosas constituyen las etapas tempranas de formación del ateroma (Fig. 3).

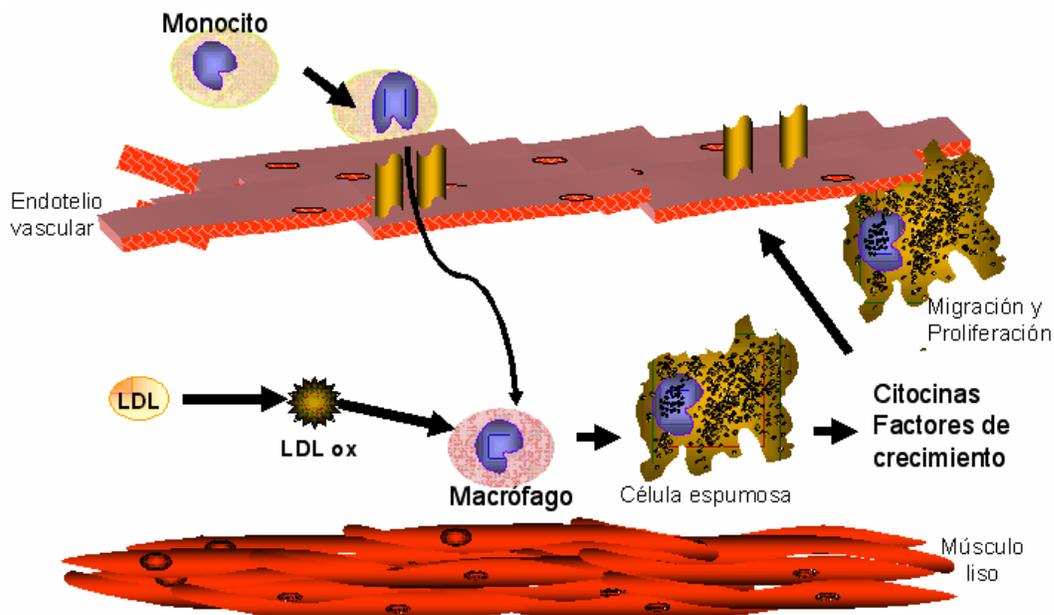


Fig. 3. Esquema de las primeras etapas en la formación de la placa ateromatosa. En zonas donde existe disfunción endotelial se facilita la infiltración de LDL al espacio subendotelial, donde sufren procesos de modificación, generando LDL oxidadas (LDLox). Los monocitos se adhieren al endotelio activado 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 LDLox. Los macrófagos captan LDLox 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.

Diversos estudios han demostrado la correlación inversa que existe entre la concentración plasmática del colesterol de las HDL (C-HDL) y el riesgo de desarrollar EAC, lo que sugiere una asociación causal entre ambos ⁶. A partir de esta correlación negativa, se ha postulado que las HDL desempeñan una función antiaterosclerosa. Uno de los mecanismos por medio del cual las HDL evitan la formación del ateroma, es el transporte reverso de colesterol (TRC), previamente descrito, además de otros mecanismos antiaterogénicos de las HDL, tales como sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

4.1 Actividad antioxidante de las HDL.

Varios de los componentes de las HDL participan en sus propiedades antioxidantes, entre ellos algunas apolipoproteínas y particularmente la paraoxonasa 1 (PON), enzima asociada físicamente a las HDL por medio de interacciones hidrofóbicas entre la región N-terminal de la proteína y los fosfolípidos de la lipoproteína ⁷. Diversos estudios epidemiológicos han demostrado una correlación entre la paraoxonasa y la incidencia de enfermedad aterosclerosa coronaria ⁸⁻¹⁰. Existe además la evidencia de que las HDL aisladas de ratones que no expresan el gen PON, carecen de la capacidad de evitar la oxidación de las LDL. Otros estudios *in vitro* han demostrado la disminución de la activación de monocitos por LDL oxidadas en presencia de PON. Las bases moleculares que explican la relación inversa entre la PON y la aterosclerosis, se han ubicado en la capacidad que posee la enzima de eliminar los lipoperóxidos asociados a lipoproteínas, dando lugar a los alcoholes correspondientes, que son inactivos desde el punto de vista de la peroxidación, la quimiotaxis y del proceso inflamatorio en general.

La composición de las HDL es un factor determinante en la asociación de la paraoxonasa a éstas. Se ha demostrado que las HDL de ratones transgénicos para apo A-II humana carecen de capacidad para evitar la oxidación. Esto sugiere que esta apolipoproteína desplaza a la PON en la superficie de la partícula ¹¹. El contenido de colesterol libre y fosfolípidos en las HDL también es determinante en el reclutamiento de la enzima de la membrana del hepatocito, 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 ¹².

5. Tiazolidinedionas.

Las tiazolidinedionas (TZD), son fármacos antidiabéticos que actúan disminuyendo la resistencia a la insulina y los niveles de ácidos grasos por un incremento tanto en la β -oxidación, como en su captación hepática. En estudios epidemiológicos se ha reportado que las TZD inducen incrementos en los niveles plasmáticos de C-HDL, sugiriendo que afectan

el metabolismo de estas lipoproteínas^{13, 14}. Las dos TZD comerciales son la pioglitazona y la rosiglitazona.

5.1 Mecanismo de acción de las tiazolidinedionas.

Las tiazolidinedionas son ligandos sintéticos de una subclase de receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs). 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 hidroxioctadecadienoico (9 y 13-HODE)^{15,16}. Los PPAR γ se expresan principalmente en tejido adiposo, hepatocitos, células endoteliales, macrófagos y células vasculares de músculo liso.

En el núcleo de la célula (Fig. 4), 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 para la proliferación de peroxisomas (PPER). Los elementos de respuesta están constituidos por nucleótidos que actúan como secuencias de regulación de la expresión de ciertos genes¹⁶.

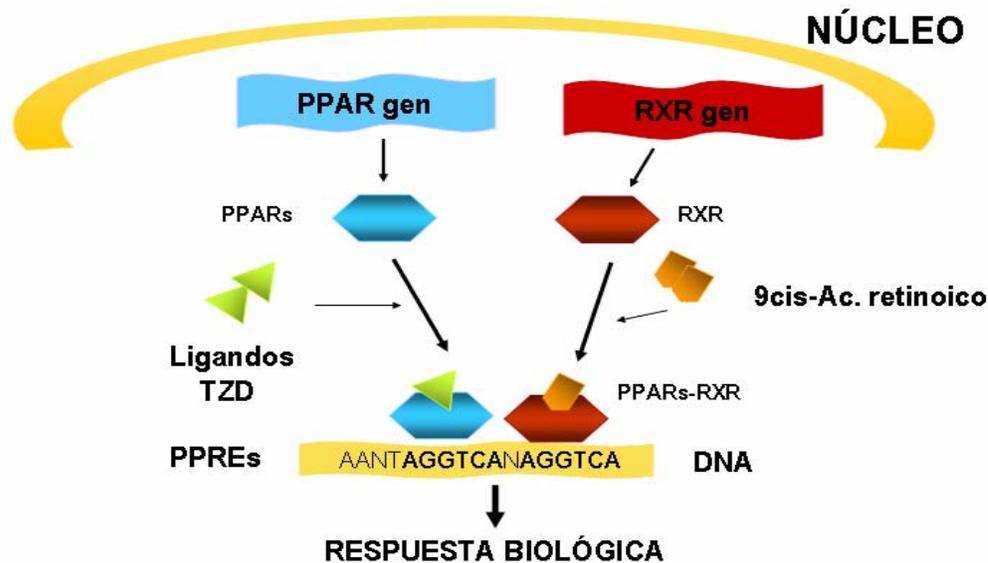


Fig. 4. Mecanismo de acción de los PPAR γ . TZD: Tiazolidinedionas, PPAR: Receptor activado por proliferador de peroxisomas; RXR: Receptor del ácido 9-cis retinoico.

Entre los genes que regulan las tiazolidinedionas vía los PPAR γ , se encuentran los que controlan la homeostasis de la glucosa; en particular el gen del receptor GLUT-4¹⁷. También se involucran en la regulación de genes implicados en el metabolismo de los lípidos, tales como el de la lipoproteína lipasa (LPL), estimula la expresión del receptor SR-BI, incrementa la expresión del ABCA-1 (ver Cuadro 3), vía el incremento de la expresión de LXR- α e incrementa la expresión de apo E¹⁸.

5.2 Pioglitazona vs. Rosiglitazona.

Los niveles de colesterol-LDL (C-LDL) no se ven modificados significativamente tras el tratamiento con pioglitazona, sin embargo, en diferentes estudios se ha observado que la rosiglitazona incrementa este valor de un 8 a un 16%¹⁹. En cuanto al colesterol-HDL (C-HDL) existen resultados controversiales, ya que algunos estudios reportan que ambos fármacos aumentan estos niveles²⁰, mientras que otros revelan que solamente la pioglitazona lo hace²¹.

En general los estudios coinciden en los efectos de estos medicamentos sobre los niveles de triacilgliceroles en plasma, mostrando que la pioglitazona los disminuye, mientras que la rosiglitazona los aumenta^{20,22}.

Las diferencias entre la rosiglitazona y la pioglitazona en las modificaciones de los niveles de C-HDL, sugieren que estos fármacos tienen distintos efectos sobre el metabolismo de las HDL, dando lugar a diferentes tipos de partículas. En vista de que los factores de remodelación intravascular de las HDL tienen un papel primordial en su metabolismo, se puede postular que la expresión de estas proteínas sufre una afectación diferencial por parte la rosiglitazona y la pioglitazona. Sin embargo, no se han realizado estudios al respecto.

HIPÓTESIS

La rosiglitazona y la pioglitazona modifican de manera diferente las actividades de los factores plasmáticos involucrados en la remodelación de las HDL, lo que se verá reflejado en distintas distribuciones de tamaños, composición y función antiaterosclerosa de estas lipoproteínas.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto de los agonistas PPAR γ , rosiglitazona y pioglitazona sobre los factores plasmáticos (CETP, LCAT y PLTP) que participan en la remodelación de las HDL, y sus repercusiones sobre la distribución de tamaños, composición y funcionalidad de estas lipoproteínas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar el perfil de lípidos en conejos antes y durante el tratamiento con tiazolidinedionas.
- Determinar el efecto de los agonistas PPAR γ sobre la distribución de tamaños y composición de las HDL.
- Establecer las modificaciones en la actividad paraoxonasa 1 antes y durante el tratamiento con tiazolidinedionas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron conejos macho, raza Nueva Zelanda de 3.5-4,0 Kg de peso. Se formaron 2 grupos de estudio (n = 12 para cada grupo), todos recibieron alimentación *ad libitum* diariamente. Un grupo recibió rosiglitazona (Avandia, Glaxo Smith-Kline) en suspensión acuosa, en dosis de 0.34 mg/kg. El otro grupo recibió pioglitazona (Zactos, Ely Lilly de México) en dosis de 1.75 mg/kg de peso corporal. El tratamiento se administró vía oral, diariamente, durante 4 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 (10 µL/mL). El plasma se separó centrifugando a 2500 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

Las concentraciones de colesterol total, triacilgliceroles, glucosa, y fosfolípidos, se determinaron mediante métodos enzimáticos-colorimétricos comerciales. El colesterol de HDL se determinó en el sobrenadante, después de precipitar de manera selectiva las lipoproteínas que contienen apo B con una solución de sulfato de dextrán/magnesio (100 µL/mL de plasma). La determinación de proteínas totales se realizó por el método de Lowry²³. (Apéndice 1)

El análisis de estos parámetros se realizó antes y después de 4 semanas de tratamiento con ambos medicamentos.

Aislamiento y análisis de subpoblaciones de HDL

Las HDL fueron separadas por ultracentrifugación secuencial 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 100,000 rpm durante 2 h 30 min. Posteriormente se aislaron las HDL ajustando con KBr sólido a una densidad =1.25 g/mL, a 100,000 rpm durante 3 h; 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 Tris 0.09 M, ácido bórico 0.08M, EDTA 3mM, pH 8.4 (Amortiguador TBE).

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)²⁴. Las bandas se tiñeron con azul de Coomasie y finalmente se analizaron por densitometría para determinar los diámetros de las HDL (HDL_{2b} 10.58-12.36 nm, HDL_{2a} 9.94-10.58 nm, HDL_{3a} 8.98-9.94 nm, HDL_{3b} 8.45-8.98 nm, HDL_{3c} 7.90-8.45 nm)²⁵. (Apéndice 2)

La composición de apolipoproteínas se determinó por medio de una electroforesis en condiciones desnaturalizantes con SDS, en gradiente de poliacrilamida 4-21%. Las bandas de cada apolipoproteína se tiñeron con azul de Coomasie y finalmente se analizaron por densitometría. Los resultados se expresan como el porcentaje de cada apolipoproteína con respecto al total de proteína de HDL. Las apolipoproteínas C-II y C-III se reportan juntas como porcentaje de apo C's. (Apéndice 3)

Determinación de actividad de enzimas y proteínas

a) ACTIVIDAD LCAT

La actividad de LCAT se determinó utilizando el método descrito por Chen y Alberts²⁶ con modificaciones realizadas en nuestro laboratorio. Se formaron liposomas que contenían

colesterol marcado con tritio, 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 fina y se contó la radiactividad de las diferentes fracciones en un contador de centelleo. 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 JH ²⁷ con modificaciones realizadas en nuestro laboratorio. El colesterol esterificado marcado con tritio, se incorporó a partículas HDL. Las partículas HDL marcadas se mezclaron con LDL, esta mezcla se incubó con el plasma en estudio (que contiene a la CETP) durante 16 h a 37°C; posteriormente se separaron las HDL de las LDL por precipitación selectiva, en la fracción sobrenadante se contó la radiactividad en un contador de centelleo. Los resultados se expresan en porcentaje de transferencia de colesterol esterificado.

c) ACTIVIDAD PLTP

La actividad PLTP se determinó con el método reportado por Murdoch et. al. ²⁸ con modificaciones hechas en nuestro laboratorio. Se utilizaron liposomas que contenían fosfatidilcolina marcada con tritio, éstos se incubaron con el plasma en estudio y además se agregaron HDL totales como aceptores de la fosfatidilcolina. La mezcla se incubó durante media hora a 37 °C. Finalmente se separaron las HDL de los liposomas mediante precipitación selectiva y se determinó la radiactividad en la fracción sobrenadante en un contador de centelleo. Los resultados se expresan como porcentaje de transferencia de fosfolípidos.

d) ACTIVIDAD PARAOXONASA

La actividad paraoxonasa (PON) se determinó por el método de Mackness et. al. ²⁹ ya estandarizado en nuestro laboratorio. Se midió la velocidad de hidrólisis de fenilacetato durante 3 minutos, agregando plasma a la mezcla, monitoreando la absorbancia del fenol a $\lambda = 270$ nm. Como blanco se utilizó la misma mezcla de reacción sin plasma, lo que

representa la hidrólisis no enzimática del fenilacetato. La actividad se expresa como μmol de fenol formado/minuto/mL de plasma (Apéndice 4).

Análisis estadístico

Para cada grupo de tratamiento, se reportó la media \pm la desviación estándar, y se compararon los valores obtenidos antes y durante el tratamiento con cada medicamento con t de Student pareada. Los porcentajes de cambio se reportan como el promedio de los porcentajes de cambio individuales con respecto al valor basal (antes del tratamiento en cada grupo), y posteriormente se compararon ambos grupos con t de Student. Valores de p menores al 0.05 se consideraron significativos.

RESULTADOS

1. Perfil de lípidos y glucosa.

En el Cuadro 4 se presentan las concentraciones de lípidos y glucosa en plasma de ambos grupos en estudio antes y después de 4 semanas de tratamiento con rosiglitazona o con pioglitazona.

El tratamiento con pioglitazona aumenta las concentraciones de colesterol en el plasma, particularmente las de C-HDL, mientras disminuye la de glucosa. Por otro lado, la rosiglitazona mantiene las concentraciones de colesterol y glucosa, pero aumenta la de triacilglicérolos.

Cuadro 4. Concentraciones plasmáticas de lípidos y glucosa en los grupos de conejos antes y durante el tratamiento con tiazolidinedionas.

	Rosiglitazona (n = 12)		Pioglitazona (n = 12)	
	Antes	Durante	Antes	Durante
Colesterol total (mg/dL)	30.9 ± 15.0	28.3 ± 10.5	25.0 ± 12.6	28.1 ± 11.0 *
C-HDL (mg/dL)	14.3 ± 8.3	15.3 ± 7.7	13.0 ± 5.8	19.0 ± 7.2 *
Triacilglicérolos (mg/dL)	40.6 ± 8.1	58.5 ± 18.7 *	48.1 ± 15.2	50.3 ± 18.8
Glucosa (mg/dL)	111.1 ± 18.8	114.5 ± 22.5	125.5 ± 5.3	113.6 ± 10.4 **

Los valores se expresan como la media ± DE.

t de Student pareada. * p<0.05, ** p<0.01 vs antes del tratamiento

2. Distribución de tamaños de HDL.

Para establecer los efectos de las TZDs sobre la distribución de tamaños de las HDL, aislamos estas lipoproteínas por ultracentrifugación secuencial y posteriormente las sometimos a una electroforesis en gradiente de poliacrilamida en condiciones nativas según se describe en la sección de métodos. En la Fig. 5 se presenta el análisis densitométrico de los corrimientos electroforéticos de las HDL del grupo tratado con rosiglitazona. Se puede observar un claro desplazamiento del pico máximo de la gráfica hacia valores más pequeños de 10.3 nm hasta aproximadamente 10 nm de diámetro.

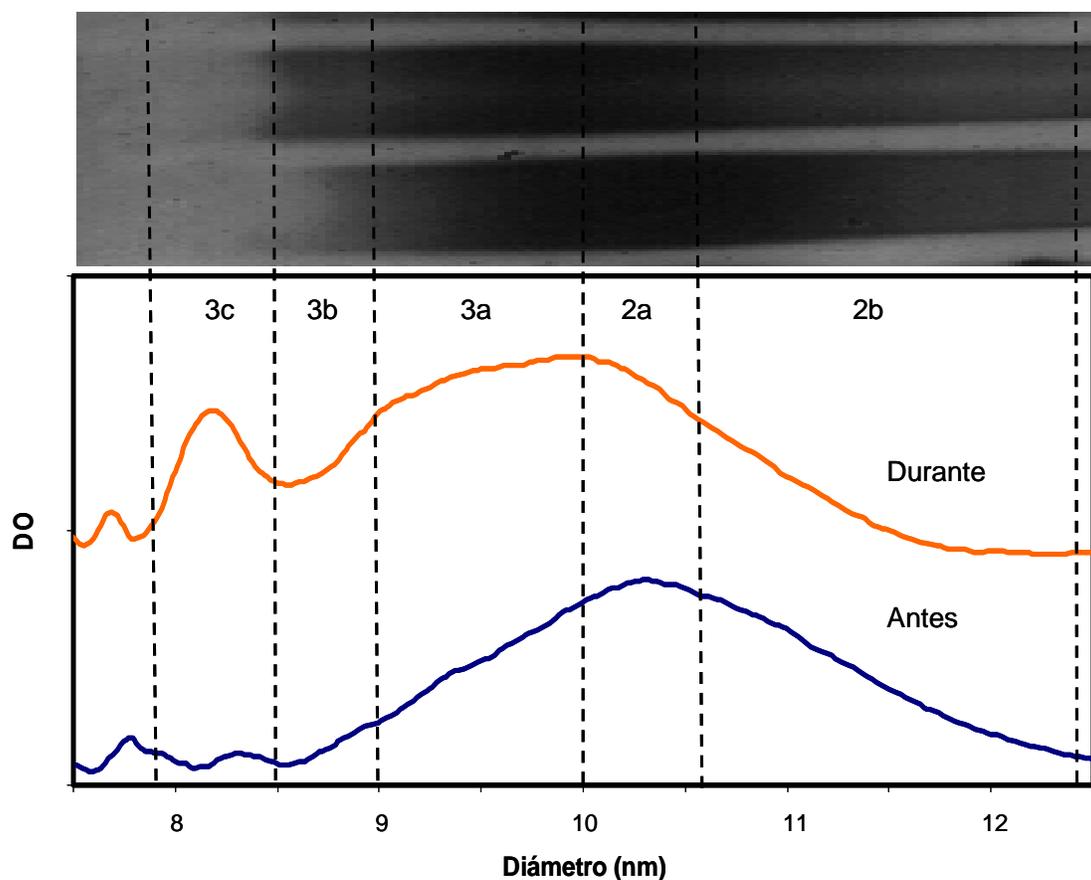


Fig. 5. Distribución de subpoblaciones de HDL. Los resultados representan la distribución promedio del grupo de conejos antes y después de ser tratados con rosiglitazona. En la parte superior se presenta ejemplo de gel nativo donde se observa el corrimiento de las subpoblaciones de HDL.

El área obtenida por integración parcial en los intervalos correspondientes a cada una de las subpoblaciones de HDL, indicadas en la Fig. 5 por líneas punteadas, reportada como porcentaje del área total bajo curva, la denominamos distribución de tamaños de HDL. En la Fig. 6 se muestran las proporciones de las diferentes subclases de HDL antes y durante el tratamiento con rosiglitazona. Observamos que la rosiglitazona produce un aumento de las HDL pequeñas, tipo 3b de un 3.6 a un 8.5 %, y también de la subpoblación 3c de un 2.0 a un 3.9 %. Concomitantemente, se observa una disminución en las partículas HDL más grandes tipo 2b del 50.6 al 38.9 %.

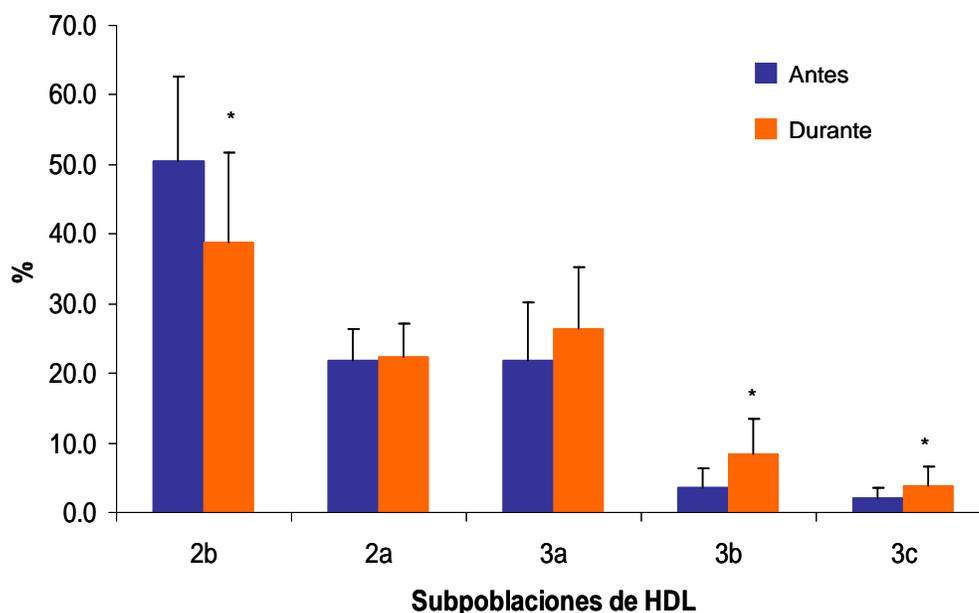


Fig. 6. Distribución relativa de las diferentes subpoblaciones de HDL antes y durante el tratamiento con rosiglitazona.

Los valores se expresan como la media \pm DE.

t de Student pareada * $p < 0.05$ vs antes del tratamiento

En lo que concierne al efecto de la pioglitazona sobre la distribución de tamaños de las HDL, el análisis densitométrico (Fig. 7) muestra un desplazamiento importante de las subpoblaciones de HDL hacia las partículas pequeñas durante el tratamiento con pioglitazona (de aproximadamente 10 nm hasta 8.8 nm).

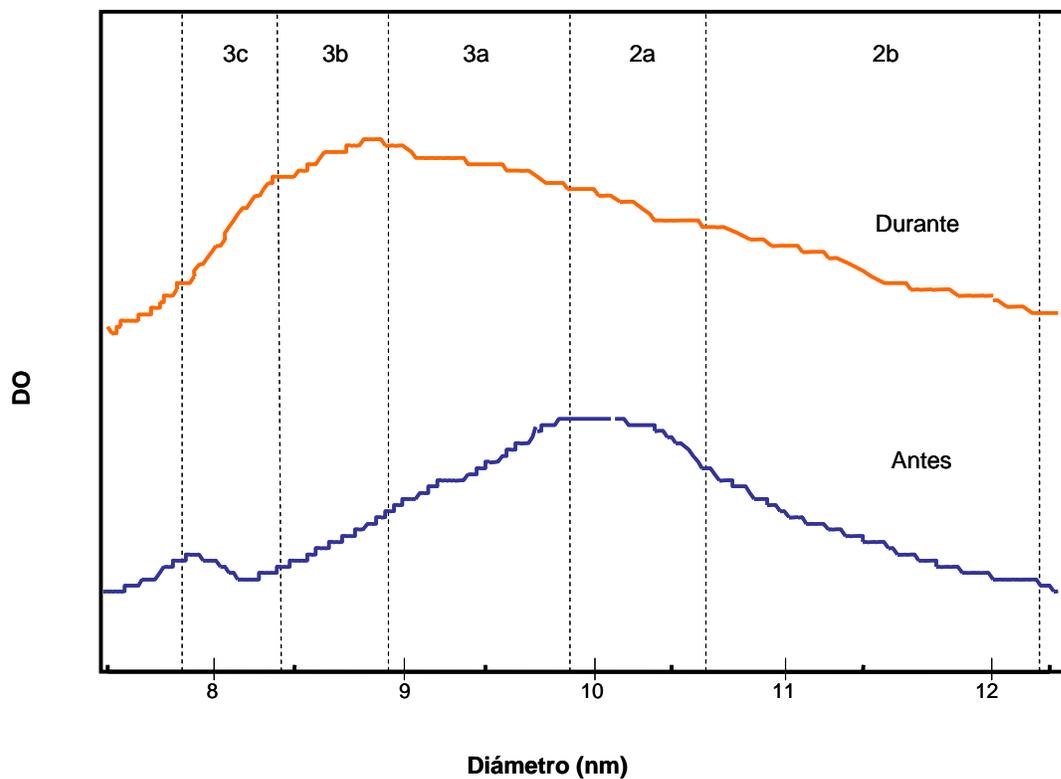


Fig. 7. Distribución de subpoblaciones de HDL. Los resultados representan la distribución promedio del grupo de conejos antes y después de ser tratados con pioglitazona.

El porcentaje de cada una de las subpoblaciones de HDL obtenido a partir del densitograma correspondiente está representado en la Fig. 8; se observa que la pioglitazona produce un aumento significativo en las partículas más pequeñas tipo 3c del 3.7 al 7.6 %, mientras que la disminución más importante es en la subpoblación 2a de 22.5 a 15.9 %.

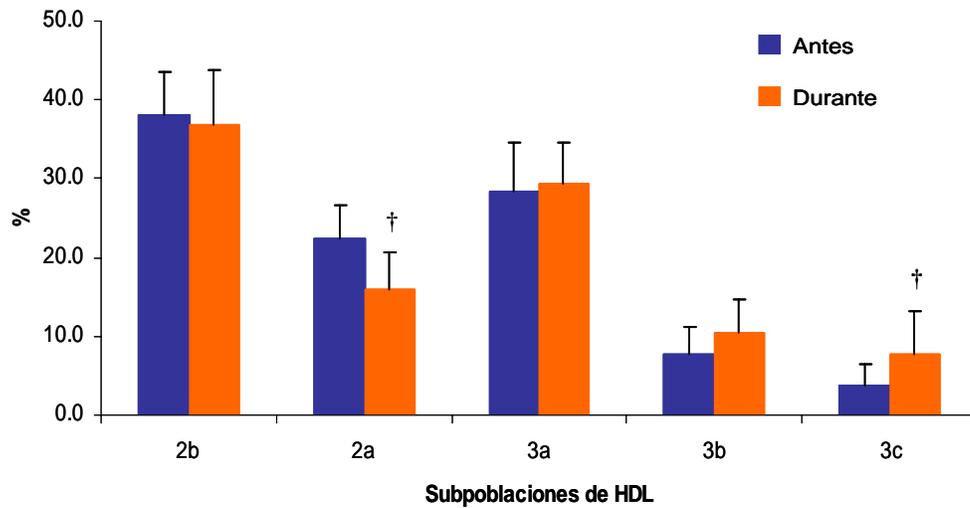


Fig. 8. Distribución relativa de las diferentes subpoblaciones de HDL antes y durante el tratamiento con pioglitazona.

Los valores se expresan como la media \pm DE.

t de Student pareada [†] p<0.001 vs antes del tratamiento

Al comparar los cambios que cada fármaco produce en la distribución de tamaños de HDL (Fig. 9) se observa un efecto diferente con cada una de las TZDs. Por una parte, la pioglitazona disminuye la proporción de partículas 2a un 29.3%, mientras que la rosiglitazona produce un aumento discreto del 6.4 % de esta subpoblación de HDL. Por otra parte, la rosiglitazona incrementa la cantidad de partículas 3b un 196.4%, mientras que la pioglitazona sólo lo hace un 50.7%.

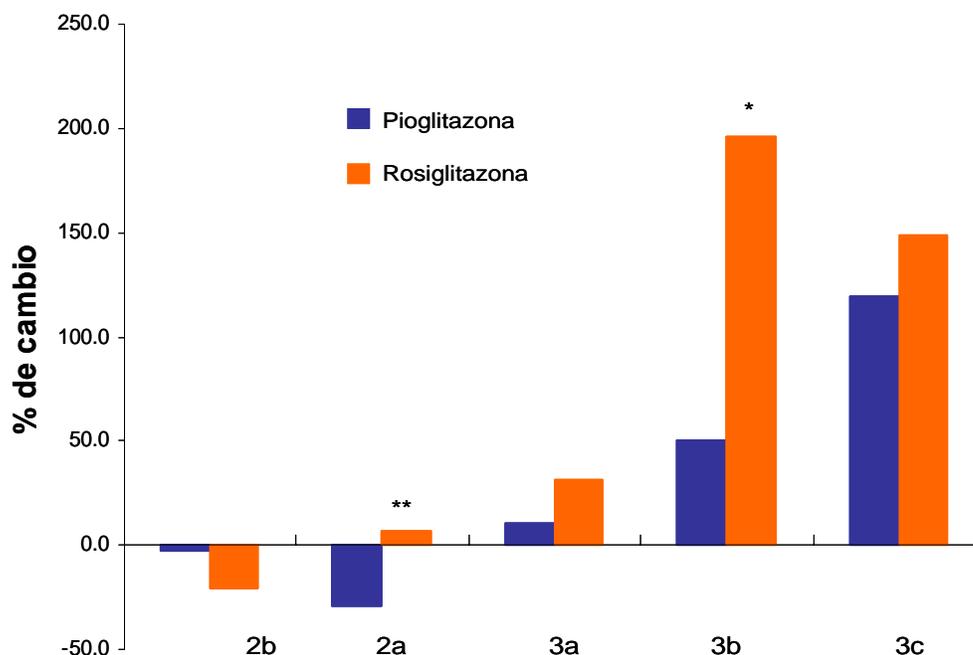


Fig. 9. Porcentaje de cambio en la distribución relativa de las subpoblaciones de HDL durante el tratamiento con pioglitazona y rosiglitazona. Se representa el promedio del porcentaje de cambio con respecto a los valores basales de cada animal experimental. t de Student *, $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs pioglitazona

3. Composición química y en apolipoproteínas de las HDL

La estructura de las HDL es un factor importante en su funcionalidad, por lo que determinamos la composición porcentual de lípidos y apolipoproteínas. Estos resultados se muestran en el Cuadro 5.

El tratamiento con rosiglitazona produce un enriquecimiento en fosfolípidos de las HDL que representa el 49.1% de la cantidad de fosfolípidos antes del tratamiento con rosiglitazona; además, se observa una disminución del 12.3% en la cantidad de proteína total. Por otro lado, podemos observar que la pioglitazona disminuye la cantidad de fosfolípidos un 45.7%, aumentando la cantidad de proteína un 22.5% con respecto a los valores basales. La Fig. 10 representa los porcentajes de cambio en la composición de lípidos y proteína total de las HDL. En ella se puede apreciar el efecto diferencial de cada una de las TZDs sobre el contenido de proteína y fosfolípidos.

Cuadro 5. Composición porcentual en lípidos y proteína del total de las partículas de HDL.

	Rosiglitazona (n = 12)		Pioglitazona (n = 12)	
	Antes	Durante	Antes	Durante
Colesterol total (%)	13.8 ± 5.7	14.1 ± 6.6	16.5 ± 6.1	16.9 ± 7.6
Triacilgliceroles (%)	5.4 ± 3.4	6.5 ± 2.3	5.5 ± 1.8	3.0 ± 2.6
Fosfolípidos (%)	25.6 ± 7.4	32.4 ± 6.3 *	25.2 ± 3.9	14.0 ± 7.5 **
Proteína (%)	55.2 ± 14.5	47.0 ± 9.7 *	52.8 ± 4.0	64.0 ± 12.5 *

Los valores se expresan como la media ± DE.

t de Student * p<0.05, ** p<0.01 vs antes del tratamiento

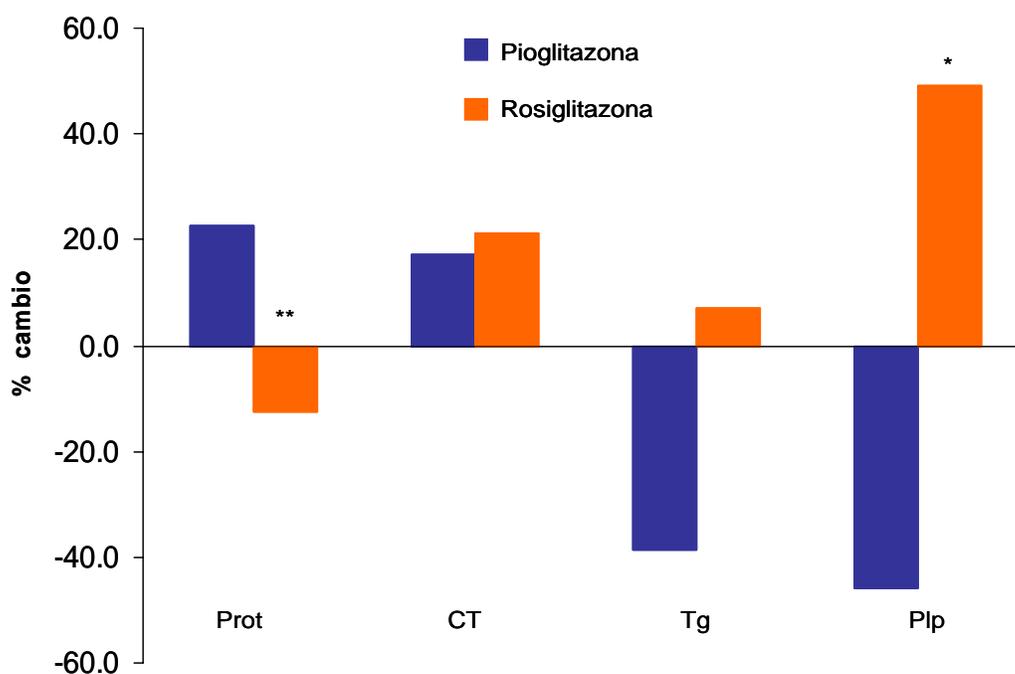


Fig. 10. Porcentaje de cambio en la composición de lípidos y proteína de las HDL totales durante el tratamiento con pioglitazona y rosiglitazona. Se representa el promedio del porcentaje de cambio con respecto a los valores basales de cada sujeto.

Prot = Proteína; CT = Colesterol total; Tg = Triacilgliceroles; Plp = Fosfolípidos.

Los valores se expresan como la media.

t de Student * p<0.05, ** p<0.01 vs pioglitazona

Para establecer la proporción de cada una de las apolipoproteínas que conforman a las HDL realizamos una electroforesis en gradiente de poliacrilamida en presencia de SDS, según se describe en la sección de métodos. Los resultados se muestran en el Cuadro 6. Estos análisis demuestran que el tratamiento con rosiglitazona incrementa la proporción de apo AI, mientras que disminuye la cantidad de apo C's. La pioglitazona no provoca cambios significativos en la proporción de apolipoproteínas. En la Fig. 11 se muestran las diferencias en los porcentajes de cambio de apolipoproteínas durante los tratamientos con rosiglitazona y pioglitazona sin observar cambios significativos.

Cuadro 6. Composición porcentual de apolipoproteínas de HDL.

	Rosiglitazona (n = 12)		Pioglitazona (n = 12)	
	Antes	Durante	Antes	Durante
^a A-IV (%)	6.5 ± 1.3	9.8 ± 5.1	11.5 ± 5.9	13.0 ± 3.3
^a E (%)	11.9 ± 6.3	10.7 ± 2.4	17.2 ± 5.9	17.1 ± 6.3
^a A-I (%)	59.1 ± 5.8	62.5 ± 4.9 *	65.0 ± 9.9	55.0 ± 15.0
^a A-II (%)	8.4 ± 3.4	7.7 ± 3.9	3.1 ± 1.2	2.7 ± 1.2
^a C's (%)	4.9 ± 3.1	2.1 ± 1.5 **	3.2 ± 1.2	6.6 ± 6.3

Los valores se expresan como la media ± DE.

t de Student * p<0.05, ** p<0.01 vs antes del tratamiento

^aRepresenta el % de la proteína total de HDL.

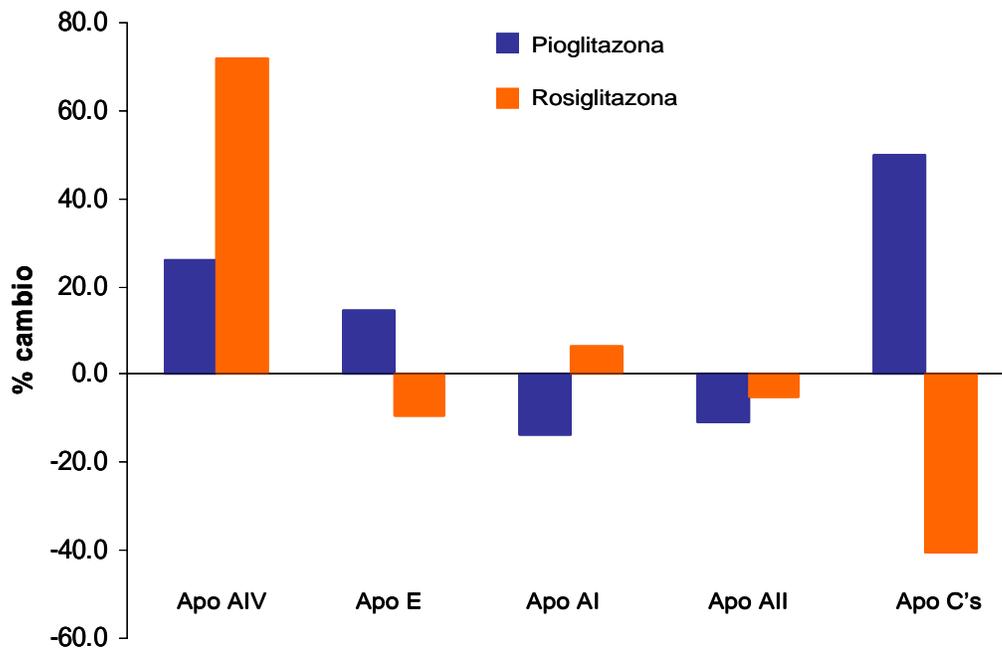


Fig. 11. Porcentaje de cambio en la composición de apolipoproteínas de HDL totales durante el tratamiento con pioglitazona y rosiglitazona. Se representa el promedio del porcentaje de cambio con respecto a los valores basales de cada sujeto. t de Student. Los valores se expresan como la media.

4. Actividad de los factores plasmáticos que intervienen en el TRC.

En nuestra hipótesis planteamos que el posible origen de las modificaciones estructurales de las HDL podría ubicarse en cambios de las actividades de las proteínas que intervienen en el TRC, es decir CETP, PLTP y LCAT. Los resultados de las determinaciones realizadas se presentan en el Cuadro 7. Los resultados claramente demuestran que ninguno de los dos tratamientos provoca cambios en estos factores plasmáticos de remodelación.

Cuadro 7. Actividad de los factores plasmáticos involucrados en el TRC.

	Rosiglitazona (n = 12)		Pioglitazona (n = 12)	
	Antes	Durante	Antes	Durante
LCAT (% de esterificación)	7.0 ± 3.2	5.5 ± 3.7	5.5 ± 2.3	4.9 ± 2.5
CETP (% de transferencia)	31.6 ± 6.7	32.3 ± 6.0	24.9 ± 11.2	25.8 ± 9.5
PLTP (% de transferencia)	24.4 ± 9.6	21.6 ± 7.3	25.6 ± 12.7	20.8 ± 9.5

LCAT Lecitina colesterol acilo transferasa; CETP Proteína de transferencia de ésteres de colesterol; PLTP Proteína de transferencia de fosfolípidos.
Los valores se expresan como la media ± DE.

5. Efecto sobre la actividad paraoxonasa.

La relación entre la estructura y la función de las HDL ha sido sugerida en diversas ocasiones. Para comenzar a explorar si los cambios en la estructura inducidos por las dos TZDs, tienen efecto en la funcionalidad de estas partículas, determinamos la actividad paraoxonasa 1 según el método descrito en la sección correspondiente y en el Apéndice 4. En el Cuadro 8 se presentan los resultados de la actividad paraoxonasa antes y durante los tratamientos con rosiglitazona y pioglitazona. Se observa que la actividad aumenta un 22.8% durante el tratamiento con rosiglitazona, mientras que la pioglitazona mantiene sin cambios esta actividad (Fig. 12).

Cuadro 8. Actividad paraoxonasa.

	Rosiglitazona (n = 12)		Pioglitazona (n = 12)	
	Antes	Durante	Antes	Durante
PON ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$)	488.5 ± 138.2	595.2 ± 179.4**	750.9 ± 291.4	771.9 ± 165.5

Los valores se expresan como la media ± DE.
t de Student pareada ** p<0.01 vs antes del tratamiento.

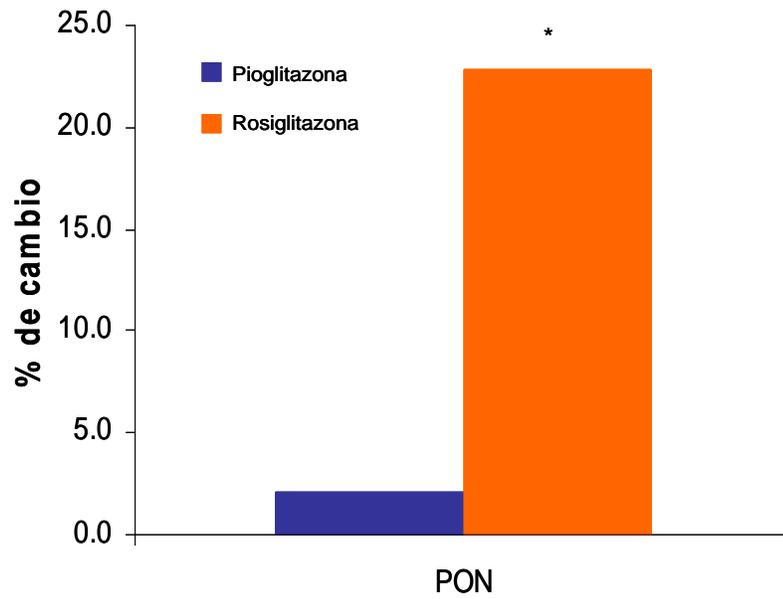


Fig. 12. Porcentaje de cambio en la actividad paraoxonasa durante el tratamiento con pioglitazona y rosiglitazona. Se representa el promedio del porcentaje de cambio con respecto a los valores basales de cada sujeto.

Los valores se expresan como la media.

t de Student * $p < 0.05$ vs pioglitazona

DISCUSIÓN

En este trabajo de investigación hemos puesto de manifiesto utilizando conejos, las similitudes y diferencias que tienen las dos tiazolidinedionas comerciales sobre la estructura, el metabolismo de las HDL, así como su efecto sobre la actividad de la enzima, físicamente asociada a estas lipoproteínas, la paraoxonasa 1. Las dosis que empleamos son, para ambos fármacos, equivalentes a tres veces la dosis máxima en el humano, a saber, 8 y 45 mg/día para la rosiglitazona y para la pioglitazona respectivamente. La elección de la dosis está basada en estudios previos de nuestro grupo y corresponde, particularmente para la pioglitazona, a la dosis que induce los cambios en la estructura y el metabolismo de las HDL ³⁰. El hecho de utilizar dosis por arriba de las máximas recomendadas en el humano, justifica plenamente la utilización de un modelo animal para nuestro trabajo.

Observamos efectos significativos sobre el perfil de lípidos, en particular un incremento en el nivel de triacilgliceroles con rosiglitazona, y un incremento del colesterol de HDL con pioglitazona. Cambios similares en el perfil de lípidos habían sido previamente reportados en el humano ²⁰⁻²²; estas similitudes entre el conejo y el humano soportan el concepto de que nuestro modelo animal semeja en gran medida el metabolismo de lípidos y lipoproteínas del humano ^{31,32}.

Estudios previos en nuestro laboratorio y comprobados en el presente trabajo, ponen de manifiesto que la pioglitazona induce un claro desplazamiento de la distribución de las HDL hacia tamaños pequeños, generando un aumento significativo de la proporción de HDL tipo 3c ³⁰. Estos resultados los confirmamos en el presente estudio. Con base en estas observaciones y en que la pioglitazona en general incrementa el colesterol-HDL, mientras que la rosiglitazona tiene un menor o nulo efecto sobre el mismo, al inicio de este trabajo planteamos la hipótesis que los tamaños de HDL se verían afectados de manera distinta con cada una de la TZDs. En acuerdo con nuestra propuesta inicial, la rosiglitazona además de producir un incremento comparable al de la pioglitazona en las HDL_{3c}, induce un incremento de aproximadamente 200 % de las HDL_{3b}. En contraste, la pioglitazona induce un incremento de la proporción HDL_{3b} aproximadamente cuatro veces menor en comparación con la rosiglitazona. Asimismo destaca los efectos opuestos de la TZDs en la

proporción de las HDL tipo 2a; mientras la pioglitazona produce un descenso significativo en la proporción de estas partículas, la rosiglitazona no afecta esta subpoblación. En resumen, los efectos de la pioglitazona y los de la rosiglitazona sobre la distribución de tamaños de HDL difieren de manera importante. Estas evidencias sugieren que los mecanismos de acción de ambos fármacos, a pesar de que ambos son agonistas de PPAR γ , difieren por lo menos en lo que concierne a sus efectos sobre las HDL. Se requieren estudios específicamente diseñados para determinar los efectos pleiotrópicos de cada una de las TZDs.

La proporción de las diferentes subclases de las HDL en plasma, está determinada, al menos parcialmente, por los factores plasmáticos de remodelación intravascular de lipoproteínas, en particular la CETP y la LCAT ²⁵, y la PLTP ^{33,34}. Con base en lo anterior, era posible que las modificaciones en la distribución de las HDL inducidas por las TZDs, tuviesen su origen en cambios de las actividades de tales factores de remodelación. Por lo tanto, para tratar de dar una explicación al origen de los cambios en la distribución de tamaños de las HDL de conejos tratados con TZDs, determinamos la actividad LCAT, CETP y PLTP. Nuestros resultados demuestran que, a pesar del impacto tan importante que tienen sobre la distribución de tamaños ^{25,33,34}, las actividades LCAT, CETP y PLTP, permanecen igual a las condiciones basales durante el tratamiento con cualquiera de las dos TZDs. En consecuencia, con base en nuestros resultados, podemos afirmar que las modificaciones en la distribución de tamaños de las HDL durante el tratamiento con TZDs no tienen su origen en cambios de la actividad LCAT, CETP ni PLTP. La sobreexpresión de otras proteínas que también participan en la remodelación de las HDL, como el receptor de membrana SR-BI, y el ABCA-1, y cuyos genes contienen elementos de respuesta para PPAR γ ^{18,35} podrían explicar las modificaciones en la distribución de tamaños inducidos por las TZDs. Adicionalmente, la subunidad beta de la ATPasa mitocondrial que puede expresarse de manera ectópica en la membrana citoplasmática, actúa como receptor HDL ³⁶; por lo tanto, si su expresión es afectada por las TZDs, podría contribuir a explicar los cambios en la distribución de tamaño de las HDL. Estas hipótesis deberán ser abordadas en estudios posteriores.

La modificación de la distribución de tamaños de las HDL por las TZDs tiene implicaciones en la aterosclerosis; estudios epidemiológicos han reportado que los pacientes con EAC tienen niveles de C-HDL₂ menores que los sujetos control³⁷. A partir de estas observaciones, se ha postulado que las HDL₂ constituyen la fracción HDL con mayor potencial antiateroscleroso. En contraste, otros estudios sugieren que las HDL pequeñas poseen un potencial antiaterogénico superior al de las partículas de mayor tamaño tipo HDL₂; las partículas HDL pequeñas son los mejores aceptores de colesterol³⁸, y poseen mejores propiedades antioxidantes que las HDL de mayor tamaño^{12,39}. Evidencias indirectas también sugieren que las HDL pequeñas son más antiaterogénicas que las partículas grandes; sujetos con hipoalfalipoproteinemia severa (colesterol-HDL < 15 mg/dL) sin historia personal ni familiar de enfermedad aterosclerosa coronaria, presentan una proporción muy elevada de HDL pequeñas⁴⁰⁻⁴². Adicionalmente, fármacos antiaterosclerosos como los fibratos, desplazan la distribución de tamaños HDL hacia partículas de menor tamaño⁴³. Considerando que las TZDs tienen efectos antiaterosclerosos^{20,21}, el desplazamiento de los tamaños de las HDL hacia partículas pequeñas por efecto de las TZDs, apoya indirectamente la postura de que la fracción HDL con mayor potencial antiaterogénico son las HDL pequeñas, en particular las de tipo 3b y 3c.

Como se ha mencionado previamente, las HDL pequeñas tienen mayor capacidad para retardar la oxidación de las LDL *in vitro*³⁹. Esta característica se debe a que la cantidad de paraoxonasa 1 que pueden fijar las HDL por partícula está en función inversa a su tamaño³⁹. La PON se sintetiza en el hepatocito y se exporta hacia la membrana nuclear en donde permanece anclada a través de interacciones hidrofóbicas entre los fosfolípidos de la membrana citoplasmática y la región N-terminal de la proteína¹². Las HDL son capaces de desorber a la PON de la membrana del hepatocito y este proceso depende de la tensión de superficie de la lipoproteína¹². De esta manera, toda la paraoxonasa circulante en plasma se encuentra asociada únicamente a las HDL. Con base en estas evidencias y nuestros resultados, postulamos que las TZDs aumentarían la actividad paraoxonasa. Adicionalmente, esperábamos un aumento más importante en los animales tratados con pioglitazona en comparación con los que recibieron rosiglitazona, debido a que la primera

induce un incremento más importante de las HDL de menor tamaño, de tipo 3c. A pesar de nuestras expectativas, nuestros resultados demuestran que sólo la rosiglitazona es capaz de incrementar la actividad de la enzima en plasma, mientras que la pioglitazona no tiene ningún efecto significativo sobre esta enzima. Esta diferencia, podría explicarse por la cantidad de fosfolípidos que contienen las HDL durante el tratamiento con TZDs; como se estableció previamente, la tensión de superficie es el factor determinante en la desorción de la PON por parte de las HDL¹². Esta tensión de superficie está directamente relacionada con el contenido de fosfolípidos que presente la partícula¹². En congruencia con tales evidencias, observamos que las HDL generadas durante el tratamiento con rosiglitazona contienen una proporción de fosfolípidos significativamente mayor a las generadas con pioglitazona. Por lo tanto, el contenido de fosfolípidos puede contribuir a explicar los diferentes efectos de las dos TZDs comerciales sobre la actividad PON.

Una explicación adicional a las diferencias en cuanto a los efectos sobre la PON por parte las TZDs, tiene relación con la velocidad de recambio de las HDL. Mientras la pioglitazona duplica la tasa de catabolismo de las HDL³⁰, resultados recientes de nuestro laboratorio han demostrado que la rosiglitazona no modifica la tasa de recambio de las HDL [Pérez-Méndez et al., resultados no publicados]. Considerando estas propiedades de las TZDs, se puede postular que las HDL generadas durante el tratamiento con pioglitazona tendrían efectivamente mayor capacidad para captar paraoxonasa 1 como habíamos propuesto inicialmente; sin embargo, debido a que la tasa de eliminación de las HDL se duplica durante el tratamiento con pioglitazona, es posible que las moléculas de PON que acarrean estas lipoproteínas, sigan el patrón de eliminación de las HDL. En consecuencia, un posible aumento de la captación de PON hepática por parte de las partículas HDL generadas durante el tratamiento con pioglitazona, se vería contrareestado por el aumento en su catabolismo. El balance final, sería la ausencia de incrementos en la actividad PON durante el tratamiento con pioglitazona, como demostramos en el presente estudio. Aplicando el mismo razonamiento, debido a que la rosiglitazona no induce un incremento en el catabolismo de las HDL, el aumento de partículas HDL_{3b} por el fármaco, a pesar de ser menos eficientes que la HDL_{3c} para captar PON³⁹, es suficiente para provocar un aumento observable en la actividad de esta enzima en plasma. Esta explicación especulativa a los

efectos diferenciales de las TZDs sobre la PON plasmática debe sustentarse en estudios cinético metabólicos *in vivo* de la enzima.

En resumen, en el presente estudio hemos demostrado los efectos que tienen la rosiglitazona y la pioglitazona sobre la estructura de las HDL, que los cambios en la distribución de tamaño de estas lipoproteínas no tienen su origen en modificaciones de los factores plasmáticos de remodelación de las HDL. Nuestros resultados también ponen de manifiesto que las modificaciones estructurales ocurren simultáneamente con un incremento significativo de la paraoxonasa plasmática en los animales tratados con rosiglitazona, sugiriendo que favorece la capacidad antioxidante de las HDL. Asimismo, nuestro estudio sirve como antecedente para plantear varios protocolos de investigación en el futuro.

BIBLIOGRAFÍA

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. Sviridov D, Nestel P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2002; 161: 245-254.
5. Secretaría de Salud Información epidemiológica de morbilidad 2000. Dirección General de Epidemiología.
6. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, et. al. 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.
7. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, 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.
8. Ruiz J, Blanche H, James RW, Garin MC, et. al. Gln-Arg192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet* 1995; 346: 869-872.
9. Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest* 1995; 96:3005-3008.

10. Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest* 1995; 96:3005-3008.
11. Ribas V, Sánchez-Quesada JL, Antón R, et. al. Human Apolipoprotein A-II enrichment displaces paraoxonase from HDL and impairs its antioxidant properties. A new mechanism linking HDL protein composition and antiatherogenic potential. *Circ Res* 2004; 95: 789-797.
12. Deakin S, Leviev I, Gomaraschi M, 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.
13. Barbier O, Torra IP, Duguay Y, et. al. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 717-726.
14. Reginato MJ, Lazar MA. Mechanisms by which thiazolidinediones enhance insulin action. *Trends Endocrinol Metab* 1999; 10: 9-13.
15. Vosper H, Guennadi AK, Tracey L, et. al. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists, hyperlipidemia, and atherosclerosis. *Pharma and Therap* 2002; 95: 47-62.
16. Marx N, Duez H, Fruchart JC, et. al. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. *Circ Res* 2004; 94: 1168-1178.
17. 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.

18. Akiyama TE, Sakai S, Lambert G, et al. Conditional distribution of the peroxisomes proliferator-activated receptor γ gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apo E in macrophages and reduced cholesterol efflux. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 2607-2619.
19. Yki-Javinen H. Drug Therapy: Thiazolidinediones. *N Eng J Med* 2004; 351: 1106-1118.
20. Khan MA, St Meter JV, Xue JL. A prospective, randomized comparison of the metabolic effects of pioglitazone or rosiglitazone in patients with type 2 diabetes who were previously treated with troglitazone. *Diabetes Care* 2002; 25: 708-711.
21. Goldberg RB, Kendall DM, Deeg MA, et. al. A comparison of lipid and glycemic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care* 2005 28: 1547-1554.
22. Gilling L, Suwatee P, DeSouza C, et. al. Effects of thiazolidinediones on cardiovascular risk factors. *Am J Cardiovasc Drugs* 2002; 2: 149-156.
23. Lowry OH, Rosebrough HJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
24. Williams PT, Krauss RM, Nichols AV, et. al. Identifying the predominant peak diameter of high-density and low-density lipoproteins by electrophoresis. *J Lipid Res* 1990; 31: 1131-1139.
25. Williams PT, Krauss RM, Nichols AV, et. al. Identifying the predominant peak diameter of high-density and low-density lipoproteins by electrophoresis. *J Lipid Res* 1990; 31: 1131-1139.

26. 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.
27. 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.
28. Murdoch SJ, Carr MC, Hokanson JE, et. al. PLTP activity in premenopausal women: relationship with lipoprotein lipase, HDL, LDL, body fat, and insulin resistance. *J Lipid Res* 2000; 41: 237-244.
29. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1991; 86:193-198.
30. Carreón-Torres E, Juárez-Meavepeña M, Cardoso-Saldaña G, et. al. Pioglitazone increases the fractional catabolic and production rates of high-density lipoproteins apo AI in the New Zealand White Rabbit. *Atherosclerosis* 2005; 181: 233-240.
31. Lamarche B, Uffelman KD, Steiner G, et. al. 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.
32. Lewis GF, Lamarche B, Uffelman KD, et. al. Clearance of postprandial and lipolytically modified human HDL in rabbits and rats. *J Lipid Res* 1997; 38:1771-1778.
33. Rye KA, Moira A. C, Barter PJ. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis* 1999; 145: 227-238.

34. Yatsuya H, Tamakoshi K, Hattori H, et. al. Serum phospholipid transfer protein mass as a possible protective factor for coronary heart diseases. *Circ J* 2004; 68: 11-16.
35. Malerod L, Sporstol M, Juvet LK, et. al. Hepatic scavenger receptor class B, type I is stimulated by peroxisome proliferators-activated receptor gamma and hepatocyte nuclear factor alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305: 557-565.
36. Martinez LO, Jacquet S, Esteve JP, et. al. Ectopic b-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* 2003; 421:75-79.
37. Lamarche B, Moorjani S, Cantin B. Associations of HDL₂ and HDL₃ subfractions with ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17: 1098-1105.
38. Castro GR, Fielding CJ: Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre- β -migrating high density lipoprotein pathway. *Biochemistry* 1988; 27: 25-29.
39. 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.
40. Perez-Mendez O, Bruckert E, Franceschini G, et al.: Metabolism of apolipoproteins AI and AII in subjects carrying similar apoAI mutations, apoAI Milano and apoAI Paris. *Atherosclerosis* 2000; 148: 317-325.
41. Elkhilil L, Majd Z, Bakir R, et al.: Fish-eye disease: structural and in vivo metabolic abnormalities of high-density lipoproteins. *Metabolism* 1997; 46: 474-483.
42. Perez-Mendez O, Castro G, Fruchart J, et. al. Kinetic and metabolic studies of apo A-I and apo A-II in a hypoalphalipoproteinemic patient (Abstract). *Eur J Neurol (suppl 2)* 1995; 2:77.

43. Huesca C, Luc G, Duhal N, et. al. Ciprofibrate increases synthesis and catabolism of HDL apo AI and AII in patients with hypertriglyceridemia (Abstract). *Atherosclerosis suppl* 2004; 5: 64.

APÉNDICE 1

Determinación de proteínas por el método de Lowry

SOLUCIONES

- ◆ -Solución de Na_2CO_3 : 20 % en H_2O
- ◆ -Solución de tartrato de Na y K: 1 g + CuSO_4 :0.5g
- ◆ -Solución de NaOH 0.8N: 16g en 500 mL H_2O
- ◆ -Solución de SDS al 10%
- ◆ -Solución patrón de albúmina: 1 mg/mL
- ◆ -Solución A. Preparar al momento
 - 1 volumen de tartrato de Na y K
 - 1 volumen de Na_2CO_3
 - 2 volúmenes de NaOH
 - 2 volúmenes de SDS
 - 2 volúmenes de H_2O

TÉCNICA

CURVA PATRÓN

Tubo	1	2	3	4	5	6	muestra
MUESTRA (mL)	0	0	0	0	0	0	20
ST (mL)	0	10	20	40	80	100	0
H_2O (mL)	100	90	80	60	20	0	80

MEZCLAR

Sol. A (mL)	1	1	1	1	1	1	1
-------------	---	---	---	---	---	---	---

INCUBAR 10 MINUTOS EN OSCURIDAD A TEMPERATURA AMBIENTE

Reac. Folin (1/6) (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
---------------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

INCUBAR 30 MINUTOS EN OSCURIDAD A TEMPERATURA AMBIENTE

Leer a una longitud de onda de 750 nm

DETERMINACIÓN DE LOS RESULTADOS

Trazar una gráfica de concentración contra absorbancia con los datos de la curva patrón.

Interpolar la absorbencia de las muestras en la gráfica para determinar la concentración correspondiente.

APÉNDICE 2

Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas

SOLUCIONES

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE MUESTRA

Sacarosa 50% + Azul de bromofenol al 0.05% c.b.p. 20 mL

A= Tris 0.09 M + Ac. Borico 0.08M + EDTA 3mM pH 8.35

B= 48 g acrilamida + 1.28g bisacrilamida c.b.p. 100mL

C= persulfato de amonio 10%

	3%	30%
Vol. total	5mL	5 mL
Sol A	0.5mL	0.5mL
Sol. B	300µL	3 mL
H₂O d	4.2mL	750µL
GLICEROL	---	750µL
TEMED	4µL	4µL
SOL. C	20µL	20µL

- 1) Depositar 25 µg de proteína/ 2 µL de buffer de muestra.
- 2) Utilizar marcador de alto peso molecular
- 3) Migrar 15 min a 40 V(para concentrar las muestras)
- 4) Migrar 15 min a 70 V (para que entren las muestras al gel)
- 5) Migrar 22 h a 160 V
- 6) Teñir el gel con azul de Coomasie

APÉNDICE 3

Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS).

Soluciones

A= 36.3g Tris-HCl c.b.p. 100mL pH 8.9

B= 48 g acrilamida + 1.28g bisacrilamida c.b.p. 100mL

C= SDS 10%

D= persulfato de amonio 10%

E= 39.4g Tris + 2g SDS c.b.p. 100mL pH 6.8

	4%	21%	St
Vol. total	4mL	4mL	3.5 mL
Sol A	1.0 mL	1.0mL	----
Sol B	320µL	1.77mL	300µL
H₂O₂ d	2.68 mL	230µL	1.5mL
GLICEROL	-----	1 mL	---
Sol C	40µL	40µL	----
Sol E	----		2 mL
TEMED	5µL	5µL	6µL
Sol D	25µL	25µL	40µL

- 1) Depositar 25 µg de proteína/ 10 µL de buffer de muestra. Calentar a ebullición durante 3 minutos.
- 2) Migrar 30 min a 40 V (para que entren las muestras al gel)
- 3) Migrar 3 h a 90 V
- 4) Teñir el gel con azul de Coomasie

APÉNDICE 4

Determinación de actividad PON

La muestra es suero fresco o congelado a -70°C . Se le harán diluciones diferentes de acuerdo al tipo de muestra (rata, conejo o humano).

Soluciones y amortiguadores:

- **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

- **Sustrato de ARE**

Agregar 1.27 μL de fenilacetato en 10 mL de buffer ARE

Procedimiento:

1. Preparar el sustrato.
2. Hacer la dilución correspondiente a las muestras:

CONEJO

Diluir 1:40 en buffer ARE para actividad ARE.

3. Determinar la actividad.

Poner 10 μL 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 $\lambda=270\text{ nm}$

*usar celda de cuarzo

CÁLCULOS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Actividad ARE ($\mu\text{mol fenol/min/mL suero}$)

$$\varepsilon \text{ fenilacetato} = 1310 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Actividad =

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

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.