



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA
ROSIGLITAZONA SOBRE FACTORES QUE
MODIFICAN LA ESTRUCTURA DE LAS
LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

MARIANA MONTER GARRIDO

TUTOR PRINCIPAL DE LA TESIS: DR. ÓSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTORAL: DR. MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA
DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de agosto de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **MONTER GARRIDO MARIANA** con número de cuenta 99193531, con la tesis titulada **“ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ROSIGLITAZONA SOBRE FACTORES QUE MODIFICAN LA ESTRUCTURA DE LAS LIPOPROTEINAS DE ALTA DENSIDAD (HDL)”**, realizada bajo la dirección del DR. OSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ:

Presidente: DRA. ELIA MARTHA PÉREZ ARMENDÁRIZ
Vocal: DRA. MARTHA FRANCO GUEVARA
Secretario: DR. JUAN PABLO MÉNDEZ BLANCO
Suplente: DR. MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA
Suplente: DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 02 de octubre de 2012

María del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad para continuar con mi formación profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría (Número CVU/Becaria: 226264/210499) y por el financiamiento para el proyecto con número 47275.

A los miembros del Comité Tutorial:

Dr. Óscar Armando Pérez Méndez

Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza

Dr. José de Jesús García Trejo

Por todo el apoyo, la paciencia y las valiosas aportaciones a esta investigación.

Muchas gracias.

También agradezco a (en orden de aparición):

La familia, por todo el apoyo .

Los amigos, principalmente porque no hace falta enumerarles, por compartir el camino.

Óscar, por la oportunidad y sobre todo, por todo lo aprendido, en especial lo que no se encuentra en libros.

Eli, porque sabes que este logro es en gran medida tuyo y que sin ti, por muchas razones, nunca hubiera sido posible.

Quienes vivieron todo esto desde las primeras filas: Ricardo, Esther, Sirena, Sintia, Selene, Dr. Soto, Mary. Nada hubiera sido igual sin ustedes. Gracias por tantas horas, tantos días, tantos años de risas y experiencias. A todas las personas cuya estancia en el laboratorio tal vez fue breve, pero que dejaron recuerdos muy gratos y duraderos.

Yuks, por las porras y empujones. Que las huellitas pumas sigan en el camino y este sea muy largo.

Los miembros del jurado, Dra. Martha Franco Guevara, Dra. Elia Martha Pérez Armendáriz y Dr. Juan Pablo Méndez Blanco, por sus observaciones y las facilidades otorgadas para la revisión de este trabajo.

Al Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, por permitirme el uso de sus instalaciones para el desarrollo de este proyecto.

Finalmente, agradezco a todas las personas que han colaborado con mi formación personal, académica y profesional.

DEDICATORIA

A mis sobrinos, Gabriel y Manuel, porque son la razón por la que todos los días deseo ser una mejor persona.

A mis abuelos, Hazael, Chucha y Sofia, que todos los días los recuerdo y sé que disfrutarían mucho estos momentos.

ÍNDICE

Resumen	9
Abstract	11
Antecedentes	13
1. Lipoproteínas.	13
1.1. Clasificación de las lipoproteínas.	14
2. Metabolismo de las lipoproteínas.	17
2.1. Metabolismo intravascular de las HDL.	18
3. Enfermedad aterosclerosa coronaria y HDL.	20
3.1. Importancia de la subclasificación de las HDL y su potencial antiaterogénico.	23
3.2. Relación entre el tamaño y el catabolismo de las HDL.	23
4. Tiazolidinedionas.	24
4.1. Mecanismo de acción de las tiazolidinedionas.	25
4.2. Efecto de las tiazolidinedionas sobre el metabolismo de las HDL.	27
Hipótesis.	30
Objetivo general.	31
Objetivos particulares.	31
Materiales y métodos.	32
Animales.	32
Recolección de muestras.	32
Análisis de laboratorio.	32
Aislamiento y análisis de subpoblaciones de HDL.	33
Determinación de la actividad de los factores plasmáticos de remodelación.	33
a) Actividad LCAT.	33
b) Actividad CETP.	34
c) Actividad PLTP.	34
Preparación y purificación de HDL marcadas con ésteres de ³ H colesterol.	35
Cinética de colesterol.	35

Influjo de colesterol.	36
Cuantificación de SR-BI.	36
Análisis estadístico.	37
Resultados.	38
Perfil de lípidos y glucosa.	38
Distribución relativa de subpoblaciones de HDL.	39
Actividad de factores plasmáticos de remodelación.	40
Cinética de colesterol.	41
Expresión de SR-BI.	43
Influjo de colesterol.	44
Discusión.	47
Bibliografía.	52
Apéndice 1.	58
Apéndice 2.	60

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Composición general de las lipoproteínas.	14
Cuadro 1. Características de las apolipoproteínas.	15
Cuadro 2. Propiedades de las lipoproteínas plasmáticas.	17
Cuadro 3. Enzimas y proteínas involucradas en el metabolismo de lipoproteínas.	19
Figura 2. Transporte reverso del colesterol.	21
Figura 3. Esquema de las primeras etapas en la formación de la placa ateromatosa.	22
Figura 4. Estructura química de las tiazolidinedionas comerciales.	25
Figura 5. Mecanismo de acción de los PPAR γ .	26
Tabla 1. Concentraciones plasmáticas de lípidos y glucosa en conejos control y tratados con rosiglitazona.	38
Tabla 2. Distribución relativa de las diferentes subpoblaciones de HDL en el grupo de conejos control y los tratados con rosiglitazona.	39
Tabla 3. Actividad de los factores plasmáticos de remodelación en conejos control y tratados con rosiglitazona.	40
Figura 6. Depuración de ésteres de colesterol de HDL en conejos control y tratados con rosiglitazona.	42
Figura 7. Transferencia de ésteres de colesterol hacia VLDL/LDL en conejos control y tratados con rosiglitazona.	43
Figura 8. Expresión de SR-BI en células Fu5AH control y tratadas con rosiglitazona.	44
Figura 9. Desarrollo de técnica de influjo de colesterol.	45
Figura 10. Transferencia de ésteres de colesterol de HDL hacia células Fu5AH control y tratadas con rosiglitazona.	46

RESUMEN

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) tienen propiedades antiaterosclerosas, tales como su capacidad de captar el colesterol excedente de las células, en un mecanismo denominado transporte reverso del colesterol (TRC); además de sus actividades antioxidante y antiinflamatoria. Las HDL son un grupo muy heterogéneo de partículas que difieren en tamaño y composición, lo cual puede ser determinante en su función antiaterogénica.

Las tiazolidinedionas (TZDs; ej: pioglitazona y rosiglitazona) son fármacos antidiabéticos, agonistas de una subclase de receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas γ (PPAR γ) y están implicados en la regulación de genes relacionados con el metabolismo de las HDL, tales como el ABCA-1, apo E y SR-BI. En este contexto, la pioglitazona y la rosiglitazona desplazan la distribución de tamaños de las HDL hacia partículas más pequeñas, además de que incrementan las tasas de catabolismo y síntesis de apo AI, la principal apolipoproteína de las HDL.

Las modificaciones en la estructura de las HDL causadas por la rosiglitazona pueden tener diversas explicaciones; la primera es la modificación de las actividades de los factores plasmáticos de remodelación que participan durante el TRC, como son la lecitin:colesterol acilo transferasa (LCAT) y las proteínas de transferencia de ésteres de colesterol y fosfolípidos (CETP y PLTP). Otra posible explicación sería un incremento en la expresión de receptor scavenger clase B tipo I (SR-BI) que se encuentra localizado en la membrana de los hepatocitos y que tiene un elemento de respuesta a PPAR γ y su interacción con las HDL da lugar a partículas más pequeñas lo cual también se podría ver reflejado en cambios en la cinética de colesterol de estas lipoproteínas.

Durante el presente proyecto hemos tratado de demostrar los factores que intervienen en las modificaciones estructurales de las HDL durante el tratamiento con

rosiglitazona. Los factores plasmáticos de remodelación, LCAT, CETP y PLTP, fueron los primeros en ser estudiados, utilizando un modelo de conejos, encontrando que su actividad no se ve modificada y que por lo tanto podrían no explicar los cambios observados en la distribución de tamaños de las HDL.

En la siguiente etapa del proyecto, estudiamos la cinética metabólica de los ésteres de colesterol de las HDL, donde encontramos que el colesterol contenido en las HDL se elimina de manera más lenta en conejos tratados con rosiglitazona al compararlo contra un grupo control, y además, hay un menor intercambio hacia las lipoproteína proaterogénicas, VLDL/LDL.

Posteriormente, utilizamos un modelo in vitro de células Fu5AH que expresan SR-BI, en donde demostramos que las células tratadas con rosiglitazona captan de manera más lenta el colesterol de HDL comparadas contra controles. Finalmente, cuantificamos la expresión del receptor hepático SR-BI en el mismo modelo celular, donde observamos que el tratamiento con rosiglitazona incrementa la expresión de dicha proteína.

En resumen, en el presente estudio demostramos que la rosiglitazona modifica el metabolismo de los ésteres de colesterol de HDL, paradójicamente asociada a una sobreexpresión del receptor SR-BI y sin modificación de actividad de la CETP ni LCAT. Este comportamiento metabólico resulta en alteraciones discretas de las subclases de HDL durante el tratamiento con rosiglitazona. Los mecanismos por los cuales una sobreexpresión de SR-BI se acompañe de una eliminación lenta del colesterol-HDL, así como las repercusiones de las modificaciones del metabolismo y estructura de las HDL sobre el desarrollo de aterosclerosis durante el tratamiento con rosiglitazona, deberán ser explorados específicamente en estudios posteriores.

ABSTRACT

High density lipoproteins have several antiatherosclerotic properties, like the reverse cholesterol transport (RTC), which is the mechanism to remove the excedent cholesterol from the peripheral cells, as well as their antioxidant and anti-inflammatory properties. HDLs are very heterogeneous particles, with different sizes and compositions, that may define their antiatherosclerotic properties.

Thiazolidinediones (TZDs; rosiglitazone and pioglitazone) are antidiabetic drugs, agonists of the peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) and are involved in the expression of genes implicated in the HDL metabolism, like ABCA-1, apo E and SR-BI. In this context, pioglitazone and rosiglitazone shift HDL size distribution towards smaller particles, and they increase the apo AI catabolism and synthesis rates.

The HDL structure modifications caused by rosiglitazone, may have different causes, like changes in the activity of plasmatic remodeling factors, like the lecithin:cholesterol acyl transferase,LCAT, or the cholesteryl esters and phospholipid transfer proteins, CETP and PLTP. Another possible explanation, could be an increase in the scavenger receptor class B type I (SR-BI), localized in the membrane of hepatic cells. This receptor has a PPAR response element and its interaction with HDL produces smaller lipoproteins and may be reflected in modifications of the HDL cholesteryl esters kinetics.

In the present study we tried to demonstrate de factors involved in the structural modification of the HDL during rosiglitazone treatment. LCAT, CETP and PLTP activities were evaluated in an animal model, and they were not modified.

Then we studied the metabolic kinetics of HDL cholesteryl esters and we found that the elimination from HDL is slower in the rabbits receiveing the rosiglitazone

treatment compared with the control group, and the transfer of these esters to the proatherogenic lipoproteins, VLDL/LDL is decreased.

In the next step, we used an in vitro model with Fu5AH cells, expressing SR-BI, where we demonstrated that the rosiglitazone treated cells have a slower uptake of the HDL cholesterol compared to controls. Finally, we measured the SR-BI expression in the same model, and we found that rosiglitazone increased such expression.

Briefly, in this work, we demonstrated that rosiglitazone modifies the HDL cholesteryl esters metabolism, with an increased SR-BI expression and without changes in the activity of plasmatic remodeling factors. This metabolic behavior results in modifications of the HDL size distribution during rosiglitazone treatment. The mechanism that explains the overexpression of SR-BI accompanied to a slower HDL cholesterol elimination, as well as the consequences of the metabolic and structural modifications of the HDL on the atherosclerosis development during rosiglitazone administration, may be explored in further studies.

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 llamados lipoproteínas.

Las lipoproteínas (Fig. 1) están formadas 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 se encuentran los lípidos no polares (triacilgliceroles y ésteres de colesterol), evitando así la interacción con el medio acuoso.

Además de su función estructural, las apolipoproteínas funcionan como cofactores o inhibidores enzimáticos y como ligandos de receptores. En el Cuadro 1 se presentan las características más importantes de algunas apolipoproteínas.

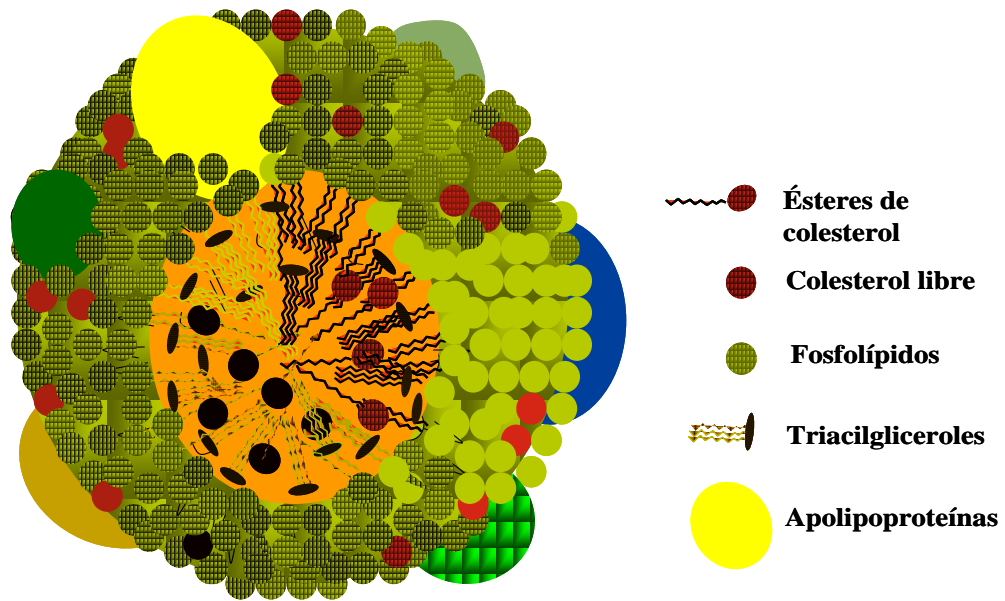


Fig. 1. Composición general de las lipoproteínas. Se muestran los lípidos hidrofóbicos del núcleo, en su superficie los lípidos anfipáticos y las apolipoproteínas que estabilizan a la lipoproteína.

1.1 Clasificación de las lipoproteínas

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

1. De acuerdo a su densidad se conocen cinco clases:

a. Quilomicrones: Son las lipoproteínas de mayor tamaño y densidad menor a 0.94 g/mL. Tienen un alto contenido en triacilglicéridos y sus apolipoproteínas son B-48, A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E.

b. Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, Very Low Density Lipoproteins): $0.94 < \text{densidad} < 1.006$ g/mL. Contienen principalmente triacilglicéridos, apo B-100, C-I, C-II, C-III y E.

Cuadro 1. Características de las apolipoproteínas¹.

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: Triacilgliceroles, 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.

c. *Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, Intermedie Density Lipoproteins):* 1.006 < densidad < 1.019 g/mL. Estas partículas contienen colesterol y triacilgliceroles, apo B-100, C-I, C-II, C-III y E.

d. *Lipoproteínas de baja densidad (LDL, Low Density Lipoproteins):* 1.019 < densidad < 1.063 g/mL. Tienen un alto contenido en colesterol y apo B-100.

e. *Lipoproteínas de alta densidad (HDL, High Density Lipoproteins):* 1.063 < 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 < densidad < 1.120 g/mL.

- HDL₃: 1.120 < densidad < 1.210 g/mL.

En función de su tamaño, las dos poblaciones, HDL₂ y HDL₃, se pueden subclasificar 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.

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

En el Cuadro 2 se resumen algunas de las características de las diferentes lipoproteínas clasificadas con base a su densidad de flotación.

Cuadro 2. Propiedades de las lipoproteínas plasmáticas ².

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: Triacilgliceroles, Prot: proteína, CL: colesterol libre; CE: colesterol esterificado.

2. 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 en su conjunto como factores plasmáticos de remodelación intravascular) están involucrados en este metabolismo. Estos factores influyen en la concentración de los lípidos en las lipoproteínas al favorecer 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 A-1 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.

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 intravascular 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.

2.1. Metabolismo intravascular de las HDL

El metabolismo intravascular de las las HDL se denomina transporte reverso del colesterol (TRC) que consiste en el regreso del exceso de colesterol proveniente de las células periféricas hacia el hígado para su excreción o reciclaje. Durante este proceso, las HDL participan de manera activa, lo que les confiere propiedades antiaterogénicas, ya que por medio de este pueden evitar la formación de la placa ateromatosa ³

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 triacilgliceroles y fosfolípidos de HDL, IDL y LDL. Es cofactor de SR-BI para una captación selectiva, así como la generación de apo A-I libre de lípidos.	Hepático.
LPL	Hidroliza los triacilgliceroles de VLDL y Qm utilizando C-II como cofactor. Favorece la generación de precursores de HDL.	Tejido adiposo y muscular, pared endotelial, pulmón.
CETP	Intercambia ésteres de colesterol por triacilgliceroles entre las HDL ₂ y las lipoproteínas que contienen apo B.	Tejido adiposo, hepático, intestino delgado.
RECEPTORES Y PROTEÍNAS DE MEMBRANA		
SR-BI	Receptor para las HDL para intercambiar colesterol entre los hepatocitos y las células	Hepatocito, macrófagos, tejidos esteroideogénicos
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 influjo hepático de colesterol.	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.

La primera etapa del TRC (Fig. 2) es el eflujo de colesterol que ocurre a través de diversos mecanismos desde 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) intercambio facilitado por la CETP de los ésteres de colesterol-HDL₂ a las lipoproteínas ricas en triglicéridos. Como resultado de este intercambio, las apos C's y E se transfieren a los quilomicrones y VLDL, mientras que las HDL₂ se enriquecen con triacilgliceroles. Esto últimos son entonces hidrolizados por la lipasa hepática (LH), dando lugar a remanentes de HDL que son remodelados en partículas pre-β y HDL₃, por medio de la actividad de la PLTP. Es así como el colesterol de los tejidos periféricos llega al hígado para ser reciclado o excretado a través de las vías biliares ⁴. Además de estas vías de eliminación del colesterol, la apo A-I puede ser reconocida por la cubilina⁵, proteína de membrana presente en el túbulo renal, que permite la internalización de las partículas para su posterior degradación. (Fig. 2).

3. 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) ⁶. Por lo tanto, el estudio de su diagnóstico y tratamiento es prioritario para combatir este mal. 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 ⁷. A partir de esta correlación negativa, se ha postulado que las HDL desempeñan una función antiaterosclerosa.

El desarrollo de la EAC implica procesos oxidativos, inflamatorios y trombóticos, en los cuales hay una participación activa de las diversas lipoproteínas que hay en el plasma (Fig. 3). Las HDL particularmente pueden participar evitando el desarrollo de la enfermedad desde varias de sus etapas.

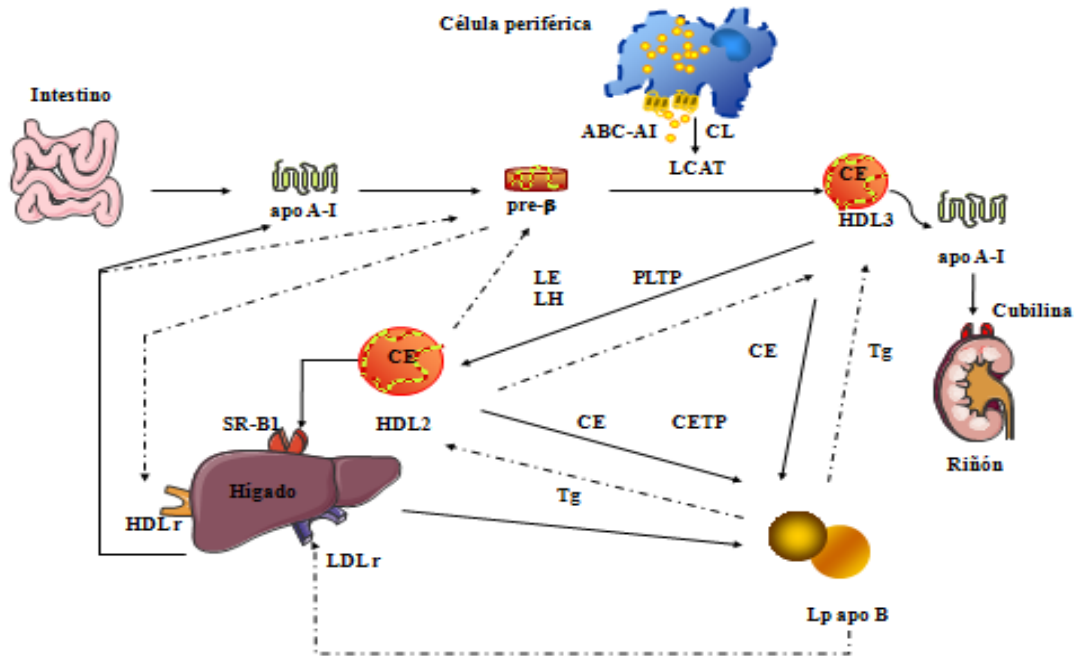


Fig 2. Transporte reverso del colesterol. Mecanismo por el cual las lipoproteínas de alta densidad (HDL) transportan el colesterol excedente de las células periféricas al hígado, para su eliminación o reciclaje. CL: Colesterol libre. CE: Colesterol esterificado. Lp apo B: Lipoproteínas ricas en apo B (VLDL; lipoproteínas de muy baja densidad, LDL; lipoproteínas de baja densidad y Qm; Quilomicrones). LCAT: Lecitina colesterol acilo transferasa; LH: Lipasa hepática; CETP: Proteína transportadora de ésteres de colesterol. PLTP: Proteína transportadora de fosfolípidos, SR-BI: Receptor Scavenger BI, ABCA-1: Transportador de membrana dependiente de ATP. LH: Lipasa hepática. LE. Lipasa endotelial. HDLr: Receptor hepático de HDL (fracción β de ATPasa).

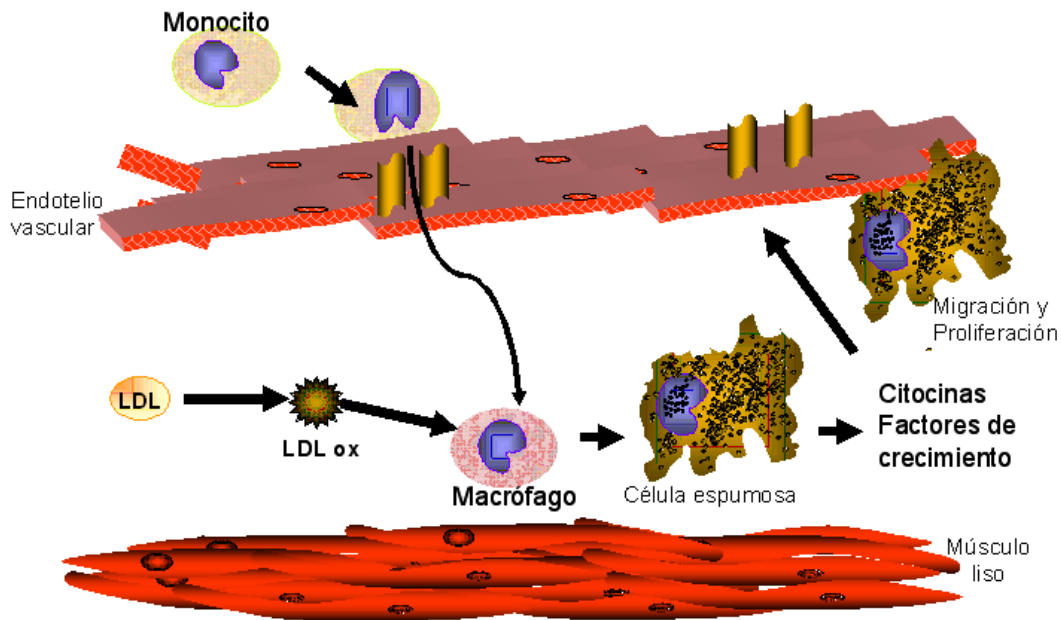


Fig. 3. Esquema de las primeras etapas en la formación de la placa aterosclerótica. En zonas donde existe disfunción endotelial se facilita la infiltración de LDL al espacio subendotelial, donde sufren procesos de modificación, generando LDL oxidadas (LDL ox). Los monocitos se adhieren al endotelio activado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

Además de su papel central en el TRC, las HDL se asocian a una enzima llamada paraoxonasa (PON) la cual evita la propagación de radicales libres hacia los lípidos de las LDL en las etapas iniciales del desarrollo de la enfermedad ⁸⁻⁹. Además inhiben la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio, retrasando la infiltración de monocitos al espacio subendotelial ¹⁰⁻¹¹. Por medio del TRC, evitan la acumulación de colesterol en los macrófagos, retardando la formación de placa aterosclerótica. Por último, poseen actividades antitrombóticas y profibrinolíticas ¹².

3.1. Importancia de la subclasificación de las HDL y su potencial antiaterogénico

Como consecuencia del metabolismo intravascular de las HDL, se originan diferentes tipos de partículas que se distinguen por su composición, tamaño y densidad. Se ha postulado que la concentración de las subpoblaciones de HDL es más importante como marcador de riesgo cardiovascular ^{1, 8-9, 13} que el nivel de colesterol-HDL. Sin embargo, existe controversia sobre cuál es la subpoblación de las HDL que brinda una mayor protección ante el riesgo de desarrollar enfermedad aterosclerosa.

En los estudios epidemiológicos prevalecen las HDL grandes tipo 2 como la fracción protectora ante el riesgo de desarrollar enfermedad coronaria ¹⁴⁻¹⁵. En contraste, diversos estudios *in vitro* demuestran lo contrario; debido a que las subpoblaciones pequeñas de HDL, principalmente las 3b y 3c, promueven con mayor eficiencia el eflujo de colesterol ¹³ y tienen un mayor poder antioxidante al asociarse fácilmente con la enzima paraoxonasa (PON) ⁸⁻⁹

3.2. Relación entre el tamaño y el catabolismo de las HDL

Las diferentes subclases de HDL son el resultado de su interacción con proteínas que modifican de manera dinámica su composición y tamaño. Estos cambios estructurales probablemente tengan efecto sobre las propiedades antiaterogénicas de estas lipoproteínas.

En diversos estudios se ha demostrado que el tamaño de las HDL se relaciona con la tasa de catabolismo de apo AI. Sujetos con la enfermedad “fish eye” que se caracterizan por carecer de actividad LCAT debido a una mutación en la proteína, se presentan concentraciones de C-HDL muy bajas, asociadas a un hipercatabolismo de apo AI ¹⁶. De la misma manera, portadores de la mutación apo AI_{Paris}, presentan HDL

con un diámetro promedio más pequeño que las de pacientes control, además de presentar un catabolismo más rápido de la proteína ¹⁷.

Con estas evidencias y otras evidencias en el mismo sentido, se puede postular que un aumento en la proporción de HDL pequeñas tipo 3b y 3c, se asocia con un catabolismo de la apo AI incrementado. Si esta afirmación es válida, entonces un incremento en el tamaño de las HDL estaría acompañado de un catabolismo más lento. En este sentido, estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado un aumento en el tamaño de HDL asociado a una menor tasa de catabolismo de apo AI en un modelo de ratas hipotiroideas. ¹⁸

En pacientes con resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2 se ha reportado que la distribución de tamaños de las HDL se desplaza hacia partículas pequeñas, además de presentar incremento en la tasa de catabolismo de apo AI ¹⁹⁻²¹. En conjunto estas evidencias apoyan la idea de que el tamaño de las HDL se asocia de manera inversa con su tasa de catabolismo.

Cabe destacar que hasta el momento, las evidencias que muestran una relación entre la presencia de HDL pequeñas y el hipercatabolismo de apo AI son indirectas, por lo que se requiere diseñar estudios que muestren una relación causa-efecto entre la estructura de la lipoproteína y su velocidad de depuración.

4. 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 ²²⁻²³. Las dos TZD comerciales son la pioglitazona y la rosiglitazona (Fig. 4).



Fig. 4. Estructura química de las tiazolidinedionas comerciales, pioglitazona y rosiglitazona.

4.1. 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 y existen tres clases diferentes: α , β/δ , y γ . Las tiazolidinedionas actúan activando a la isoforma γ , cuyos ligandos naturales son 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 hidroxi-octadecadienoico (9 y 13-HODE) ²⁴⁻²⁵. 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, los PPARs activados por su ligando forman un heterodímero con el receptor del ácido retinóico (RXR) (Fig. 5). Una vez formado, el heterodímero (PPAR:RXR), se une a elementos de respuesta para la proliferación de peroxisomas (PPRE). Los elementos de respuesta están constituidos por nucleótidos que actúan como secuencias de regulación de la expresión de ciertos genes ²⁵.

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-4 ²⁶. También se involucran en la regulación de genes implicados en el metabolismo de los lípidos, tales como el de la lipoproteína lipasa (LPL), incrementa la expresión de apo E, del receptor SR-BI y ABCA-1 (ver Cuadro 3)²⁷⁻²⁸.

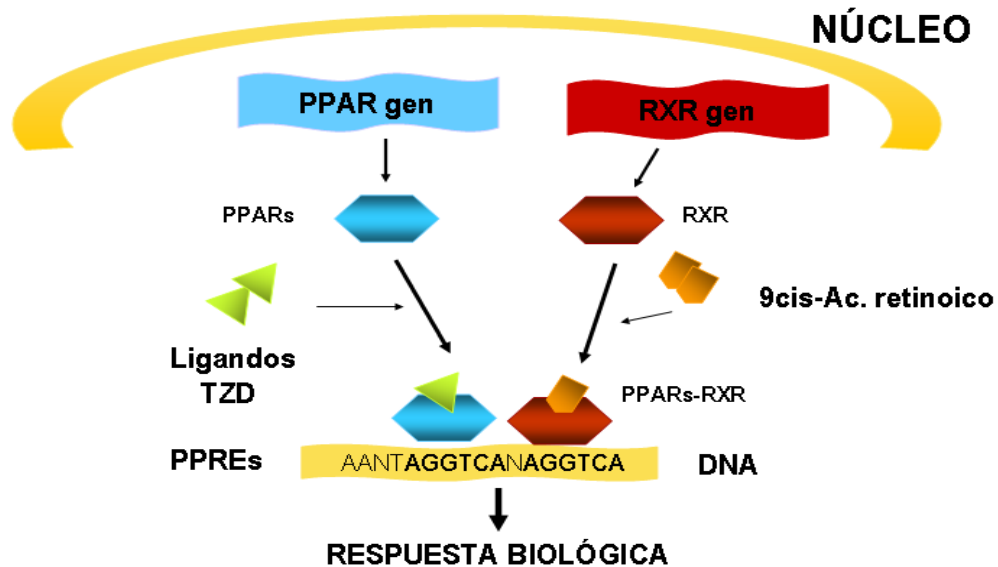


Fig. 5. Mecanismo de acción de los PPAR γ . TZD: Tiazolidinedionas, PPAR: Receptor activado por proliferador de peroxisomas; RXR: Receptor del ácido 9-cis retinoico.

En el 2007, la Agencia de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos, (Food and Drug Administration, FDA), revisó los resultados de diversos estudios clínicos que mostraban la asociación de la administración de Avandia con el incremento de riesgo de eventos isquémicos, tales como angina e infarto al miocardio, en comparación con el placebo y otros fármacos antidiabéticos, como la metformina y las sulfonilureas, por lo que requirió al fabricante la inclusión de una leyenda en el empaque donde se advirtiera de los riesgos concomitantes al consumo del medicamento (*"black box"*) y la realización de estudios a largo plazo donde se evaluarán dichos riesgos ²⁹⁻³⁰.

En el 2010, la FDA, tras la publicación de estudios clínicos que confirmaron la asociación del consumo de rosiglitazona con el riesgo de sufrir falla cardíaca, infartos, etc. ³¹ limitó el consumo del medicamento a pacientes diabéticos que no logren controlarse con otros fármacos ³²⁻³³.

Además de las evidencias expuestas anteriormente, el uso de TZDs ha sido muy controversial debido a diferentes efectos adversos presentes durante su consumo, tales como aumento de peso, fracturas óseas y edema macular ³⁴⁻³⁵.

4.2. Efecto de las tiazolidinedionas sobre el metabolismo de las HDL

Estudios realizados previamente en nuestro laboratorio demostraron que la pioglitazona aumenta al doble las tasas de síntesis y catabolismo de apo AI en conejos, asociado a un incremento en la proporción de HDL pequeñas tipo 3c. Además, se observó un incremento significativo en la concentración plasmática de C-HDL en los animales tratados con este fármaco. Con este modelo, una vez más se demostró la asociación del tamaño de las partículas HDL y su catabolismo ³⁶.

Posteriormente, al realizar experimentos similares, pero esta vez usando rosiglitazona, se observaron diferencias en el efecto de este fármaco sobre el metabolismo de las HDL con respecto a lo que se observó en los animales tratados con pioglitazona. En primer lugar, la rosiglitazona induce incrementos en las tasas de catabolismo y síntesis de la apo AI, pero éstos son cuatro y cinco veces menores, respectivamente, a los producidos por la pioglitazona ³⁷. Además, la proporción de HDL3c también aumenta, pero en menor proporción que en el tratamiento con el pioglitazona. Este hecho soporta la hipótesis que asocia el aumento en el catabolismo de las HDL con un menor tamaño de partícula. Finalmente, a diferencia de la pioglitazona, la rosiglitazona no modifica la concentración de C-HDL en los conejos tratados.

Además del efecto diferencial en cuanto al metabolismo de apo AI con ambos fármacos se observan diferencias en la composición lipídica de las HDL de animales tratados con uno u otro medicamento. En el caso del tratamiento con rosiglitazona, las HDL presentan un aumento en la proporción de fosfolípidos y colesterol libre inducidas por cada una de las tiazolidinedionas³⁷; estas diferencias en cuanto a composición, pueden ser causantes de un incremento en la asociación de PON a las HDL, enzima que participa en la actividad antioxidante de estas lipoproteínas. Las diferencias que se presentan en el contenido de fosfolípidos entre ambos fármacos, puede afectar también el catabolismo de estas partículas, ya que se ha demostrado que el incremento en estos lípidos de superficie se asocia a un catabolismo más lento.

El origen de las modificaciones estructurales de las HDL durante el tratamiento con rosiglitazona no ha sido elucidado. Modificaciones en la actividad de los factores plasmáticos de remodelación, LCAT, CETP y PLTP, podrían dar una explicación a los cambios en la estructura de estas partículas. Del mismo modo ocurre con la modificación en la eliminación por vía hepática del C-HDL por medio del receptor SR-BI, cuya expresión se modifica por activación de PPAR γ , como se mencionó anteriormente.

Además, en conejos tratados con rosiglitazona se observó un aumento en el catabolismo de la apo AI presente en las HDL como resultado de la disminución del tamaño de las partículas ³⁷. Sin embargo, el metabolismo del colesterol presente en dichas lipoproteínas no ha sido estudiado. Es importante recordar que el colesterol y la proteína de las HDL tienen diferentes sitios catabólicos; mientras que se ha planteado que la proteína, en particular la apo AI, puede ser eliminada por vía renal ⁵, el colesterol se elimina principalmente por vía hepática ⁴.

Por lo anterior, los resultados de los estudios cinéticos con apo AI descritos anteriormente, no necesariamente reflejan lo que ocurre con la eliminación de colesterol de las HDL. Dado que la rápida eliminación del colesterol de HDL destaca

entre las propiedades antiaterogénicas de las mismas, el estudio cinético de su metabolismo podría apoyar la idea de que la estructura de las HDL es determinante en su capacidad para impedir o disminuir el desarrollo de la aterosclerosis.

Durante el presente proyecto se estudió la actividad de los diferentes factores plasmáticos de remodelación durante el tratamiento con rosiglitazona como posible causa de la modificación estructural de las HDL observada anteriormente. Además se realizaron estudios cinéticos utilizando ésteres de colesterol en conejos tratados con rosiglitazona para el estudio del flujo de C-HDL *in vivo*. Finalmente se plantearon modelos *in vitro* para el estudio de la expresión de SR-BI y su relación con la captación hepática (influjos) de colesterol.

HIPÓTESIS

El tratamiento con rosiglitazona causa modificaciones en la actividad de los factores plasmáticos de remodelación de las HDL e incrementa la expresión hepática de SR-BI, lo que resulta en cambios estructurales de las HDL y en la cinética metabólica de sus ésteres de colesterol.

OBJETIVO GENERAL

Describir algunos de los factores que participan en las modificaciones estructurales en las HDL observadas durante el tratamiento con rosiglitazona.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la actividad de los factores plasmáticos de remodelación, LCAT, CETP y PLTP antes y durante el tratamiento con rosiglitazona en un modelo de conejos.
2. Determinar la cinética de ésteres de colesterol de HDL en conejos tratados con rosiglitazona.
3. Valorar el efecto de la rosiglitazona sobre la expresión de SR-BI y su influencia sobre la captación de colesterol *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron conejos macho, raza Nueva Zelanda de 3.5-4.0 kg de peso. Un grupo recibió rosiglitazona (Avandia, Glaxo Smith-Kline) en suspensión acuosa, en dosis de 0.34 mg/kg, lo que corresponde al triple de la dosis máxima utilizada en humanos con el objeto de acentuar los efectos sobre el metabolismo de las lipoproteínas; en el caso del grupo de conejos control recibieron el vehículo. El tratamiento se administró vía oral, diariamente, durante 6 semanas. El tamaño del grupo fue determinado en base a estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio en los cuales se emplearon conejos³⁶⁻³⁸

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. El plasma se separó centrifugando a 2500 rpm durante 15 min. Las HDL se separaron a partir de plasma fresco, mientras que el resto de las muestras de plasma se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

Análisis de laboratorio

Las concentraciones de colesterol total, triacilgliceroles, glucosa, y fosfolípidos, se determinaron mediante métodos enzimático-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).

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, y nuevamente centrifugando a 100 000 rpm durante 3 h; en estas condiciones del 80% a 85% de la apo A-I total del plasma se recupera en las fracciones de las HDL. Las HDL aisladas se dializaron en una solución amortiguadora de Tris 0.09 M, ácido bórico 0.08M, EDTA 3mM, pH 8.4 (Amortiguador TBE). La determinación de proteína se realizó por el método de Lowry ³⁹. (Apéndice 1)

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) ⁴⁰ Las bandas se tiñeron con azul de Coomassie y finalmente se analizaron por densitometría óptica 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) ⁴¹. (Apéndice 2)

Determinación de actividad de factores plasmáticos de remodelación

a) ACTIVIDAD LCAT

La actividad de LCAT se determinó utilizando el método descrito por Chen y Alberts ⁴² con modificaciones realizadas en nuestro laboratorio ⁴¹. Se prepararon proteoliposomas 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 detuvo y los lípidos fueron extraídos 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 expresaron como porcentaje de colesterol esterificado.

b) ACTIVIDAD CETP

La actividad de CETP se determinó de acuerdo a método descrito por Tollefson JH ⁴³ con modificaciones realizadas en nuestro laboratorio ⁴¹. El colesterol esterificado marcado con tritio, se incorporó a partículas HDL. Las partículas HDL marcadas se mezclaron con VLDL y se incubaron con el plasma en estudio (que contiene a la CETP) durante 16 h a 37°C; posteriormente se separaron las HDL de las VLDL por precipitación selectiva, usando una solución de sulfato de dextrán/magnesio, en la fracción sobrenadante se contó la radiactividad en un contador de centelleo. Los resultados se expresan en porcentaje de transferencia de colesterol esterificado por hora y por mL de plasma

c) ACTIVIDAD PLTP

La actividad PLTP se determinó con el método reportado por Murdoch et al ⁴⁴ 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 los liposomas de las HDL, precipitándolos de manera selectiva con una solución de sulfato de dextrán/magnesio y se determinó la radiactividad

en la fracción sobrenadante en un contador de centelleo. Los resultados se expresan como porcentaje de transferencia de fosfolípidos por hora y por mL de plasma.

Preparación y purificación de HDL marcadas con ésteres de ³H-colesterol

La preparación de HDL marcadas con ésteres de ³H-colesterol se realizó por la técnica estandarizada en nuestro laboratorio ⁴¹. A partir de plasma fresco se separó por ultracentrifugación la fracción de lipoproteínas de densidad menor a 1.063 g/mL (VLDL/LDL). El resto del plasma, que contiene a las HDL y otras proteínas, entre ellas la enzima LCAT, fue marcado con 1 α , 2 α -³H-colesterol libre (1 μ Ci por cada mL de plasma, con una actividad específica de 118.96 mCi/mg de colesterol) e incubado durante 16 a 18 horas a 37 °C para permitir que la LCAT esterifique el colesterol radiactivo y los ésteres se incorporen en las HDL. Posteriormente, las HDL fueron separadas por ultracentrifugación y purificadas por medio de cromatografía de exclusión de tamaños (Sephadex G-25 Medium) con la finalidad de eliminar el colesterol no incorporado a las lipoproteínas, eluyendo con amortiguador de fosfatos con un pH de 7.4 ⁴⁵. Las fracciones eluidas que contienen a las HDL marcadas son identificadas determinando la concentración de proteína y colesterol.

Cinética de colesterol

Los estudios cinéticos de ésteres de colesterol de las HDL se llevaron a cabo con el método reportado por Kee et al, modificado en nuestro laboratorio ⁴⁶. Brevemente, un grupo de conejos tratados con rosiglitazona y otro de conejos control recibieron por vía intravenosa HDL aisladas de conejos donadores marcadas con ésteres de ³H-colesterol a una dosis de 1×10^6 cpm (aproximadamente 400 cpm/ μ g de proteína). Se tomaron muestras de plasma a diferentes tiempos durante 5 horas, considerando

como el valor del tiempo inicial (t_0) a la muestra obtenida 5 minutos después de la administración. Las fracciones VLDL/LDL y HDL se separaron por ultracentrifugación. En cada fracción se determinó la cantidad de radiactividad con un contador de centelleo. Se considera el 100% de radiactividad al total de cuentas en la fracción HDL en el t_0 , mientras que en el caso de la fracción de lipoproteínas que contienen apo B, la radiactividad presente en el t_0 es considerada como el 0% ya que es debida a transferencia pasiva.

Influjo de colesterol

Se determinó de acuerdo al método de Badeau y cols. ⁴⁵ utilizando células de hepatoma de rata Fu5AH que expresan constitutivamente el SR-BI. Las células se cultivaron (50 000 células/pozo) en presencia de rosiglitazona durante 48 horas (0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Veinticuatro horas antes de realizar el ensayo, las células se lavaron y se incubaron con medio que contiene 1% de SFB con la finalidad de eliminar la reserva de colesterol intracelular; posteriormente se agregaron HDL marcadas con ésteres de ³H-colesterol (25 000 cpm/pozo), y se determinó la cantidad de colesterol transferido de las lipoproteínas a las células a diferentes tiempos para establecer el intervalo óptimo. Para calcular el porcentaje de transferencia, se midió la radiactividad en el medio y después de lavar se extrajo el colesterol de las células incubando durante 1 h a temperatura ambiente con isopropanol.

Cuantificación de SR-BI

Se determinó en células Fu5AH, mediante Western blot. Las células fueron cultivadas (2 000 000 células/ensayo) en presencia de rosiglitazona durante 48 horas (0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Posteriormente fueron desprendidas con tripsina y lavadas. Posteriormente fueron resuspendidas en amortiguador de fosfatos (pH 7.4) adicionado de Zwittergent y lisadas por medio de ultrasonido, dejándose incuban toda la noche a 4°C. Cincuenta μg de la muestra ya incubada se separaron en un gel SDS-PAGE al 10% durante 2.5 h a

80 V. Al finalizar, se transfirió hacia una membrana de PVDF, que después de ser bloqueada (albúmina 3%) durante toda la noche, se incubó con anticuerpo policlonal anti SR-BI de rata y anti GAPDH (gliceraldehído 3-fosfatodeshidrogenasa, 1:1000), para estandarizar la cantidad de proteína. Después de lavar se incubó con anticuerpo secundario anti IgG de cabra conjugado a peroxidasa y finalmente fue revelado con O-diaminobencidina y peróxido de hidrógeno. El análisis se llevó a cabo mediante densitometría óptica, utilizando como control la expresión de la GAPDH.

Análisis estadístico

Para cada grupo de tratamiento, se reportó la media \pm la desviación estándar. Se compararon por medio de una prueba t de Student de grupos independientes los valores obtenidos del grupo o células control contra los conejos o las células tratados con rosiglitazona. En el caso de la determinación de triglicéridos, se realizó la misma prueba estadística, empleando el logaritmo de los valores obtenidos para normalizar. Valores de p menores al 0.05 se consideraron significativos.

RESULTADOS

Perfil de lípidos y glucosa.

En vista de que la rosiglitazona es un antidiabético, nos interesamos en primer lugar en establecer si el fármaco inducía hipoglucemia en los conejos tratados. Nuestros resultados demuestran que no existen diferencias significativas de la glucosa plasmática entre el grupo tratado durante 6 semanas con rosiglitazona y el control (tabla 1). En lo que concierne al perfil lipídico, el tratamiento con rosiglitazona no modificó las concentraciones plasmáticas de C-HDL, pero produjo un incremento en la concentración plasmática de triglicéridos de aproximadamente el 40%. Estos resultados se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones plasmáticas de lípidos y glucosa en conejos control y tratados con rosiglitazona

	Control	Rosiglitazona
	(n=12)	(n = 12)
Colesterol total (mg/dL)	30.89 ±15.06	28.18 ± 10.42
Colesterol- HDL (mg/dL)	14.29 ± 8.11	15.44 ± 7.72
Triglicéridos (mg/dL)	40.71 ± 7.96	58.41 ± 18.58*
Glucosa (mg/dL)	111.06 ±18.72	114.58 ± 22.5

*Los valores se expresan como la media ± DE.
t de Student * p<0.05 vs. grupo control.*

Distribución relativa de subpoblaciones de HDL

Para establecer los efectos de la rosiglitazona sobre la distribución de tamaños de las HDL aislamos estas lipoproteínas por ultracentrifugación secuencial a partir de plasma de los conejos tratados. Posteriormente las sometimos a una electroforesis en gradiente de poliacrilamida en condiciones nativas para determinar la distribución relativa de las subclases de HDL según se describe en la sección de métodos. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Distribución relativa de las diferentes subpoblaciones de HDL en el grupo de conejos control y los tratados con rosiglitazona.

	Control	Rosiglitazona
	(n=12)	(n = 12)
HDL 2b (%)	45.9 ± 8.8	41.0 ± 10.5 *
HDL 2a (%)	21.2 ± 2.5	21.0 ± 6.7
HDL 3a (%)	24.7 ± 8.1	25.4 ± 8.4
HDL 3b (%)	6.3 ± 4.4	6.2 ± 4.5
HDL 3c (%)	1.9 ± 1.0	3.9 ± 2.9 **

*Los valores se expresan como la media ± DE.
t de Student * p<0.05; ** p<0.001 vs. grupo control*

La distribución de subpoblaciones de HDL se desplaza ligeramente hacia partículas más pequeñas en el caso de los conejos tratados con rosiglitazona al compararlos contra el grupo control. Se observa una menor proporción de HDL 2b, mientras que aumenta la fracción 3c, que son las más pequeñas.

Actividad de factores plasmáticos de remodelación

La estructura de las HDL es modificada continuamente durante su metabolismo intravascular debido al intercambio de lípidos que se lleva a cabo entre las diferentes lipoproteínas; este proceso es realizado por diferentes enzimas y proteínas, entre ellas los factores de remodelación intravascular, LCAT, CETP y PLTP. En nuestra hipótesis planteamos que el posible origen de las modificaciones estructurales de las HDL podría ubicarse en cambios en las actividades de dichos factores. Los resultados de las determinaciones realizadas se presentan en la Tabla 3, donde claramente se observa que el tratamiento con rosiglitazona no modifica las actividades de dichos factores.

Tabla 3. Actividad de los factores plasmáticos de remodelación en conejos control y tratados con rosiglitazona.

	Control	Rosiglitazona
	(n=12)	(n = 12)
LCAT		
(% de esterificación)	7.0 ± 3.2	5.5 ± 3.7
CETP		
(% de transferencia)	31.6 ± 6.7	32.3 ± 6.0
PLTP		
(% de transferencia)	24.4 ± 9.6	21.6 ± 7.3

*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.*

Cinética de colesterol

Las modificaciones estructurales en las HDL observadas durante el tratamiento con rosiglitazona, podrían ser el resultado de cambios en el flujo de colesterol entre las diferentes lipoproteínas. Para demostrar esto, administramos HDL que contienen ésteres de colesterol marcados con tritio a conejos tratados con rosiglitazona. Posteriormente cuantificamos la radiactividad presente en las fracciones VLDL/LDL y HDL a diferentes tiempos, tal como se describe en la sección de métodos.

Las gráficas muestran que en los conejos tratados con rosiglitazona (n=8), existe un mayor porcentaje de radiactividad en la fracción HDL a los 150, 240 y 300 minutos, en comparación con el grupo control (n=7) (Figura 6).

Por otro lado, al analizar la transferencia de ésteres de colesterol hacia la fracción VLDL/LDL, observamos que en el caso de los animales tratados con rosiglitazona existe un menor porcentaje de radiactividad a los 15, 30 y 60 min en comparación con el grupo control (Fig. 7).

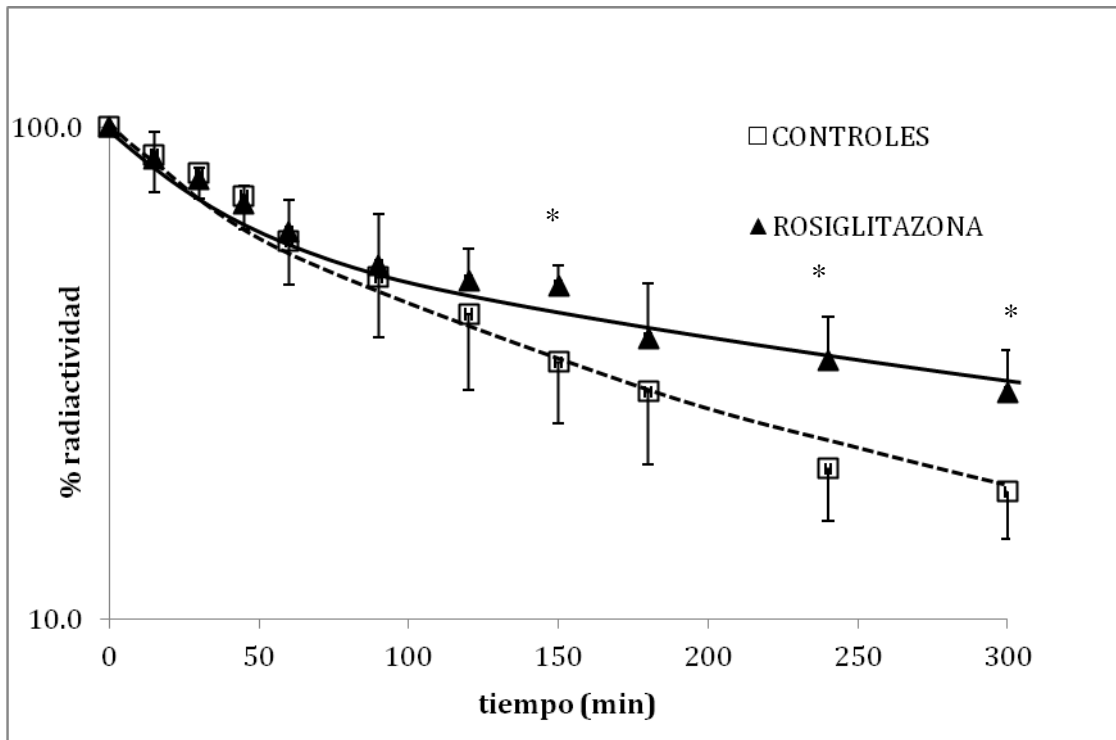


Fig. 6. Depuración de ésteres de colesterol de HDL en conejos control y tratados con rosiglitazona.

Los valores se expresan como media \pm error estándar.

t de Student * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. grupo control

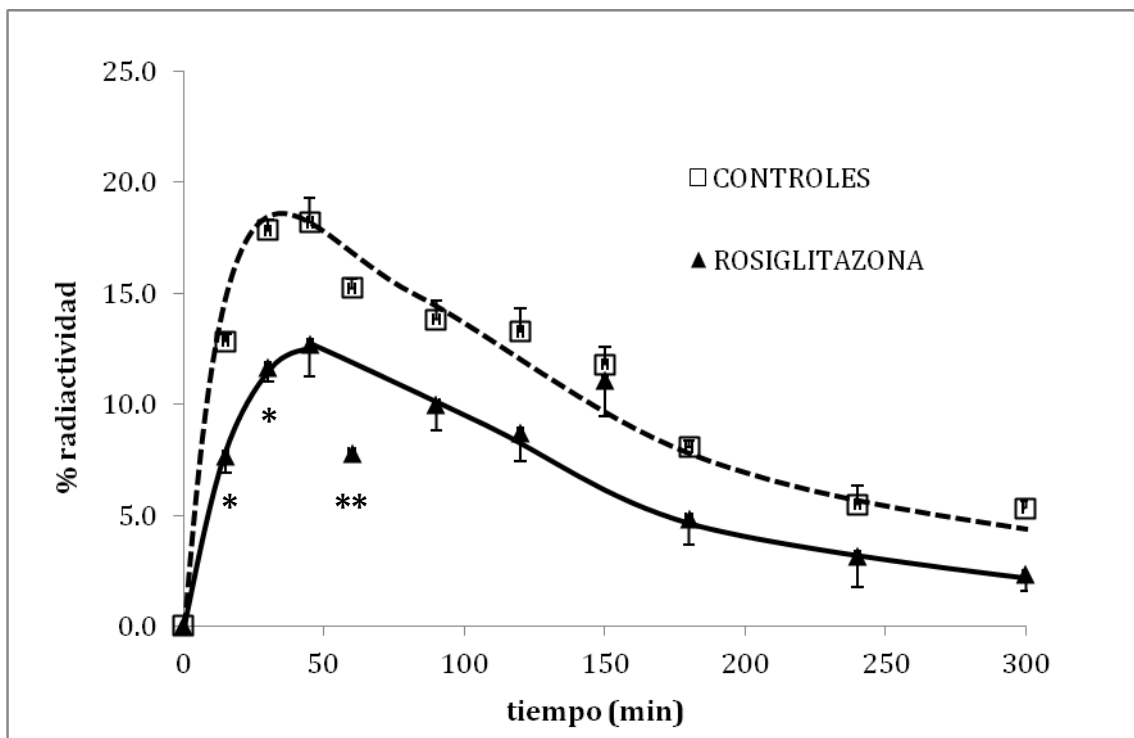


Fig. 7. Transferencia de ésteres de colesterol hacia VLDL/LDL en conejos control y tratados con rosiglitazona.

Los valores se expresan como media \pm error estándar.
t de Student * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. grupo control

Expresión de SR-BI

El C-HDL es captado en el hígado a través de un receptor de membrana llamado SR-BI cuya función es remover el colesterol esterificado que contienen las HDL grandes para regenerar partículas pequeñas del tipo 3, por lo que las modificaciones en la expresión de dicho receptor podrían repercutir directamente en la distribución de tamaños y metabolismo de las HDL de los conejos tratados con rosiglitazona. Para comprobarlo, cuantificamos esta proteína en cultivos de células de hepatoma Fu5AH tratadas con rosiglitazona, mediante Western blot, utilizando para la normalización GAPDH como proteína constitutiva.

En los ensayos realizados, encontramos que las células tratadas con rosiglitazona presentan un aumento del 59 % en la cantidad de SR-BI con respecto al cultivo control (Fig. 8).

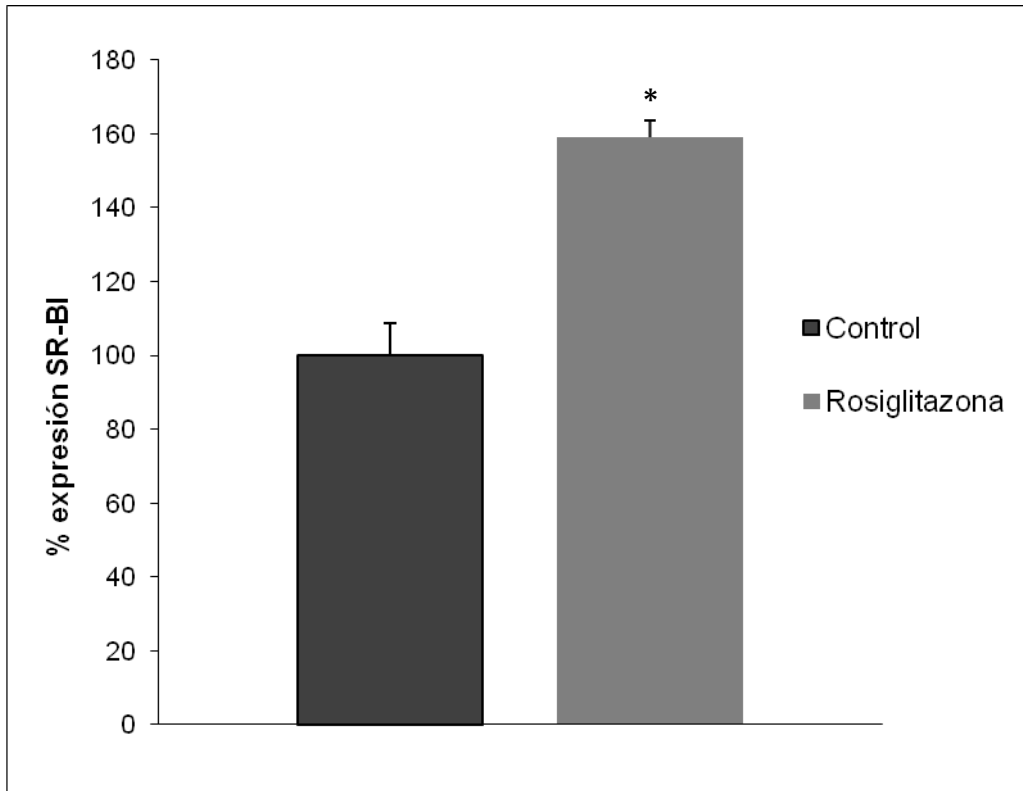


Fig. 8. Expresión de SR-BI en células Fu5AH control y tratadas con rosiglitazona. (n=5).

Los valores se expresan como porcentaje de expresión con respecto al control. \pm error estándar.

t de Student * $p < 0.05$ vs. grupo control

Influjo de colesterol

Al observar el incremento en la expresión de SR-BI, nuestro siguiente objetivo fue determinar si dicho aumento en la expresión de la proteína se acompañaba de cambios en la captación de colesterol en el modelo de células tratadas con rosiglitazona, las cuales fueron coincubadas con HDL enriquecidas con ésteres de

colesterol marcados con tritio y finalmente se determinó el porcentaje de radiactividad en el interior de las células.

Durante el desarrollo de la técnica, se estableció el tiempo óptimo de incubación mediante una cinética de influjo (Fig. 9), el cual resultó de ser de 3 horas.

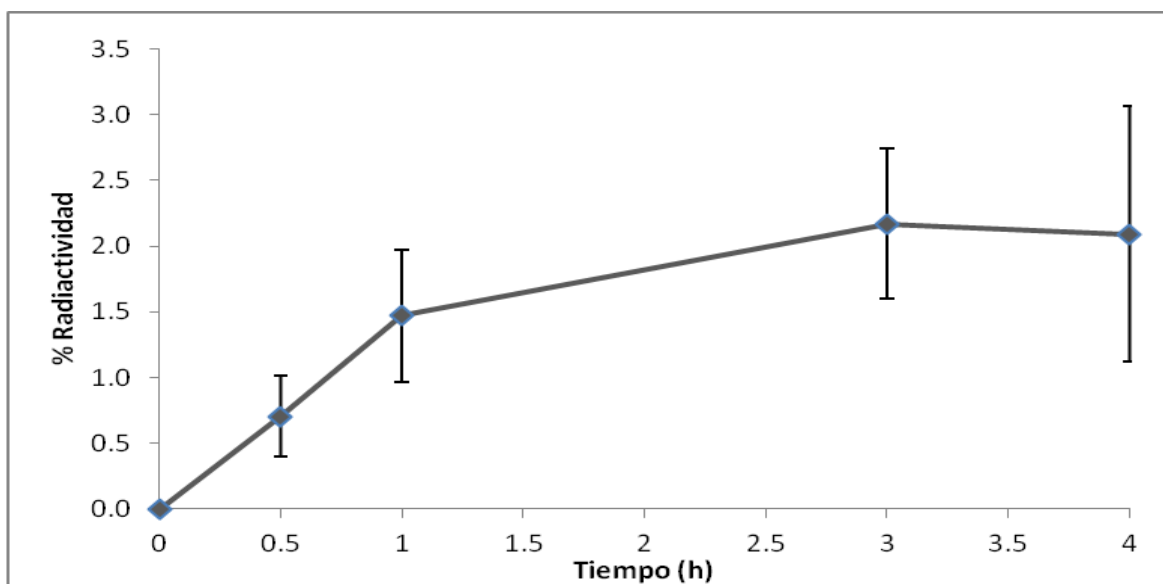


Fig- 9. Desarrollo de técnica de influjo de colesterol (n = 15). Los resultados se muestran como la media \pm desviación estándar.

Una vez establecidas las condiciones experimentales, observamos que las células tratadas con rosiglitazona presentan una captación del 1.6% de ésteres de colesterol de HDL, mientras que en el caso de las células control es del 2.2% y la diferencia fue estadísticamente significativa (Fig. 10).

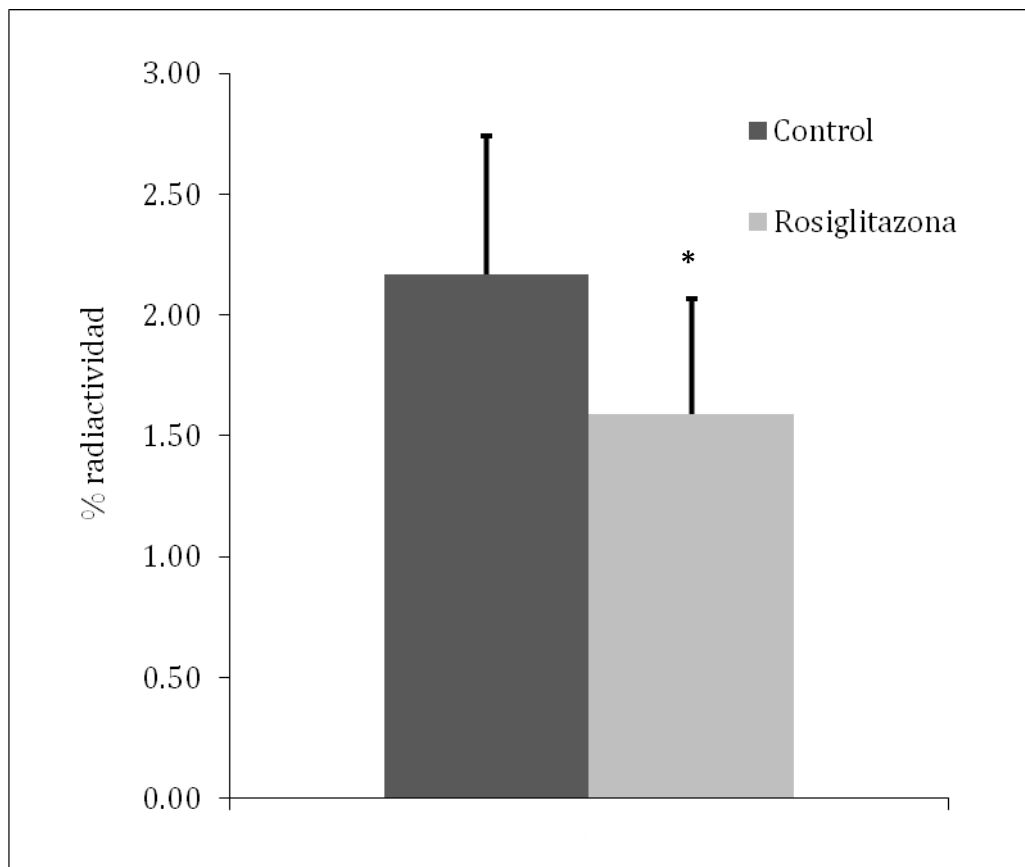


Fig.10. Transferencia de ésteres de colesterol de HDL hacia células Fu5AH control y tratadas con rosiglitazona.. (n =15).
Los valores se expresan como la media ± DE.
t de Student * p<0.05 vs. grupo control.

DISCUSIÓN

Durante el presente trabajo de investigación, hemos puesto de manifiesto diversos cambios en el metabolismo de las HDL durante el tratamiento con rosiglitazona, haciendo uso de un modelo de conejos y posteriormente experimentos *in vitro* utilizando cultivos celulares para confirmar algunas de las hipótesis.

La administración de rosiglitazona indujo un ligero aumento en la proporción de HDL pequeñas tipo 3c en los conejos tratados, mientras que en la cinética de ésteres de colesterol se observó una menor transferencia de colesterol hacia la fracción apo B y un mayor tiempo de residencia en las HDL. Por otro lado, el cultivo celular mostró que el tratamiento con rosiglitazona incrementó la expresión de SR-BI lo que no se vio reflejado en el influjo celular que disminuyó ligeramente.

En el modelo animal, observamos que las concentraciones plasmáticas de C-HDL se mantienen sin cambios en los conejos tratados con rosiglitazona, y que el único parámetro que se modificó en el perfil de lípidos, fueron los triglicéridos que aumentaron 40% en los conejos tratados. A pesar de que no existe un consenso, algunos estudios han puesto en evidencia que la rosiglitazona induce ligeros incrementos en los triglicéridos plasmáticos sin afectar de manera importante al C-HDL ^{47, 48}. A diferencia de estos estudios, la magnitud en el aumento en los triglicéridos en nuestro modelo es mucho mayor, y esto podría deberse a que se empleó una dosis que representa el triple de la máxima empleada en humanos.

Si bien no observamos variaciones significativas del C-HDL, pusimos de manifiesto cambios discretos en la distribución de tamaños. Estudios previos de nuestro grupo demostraron que la pioglitazona provoca un mayor aumento en la proporción de HDL pequeñas tipo 3c que la rosiglitazona ³⁶⁻³⁷. Esta diferencia puede ser explicada porque las tiazolidinedionas presentan un agonismo parcial del receptor PPAR α , cuyo

elemento de respuesta si se encuentra presente en el gen de la apo AI, pero al parecer, la afinidad de la pioglitazona hacia este receptor es mayor que la de la rosiglitazona. En consecuencia, la pioglitazona induce una síntesis mayor de apo AI ³⁶; considerando que las HDL se sintetizan como partículas pre- β que tienen un diámetro de 5.3 nm ⁴⁹ en promedio, el incremento de la síntesis de apo AI redundaría en el incremento del número de partículas HDL pequeñas. La pioglitazona al tener mayor afinidad por los PPAR α que la rosiglitazona, favorece la presencia de HDL pequeñas tipo 3c.

A pesar de que el aumento en la síntesis y catabolismo de apo AI podría contribuir en gran medida a la explicación del aumento en la proporción de HDL pequeñas durante el tratamiento con rosiglitazona, no podemos descartar la probable influencia del receptor hepático SR-BI sobre dicho efecto. Previamente se ha reportado que el gen *SRBI* que codifica para el receptor tiene elemento de respuesta a PPAR γ ²⁷, por lo que esperábamos que la administración de una TZD incrementara su expresión, favoreciendo la captación de ésteres de colesterol provenientes de HDL en el hígado. Con base en esta propuesta, decidimos evaluar el efecto de la rosiglitazona sobre el metabolismo de ésteres de colesterol de HDL *in vivo* realizando una cinética de los mismos en los animales tratados con el fármaco. En dichos experimentos, observamos una mayor presencia de radiactividad en la fracción HDL a lo largo del tiempo en los conejos tratados, mientras que en la fracción apo B se observó una menor cantidad de radiactividad al compararlo con el grupo control. Estos resultados nos sugieren que el tratamiento con rosiglitazona favorece la permanencia de los ésteres de colesterol en las HDL y además disminuye su transferencia hacia las fracción VLDL/LDL.

Con base a estos datos, podríamos suponer que existe una disminución en la actividad de la CETP, encargada de la transferencia de los ésteres de colesterol de las HDL a las VLDL y LDL; sin embargo, al determinar la actividad de la proteína en el plasma de conejos tratados con rosiglitazona y compararla con la de los animales control, no encontramos diferencia significativas.

A continuación, intentamos explicar las modificaciones en la cinética de ésteres de colesterol por una disminución en la actividad de la enzima responsable de la esterificación del colesterol en la HDL, la LCAT, lo cual además apoyaría el aumento en la proporción de HDL pequeñas 3c. Al disminuir la actividad de esta enzima, se produciría una menor cantidad de ésteres de colesterol disponibles para ser transferidos hacia la fracción apo B, lo cual implicaría una modificación en el metabolismo intravascular de las HDL. Al realizar experimentos sobre la actividad de dicha enzima en plasma de conejos tratados con rosiglitazona, tampoco encontramos cambios en su actividad.

Finalmente, la última hipótesis a descartar, se centra sobre la expresión del receptor hepático SR-BI; una menor expresión del receptor explicaría la disminución de la eliminación de los ésteres de colesterol del compartimento plasmático. Para comenzar a explorar esta posibilidad, planteamos un modelo *in vitro* empleando células de hepatoma de rata, Fu5AH, las cuales expresan al receptor. En congruencia con estudios previos, observamos un aumento discreto en la expresión del receptor en las células tratadas con rosiglitazona; sin embargo, este resultado no coincide con la evidencia mostrada en el modelo animal, en el cual los ésteres de colesterol permanecen más tiempo en las HDL.

Es importante enfatizar que la sobreexpresión del SR-BI no es sinónimo de una mayor función; este receptor se acopla a la membrana celular por interacción de la proteína PDZK-1⁵⁰. Por esta razón, decidimos en una primera etapa establecer si efectivamente la función del SR-BI se incrementaba en la misma proporción que la expresión de la proteína en las células de hepatoma de rata. Diseñamos un modelo de eflujo de colesterol, coincubando las células tratadas con rosiglitazona con HDL que contenían ésteres de colesterol radiactivos según se describe en la sección de métodos. Al determinar la cantidad de radiactividad intracelular y la presente en el medio, calculamos el porcentaje de colesterol captado por las células, observando que las que fueron con el fármaco, presentaron menor captación de ésteres de colesterol que las

células control. Este resultado coincide con el que se presenta en el modelo animal, en cual el colesterol permanece más tiempo en las HDL, lo cual podría ser consecuencia de una menor captación del mismo a nivel hepático.

Como se mencionó previamente, la razón por la que a pesar de la sobreexpresión de SR-BI no observamos un aumento en la captación de colesterol en el cultivo de Fu5AH puede tener su origen en la proteína acopladora PDZK-1. Estudios preliminares de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que la cantidad de PDZK1 en las células tratados con rosiglitazona no se modifica con respecto a las células control (**O. Pérez-Méndez, datos no publicados**); estos resultados sugieren que al no aumentar la expresión de PDZK-1 en la misma magnitud que el SR-BI, no alcanza los niveles necesarios para que la captación se lleve a cabo y por lo tanto la sobreexpresión del receptor no se acompaña de un aumento en su funcionalidad.

La diferencia entre el modelo animal y el cultivo celular es una limitante de este estudio porque no permite una franca relación de los resultados obtenidos en cada uno de ellos. Sin embargo, en estudios posteriores se espera lograr cuantificar la expresión de SR-BI en tejido hepático de conejos tratados con rosiglitazona y lograr obtener conclusiones más contundentes, siendo esta proteína la que posiblemente tenga mayor relación con el aumento en la proporción de HDL pequeñas en el modelo de conejos.

En resumen, en el presente estudio demostramos que la rosiglitazona modifica el metabolismo de los ésteres de colesterol de HDL, paradójicamente asociada a una sobreexpresión del receptor SR-BI y sin modificación de actividad de la CETP ni LCAT. Este comportamiento metabólico resulta en alteraciones discretas de las subclases de HDL durante el tratamiento con rosiglitazona, aumentando la proporción de las HDL pequeñas tipo 3. Los mecanismos por los cuales una sobreexpresión de SR-BI se acompañe de una eliminación lenta del colesterol-HDL, así como las repercusiones de las modificaciones del metabolismo y estructura de las HDL sobre el desarrollo de

aterosclerosis durante el tratamiento con rosiglitazona, deberán ser explorados específicamente en estudios posteriores.

BIBLIOGRAFÍA

1. Von Eckardstein A, Huang Y, Assman 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, Assman G. HDL and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb and Vasc Biol* 2001;21:13-27.
4. Sviridov V, Nestel P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2002;161:245-254.
5. Kozyraki R, Fyfe J, Kristiansen M, et al. The intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, is a high-affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein. *Nat Med* 1999;5:656-661.
6. Secretaría de Salud. Información epidemiológica de morbilidad. Dirección General de Epidemiología 2000.
7. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein, 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.
8. Deakin S, Leviev I, Gomaschi 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.

9. Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb and Vasc Biol* 2003;23:1881-1888.
10. Calabresi L, Franceschini G, Sirtori CR, et al. Inhibition of VCAM-1 expression in endothelial cells by reconstituted high-density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Comm* 1997;238:61-65.
11. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, et al. High density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb and Vasc Biol* 1995;15:1987-1994.
12. Mineo C, Deguchi H, Griffin J, et al. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res* 2006;98:1352-1364.
13. Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre- β -migrating high density lipoprotein pathway. *Biochem Biophys Res Comm* 1988;27:25-29.
14. Pascot A, Lemieux I, Prud'homme D, et al. Reduced HDL particle size as an additional feature of the atherogenic dyslipidemia of abdominal obesity. *J Lipid Res* 2001;42:2007-2014.
15. Arsenault BJ, Lemieux I, Després JP, et al. HDL particle size and the risk of coronary heart disease in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk prospective population study. *Atherosclerosis* 2009;206:276-281.
16. Elkhailil 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.
17. Pérez-Méndez 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.

18. Huesca-Gómez C, Franco M, Luc G, 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.
19. Pérez-Méndez O, Torres-Tamayo M, Posadas-Romero C, et al. Abnormal HDL subclasses distribution in overweight children with insulin resistance or type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 2007;376:17-22.
20. Pietzsch J, Julius U, S Nitzsche, et al. In vivo evidence for increased apolipoprotein A-I catabolism in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetes* 1998;47:1928-1934.
21. Frénais R, Ouguerram K, Maugeais C, et al. High density lipoprotein apolipoprotein AI kinetics in NIDDM: a stable isotope study. *Diabetologia* 1997;40:578-583.
22. Barbier O, Torra IP, Duguay Y et al. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arteriosc Thromb and Vasc Biol* 2002;22:717-726.
23. Reginato MJ, Lazar MA. Mechanisms by which thiazolidinediones enhance insulin action. *Trends Endocrinol Metab* 1999;10:9-13.
24. Vosper H, Guennadi AK, Tracey L, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists, hyperlipidemia, and atherosclerosis. *Pharma and Therap* 2002;95.
25. 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.
26. Gegick CG, Alheimer MD. Thiazolidinediones: comparison of long-term effects on glycemic control and cardiovascular risk factors. *Curr Med Res Opin* 2002;18.

27. Malerød L, Sporstøl M, Juvet LK, et al. Hepatic scavenger receptor class B, type I is stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and hepatocyte nuclear factor 4alpha. *Biochem Biophys Res Comm* 2003;305:557-565.
28. Akiyama TE, Sakai S, Lambert G, et al. Conditional distribution of the peroxisomes proliferator-activated receptor g gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apo E in macrophages and reduced cholesterol efflux. *Mol Cel Biol* 2002;22:2607-2619.
29. Administration U.S. Food and Drug. FDA Adds Boxed Warning for Heart-related Risks to Anti-Diabetes Drug Avandia. <http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/2007/ucm109026.htm> 2007.
30. Starner CI, Schafer JA, Heaton AH, et al. Rosiglitazone and pioglitazone utilization from January 2007 through May 2008 associated with five risk-warning events. *J Manag Care Pharm* 2008;14:523-531.
31. Loke YK, Kwok CS, S Singh. Comparative cardiovascular effects of thiazolidinediones: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ* 2011;17:342-351.
32. Administration U.S. Food and Drug. FDA significantly restricts access to the diabetes drug Avandia. <http://www.fda.gov/drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm226956.htm>. 2010.
33. Woodcock J, Sharfstein JM, M Hamburg. Regulatory Action on Rosiglitazone by the U.S. Food and Drug Administration. *N Engl J Med* 2010;363:1489-1491.
34. Motola D, Piccinni C, Biagi C, et al. Cardiovascular, ocular and bone adverse reactions associated with thiazolidinediones: a disproportionality analysis of the US FDA adverse event reporting system database. *Drug Saf* 2012;35:315-323.

35. Cariou B, Charbonnel B, B Staels. Thiazolidinediones and PPAR γ agonists: time for a reassessment. *Trends Endocrinol Metab* 2012;23:205-215.
36. 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.
37. Carreón-Torres E, Rendón-Sauer K, Monter-Garrido M, et al. Rosiglitazone modifies HDL structure and increases HDL- apo AI synthesis and catabolic rates. *Clin Chim Acta* 2009;401:37-41.
38. Pérez-Méndez O, Alvarez-Salcedo P, Carreón-Torres E, et al. Palmitic acid in HDL is associated to low apo A-I fractional catabolic rates in vivo. *Clin Chim Acta* 2007;378:53-58.
39. Lowry OH, Rosebrough HJ, AL Farr. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
40. 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.
41. Huesca-Gómez C, Carreón-Torres E, Nepomuceno-Mejia T, et al. Contribution of cholesteryl ester transfer protein and lecithin:cholesterol acyltransferase to HDL size distribution. *Endocr Res* 2004;30:403-415.
42. Chen C, JJ Albers. 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.
43. Tollefson HJ, JJ Albers. Isolation, characterization and assay of plasma lipid transfer proteins. In: Albers JJ, JP S, eds. *Methods in enzymology*. New York: Academic Press Inc; 1994:781-797.

44. 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.
45. Badeau RM, Metso J, Tikkanen MJ, et al. High-density lipoprotein-associated 17beta-estradiol fatty acyl ester uptake by Fu5AH hepatoma cells: implications of the roles of scavenger receptor class B, type I and the low-density lipoprotein receptor. *Biochim Biophys Acta* 2007;1771:1329-1334.
46. Kee P, Caiazza D, Rye KA, et al. Effect of inhibiting cholesteryl ester transfer protein on the kinetics of high-density lipoprotein cholesteryl ester transport in plasma: in vivo studies in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:884-890.
47. Khan MA, St Peter JV, JL Xue. A Prospective, Randomized Comparison of the Metabolic Effects of Pioglitazone or Rosiglitazone in Patients With Type 2. *Diabetes Care* 2002;25:708-711.
48. 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.
49. Rye KA, PJ Barter. Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor apolipoprotein A-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:421-428.
50. Yesilaltaya A, Kocherb O, Rigotti A, et al. Regulation of SR-BI-mediated high-density lipoprotein metabolism by the tissue-specific adaptor protein PDZK1. *Curr Opin Lipidol* 2005;16:147-152.

APÉNDICE 1

Determinación de proteínas por el método de Lowry

SOLUCIONES

- ◆ -Solución de Na₂CO₃: 20 % en H₂O
- ◆ -Solución de tartrato de Na y K: 1 g + CuSO₄:0.5g
- ◆ -Solución de NaOH 0.8N: 16g en 500 mL H₂O
- ◆ -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 Na₂CO₃
 - 2 volúmenes de NaOH
 - 2 volúmenes de SDS
 - 2 volúmenes de H₂O

TÉCNICA

CURVA PATRÓN

Tubo	1	2	3	4	5	6	muestra
MUESTRA (μL)	0	0	0	0	0	0	20
ST (μL)	0	10	20	40	80	100	0
H ₂ O (μL)	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 absorbancia 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