



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

FACTORES QUE DETERMINAN EL METABOLISMO Y LAS
PROPIEDADES ANTIATEROSCLEROSAS *in vitro* DE LAS
LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL) DURANTE EL
TRATAMIENTO CON TIAZOLIDINEDIONAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

JUANA ELIZABETH CARREÓN TORRES

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

Dr. ÓSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ
Facultad de Medicina, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dra. MARTA MENJIVAR IRAHETA
Facultad de Ciencias, UNAM
Dra. REBECA LÓPEZ MARURE
Facultad de Medicina, UNAM

MÉXICO, D.F.

Noviembre 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 **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **CARREÓN TORRES JUANA ELIZABETH** con número de cuenta **95578880** con la tesis titulada **"FACTORES QUE DETERMINAN EL METABOLISMO Y LAS PROPIEDADES ANTIATEROSCLEROSAS in Vitro DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL) DURANTE EL TRATAMIENTO CON TIAZOLIDINEDIONAS,"** realizada bajo la dirección del DR. ÓSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ.

Presidente: DR. MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA
Vocal: DRA. ELIA MARTHA PÉREZ ARMENDARIZ
Secretario: DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ
Suplente: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
Suplente: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE

El comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizara a solicitud del alumno, **con cinco sinodales**, en apego a la nueva normatividad, acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, con base en lo establecido en el Artículo 31 del Reglamento General de Estudios de Posgrado vigente.

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 25 de octubre de 2012

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas por darme la oportunidad de realizar mis estudios y por todo el apoyo recibido durante mi estancia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca No. 172703, otorgada durante la realización de mis estudios.

Y por el financiamiento para el proyecto vinculado a este trabajo con No. 47275.

A los miembros del Comité Tutor por su paciencia, su valioso tiempo, consejos e ideas que aportaron a este proyecto.

Dra. Rebeca López Marure

Dra. Marta Menjivar Iraheta

Dr. Oscar Armando Pérez Méndez

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, abuela, y familia porque siempre creyeron en mí y me brindaron su apoyo incondicional para lograr esta meta.

Al Dr. Oscar Pérez Méndez por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por la confianza y paciencia que siempre me ha tenido, por compartir su sabiduría y experiencia en todos los aspectos y por todos los momentos tan divertidos que he pasado dentro y fuera de su laboratorio.

A mi jurado de examen por sus comentarios y sobre todo por dedicar su valioso tiempo en la corrección de esta tesis.

Dra. Elena Zambrano González
Dra. Elia Martha Pérez Armendariz
Dra. Rebeca López Marure
Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza
Dr. José Pedraza Chanverri

A mi amiga Mariana porque estuvo minuto a minuto en el desarrollo de este proyecto, por su amistad incondicional, por sus regaños y consejos, por todas esas experiencias “buenas, malas, eróticas y esotéricas” que vivimos fuera y dentro del laboratorio.

A mis amigos y compañeros que están y han estado en el laboratorio Vladimir, Selene, María, Junior, Cynthia, Sirena, Miriam, Ernesto, Tío Gamboa, por su apoyo incondicional. Por esos tan buenos momentos, por compartir sus experiencias, por su valiosa amistad y compañerismo.

Al Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” y su laboratorio de metabolismo de lípidos del departamento de Biología Molecular, por facilitarme sus instalaciones para el desarrollo de esta investigación.

Agradezco al Hospital Regional “Licenciado Adolfo López Mateos” del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) por el apoyo recibido para concluir mis estudios y obtener el grado.

Y a todas aquellas personas que han participado tanto en mi desarrollo personal como en el ámbito profesional y que de una u otra manera hicieron posible que este proyecto concluyera.

ÍNDICE

TEMA	PÁGINA
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
ANTECEDENTES	5
I. LIPOPROTEÍNAS	5
I.1 COMPONENTES DE LAS LIPOPROTEÍNAS	6
I.1.1 LÍPIDOS	6
I.1.2 APOLIPOPROTEÍNAS	6
I.2 CLASIFICACIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS	6
I.3 METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS	8
II. ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA (EAC) Y HDL	11
II.1 EAC	11
II.2 HDL Y SU CAPACIDAD ANTIATEROGÉNICA	12
II.2.1 SUBPOBLACIONES DE HDL	12
II.2.2 TRANSPORTE REVERSO DEL COLESTEROL	13
II.2.3 PROPIEDADES ANTIATEROGÉNICAS DE LAS HDL	15
III. TIAZOLIDINEDIONAS	18
III.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS TZD	18
III.2 EFECTO DE LAS TZD SOBRE EL PERFIL DE LÍPIDOS	19
III.4 EFECTO DE LAS TZD EN EL METABOLISMO DE LAS HDL	20
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	24
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS PARTICULARES	24

MATERIALES Y MÉTODOS	25
Animales	25
Recolección de muestras	25
Análisis de laboratorio	25
Aislamiento y análisis de subpoblaciones de HDL de conejo	26
Aislamiento y marcaje de apo A-I de conejo	26
Cinética metabólica de la apo A-I de las HDL	27
Determinación de la densidad de carga de superficie	28
Determinación de enzimas y proteínas asociadas a las HDL	29
a) actividad LCAT	29
b) actividad CETP	29
c) actividad PLTP	30
d) actividad PON	30
Influjo de colesterol	31
Preparación y purificación de las HDL marcadas con ³ H colesterol	31
Cinética de transferencia de ésteres de colesterol de las HDL	32
Expresión del receptor membranar SR-BI	32
Expresión de la proteína de membrana PDZK1	33
Análisis estadístico	33
RESULTADOS	34
Efecto de las TZD sobre el perfil de lípidos y glucosa	34
Efecto de las TZD sobre el tamaño y composición de las HDL	34
Actividad de los factores plasmáticos que intervienen en el TRC	37
Cinética metabólica de la apo A-I de las HDL	38
Densidad de carga de superficie	40
Efecto de las TZD sobre la funcionalidad de las HDL	41
Influjo de colesterol	42
Cinética metabólica de ésteres de colesterol de HDL	43
Expresión de SR-BI y PDZK1	44
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	53
BIBLIOGRAFÍA	54
APÉNDICE	64
ARTÍCULO	66

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Esquema general de la composición de las lipoproteínas.	5
Cuadro 1. Características de las apolipoproteínas.	7
Cuadro 2. Propiedades fisicoquímicas de las lipoproteínas.	8
Cuadro 3. Enzimas y proteínas involucradas en el metabolismo de las lipoproteínas.	9
Figura 2. Metabolismo intravascular de las lipoproteínas.	10
Figura 3. Transporte Reverso del Colesterol.	15
Figura 4. Estructura química de las TZD.	18
Figura 5. Mecanismo de acción de los PPAR γ .	19
Cuadro 4. Concentraciones plasmáticas de lípidos y glucosa en los grupos de conejos tratados con TZD.	34
Cuadro 5. Distribución relativa de las subpoblaciones de las HDL durante el tratamiento con pioglitazona y rosiglitazona.	35
Cuadro 6. Composición de apolipoproteínas de HDL.	36
Cuadro 7. Composición química de las HDL.	37
Cuadro 8. Actividad de factores plasmáticos LCAT, CETP y PLTP.	38
Figura 6. Curvas de decaimiento radiactivo de la ^{125}I -apo A-I de las HDL.	39
Cuadro 9. FCR y PR de ^{125}I -apo A-I de las HDL de los grupos en estudio.	40
Cuadro 10. Densidad de carga de superficie de las HDL durante el tratamiento con pioglitazona y rosiglitazona.	41
Cuadro 11. Actividad paraoxonasa.	41
Figura 7. Influjo de ^3H -colesterol de las HDL.	42
Figura 8. Curvas de % de radiactividad transferida del ^3H -Colesterol de las HDL.	43
Cuadro 12. FCR de ^3H -EC de las HDL de los grupos en estudio.	44
Figura 9. Expresión del receptor SR-BI y la proteína de anclaje PDZK1.	45

ABREVIATURAS

ABCA-1:	Transportador de membrana dependiente de ATP, miembro 1 de la subfamilia ABCA
Apo:	Apolipoproteínas
ATPIII:	Guía para el tratamiento en adultos III (<i>Adult Treatment Panel III</i>)
CETP:	Proteína de transferencia de ésteres de colesterol
C-HDL:	Colesterol de lipoproteínas de alta densidad
C-LDL:	Colesterol de lipoproteínas de baja densidad
CT:	Colesterol total
CL:	Colesterol libre
EAC:	Enfermedad aterosclerosa coronaria
EC:	Ésteres de colesterol
FCR:	Tasa de catabolismo fraccional
Fu5AH:	Línea celular de hepatoma de rata
HDL:	Lipoproteínas de alta densidad (<i>High density lipoprotein</i>)
IDL:	Lipoproteínas de densidad intermedia (<i>Intermediate density lipoprotein</i>)
LCAT:	Lecitina colesterol acilo transferasa
LDL:	Lipoproteínas de baja densidad (<i>low density lipoprotein</i>)
LH:	Lipasa hepática
Lp:	Lipoproteína
LPL:	Lipoproteína lipasa
PAGE:	Electroforesis en gradiente de poliacrilamida
Plp:	Fosfolípidos
PLTP:	Proteína de transferencia de fosfolípidos
PON:	Paraoxonasa
PPAR:	Receptor activado por proliferador de peroxisomas

PPRE:	Elemento de respuesta a proliferadores de peroxisomas
PDZK1:	Proteína renal acopladora con un multi-dominio PDZ
PR:	Tasa de producción
RXR:	Receptor del ácido retinóico
SR-BI:	Receptor scavenger clase B tipo I
Tg:	Triacilgliceroles
TRC:	Transporte reverso del colesterol
TZD:	Tiazolidinedionas
VLDL:	Lipoproteínas de muy baja densidad (<i>Very low density lipoprotein</i>)

RESUMEN

Existe una relación negativa entre las concentraciones plasmáticas del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) y el riesgo de desarrollar enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC).

Una probable explicación a esta relación inversa es el metabolismo intravascular de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), conocido como transporte reverso del colesterol (TRC). Las HDL durante su metabolismo sufren una constante remodelación en estructura y composición, dando como resultado diversas subpoblaciones HDL, con propiedades antiaterogénicas y sitios metabólicos diferentes. Así, un tratamiento farmacológico que modifique el metabolismo de las HDL, tendría repercusiones en la estructura de la lipoproteína y en su función antiaterogénica. Sin embargo, se conoce poco acerca de la relación estructura-función-metabolismo de las HDL y cómo se modifica esta relación durante el tratamiento con fármacos antiaterosclerosos.

Las tiazolidinedionas (TZD, glitazonas), fármacos antidiabéticos agonistas de PPAR γ , tienen propiedades antiaterosclerosas, además de incrementar las concentraciones plasmáticas de C-HDL. En el marco del presente estudio, postulamos que el tratamiento con TZD tienen un efecto sobre la síntesis y catabolismo de la apo A-I y colesterol de las HDL, así como sobre la actividad de enzimas y proteínas de transporte que participan en el TRC. Como resultado, las TZD generarían modificaciones en la estructura, composición y muy probablemente de la capacidad antiaterosclerosa de las HDL.

Para comenzar a explorar la relación estructura-metabolismo-función de las HDL utilizamos conejos Nueva Zelanda tratados durante 6 semanas con pioglitazona a dosis de 1.75 mg/Kg o rosiglitazona a 0.34 mg/Kg de peso. En ambos casos, la dosis es equivalente a 3 veces la posología habitual del humano. De acuerdo a estudios previos, los conejos presentan una estructura y metabolismo de las HDL muy similar a la de los humanos. Las HDL generadas en los conejos, se caracterizaron por ultracentrifugación secuencial y PAGE 3-30% en condiciones nativas. Para determinar el metabolismo de los componentes químicos de las HDL se realizaron estudios cinéticos, por medio de marcado exógeno con isótopos radiactivos (^{125}I -apo A-I y ^3H -Colesterol). Para demostrar los efectos de funcionalidad de las HDL y expresión de proteínas que participan en el TRC se utilizaron células de hepatoma de rata, Fu5AH, que se cultivaron en presencia de pioglitazona 2.0 $\mu\text{g/mL}$ o rosiglitazona 0.4 $\mu\text{g/mL}$, 48 h antes de la determinación.

En este estudio se demostró que las TZD modifican de manera distinta la estructura, el metabolismo y funcionalidad de las HDL. La pioglitazona y la rosiglitazona provocaron un incremento de 2.9 y 1.6 veces, respectivamente, de la proporción relativa de partículas pequeñas, HDL3, pero el efecto de la rosiglitazona fue más discreto y sólo se observó en las partículas de tipo HDL3c. A pesar de estas pequeñas diferencias la tasa de producción (PR) de la apo A-I fue de un 121% y 64% mayor con pioglitazona y rosiglitazona, respectivamente, respecto a los conejos no tratados. En el mismo sentido, la tasa de catabolismo (FCR) de la apo A-I incrementó 128% con pioglitazona y 24% con rosiglitazona. Este balance metabólico se manifiesta por una elevación de la concentración de apo A-I plasmática en un 37.5%, únicamente con rosiglitazona. En cuanto a la composición química de las HDL, la pioglitazona originó partículas enriquecidas en apo A-I y con una disminución en la proporción de apo C's, triacilglicérols y fosfolípidos. Por el contrario, la rosiglitazona disminuyó la proporción de proteína, especialmente de apo A-I e incrementó la proporción de fosfolípidos. Dichos cambios estructurales en las HDL probablemente contribuyen al incremento de la carga de superficie en un 6% con pioglitazona, el incremento en la actividad PON un 21% con rosiglitazona y del hipercatabolismo de las partículas de HDL observado con ambas TZD.

En cuanto a la eliminación de los ésteres de colesterol (EC), con cualquiera de las glitazonas, es más lenta con respecto al grupo control. El FCR disminuyó 67% con pioglitazona mientras que con rosiglitazona sólo disminuyó un 33%. Estos cambios podrían estar asociados al aumento en la expresión de receptor hepático SR-BI en un 25.1% y 29.2% con pioglitazona y rosiglitazona, respectivamente. Sin embargo, la proteína PDZK1, indispensable para el funcionamiento del SR-BI, no tuvo cambios con ninguna de las TZD.

En resumen, nuestros resultados demuestran que las TZD producen modificaciones de la estructura y metabolismo de las HDL, sugiriendo que un aumento de la producción de la apo A-I de HDL no implica un aumento en la eliminación del colesterol-HDL plasmático. Por lo que inducir una sobre síntesis de apo A-I no es suficiente para mejorar el TRC. Por otra parte nuestro estudio sugiere que el incremento del catabolismo y de las síntesis de la apo A-I de las HDL se manifiesta por incrementos de la proporción relativa de HDL pequeñas que podrían explicar parcialmente la actividad antiaterosclerosa de las TZD.

ABSTRACT

There is a negative relationship between high-density lipoprotein cholesterol, (HDL-C) and the risk of coronary artery disease (CAD).

A likely explanation for this inverse relationship is the intravascular metabolism of high density lipoproteins (HDLs), known as reverse cholesterol transport (RCT). During their metabolism, HDLs undergo constant remodelling in structure and composition, resulting in various subpopulations of HDLs that may have different antiatherogenic properties and metabolic sites. Thus, a drug treatment that alters the metabolism of HDL, may have implications for the structure of lipoproteins and their antiatherogenic function. However, little is known about the relationship between the HDL metabolism, structure and their function, and how antiaterosclerotic drugs affect such relationship.

Thiazolidinediones (TZDS, glitazones), antidiabetic drugs that are PPAR gamma agonists, have anti-atherosclerotic properties, and increase the plasma concentrations of HDL-C. In the present study, we postulated that TZDs treatment affects the synthesis and catabolism of apo A-I and HDL cholesterol, as well as the activity of enzymes and transfer proteins involved in RCT. As a result, TZD may induce changes in the structure, composition and probably antiaterosclerotic properties of HDL.

In order to gain more insight about the relationship between structure-function-metabolism of HDL, we treated New Zealand rabbits with pioglitazone or rosiglitazone during six weeks, at doses of 1.75 mg/kg or 0.34 mg/kg. In both cases, the dosage is equivalent to 3 times the usual human dosage. According to previous studies, the structure and HDL metabolism in rabbits is similar to that of humans. The HDLs in rabbits, were characterized by sequential ultracentrifugation and PAGE 3-30% under native conditions. To determine the metabolism of the chemical components of HDL, kinetic studies were performed, using HDLs labelled, with radioactive isotopes, ^{125}I -apo A-I or ^3H -cholesterol. To demonstrate the effects of HDL functionality and expression of proteins involved in the RCT we used rat hepatoma cells, Fu5AH, which were cultured in presence of pioglitazone, 2.0 $\mu\text{g/mL}$ or rosiglitazone, 0.4 $\mu\text{g/mL}$, 48 h before determination.

This study showed that both TZDs modify differently the structure, metabolism and function of HDL. Pioglitazone and rosiglitazone caused an increase of 2.9 and 1.6 times, respectively, the relative proportion of small HDL3 particles, but the effect was more discrete with rosiglitazone and it affected only HDL3c type particles. Despite these small differences the production rate

(PR) of apo A-I was 121% and 64% higher with pioglitazone and rosiglitazone, respectively, compared to control group. Similarly, catabolic rate (FCR) of apo A-I increased 128% with pioglitazone and rosiglitazone 24%. This metabolic balance resulted in an elevation of about 37.5% the apo A-I plasma concentration with rosiglitazone. Concerning the chemical composition of HDL, pioglitazone induced an apo A-I enrichment of HDL particles and a decrease in the proportion of apo C's, triacylglycerols and phospholipids. In contrast, rosiglitazone decreased the proportion of protein, especially of apo A-I and increased the proportion of phospholipids content of HDLs. These changes of the HDL chemical composition, may contribute to the 6% increase of surface charge observed with pioglitazone, and the 21% increase of PON activity with rosiglitazone and hypercatabolism of HDL particles observed with both TZDs.

Both glitazones slowed the cholesteryl esters (CE) elimination compared with the control group. The FCR of HDL-cholesteryl esters decreased 67% with pioglitazone while with rosiglitazone the observed decrease was only of 33%. These changes could be related to the high hepatic expression of SR-BI receptor that was 25.1% and 29.2% with pioglitazone and rosiglitazone treatments, respectively as compared to control cells. However, PDZK1 protein, essential for the SR-BI function, was unchanged with any of TZDs.

In summary, our results showed that TZDs produce modifications of the structure and HDL metabolism, and demonstrated that a high production of apo A-I HDL does not imply an increase in the removal of plasma HDL cholesterol from plasma; inducing the synthesis of apo A-I is not enough to improve the RCT. Moreover our study suggests that a high catabolism and synthesis of apo A-I result in an increased proportion of small HDL may partially explain antiatherosclerotic activity of TZDs.

ANTECEDENTES

I. LIPOPROTEÍNAS

Las lipoproteínas (Lp) son complejos macromoleculares y pseudomicelares conformados por una fracción proteínica, denominada apolipoproteína (apo) que estabiliza en términos fisicoquímicos a la partícula. Las apolipoproteínas se unen por interacciones hidrofóbicas y electrostáticas a la fracción lipídica de las lipoproteínas, que consisten de un núcleo de lípidos hidrofóbicos (no polares), como triacilglicerolos y ésteres de colesterol rodeados de una mezcla de lípidos anfipáticos, principalmente fosfolípidos y colesterol no esterificado. (Figura 1)

La principal función de las lipoproteínas es la de transportar los lípidos, desde su lugar de absorción o síntesis hasta los órganos o tejidos que los requieran o para su eliminación, esto debido a la naturaleza acuosa del plasma.

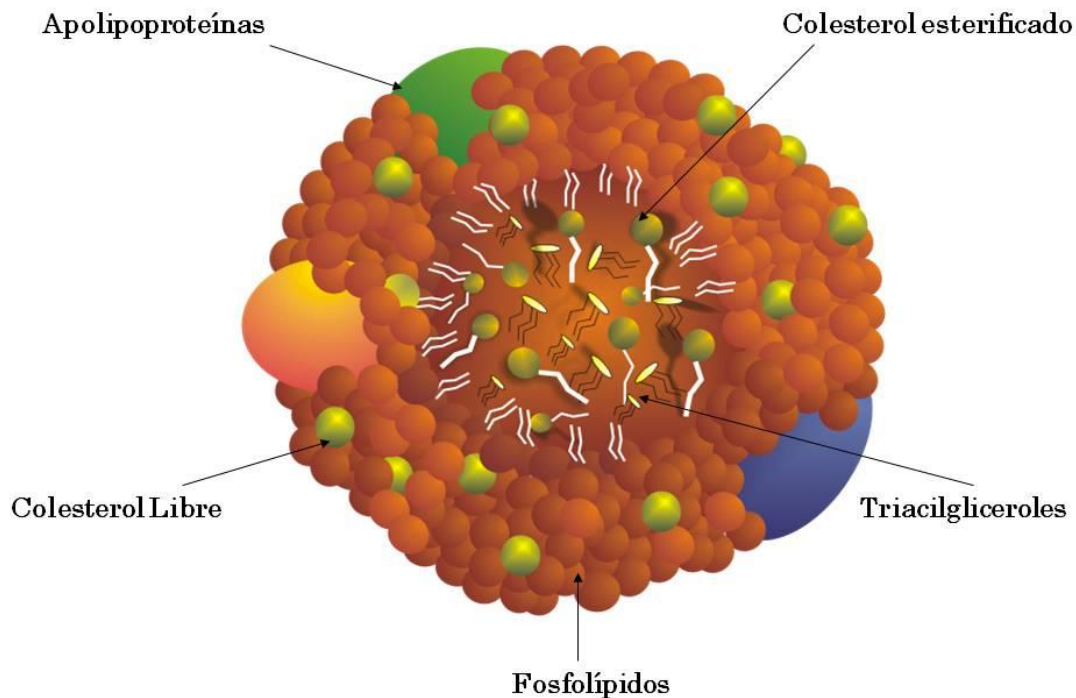


Figura 1. Esquema general de la composición de las lipoproteínas. Se observa los lípidos hidrofóbicos del núcleo, en su superficie los lípidos anfipáticos y las apolipoproteínas que estabilizan a la lipoproteína.¹

I.1 COMPONENTES DE LAS LIPOPROTEÍNAS

I.1.1. LÍPIDOS

Los lípidos se pueden definir como moléculas orgánicas de origen celular, insolubles en medio acuoso, que integran una familia de compuestos muy heterogénea, con una gran diversidad de estructuras y funciones, pero con características químicas similares.

Los lípidos pueden participar como cofactores enzimáticos, transportadores electrónicos, agentes emulsionantes, como fuente de energía, forman parte de la estructura de hormonas y de mensajeros intracelulares, así como de lipoproteínas plasmáticas y membranas.

De acuerdo a su estructura podemos clasificar a los lípidos en diferentes grupos, pero sólo algunos de ellos se encuentran asociados con las lipoproteínas. Los principales lípidos que destacan dentro de estas partículas son ácidos grasos, colesterol, fosfolípidos y triacilglicerolos.

I.1.2. APOLIPOPROTEÍNAS

Son proteínas asociadas a las lipoproteínas de peso molecular variable y sus funciones son estructurales, como ligandos de receptores membranales y como cofactores de enzimas del metabolismo intravascular de los lípidos. Las diferentes apolipoproteínas y sus principales características se resumen en el cuadro 1.

I.2. CLASIFICACIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS

Las lipoproteínas se clasifican de acuerdo con su densidad de flotación, a su movilidad electroforética y/o a su contenido de apolipoproteínas. En el cuadro 2 se describe la clasificación por orden creciente de densidad y decreciente de tamaño; se indica la movilidad electroforética correspondiente a cada clase de lipoproteínas, así como su composición química.

Cuadro 1. CARACTERÍSTICAS DE LAS APOLIPOPROTEÍNAS ^{2,3}

Apo	Masa Molecular (Da)	Localización	Función
A-I	29,016	HDL, Qm	Principal componente de las HDL, activador de LCAT, estimula el flujo del colesterol.
A-II	17,414	HDL	Principal proteína componente de HDL, inhibidor de LH y de la LCAT.
A-IV	44,465	HDL, Qm	Activador de LCAT, modulador de LPL y estimula el flujo de colesterol.
A-V	39,000	HDL, VLDL	Estimula la captación de lípidos por el hígado y la unión de proteoglicanos a la LPL.
B-100	512,723	VLDL, LDL	Ligando para receptor de LDL.
B-48	240,800	Qm	Proteína estructural de los Qm.
C-I	6,630	HDL, VLDL, Qm	Activador de LCAT, inhibe la captación hepática de Tg.
C-II	8,900	HDL, VLDL, Qm	Activador LPL, inhibición de la captación hepática de Lp-apo B100.
C-III _{0,1,2}	8,800	HDL, VLDL, Qm	Inhibidor de la LPL.
E _{2,3,4}	34,145	VLDL, HDL	Ligando de receptor de LDL y de residuos de Qm, estimula el eflujo de colesterol.

Apo; Apolipoproteína, Da; Daltons, Qm; Quilomicrones, VLDL; Lipoproteínas de muy baja densidad, LDL; Lipoproteínas de baja densidad, HDL; Lipoproteínas de alta densidad, LCAT; Lecitina colesterol aciltransferasa, LPL; Lipoproteína lipasa, LH; Lipasa hepática, Tg; triacilgliceroles, Lp; lipoproteína.

Cuadro 2. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS. ^{2,3}

Lp	Mov Electroforé tica	Densidad de Flotación (g/mL)	Tamaño (nm)	Proteína (%)	Fosfolípidos (%)	Tg (%)	Colesterol Libre Ester (%)	
Qm	Origen	<0.95	>70	1-2	3-6	90-95	1-3	2-4
VLDL	Pre-beta	0.95-1.006	30-70	6-10	15-20	45-65	4-8	5
IDL	Pre-beta, beta	1.006-1.019	20-30	15-20	15-20	25-30	5-10	30-35
LDL	Beta	1.019-1.063	18-30	18-22	18-24	4-8	6-8	45-50
HDL	Alfa	1.063-1.21	5-12	45-55	26-32	2-7	3-5	15-20

Lp; lipoproteína, Qm; Quilomicrones, VLDL; Lipoproteínas de muy baja densidad, IDL; Lipoproteínas de densidad intermedia, LDL; Lipoproteínas de baja densidad, HDL; Lipoproteínas de alta densidad.

I.3. METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS

La composición química y estructura de las lipoproteínas plasmáticas se modifica continuamente, como resultado del intercambio dinámico de lípidos y apolipoproteínas que existen entre ellas durante su metabolismo intravascular. Una gran variedad de enzimas, proteínas y algunos receptores de membrana están involucrados en este metabolismo, influyendo en la concentración de los lípidos y favoreciendo el transporte, la captación celular, o la hidrólisis de los mismos.^{2,4}

En el Cuadro 3 se presentan algunas características destacables de las enzimas, proteínas de transporte y receptores que intervienen en el metabolismo de las lipoproteínas.

Cuadro 3. ENZIMAS Y PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS ^{2,4,5}

NOMBRE	FUNCIÓN	ORIGEN
LCAT	Cataliza la esterificación del colesterol (presente en las HDL y o LDL) con un ácido graso de la lecitina. Contribuye a la maduración de HDL.	Hepático
LH	Hidroliza los triacilglicerolos y fosfolípidos de HDL, IDL y LDL. Es cofactor del SR-B1 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 apo C-II como cofactor. Favorece la generación de precursores de HDL.	Tejido adiposo, endotelio y pulmón
LE	Hidroliza fosfolípidos en las HDL.	Endotelio, hígado y macrófagos
PLTP	Transfiere fosfolípidos de lipoproteínas ricas en triacilglicerolos y de HDL. Favorece la generación de precursores de HDL y de apo A-I.	Hepático y endotelio
CETP	Intercambia ésteres de colesterol por triacilglicerolos entre las HDL2 y las lipoproteínas que contienen apo B.	Tejido adiposo, hepático, intestino delgado
RECEPTORES Y PROTEÍNAS MEMBRANALES		
SR-BI	Receptor de las HDL para promover el flujo bidireccional del colesterol libre y esterificado entre los hepatocitos y las células.	Hepático, macrófagos
ABCA-1 ABCG-1	Modulación del eflujo de colesterol y fosfolípidos. Favorece a la maduración de HDL.	Intestino, células de Kupffer, macrófagos
CD36	Receptor de LDLox. Promueve la acumulación del colesterol en las lipoproteínas.	Macrófagos y monocitos
Apo B/E-R	Receptor para lipoproteínas que contienen apo B y E. Incrementa el eflujo de colesterol vía los hepatocitos.	Hepático

LCAT; Lecitina colesterol acilotransfera, LH; Lipasa hepática, LPL; Lipasa lipoprotéica, LE; Lipasa endotelial, CETP; Proteína de transferencia de ésteres de colesterol, PLTP; Proteína de transferencia de fosfolípidos, SR-BI; Receptor scavenger de clase B tipo I, ABCA-1; Transportador de membrana dependiente de ATP, miembro 1 de la subfamilia ABCA/G, Apo; apolipoproteína, Qm; Quilomicrones, VLDL; Lipoproteínas de muy baja densidad, IDL; Lipoproteínas de densidad intermedia, LDL; Lipoproteínas de baja densidad, LDLox; LDL oxidadas, HDL; Lipoproteínas de alta densidad.

Existen al menos tres mecanismos por los que se modula el tráfico intravascular de los lípidos (Figura 2). Uno para el movimiento de lípidos exógenos que entran en la célula, el cual se lleva a cabo por los quilomicrones. Otro, para el movimiento de lípidos sintetizados en el retículo endoplásmico (fuente endógena de colesterol) hasta la membrana plasmática, donde hay una participación activa de las VLDL y HDL. El tercero es el transporte reverso del colesterol (TRC), donde en particular las HDL tienen una participación muy importante y este mecanismo explica la diversidad en estas lipoproteínas; lo anterior se describe en detalle en la sección II.^{1,5,6}

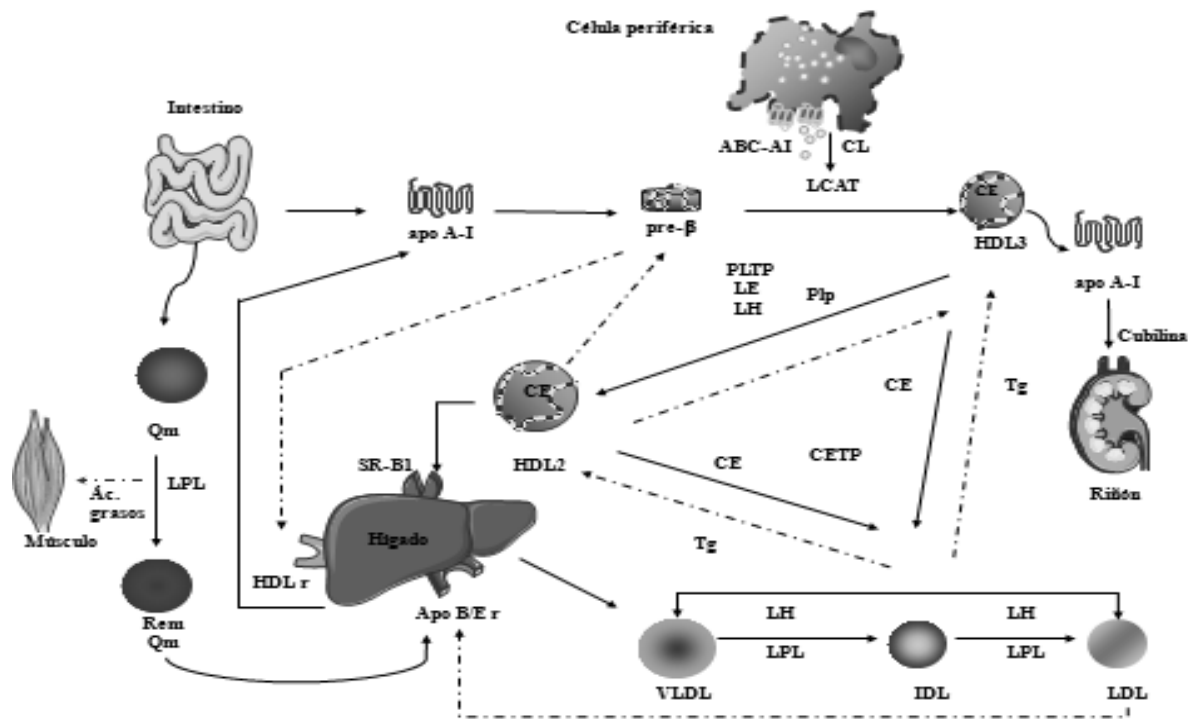


Figura 2. Metabolismo intravascular de las lipoproteínas. Los lípidos provenientes de los alimentos (vía exógena) forman pequeñas micelas por acción de los ácidos biliares conjugados, lecitina y colesterol, liberados y por enzimas pancreáticas, la enzima colesterol esterasa (CEasa), la lipasa pancreática (LP) y fosfolipasa A, las cuales actúan: 1) sobre los Tg para liberar ácidos grasos libres (AGL), 2) rompen enlaces éster liberando AGL y CL y 3) hidrolizan los fosfolípidos (Plp) exógenos, respectivamente. En el enterocito los ácidos grasos son esterificados con glicerol formando Tg, los cuales se ensamblan con pequeñas cantidades de CL junto con apolipoproteínas y Plp para formar los Qm que son liberados a la linfa mesentérica y finalmente a la circulación. En el plasma los Qm son remodelados por la LPL y LH dando lugar a remanentes de quilomicrón (Rem Qm). Estas partículas son enriquecidas, por la acción de la CETP, con CE que provienen de las HDL, los cuales son captados por los receptores hepáticos (SR-BI, ApoB/E-R, HDL-r). Las VLDL (vía endógena) son sintetizadas en el aparato de Golgi de los hepatocitos a partir del ensamblaje de AGL, glicerol-3-fosfato, y una baja cantidad de colesterol. Las VLDL posteriormente interactúan con LH, para hidrolizar a sus Tg, y transformarse en IDL. Estas últimas pueden ser captadas por el hígado a través del receptor apoB/E o seguir disminuyendo su tamaño, ya que sufren hidrólisis de sus Tg restantes hasta convertirse en LDL y ser captadas por su receptor hepático. En el TRC, las HDL son sintetizadas en el hígado o en la mucosa del intestino como partículas pre-β, pobres en lípidos, estas partículas son capaces de captar CL. Una vez capturado el CL, se esterifica por la enzima LCAT y es llevado al hígado para ser eliminado o reciclado por dos mecanismos: 1) Puede ser eliminado directamente de la lipoproteína por el receptor hepático SR-BI y 2) por medio del receptor hepático apo B/E.

II. ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA (EAC) Y HDL

II.1 EAC

La enfermedad arterial coronaria (EAC) se caracteriza por proliferación de células musculares lisas (CMLV), depósito de lípidos que conforman placas visibles y de la participación activa de las diversas lipoproteínas que hay en el plasma.⁷ Existen varios factores de riesgo asociados al desarrollo de EAC, entre los que encontramos edad, sexo, factores genéticos, hipertensión, obesidad, dislipidemias, resistencia a la insulina y diabetes.⁸

Múltiples estudios epidemiológicos en el área han demostrado que la elevación de las concentraciones plasmáticas de colesterol total y de LDL conduce a la aparición de EAC. La guía para el tratamiento en adultos III (ATPIII:Adult Treatment Panel III) designó como factor de riesgo cardiovascular la presencia de LDL pequeñas y densas.⁹ Pietzsch et al.¹⁰ han sugerido que las LDL2 y LDL3 permanecen más tiempo en circulación ya que disminuye su afinidad por el receptor hepático de LDL y esto resulta en una disminución de su catabolismo. Como consecuencia del aumento en el tiempo de residencia, las LDL penetran al espacio subendotelial, ambiente de estrés oxidativo intenso, dando lugar a la peroxidación de sus lípidos.

Las LDL modificadas promueven la proliferación y diferenciación de monocitos circulantes a macrófagos que atraviesan el endotelio vascular expresando en su membrana plasmática receptores scavenger tipo A, tipo B (CD36) y LOX-1, que favorecen la fagocitosis de estas lipoproteínas. La falta de maquinaria enzimática capaz de degradar los lipoperóxidos de las LDL captadas, tiene como consecuencia un cúmulo de éstos en el citoplasma del macrófago, conocido entonces como célula espumosa. Estas células espumosas, antes de morir, liberan citocinas (TNF α , IL-1 β e IL-6) que estimulan al endotelio vascular para producir diferentes sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras que no sólo regulan su tono vasomotor, sino que además pueden ser marcadores de un proceso inflamatorio y trombótico. Entre estas sustancias se encuentran la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1), la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), E-selectina y P-selectina, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), proteína quimiotáctica para monocitos (MCP-1). Las adhesinas favorecen la infiltración de los monocitos circulantes, lo que promueve y exagera el proceso inflamatorio y desarrollo del ateroma.¹²

Las LDL modificadas también promueven la actividad procoagulante del endotelio debido a un incremento en la secreción de factor tisular (TF), cofactor del factor VIIa de la cascada de coagulación, que a su vez activa a los factores IX y X que resultan en la formación de trombina. La actividad fibrinolítica también se modifica por acción de las LDL modificadas ya

que reduce la secreción del factor activador del plasminógeno tisular (tPA) e incrementa la secreción del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) por el endotelio.^{11,12}

II.2 HDL Y SU CAPACIDAD ANTIATEROGÉNICA

Desde los años 70s, diversos estudios epidemiológicos han descrito una relación inversa del colesterol de HDL (C-HDL) con el riesgo de desarrollar EAC.^{2,7,8} El último ATPIII del programa nacional de educación sobre el colesterol (NECP), en Estados Unidos ha reportado que la hipoalfalipoproteinemia, (concentraciones plasmáticas de C-HDL <40 mg/dL) es un factor de riesgo para desarrollar EAC.⁹ En este contexto, las HDL han sido catalogadas como partículas antiaterogénicas, ya que evitan la formación de placa ateromatosa a través de varios mecanismos entre los que destaca el transporte reverso del colesterol (TRC).

II.2.1 SUBPOBLACIONES DE HDL

Las HDL, se han clasificado al igual que las otras lipoproteínas, por su densidad de flotación, su movilidad electroforética y su contenido en apolipoproteínas. De acuerdo a su densidad se han separado dos subpoblaciones HDL2 ($1.063 < \rho < 1.210$ g/mL) y HDL3 ($1.120 < \rho < 1.210$ g/mL).² Por su contenido en apolipoproteínas se han distinguido dos grandes grupos, la lipoproteínas que contienen solamente apo A-I (LpA-I) y las que contienen tanto apo A-I como apo A-II (LpA-I:A-II). Por su tamaño, las HDL se subdividen en cinco clases, en orden creciente: HDL3c, HDL3b, HDL3a, HDL2a y HDL2b.¹³ Otra clasificación las divide en α^- y pre β -HDL, por la fracción electroforética plasmática en la que migran en combinación con su tamaño.

Todos estos intentos de subclasificar a las HDL responden a dos factores: la heterogeneidad de esta familia de lipoproteínas, producto de la remodelación constante de las HDL por su metabolismo intravascular (TRC) y a que muy probable su función antiaterosclerosa que realizan las HDL dependa de su composición, tamaño, carga eléctrica y otra serie de factores fisicoquímicos. No obstante, no hay un consenso acerca de cuál es el mejor método de subclasificación de las HDL.

En este contexto, a pesar de todas las actividades antiaterogénicas de las HDL, los niveles bajos de C-HDL no siempre son un factor de riesgo cardiovascular, ya que en casos aislados de hipoalfalipoproteinemias severas, éstas no se asocian a un riesgo elevado de EAC. En primer lugar, se ha observado que un incremento en el catabolismo de la apo A-I de las HDL asociado a la presencia de partículas HDL pequeñas, tipo HDL3c, es característico de estas hipoalfalipoproteinemias sin riesgo elevado de EAC.^{14,15} Por otra parte, el C-HDL no es

antiateroscleroso *per se*, y la experiencia con el Torcetrapib ha dejado este concepto muy claro. El Torcetrapib es un fármaco inhibidor de la CETP que provoca elevaciones muy importantes del C-HDL y que se tuvo que detener su uso porque en estudios de fase III se demostró que induce un incremento de eventos cardiovasculares.^{16,17} Estas observaciones sugieren que el potencial antiateroscleroso de las HDL depende de su metabolismo y de su estructura.

En este sentido, Kontush et al.¹⁸ describen que las HDL pequeñas tienen una capacidad mayor de evitar la oxidación de las LDL *in vitro*. Además, Argmann et al.¹⁹ han postulado que las partículas HDL pequeñas funcionan como los mejores aceptores del colesterol excedente de las células. En nuestro laboratorio se ha puesto de manifiesto que los fibratos²⁰ y la pioglitazona²¹, ambos fármacos con propiedades antiaterosclerosas, producen un aumento en el catabolismo de las HDL y se asocian también a un aumento en la proporción de partículas HDL3c. Además, se ha demostrado que en situaciones fisiopatológicas como el hipotiroidismo, donde las HDL se sintetizan más lentamente, existe un incremento en la proporción relativa de HDL grandes.²⁰ Barter et al.²² postularon que la expresión de moléculas de adhesión disminuye con HDL3, que con partículas de mayor tamaño tipo HDL2.

Estas evidencias en su conjunto sugieren que las partículas HDL pequeñas, tienen un mayor potencial antiaterogénico con relación al resto de las subpoblaciones.

Sin embargo, en los estudios epidemiológicos prevalecen las partículas grandes, tipo HDL2, como la fracción protectora ante el riesgo de desarrollar enfermedad coronaria.^{23,24} Lamarche et al.²⁵ han descrito que pacientes con EAC tienen niveles de C-HDL2 menores que los sujetos control. Asimismo, Asztalos²⁶ demostró que en sujetos con EAC la población de α 1HDL (partículas grandes y ricas en colesterol) se incrementa después de un tratamiento con simvastatina y niacina, mientras la población de α 3HDL (ricas en triacilglicérol) está elevada en pacientes sin tratamiento.

Estos resultados controversiales no permiten afirmar cual de las subpoblaciones de HDL es más antiaterogénica, pero sí nos permite sugerir que tanto el tamaño como la composición juegan un papel importante para determinar la funcionalidad de las HDL y podría ser un mejor parámetro predictor de riesgo cardiovascular que las concentraciones plasmáticas del C-HDL.

II.2.2 TRANSPORTE REVERSO DEL COLESTEROL (TRC)

La primera etapa del metabolismo intravascular de las HDL, llamado transporte reverso de colesterol, es el eflujo de colesterol y fosfolípidos desde las células hacia las HDL de tipo pre- β o

HDL3 (Figura 3). Esta primera etapa se lleva a cabo principalmente por dos transportadores de membrana denominados, ABCA-1 y ABCG-1 (ATP-binding cassette Class A Type 1 y Class G Type 1) dependientes de ATP. Una vez en las HDL, el colesterol se esterifica por la enzima plasmática LCAT. Esta esterificación provoca que el colesterol pierda su carácter anfipático, abandonando la superficie de la partícula para situarse en el interior de la misma, dando origen a HDL más grandes y menos densas, tipo HDL2. A partir de ahí, este colesterol esterificado (CE) puede tomar al menos dos caminos: 1) Ser eliminado directamente de la lipoproteína por el receptor hepático SR-BI, dando origen a partículas pequeñas tipo HDL3, capaces de reiniciar el ciclo de captación de colesterol, y 2) por medio de diversas reacciones de transferencia, en las que intervienen la proteína CETP, el CE de las HDL2 es intercambiado por los triacilgliceroles contenidos en las lipoproteínas ricas en apo-B, como VLDL y IDL, por una parte, y por la otra, la apo C y apo E pasan a los quilomicrones y VLDL. A continuación, la LH y la LE hidrolizan los triacilgliceroles de las HDL2 y en asociación con la actividad de la PLTP remodelan los remanentes de HDL en partículas pre- β y HDL3, ambas con la capacidad de iniciar el ciclo. Es así como el colesterol de los tejidos periféricos llega al hígado para ser reciclado y excretado a través de las vías biliares.²⁷

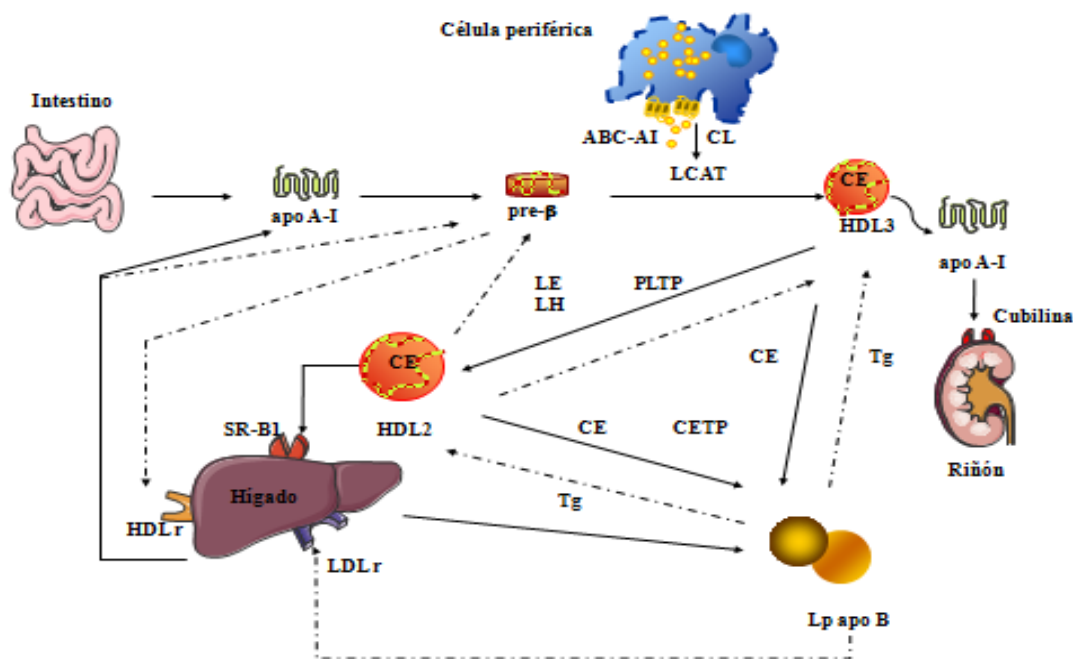


Figura 3. Transporte Reverso del Colesterol. Mecanismo por el cual las lipoproteínas de alta densidad (HDL) transportan el colesterol excedente de las células periféricas al hígado, para su eliminación o reciclaje. CL: Colesterol libre. CE: Colesterol esterificado. Lp apo B: Lipoproteínas ricas en apo B (VLDL; lipoproteínas de muy baja densidad, LDL; lipoproteínas de baja densidad y Qm; Quilomicrones). LCAT: Lecitina colesterol aciltransferasa; 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. LH: Lipasa hepática. LE. Lipasa endotelial. HDLr: Receptor hepático de HDL (fracción β de ATPasa).

II.2.3. PROPIEDADES ANTIATEROGENICAS DE LAS HDL

Las HDL, además de participar en el TRC, presentan otras características que las hacen potencialmente antiaterogénicas como se describe a continuación.

Actividad antioxidante de las HDL.^{28,29} Varios de los componentes de las HDL participan en su capacidad de evitar la oxidación de las LDL, entre los que se encuentran a la apo A-I y a la enzima paroxonasa-1 (PON1).

La apo A-I, principal apolipoproteína de las HDL constituye aproximadamente 70% de la masa proteínica de la partícula, capaz de remover los lípidos oxidados de las LDL. La apo A-I reduce a los lipoperóxidos en sus correspondiente lipohidróxidos, sustancias biológicamente inactivas, debido a que los residuos de metionina de la apo A-I se oxidan formando sulfóxidos. Los lipohidróxidos formados son selectiva y rápidamente catabolizados por el hígado.

Por otra parte la PON1 es una enzima asociada por interacciones hidrofóbicas a las HDL³⁰, dicha asociación física entre la enzima y la lipoproteína es muy específica y explica la correlación directa que existe entre la concentración de apo A-I y la cantidad de PON1.³¹ En este sentido, la capacidad de las HDL para reclutar a la paraoxonasa de la membrana del hepatocito depende del contenido de colesterol libre y fosfolípidos presentes en la lipoproteína, 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.²⁹ Además se ha observado que la cantidad de PON1 presente en las HDL depende inversamente de la apo A-II, segunda proteína característica de las HDL.³¹ Kontoush et al.¹⁸ han sugerido que no cualquier tipo de partícula HDL es capaz de transportar PON1 en plasma y conducirla al espacio subendotelial en donde desempeña su papel antiateroscleroso, sólo las partículas HDL3b y HDL3c. La PON1 también previene la oxidación de las HDL, preservando así la funcionalidad de estas lipoproteínas en relación a su capacidad antiaterogénica.

Regulación de la respuesta inflamatoria por las HDL.^{22,29} La interacción de los monocitos con las células endoteliales está mediada por moléculas de adhesión localizadas en la superficie luminal del endotelio. Entre éstas se incluyen a la molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1), la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), a la E-Selectina y P-Selectina. La expresión de estas moléculas es abundante en la placa ateromatosa por el proceso inflamatorio que desencadenan las LDLox.³³ Estudios *in vitro*, han puesto en evidencia que las HDL inhiben la expresión de la VCAM-1, ICAM-1 y de la E-selectina. Uno de los mecanismos por el cual las HDL impiden la expresión de adhesinas es la inhibición de la esfingosina cinasa, afectando la translocación nuclear del NF-κB, lo que evita la expresión de factores inflamatorios como el TNFα, interleucina 6 (IL-6) y moléculas de adhesión como la VCAM-1 e ICAM-1.³² Otro de los mecanismos por el cual las HDL pueden inhibir la expresión de moléculas de adhesión es por su capacidad antioxidante de estas lipoproteínas, ya que las LDL oxidadas activan y estimulan la translocación del NF-κB, generando un incremento en citocinas y TNFα, que dan como resultado un proceso inflamatorio. Al favorecer la reducción de especies oxidadas y estimular la producción de óxido nítrico (NO), las HDL disminuyen la actividad de NF-κB y la consecuente reducción en la expresión de moléculas de adhesión.¹¹

Así, la composición de las HDL es un factor importante para determinar su funcionalidad; Barter et al.²² han encontrado que la expresión de moléculas de adhesión disminuye en mayor proporción con HDL3 que con partículas de mayor tamaño tipo HDL2. Calabresi et al.³² han demostrado que el contenido de apo A-I en las HDL favorece la inhibición de las adhesinas.

Además, Baker et al.³³ demostraron que el tipo de fosfolípido presente en las HDL determina la habilidad de estas partículas para inhibir la expresión de moléculas de adhesión.

Regulación de la coagulación y la fibrinólisis por las HDL.^{28,34} La disfunción endotelial está asociada con un incremento en la adhesión plaquetaria, en la actividad procoagulante y una fibrinólisis alterada. Las LDL oxidadas favorecen la disfunción endotelial, ya que estimulan la secreción de factor tisular (FT) y reducen la actividad fibrinolítica del endotelio por incrementar la secreción del inhibidor de activador del plasminógeno tipo I (PAI-I).

En este contexto, las HDL pueden tener efectos profibrinolíticos y antitrombóticos debido a que evitan la formación de LDL oxidadas por los diferentes mecanismos antes mencionados. Mineo et al.³⁵ han descrito una correlación directa entre las concentraciones de apo A-I y la respuesta anticoagulante de la proteína C activada y la proteína S, sustancias que inactivan a los factores de coagulación Va y VIIIa. Esta actividad anticoagulante de las HDL aparentemente se debe a partículas grandes de tipo HDL2. Callegari et al.³⁶ han encontrado que la composición de las HDL puede modificar la capacidad fibrinolítica de estas partículas, ya que partículas HDL3 oxidadas promueven la expresión del PAI-I y como consecuencia se evita la fibrinólisis, en comparación con las HDL3 no modificadas.

*Otras actividades antiaterosclerosas.*³⁴ Las HDL también pueden prevenir la muerte programada de las células endoteliales, pero los mecanismos que intervienen en esta función son aún mal conocidos. Por otra parte, las HDL pueden inactivar al sistema del complemento mediante la apo A-I, esta proteína tiene la propiedad de unirse al factor C9 del complemento, inhibiendo la formación del complejo C5a-C9, anulando así sus efectos nocivos sobre el endotelio.

La prostaciclina PGI2 producida por la acción de la ciclooxigenasa de las células endoteliales tiene un potente efecto vasorrelajante y disminuye la liberación de factores de crecimiento que estimula la proliferación local de las células del músculo liso involucradas en el desarrollo del ateroma. A este nivel, las HDL estimulan la producción de PGI2 a través de dos mecanismos: aprovisionan a las células endoteliales de ácido araquidónico, principal sustrato para la síntesis de PGI2 y además estimulan la síntesis de ciclooxigenasa en las células endoteliales y de músculo liso vascular. En estudios recientes se ha observado que son las HDL3 las que favorecen esta producción.³⁷

III. TIAZOLIDINEDIONAS

Las tiazolidinedionas (TZD, glitazonas) son antidiabéticos orales que actúan disminuyendo la resistencia a la insulina y son agonistas de una subclase de receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs), del tipo γ .³⁸ En algunos estudios epidemiológicos³⁹⁻⁴¹ se ha reportado que las TZD inducen incremento en los niveles plasmáticos de C-HDL, sugiriendo que estos fármacos afectan el metabolismo de las HDL. Sin embargo, se conoce poco acerca del efecto de la TZD sobre la síntesis y catabolismo de las HDL, así como sobre los procesos de remodelación de las mismas.

Las TZD utilizadas en la clínica son la pioglitazona y la rosiglitazona (Figura 4).

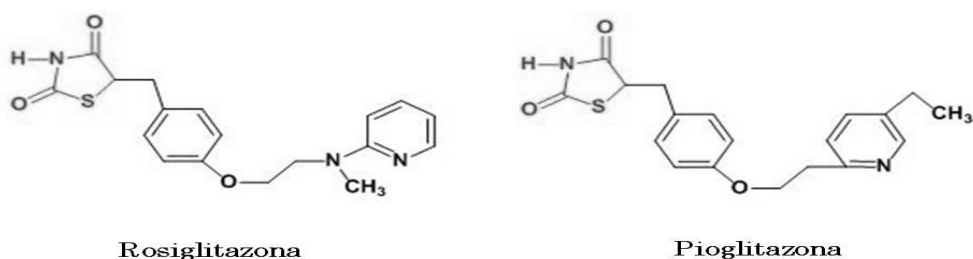


Figura 4. Estructura química de las TZD. Rosiglitazona y Pioglitazona.

III.1. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS TZD

Desde hace unas décadas se han descrito a los PPAR, como factores de transcripción dependientes de ligando. Se han determinado tres genes diferentes α , β/δ , γ . Las TZD actúan activando a la isoforma γ que además tiene como ligandos naturales a los ácidos grasos poliinsaturados y sus derivados, así como las prostaglandinas D2 y sus derivados (15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandinas J₂), 9 y 13(S)-ácido hidroxioctadecadienoico (9 y 13-HODE).³⁸⁻⁴²

Los PPAR γ se expresan principalmente en tejido adiposo, hepatocitos y músculo, además de otros tejidos como células pancreáticas β , células endoteliales y en macrófagos.⁴³

En el núcleo de la célula, los PPAR activados por su ligando forman un heterodímero con el receptor del ácido retinoico (RXR). Una vez formado, el heterodímero (PPAR:RXR), se une a elementos de respuesta específicos (secuencias de DNA), llamados elementos de respuesta a los proliferadores de peroxisomas (PPRE). Los elementos de respuesta actúan como secuencias de regulación de la expresión de genes involucrados en el metabolismo de glucosa, lípidos e inflamación (Figura 5).³⁸

Las TZD regulan la expresión de genes relacionados con el metabolismo y estructura de las HDL entre los que encontramos al de la lipoproteína lipasa (LPL), al del receptor SR-BI, e incrementa de manera indirecta la expresión del ABC-A1, ABC-G1 y la expresión de apo E, vía el estímulo de la expresión de LXRα.⁴⁴

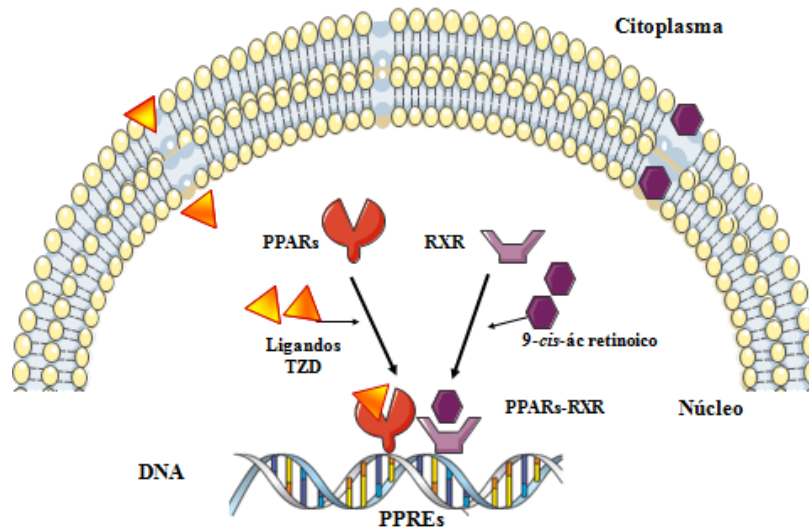


Figura 5. Mecanismo de acción de los PPARγ. TZD: Tiazolidinedionas, PPAR: Receptor activado por proliferador de peroxisomas; RXR: Receptor del 9-cis ácido retinoico.

III.2. EFECTO DE LAS TZD SOBRE EL PERFIL DE LÍPIDOS

Se ha demostrado que las TZD además de tener un efecto sobre el control glicémico, modifican las concentraciones plasmáticas de lípidos. Esto sugiere que la pioglitazona y la rosiglitazona afectan el metabolismo de lípidos y lipoproteínas. Sin embargo, su efecto sobre los lípidos es controversial, ya que cada fármaco produce modificaciones diferentes. Diversos estudios demuestran que el tratamiento con pioglitazona se asocia con mejor efecto sobre el perfil de lípidos en comparación con la rosiglitazona.^{45,46} El tratamiento con TZD modifica de manera distinta las concentraciones de triacilglicerolos (Tg), C-HDL y la estructura de las partículas HDL, colesterol de LDL (C-LDL) y el tamaño de partícula de las LDL. Ambos disminuyen la producción de ácidos grasos y las VLDL.⁴⁶ Con respecto a las concentraciones de C-LDL se ha reportado que el tratamiento con pioglitazona como monoterapia o en combinación con otros fármacos hipoglucemiantes, disminuye las concentraciones plasmáticas, en contraste la rosiglitazona los incrementa entre el 8-16%.⁴⁶ Las tiazolidinedionas también tienen efecto sobre el tamaño de partículas de LDL generando partículas de mayor tamaño y densidad,

siendo estas menos susceptibles a la oxidación y por lo tanto menos aterogénicas. Goldberg et al.⁴⁵ han demostrado que sólo la pioglitazona modifica el tamaño de partícula de las LDL y esto se acompaña de una disminución en el número de partículas. En contraste, la rosiglitazona incrementa el tamaño y concentración de partículas de LDL a expensas de incrementar la concentración de triacilglicerol en plasma.

El efecto de la TZD sobre los triacilglicerol también es variable. Se ha reportado que la pioglitazona disminuye en un 9% aproximadamente los triacilglicerol mientras que la rosiglitazona puede no modificarlos o aumentarlos hasta un 20% . Van Wijk et al.⁴⁷ encontraron que la rosiglitazona tiene un efecto dosis-dependiente y de mayor magnitud sobre el incremento en el colesterol total y el C-LDL mientras la pioglitazona sólo tiene efectos dosis dependiente sobre los triacilglicerol.

Se ha descrito que ambos fármacos incrementan entre el 9-15% los niveles plasmáticos de C-HDL, mientras que otros revelan que sólo la pioglitazona lo hace.³⁸⁻⁴⁷ Sin embargo, no se conocen bien los mecanismos que participan en la regulación de los niveles de C-HDL durante el tratamiento con TZD. En este contexto se vuelve interesante estudiar el efecto de estos dos fármacos en el metabolismo de las HDL, así como de los factores plasmáticos que participan el TRC y si esto responde en parte a las diferencias observadas en las concentraciones plasmáticas de los lípidos y de la distribución de las HDL.

III.4. EFECTO DE LAS TZD EN EL METABOLISMO DE LAS HDL

Existen múltiples factores que pueden modificar el metabolismo de las HDL, incluyendo a la densidad de carga de superficie, tamaño y composición de las partículas. En estudios previos en nuestro laboratorio se ha demostrado que la pioglitazona incrementa la tasa de síntesis (PR) en un 126% y la tasa de catabolismo (FCR) en un 119%. El balance metabólico final es que la concentración plasmática de la apo A-I de las HDL permanece sin cambio durante el tratamiento con pioglitazona. Asociado a este hipermetabolismo, se observó un incremento de la proporción de partículas pequeñas, tipo HDL3c de 3.7 a 7.6%.²¹

De la misma manera, la remodelación de las HDL por los factores biológicos como las enzimas LCAT, CETP, PLTP y LH, puede alterarse por la carga de superficie y composición de las HDL⁴⁸. Akiyama et al.⁴⁴ describieron que la expresión de las lipasas, el receptor SR-BI y ABC-A1 puede ser modificada por las TZD.

En el mismo sentido, Davidson et al.⁴⁹ encontraron que mientras menos negativamente esté cargada la partícula HDL, se cataboliza más rápido del plasma. Aproximadamente el 90% de la

carga de las HDL es debida a la apo A-I, mientras que el 10% restante se debe a los fosfolípidos presentes en la superficie de la partícula. Carreón-Torres et al.²¹ reportaron que el tratamiento con pioiglitazona incrementa la tasa de síntesis de la apo A-I.

De manera similar el receptor SR-BI, el cual se une a las HDL para el intercambio de colesterol, también es sensible a las cargas electrostáticas y se une a los fosfolípidos con una gran afinidad⁵⁰ y su expresión puede ser modificada por las glitazonas.

JUSTIFICACIÓN

La enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC), ha sido una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en México, en las últimas décadas.

Se ha puesto de manifiesto que la población tiene una predisposición genética de presentar varias formas de dislipidemias, en particular bajos niveles de C-HDL, así como de desarrollar enfermedades cardiovasculares; esto se ha atribuido a hábitos y estilos de vida como son: un consumo alto de calorías, grasas y carbohidratos, tabaquismo, consumo de alcohol y sedentarismo.

Estudios epidemiológicos han reportado que existe una relación negativa entre los niveles plasmáticos de C-HDL y el riesgo de desarrollar EAC. Lo anterior se ha atribuido a las características antiaterogénicas de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), su apolipoproteína principal, la apo A-I y principalmente, a su metabolismo intravascular, el TRC. Las HDL durante su metabolismo sufren una constante remodelación, dando como resultado una población muy heterogénea de partículas, que difieren en tamaño y composición. Sin embargo, existen evidencias que las diferentes subpoblaciones de HDL también pueden diferir en funcionalidad antiaterogénica y tener múltiples sitios metabólicos, por lo que se ha sugerido que no es suficiente sólo la determinación plasmática de la concentración de C-HDL. En este contexto, se ha demostrado que modificaciones en las concentraciones de C-HDL no siempre se asocian a cambios inversos sobre el desarrollo de aterosclerosis. En sujetos con ciertos tipos de hipoalfalipoproteinemia, no se observa un aumento en el riesgo de desarrollar EAC, asociado a un incremento en la proporción de HDL pequeñas.

Tomando en cuenta que las tiazolidinedionas tienen propiedades antiaterosclerosas, además de incrementan los niveles de C-HDL, se puede postular que tienen un efecto sobre la síntesis y catabolismo de estas lipoproteínas, así como de modificar la actividad de los factores plasmáticos de remodelación, LCAT, CETP y PLTP, que darían como resultado modificaciones en la estructura, composición y muy probablemente en su capacidad antiaterosclerosa de las HDL. Sin embargo, se conoce poco acerca de la relación estructura-función metabolismo de las HDL y como se modifica esta relación durante el tratamiento con fármacos antiaterosclerosos.

Por lo anterior, es motivo de estudio en esta tesis, evaluar la importancia de los factores plasmáticos de remodelación, la influencia que tienen éstos sobre la estructura y metabolismo de los diferentes componentes de las HDL (apo A-I y principalmente colesterol), así como establecer, si tales modificaciones repercuten en la funcionalidad de estas lipoproteínas.

HIPÓTESIS

El tratamiento con pioglitazona y rosiglitazona modifica de manera diferente el metabolismo (tasa de producción y catabolismo) de la apolipoproteína A-I y colesterol de las HDL dando como resultado un desplazamiento en la distribución de tamaños hacia HDL pequeñas y con alteraciones en su composición química. Estas modificaciones tienen su origen en alteraciones en el TRC y repercuten en aumentar la capacidad antiaterogénica de estas lipoproteínas

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar los mecanismos que dan origen al aumento de partículas pequeñas, HDL3, durante el tratamiento con tiazolidinedionas, así como la funcionalidad de estas lipoproteínas en un modelo animal, conejos Nueva Zelanda.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar el efecto de la rosiglitazona sobre la cinética metabólica (síntesis y catabolismo) de la apo A-I de las HDL en conejos.

Valorar el efecto en las actividades de los factores de remodelación de las HDL (LCAT, CETP y PLTP) durante el tratamiento con TZD.

Determinar la actividad PON1 en suero de animales tratados con tiazolidinedionas.

Caracterizar los parámetros cinéticos (síntesis y catabolismo) del C-HDL en conejos tratados con pioglitazona y rosiglitazona.

Determinar el eflujo de colesterol promovido por las HDL de conejos tratados en células de hepatoma de rata, Fu5AH, en cultivo después del tratamiento con tiazolidinedionas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron conejos macho raza Nueva Zelanda de 3.5-4.0 Kg de peso. Se formaron 3 grupos de estudio, todos recibieron alimentación *ad libitum*. El grupo control (n=9) recibió 1 mL de agua como vehículo del fármaco. De los grupos bajo tratamiento (n=12 cada grupo), uno recibió pioglitazona (Cristales de pioglitazona, Takeda) en dosis de 1.75 mg/kg de peso corporal. El otro grupo recibió rosiglitazona (Avandia, Glaxo Smith-Kline), en dosis de 0.34 mg/kg de peso corporal. El tratamiento se administró vía oral, en suspensión acuosa, diariamente, durante 6 semanas. Estas dosis corresponden a 4 veces la posología habitual del humano.

Recolección de muestras

Las muestras sanguíneas se obtuvieron por punción arterial en las orejas, después de un ayuno de 12 h, en tubos con heparina (Sol. inyectable, 1000 UI/mL, PISA, 10 µL/mL). El plasma se separó centrifugando a 3000 rpm durante 10 min. Las muestras de plasma se mantuvieron almacenadas a -70°C hasta su análisis correspondiente. Para el análisis de subpoblaciones de HDL se tomó una alícuota de plasma fresco antes de congelar.

Análisis de laboratorio

La concentración de colesterol total, triglicéridos (reactivo comercial: Randox; Reino Unido), fosfolípidos, colesterol libre (reactivo comercial: Wako Chemicals GmbH; Alemania), se determinó por métodos enzimáticos y colorimétricos. El colesterol-HDL se determinó en el sobrenadante, después de precipitar las lipoproteínas que contienen apo B con una solución de sulfato de dextrán/magnesio (reactivo comercial: Randox, 100 µL/mL de plasma). La concentración de ésteres de colesterol se calculó de la siguiente manera:⁵¹

$$(\text{Colesterol total} - \text{Colesterol libre}) \times 1.68 = \text{Colesterol esterificado (mg/dL)}$$

La determinación de proteínas totales se realizó por el método de Lowry et al.⁵² (Apendice I)

El análisis de estos parámetros se realizó antes y al término de 6 semanas de tratamiento con ambos medicamentos.

Aislamiento y análisis de subpoblaciones de HDL de conejo

Las HDL se separaron por centrifugación secuencial (Beckman Optima TLX) a 100,000 rpm en tubos de policarbonato, utilizando KBr sólido para ajustar las diferentes densidades. Primeramente se aislaron las lipoproteínas que contienen apo B, con una densidad menor a 1.063 g/mL, durante 2 h 30 min. Posteriormente, se aislaron las HDL a una densidad de 1.21 g/mL, durante 3 h. Bajo estas condiciones del 80% al 85% de la apo A-I del total del plasma se recupera en la fracción de las HDL. Estas HDL se dializaron en una solución amortiguadora de TBE (Tris 0.09 M, ácido bórico 0.08 M, EDTA 3 mM, pH=8.4). Para determinar estructura, homogeneidad y diámetro de las HDL, se realizó por medio de una electroforesis en condiciones no desnaturalizantes en gradiente de poliacrilamida 3%-30%, utilizando como referencia marcadores proteínicos de alto peso molecular (tiroglobulina, 17 nm; ferritina, 12.2 nm; catalasa, 10.4 nm; lactato deshidrogenasa, 8.2 nm; y albúmina, 7.1 nm. Kit Pharmacia, Uppsala, Suecia),⁵³ haciendo las bandas visibles con una tinción de azul de Coomassie y finalmente se sometió a un análisis de densitometría óptica (Molecular Analyst Software Versión 1.1, 1994 Bio-Rad), para determinar los diámetros de las HDL. La proporción relativa de cada una de las subpoblaciones de HDL se expresa como el porcentaje del área bajo la curva de HDL total, integrada en un rango de 12.36 a 7.9 nm.⁵⁴

Aislamiento y marcaje de apo A-I de conejo.

A partir de plasma obtenido de conejos se aislaron HDL por centrifugación secuencial. Primeramente se aislaron las lipoproteínas que contienen apo B a una densidad menor de 1.063 g/mL, durante 2 h 30 min. Posteriormente, se aislaron las HDL a una densidad 1.21 g/mL ajustando con KBr sólido, finalmente se dializaron con NH_4HCO_3 5 mM, por 3 días. Las HDL obtenidas se deslipidaron con una mezcla etanol-éter (2:1,v/v). Se extrajo la parte proteínica y ésta se disolvió en una solución amortiguadora de Tris-HCl 30 mM y urea 6 M a pH=8.0. Esta mezcla se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico, usando una columna UNO™ Q1 (Bio-Rad, Q1-2291) acoplada a un sistema de cromatografía Bio-Rad Duo Flow. La elución de proteínas se realizó con un gradiente lineal en la misma solución amortiguadora de NaCl 0.1 M. Las fracciones se recolectaron de 250 μL y se seleccionaron solo las fracciones que contenían apo A-I. Las fracciones obtenidas se dializaron con bicarbonato de amonio 5 mM. La pureza fue del 98% determinada por SDS-PAGE 4%-21%. La concentración de apo A-I se midió por espectrofotometría, asumiendo un coeficiente de extinción molar de $1.13 \text{ mL} \times \text{mg}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

El marcado de la apo A-I se llevó a cabo por el método de monoclóruo de yodo.⁵⁵ Se mezcló 1 mg de proteína con un mCi de Na¹²⁵I (Amersham Biosciences, IMS30: IMS300) y ICl. La proteína marcada se separó del yodo libre pasando la mezcla a través de una columna de Sephadex G-25 1.0x10.0 cm (Pharmacia Fine Chemicals). La proteína marcada, ¹²⁵I-apo A-I, se incorporó a las HDL obtenidas de conejos normales, incubando esta mezcla 1 h a 37°C. Para separar la proteína libre, ¹²⁵I-apo A-I, que no se incorporó a las HDL, se realizó una ultracentrifugación ajustando la mezcla con KBr sólido a una densidad 1.25 g/mL. Las ¹²⁵I-HDL, se dializaron con una solución de NaCl 0.15 M. La solución se esterilizó usando membranas de 0.22 µm (Millipore, Bedford, MA) y se almacenó hasta su uso a 4°C.

Cinética metabólica de la apo A-I de las HDL

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

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

Donde:

N_0 = actividad inicial, para $t=0$

N = actividad al tiempo t

λ = Constante de decaimiento (60 días)

Las curvas de decaimiento, ¹²⁵I, se construyeron, considerando el 100% de radiactividad, a las cuentas obtenidas en la muestra tomada a los 10 min. Los porcentajes de la cinética de radiactividad se adaptaron a una función biexponencial usando un programa SAAM II, de donde se obtuvo la tasa de catabolismo fraccional (FCR, h⁻¹).⁵⁶

Para calcular la tasa de producción (PR, mg/Kg/h) se utiliza la siguiente fórmula: ⁵⁷

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

El volumen plasmático se consideró como 3.28% del peso corporal de los conejos.²¹

Determinación de la densidad de carga de superficie

Para la determinación de la densidad de carga de superficie de las HDL se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.05% de acuerdo al método descrito por Sparks y Phillips⁵⁷ con modificaciones realizadas en nuestro laboratorio. Las bandas se hicieron visibles con una tinción con negro de amido y finalmente se sometió a un análisis de densitometría óptica (Molecular Analyst Software Versión 1.1, 1994 Bio-Rad), para determinar la densidad de carga de superficie de las HDL, la cual está en función del radio.

La densidad de carga de superficie (Cd) expresada en unidades electroestáticas (esu)/cm² se determinó utilizando la siguiente fórmula:⁵⁷

$$Cd = \frac{V \times 4.8 \times 10^{-10}}{4 \times \pi \times r^2}$$

Donde r es radio de la partícula (cm) y V es la carga neta o valencia, que representa el número de cargas negativas que tiene en exceso la partícula, la cual es estimada considerando a la lipoproteína como una esfera. Este parámetro se calculó a su vez con la siguiente fórmula:

$$V = \frac{(6.25 \times 10^7) \times U \times 6 \times \pi \times r \times \eta (1 + kr + kr_i)}{f \times (1 + kr_i)}$$

Donde:

r = radio de la partícula (cm)

η = coeficiente de viscosidad (0.0089 poise)

r_i = radio del contraión (2.5×10^{-8} cm, correspondiente al Na⁺)

k = constante de Debye-Huckel dependiente de la fuerza iónica (7.3074×10^6 para una fuerza iónica de 0.05)

f = grosor de la bicapa de iones que circundan a la lipoproteína.

U = representa la movilidad electroforética que se obtiene dividiendo la velocidad electroforética (distancia de migración en mm entre el tiempo de migración en segundos) entre el potencial electroforético (voltaje aplicado entre la distancia del gel en cm).

Determinación de enzimas y proteínas asociadas a las HDL

a) Actividad de LCAT

La actividad de LCAT se determinó de acuerdo al método descrito por Chen y Alberts⁵⁸ con modificaciones realizadas en nuestro laboratorio. Brevemente, se prepararon proteoliposomas que contenían colesterol libre (46 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech) marcado con tritio (³H); 1 α ,2 α (n)-³H-colesterol), fosfatidilcolina (10 mg/mL; Sigma, St. Louis MO) y apo A-I (1 mg/mL; Sigma, St. Louis MO). Los proteoliposomas se incubaron con 15 μ L de plasma durante 1 h a 37°C en una solución amortiguadora (Tris 10 mM, NaCl 140 mM, EDTA Na₂ 1 mM). La reacción se detuvo y se extrajeron los lípidos mediante una mezcla de disolventes orgánicos (CHCl₃-MeOH; 2:1). Posteriormente, se separó el colesterol libre del esterificado mediante una cromatografía de capa fina y se midió la radiactividad de las diferentes fracciones en un contador de radiación beta. Los resultados se expresan como porcentaje de colesterol esterificado por hora y por mL de plasma.

b) Actividad de CETP

La actividad de CETP se determinó de acuerdo a método descrito por Tollefson y Albers⁵⁹ con modificaciones realizadas en nuestro laboratorio. Brevemente, la fracción de lipoproteínas de densidad menor a 1.063 g/mL (VLDL/LDL), se aisló por centrifugación secuencial, a partir de plasma fresco cuya densidad se ajustó con KBr sólido. El resto del plasma, después de centrifugar, que contiene a las HDL y otras proteínas, entre ellas la enzima LCAT, se marcó con ³H-colesterol libre (1 μ Ci/mL de plasma; 1 α ,2 α (n)-³H-colesterol, Amersham Pharmacia Biotech) se incubó de 16 a 18 h a 37°C para permitir que la LCAT esterifique el colesterol radiactivo y los ésteres se incorporen en las HDL.

Las partículas HDL marcadas (1 x 10⁴ cpm) se mezclaron con lipoproteínas, previamente aisladas, que contienen apo B, como aceptor, esta mezcla se incubó con 10 μ L del plasma en estudio (que contienen a la CETP) durante 16 h a 37°C; posteriormente se separaron las HDL de las lipoproteínas que contienen apo B, por precipitación selectiva, con una solución precipitante de sulfato de dextrana/magnesio (100 μ L/mL plasma, CIBA-Corning Diagnostics). Finalmente se midió la radiactividad en un contador de radiación beta tanto de la muestra

antes de precipitar como de la fracción sobrenadante. Los resultados se expresan en porcentaje de transferencia de colesterol esterificado.

c) Actividad de PLTP

La actividad de PLTP se determinó por el método descrito por Murdoch et al.⁶⁰ con modificaciones realizadas en nuestro laboratorio. Se utilizaron liposomas que contenían fosfatidilcolina (100 mCi/mmol; Amersham Pharmacia Biotech) marcados con tritio (³H) L-3-Fosfatidil [N-metil-³H] colina, 1,2-dipalmitoil- éstos se incubaron durante 30 min a 37°C, con 10 µL del plasma en estudio y HDL totales aisladas previamente por centrifugación secuencial a una densidad de 1.21 g/mL, como aceptores de la fosfolípidos (fosfatidilcolina). Finalmente, la reacción se detuvo separando a las HDL, en el sobrenadante, de los liposomas por precipitación selectiva con una solución de sulfato de dextrana/magnesio (100 µL/mL, CIBA-Corning Diagnostics). La radiactividad se determinó antes de precipitar y en la fracción sobrenadante en un contador de radiación beta. Los resultados son expresados en porcentaje de fosfolípidos transferidos por hora y por mililitro de plasma.

d) Actividad PON

La actividad paraoxonasa (PON) se determinó por el método de Mackness et al.⁶¹ ya estandarizado en nuestro laboratorio. Se midió la velocidad de hidrólisis de fenilacetato durante 3 min, agregando 10 µL de plasma, previamente diluido (1:10) en 1 mL de solución amortiguadora (Tris 20 mM y CaCl₂ 0.9 mM, pH 8.0) y 0.13 µL de fenilacetato (sustrato ARE), monitoreando la formación 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/mililitro de plasma.

Influjo de colesterol

La captación de colesterol a través del SR-BI se determinó de acuerdo al método de Badeau et al.⁶³ utilizando un cultivo de células de hepatoma de rata (Fu5AH) que expresan constitutivamente el SR-BI. Las células fueron cultivadas (50,000 células/pozo) en presencia de pioglitazona (2.0 µg/mL), rosiglitazona (0.4 µg/mL) y dimetildulfóxido (DMSO, 10µL), respectivamente, 48 h antes de realizar el ensayo, en medio D-MEM suplementado con 5% de suero bovino fetal (SBF), llegando a una confluencia celular del 80%, 24 h antes del ensayo las células fueron lavadas con HEPES e incubadas con D-MEM suplementado con 1% de SBF y su

correspondiente fármaco, con la finalidad de disminuir la reserva de colesterol intracelular. Después de este tiempo de incubación se añadieron HDL previamente marcadas con ésteres de ^3H -colesterol (25,000 cpm/pozo). La cantidad de colesterol transferido de las lipoproteínas a las células se determinó a diferentes tiempos: 30 min, 1, 3, 4 h. Al finalizar cada uno de estos tiempos de incubación el medio de cultivo se extrajo y se cuantificó la radiactividad. Las células Fu5AH posteriormente fueron lavadas con HEPES y el colesterol captado por las células se extrajo después de incubar durante 1 h a temperatura ambiente con isopropanol, se centrifugó y en el sobrenadante se cuantificó la radiactividad. La transferencia de ésteres de colesterol se reportó en porcentaje.

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

La preparación de las HDL marcadas con ésteres de colesterol tritiado se realizó por la técnica reportada por Huesca-Gómez et al.⁵⁴ A partir de plasma fresco se aisló por ultracentrifugación la fracción de lipoproteínas de densidad menor a 1.063 g/mL (VLDL/LDL), ajustando el plasma con KBr sólido. El resto del plasma, después de centrifugar, que contiene a las HDL y otras proteínas, entre ellas la enzima LCAT, se marca con $1\alpha,2\alpha(n)\text{-}^3\text{H}$ -colesterol libre (1 $\mu\text{Ci/mL}$ de plasma, con una actividad específica de 118.9 mCi/mg de colesterol) y se incuba de 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, de esta mezcla se separaron las HDL por ultracentrifugación, ajustando el plasma a una densidad de 1.21 g/mL con KBr sólido. El colesterol no incorporado a las lipoproteínas se separó mediante una cromatografía por exclusión de tamaños, eluyendo con amortiguador de fosfatos con un pH=7.4. Las fracciones eluidas que contenían a las HDL marcadas fueron identificadas determinando la concentración de proteína y colesterol. Las fracciones que contenían HDL se concentraron utilizando un sistema de membranas de ultrafiltración (Amicon Ultra-4,-Millipore). La solución se esterilizó usando membranas de 0.22 μm (Millipore, Bedford, MA) y se almacenó hasta su uso a 4°C.

Para verificar el porcentaje de esterificación de las HDL, se realizó una extracción de lípidos mediante una mezcla de $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$; 2:1. Posteriormente, se separó el colesterol libre del esterificado mediante una cromatografía de capa fina y se midió la radiactividad de las diferentes fracciones en un contador de radiación beta. El 97% del colesterol fue esterificado.

Cinética de transferencia de ésteres de colesterol

Los estudios cinéticos de ésteres de colesterol de HDL se llevaron a cabo con el método descrito por Kee et al.⁶² modificado en nuestro laboratorio. A los grupos de conejos en estudio, tratados y no tratados, previo a la cinética se les mantuvo en ayuno de 12 h. El estudio cinético se llevó a cabo al término de seis semanas de tratamiento. Éste consistió en administrar un bolo de ³H-CE-HDL, conteniendo 1×10^6 cpm (aproximadamente 400 cpm/ μ g de proteína), en un volumen total de 500 μ L en las venas marginales de la oreja. A continuación se obtuvo 1 mL de sangre de la vena marginal, a diferentes tiempos, a los 5 min, y posteriormente a 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240 y 300 min, después de la aplicación de las ³H-CE-HDL. De cada una de estas muestras se separó una alícuota de 300 μ L de plasma y se separaron las fracciones VLDL/LDL y HDL por centrifugación secuencial ajustando el plasma con KBr sólido, a una densidad menor de 1.063 y 1.21 g/mL respectivamente, en cada una de estas fracciones se determinó la radiactividad con un contador de radiación beta. Las curvas de decaimiento radiactivo fueron construidas considerando el 100% de radiactividad inicial a las cuentas obtenidas en la muestra de plasma tomada a los 5 min.

Expresión del receptor membranal SR-BI

La expresión del receptor SR-BI se determinó mediante Western blot en células de hepatoma de rata Fu5AH, que expresan constitutivamente el SR-BI. Las células se cultivaron (2,000,000 células/ensayo) en presencia de pioglitazona (2.0 μ g/mL), rosiglitazona (0.4 μ g/mL) y DMSO (10 μ L) respectivamente, durante 48 horas. Posteriormente se desprendieron con tripsina y se lavaron con HEPES e inhibidores de proteasas (Benzamidina 0.5 M y aprotinina 10 KIU/mL). Se resuspendieron en amortiguador de fosfatos (pH= 7.4) que contiene Zwittergent 3-14 al 0.75%, se sonicaron durante 10 s seis veces a 45 W, en un procesador ultrasónico (ultrasonics processor) dejando incubar toda la noche a 4°C. Se depositaron 50 μ g de muestra ya incubada y el SR-BI se separó por electroforesis en un gel SDS-PAGE al 10% durante 2.5 h a 70 V. Al finalizar, se transfirió hacia una membrana de fluoruro de polivinildieno (PVDF), que posteriormente se bloqueó (albúmina 3%) durante toda la noche, se incubó con anticuerpo policlonal anti SR-BI de rata (1:1000, NOVUS Biologicals) y anti GADPH (1:1000; NOVUS Biologicals), como estándar interno, para normalizar la cantidad de proteína. Después se lavó e incubó con anticuerpo secundario anti IgG de cabra conjugado a peroxidasa (R&D system) y finalmente se reveló con o-diaminobencidina y peróxido de hidrógeno.

Expresión de la proteína de membrana PDZK1

La expresión de PDZK1 se determinó en células de hepatoma de rata Fu5AH, que expresan constitutivamente el SR-BI, mediante Western blot. Las células se cultivaron (2,500,000 células/ensayo) en presencia de pioglitazona (2.0 µg/mL), rosiglitazona (0.4 µg/mL) y DMSO, respectivamente, durante 48 h. Posteriormente se desprendieron con tripsina y se lavaron con HEPES e inhibidores de proteasas (Benzamidina 0.5 M y aprotinina 10 KI/mL). Se resuspendieron en amortiguador de fosfatos (pH= 7.4) que contiene Zwittergent 3-14 al 0.75%, se sonicaron durante 10 s seis veces a 45 W, en un procesador ultrasónico (ultrasonics processor) dejando incubar toda la noche a 4°C. Se depositaron 50 µg de muestra, posterior a la incubación y el SR-BI se separó por electroforesis en un gel SDS-PAGE al 10% durante 2.5 h a 70 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 PDZK1 de rata (1:500, abcam) y anti GADPH (1:1000; R&D system), como estándar interno, para normalizar la cantidad de proteína. Después se lavó e incubó con anticuerpo secundario anti IgG de cabra conjugado a peroxidasa (R&D system) y finalmente se reveló con o-diaminobencidina y peróxido de hidrógeno.

Análisis estadístico

Los datos expresan la media±desviación estándar (DE). Las diferencias significativas entre las medias se evaluó utilizando una prueba paramétrica, t Student's no pareada. Cada uno de los parámetros que se estudiaron se determinó en el grupo control y después del tratamiento con pioglitazona y rosiglitazona. Las diferencias se consideraron significativas con un valor de $P < 0.05$.

RESULTADOS

Efecto de las TZD sobre el perfil de lípidos y glucosa

Como se había informado en experimentos anteriores, las TZD; pioglitazona y rosiglitazona, modifican de manera distinta las concentraciones plasmáticas de lípidos. En el cuadro 4 se presentan las concentraciones plasmáticas de C-Total, C-HDL y triacilgliceroles de los grupos tratados con TZD y control después de 6 semanas de tratamiento, así como las concentraciones plasmáticas de glucosa. El tratamiento con pioglitazona incrementó la concentración de C-HDL 30%, mientras rosiglitazona sólo incrementa las concentraciones plasmáticas de triacilgliceroles 30%, con respecto al control. A las dosis utilizadas las TZD, no modifican las concentraciones plasmáticas de glucosa.

Cuadro 4. Concentraciones plasmáticas de lípidos y glucosa en los grupos de conejos tratados con pioglitazona y rosiglitazona.

	Control n=9	Pio 1.75 mg/kg n=12	Rosi 0.34mg/kg n=12
Colesterol total (mg/dL)	27.9 ± 13.0	28.1 ± 12.1	28.3 ± 10.5
C-HDL (mg/dL)	13.7 ± 7.1	19.0 ± 7.2*	15.3 ± 7.7
Triacilgliceroles (mg/dL)	44.4 ± 11.7	50.3 ± 18.8	58.5 ± 18.7*
Glucosa (mg/dL)	112.9 ± 4.3	113.6 ± 10.4	114.5 ± 22.5

Pio:pioglitazona, Rosi:Rosiglitazona.

Los valores están expresados como la media ± DE.

t Student. * $P < 0.05$ Grupo tratado vs grupo control.

Efecto de las TZD sobre el tamaño y composición de las de HDL

La estructura y composición de las HDL, son factores importantes que podrían explicar las diferencias en su metabolismo y probablemente en la funcionalidad de estas partículas. En este sentido, es elemental determinar los posibles cambios en estructura y composición de las HDL durante el tratamiento con pioglitazona y rosiglitazona.

Los cambios en la distribución relativa de las subpoblaciones de HDL con el tratamiento de TZD se presentan en el cuadro 5.

Cuadro 5. Distribución relativa de las subpoblaciones de las HDL durante el tratamiento con pioglitazona y rosiglitazona

	Control n=9	Pio 1.75 mg/kg n=12	Rosi 0.34 mg/kg n=12
HDL2b (%)	40.7 ± 10.1	35.1 ± 7.9*	42.3 ± 8.6 ^a
HDL2a (%)	23.2 ± 4.1	17.9 ± 4.3†	22.3 ± 4.4 ^a
HDL3a (%)	27.2 ± 7.5	30.8 ± 5.3*	24.6 ± 5.8 ^b
HDL3b (%)	6.9 ± 3.8	10.1 ± 3.9†	7.2 ± 4.1
HDL3c (%)	2.1 ± 1.1	6.2 ± 4.2†	3.4 ± 1.8 ^{*,a}

Pio:pioglitazona, Rosi:Rosiglitazona.

Los valores están expresados como media ± DE.

t Student. * $P < 0.05$, † $P < 0.001$ Grupo tratado vs grupo control

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.001$ Pio vs Rosi.

El tratamiento con pioglitazona disminuye un 13.7% la proporción relativa de partículas grandes, tipo HDL2b e incrementa 0.5 y 3 veces, respectivamente, la proporción de partículas pequeñas, tipo HDL3b y 3c (Cuadro 5), sin embargo, el tratamiento con rosiglitazona sólo incrementa el 62%, la proporción de HDL3c, sin modificar la proporción de partículas grandes, HDL2a y 2b.

Estos cambios en tamaño podrían explicarse por cambios en la composición proteínica y química de las HDL. En el Cuadro 6 se presentan los resultados de composición proteínica de dichas partículas, durante el tratamiento con TZD.

Cuadro 6. Composición de apolipoproteínas de HDL

Apolipoproteína	Control n=9	Pio 1.7 mg/kg n=12	Rosi 0.34 mg/kg n=12
A-IV (%)	10.5 ± 6.7	9.9 ± 7.0	11.4 ± 5.2
E (%)	15.2 ± 4.6	7.7 ± 2.1	12.5 ± 2.6
A-I (%)	68.3 ± 7.2	79.5 ± 2.9*	69.4 ± 5.4 ^a
A-II (%)	2.4 ± 1.0	1.6 ± 0.6	4.4 ± 2.5 ^a
C's (%)	3.6 ± 0.9	1.3 ± 0.3*	2.3 ± 1.6

Pio:pioglitazona, Rosi:Rosiglitazona.

Los valores están expresados como media del porcentaje de la proteína total HDL ± DE.

t Student. * $P < 0.05$ Grupo tratado vs grupo control.

^a $P < 0.05$ Pio vs Rosi.

Como se observa en los resultados, la pioglitazona incrementa la proporción de apo A-I un 16.4% y disminuye 36.0% la proporción de apo C's. Sin, embargo, el tratamiento con rosiglitazona no modifica la composición proteínica de estas partículas.

Diversos autores han descrito que la funcionalidad de las HDL no sólo depende de la composición proteínica de las HDL, sino también de la composición lipídica de estas lipoproteínas. (Cuadro 7)

Cuadro 7. Composición química de las HDL

	Control n=9	Pio 1.7 mg/kg n=12	Rosi 0.34 mg/kg n=12
Proteína (%)	52.8 ± 4.0	64.0 ± 12.5*	47.0 ± 9.7*,a
Colesterol total (%)	16.5 ± 6.1	16.9 ± 7.6	14.1 ± 6.6
Triglicéridos (%)	5.5 ± 1.8	3.0 ± 1.6*	6.5 ± 2.3 ^b
Fosfolípidos (%)	25.2 ± 3.9	14.0 ± 7.5*	32.4 ± 6.3*,a

Pio:pioglitazona, Rosi:Rosiglitazona.

Los valores están expresados como media del porcentaje de masa seca total ± DE.

t Student. * $P < 0.05$ Grupo tratado vs grupo control.

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.001$ Pio vs Rosi

El tratamiento con pioglitazona disminuye 45% la proporción de triglicéridos y fosfolípidos en las HDL. Por el contrario, el tratamiento con rosiglitazona incrementa 28% la proporción de fosfolípidos y disminuye 11% la proporción de proteína. (Cuadro 7)

Actividad de los factores plasmáticos que intervienen en el TRC

La composición de las HDL se modifica continuamente como resultado del intercambio dinámico de lípidos entre otras lipoproteínas, este intercambio se lleva a cabo por enzimas, proteínas involucradas en el TRC, por lo que es importante su determinación. Los resultados se presentan en el cuadro 8. Ninguno de los 3 componentes del TRC determinados presentó modificaciones significativas por el tratamiento con TZD.

Cuadro 8. Actividad de factores plasmáticos LCAT, CETP y PLTP

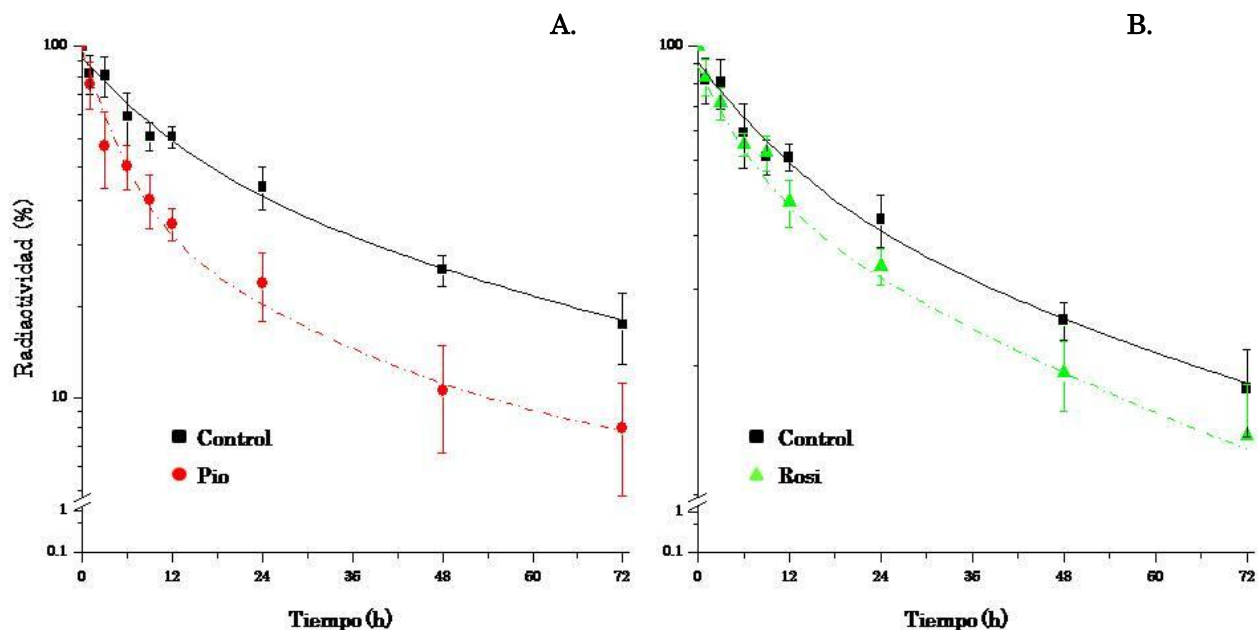
	Control n=9	Pio 1.7 mg/kg n=12	Rosi 0.34 mg/kg n=12
CETP (% de transferencia)	28.5 ± 6.7	25.8 ± 9.5	31.6 ± 6.7
PLTP (% de transferencia)	25.4 ± 11.1	21.8 ± 9.3	21.6 ± 7.3
LCAT (% de esterificación)	6.3 ± 2.7	4.9 ± 2.5	5.5 ± 3.7

Pio:pioglitazona, Rosi:Rosiglitazona.

Los valores están expresados como Media ±DE.

Cinética metabólica de la apo A-I de las HDL

Los resultados anteriores demostraron que las TZD modifican de manera distinta la distribución relativa y composición de las HDL. En este contexto, estos cambios en las HDL pueden repercutir en su metabolismo, es decir, un aumento en su síntesis o una disminución en su catabolismo. A través de estudios cinéticos, podemos evaluar parámetros como la tasa de catabolismo (FCR, fractional catabolic rate), así como la tasa de producción absoluta (PR production rate), que refleja el metabolismo de las lipoproteínas. Carreon-Torres et al.²¹ demostraron que la pioglitazona incrementaba la tasa de catabolismo y producción de la apo A-I. En la figura 6 se presentan las gráficas de decaimiento radiactivo de la ¹²⁵I apo A-I de las HDL después del tratamiento con pioglitazona y rosiglitazona, el análisis matemático de esta curva permite calcular la FCR de la apo A-I.



²¹ Carreón-Torres et. al *Atherosclerosis*, 2005.

Figura 6. Curvas de decaimiento radiactivo de la ^{125}I -apo A-I de las HDL en los diferentes grupos en estudio.

■ Representa el grupo Control. A. ● Representa el grupo tratado con pioglitazona (Pio) 1.74 mg/Kg.²¹ B. ▲ Representa el grupo tratado con rosiglitazona (Rosi) 0.34 mg/Kg.

Los datos representan la media del porcentaje de la radiactividad inicial $\pm$ DE.

La radiactividad fue normalizada en función del resultado al tiempo de 10 min.

Se puede observar que la radiactividad del plasma del grupo tratado con rosiglitazona desaparece más rápido en comparación con el grupo control. Estudios previos en nuestro laboratorio, ya publicados, con pioglitazona mostraron un comportamiento similar. Estas curvas se adaptaron a un modelo bicompartimental que permite calcular la FCR de la apo A-I. (Cuadro 9)

Cuadro 9. FCR y PR de ^{125}I -apo A-I de las HDL de los grupos en estudio.

	Control (n=9)	Pio 1.74 mg/kg (n=8)	Rosi 0.34 mg/kg (n=8)
FCR (h ⁻¹)	0.025 ± 0.006	0.057 ± 0.014†	0.031±0.004*, ^a
PR (mg/kg/h)	0.56 ± 0.16	1.24 ± 0.62†	0.918±0.238†
Apo A-I (mg/L)	602 ± 82	634 ± 182	828±201*

Pio:pioglitazona, Rosi:Rosiglitazona.

Los valores están expresados como Media ±DE.

t Student. * $P<0.05$, † $P<0.001$ Grupo tratado vs grupo control

^a $P<0.05$ Pio vs Rosi

El tratamiento con rosiglitazona incrementó la tasa de catabolismo en un 124%, comparado con el grupo control. La tasa de producción también se incrementó con rosiglitazona 60% con respecto al grupo control (Cuadro 9). Sin embargo, el incremento con pioglitazona es 50% mayor, como se había reportado anteriormente, la pioglitazona incrementa el FCR y PR en un 2.3 y 2.2 veces, respectivamente, comparado con el grupo control.²¹

Densidad de carga de superficie

Como se mencionó anteriormente existen factores intrínsecos a las lipoproteínas que pueden modificar su metabolismo, como la densidad de carga de superficie (Cd), que se define como las unidades electrostáticas de una partícula por unidad de superficie. La Cd afecta directamente el metabolismo *in vitro* de las HDL; la carga de la partícula es una característica que puede regular su catabolismo en el plasma debido a las interacciones electrostáticas entre estas lipoproteínas, las enzimas, receptores y proteínas involucradas en el TRC afectando la remodelación de la partícula. Por esta razón determinamos la carga eléctrica de las HDL obtenidas después del tratamiento con ambos fármacos, pioglitazona y rosiglitazona. (Cuadro 10)

Cuadro 10. Densidad de carga de superficie (Cd) de las HDL durante el tratamiento con pioglitazona y rosiglitazona.

	Control (n=9)	Pio 1.74 mg/kg (n=12)	Rosi 0.34 mg/kg (n=12)
Cd ((-) x10³ esu/cm²)	30041 ± 827	31964 ± 1761*	31543 ± 1842

Pio:pioglitazona, Rosi:Rosiglitazona..

Los valores están expresados como media ±DE.

t Student. **P*<0.05 Grupo vs grupo control

La Cd incrementa un 6.4% durante el tratamiento con pioglitazona, mientras que con rosiglitazona sólo incrementa un 4.9% sin alcanzar diferencia significativa. (Cuadro 10).

Efecto de las TZD sobre la funcionalidad de las HDL

El conjunto de estos resultados nos llevó a plantear otros estudios que nos permitieron dilucidar los factores involucrados en la génesis de partículas pequeñas así como la relación con su metabolismo y funcionalidad. La relación entre la estructura y la función de las HDL se ha sugerido.

Actividad paraoxonasa (PON)

Para comenzar a explorar si los cambios en la estructura inducidos por las dos TZD, tienen efecto en la funcionalidad de estas partículas, determinamos la actividad paraoxonasa 1.

Cuadro 11. Actividad paraoxonasa.

	Control (n=9)	Pio 1.74 mg/kg (n=12)	Rosi 0.34 mg/kg (n=12)
PON (μmol/min/mL)	488.5 ± 138.2	485.7 ± 113.5	595.2 ± 179.4*,a

Pio:pioglitazona, Rosi:Rosiglitazona.

Los valores están expresados como media del porcentaje de la proteína total HDL ± DE.

t Student. **P*<0.05 Grupo tratado vs grupo control.

^a *P*<0.05 Pio vs Rosi.

Influjo de colesterol

El transporte reverso de colesterol es otro de los mecanismos, que se ha descrito, por el cual las HDL inhiben el desarrollo de aterosclerosis. Uno de los factores que es esencial en la mediación del colesterol entre el hepatocito, las HDL y otras lipoproteínas es el receptor hepático SR-BI.

En este contexto, se determinó el influjo de colesterol mediado por el SR-BI en cultivo de células Fu5AH según se describe en la sección de material y métodos. El porcentaje de radiactividad transferida al interior de las células, se presenta en la figura 7.

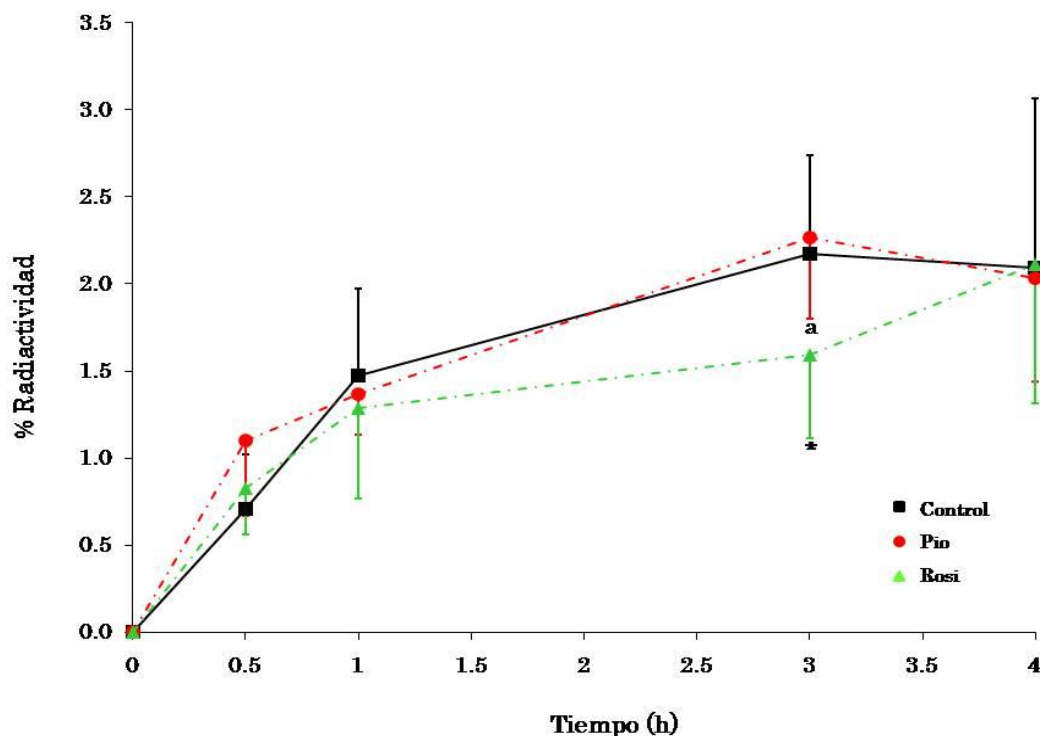


Figura 7. Influxo de ^3H -colesterol de las HDL. Cultivo de células de hepatoma de rata Fu5AH, que expresan SR-BI. Células tratadas con pioglitazona (Pio, 2.0 $\mu\text{g/mL}$) o con rosiglitazona (Rosi, 0.4 $\mu\text{g/mL}$) y las células control (DMSO); sin tratamiento. ■ Representa el % de radiactividad transferida al interior de las células control.

● Representa el % de radiactividad transferida al interior de las células tratadas con Pio. ▲ Representa el % de radiactividad transferida al interior de las células tratadas con Rosi.

Los datos se expresan como la media $\pm$ DE.

t Student. * $P < 0.05$ Grupo tratado vs grupo control. ^a $P < 0.01$ Pio vs Rosi.

Se observa que el influjo de ésteres de colesterol en las células tratadas con rosiglitazona a las 3 h disminuye en un 26.6% comparado con las células control y las tratadas con pioglitazona, sin embargo, en los demás tiempos no se observan diferencias significativas entre ambos grupos.

Cinética de transferencia de ésteres de colesterol de HDL

Además del SR-BI existen otros sitios catabólicos de las HDL que le permiten remover y transportar el colesterol, por lo que se evaluó esta capacidad *in vivo* después del tratamiento con TZD. En la figura 8 se presentan las curvas de decaimiento radiactivo de las HDL y enriquecimiento por parte de las Lp que contienen apo B. Se observa que en ambos grupos la captación máxima de CE ocurre alrededor de los 50 min para posteriormente decaer; además el tratamiento con pioglitazona no modifica la proporción de colesterol en las lipoproteínas pro-aterogénicas, VLDL/IDL/LDL.

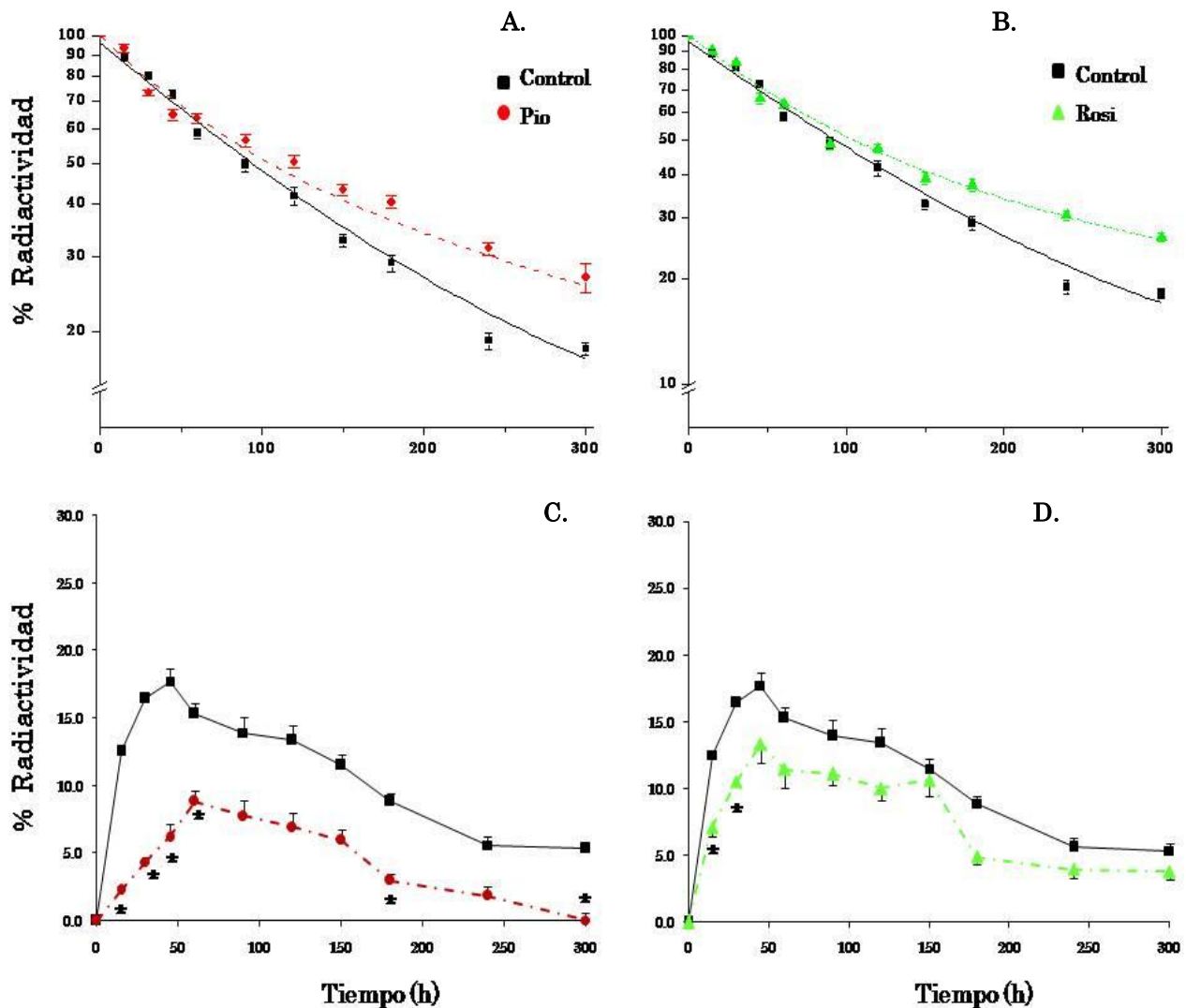


Figura 8. Curva de % de radiactividad transferida del ^3H -Colesterol de las HDL. ■ Representa el % de radiactividad en las lipoproteínas del grupo control. ● Representa el % de radiactividad en las lipoproteínas del grupo tratado con pioglitazona (Pio, 1.75 mg/Kg). ▲ Representa el % de radiactividad en las lipoproteínas del grupo tratado con rosiglitazona (Rosi, 0.34 mg/Kg). A. HDL Pio vs Controles. B. HDL Rosi vs Controles. C. Top $\delta=1.063$ g/mL (VLDL/IDL/VLDL) Pio vs Controles. D. Top $\delta=1.063$ g/mL (VLDL/IDL/VLDL) Rosi vs Controles.

Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar (EE).

La radiactividad se normalizó en función del resultado al tiempo de 5 min.

t Student. * $P < 0.05$ Grupo tratado vs grupo control.

El decaimiento radiactivo en la fracción HDL de los animales tratados con pioglitazona y rosiglitazona es más lento con respecto al grupo control, sugiriendo que la eliminación del colesterol-HDL es menor.

Cuadro 12. FCR de ^3H -EC de las HDL de los grupos en estudio.

	Control (n=9)	Pio 1.74 mg/kg (n=8)	Rosi 0.34 mg/kg (n=8)
FCR (h⁻¹)	0.006 ± 0.002	0.002 ± 0.001*	0.004 ± 0.002

Los valores están expresados como Media ±DE.

t Student. * $P < 0.05$ Grupo tratado vs grupo control

En el cuadro 12 se muestra que el tratamiento con pioglitazona disminuye la tasa de catabolismo de los ésteres de colesterol en un 67%, comparado con el grupo control y en 33% con rosiglitazona. Estos resultados demuestran que nuevamente, el efecto de ambos fármacos sobre el metabolismo de HDL es diferente, específicamente en los ésteres de colesterol.

Expresión de SR-BI y PDZK1

Los resultados anteriores sugieren que el tratamiento con TZD podrían modificar la expresión de factores como el receptor hepático SR-BI y la proteína de anclaje PDZK1, y explicar, en parte, las modificaciones en el influjo de colesterol y como consecuencia en el metabolismo y remodelación de las HDL. El tratamiento con pioglitazona y rosiglitazona incrementa solo la proteína del receptor SR-BI un 25 y 29% respectivamente, sin modificar la expresión del PDZK1. Los resultados de expresión de las proteínas SR-BI y PDZK1 se presentan en la figura 9.

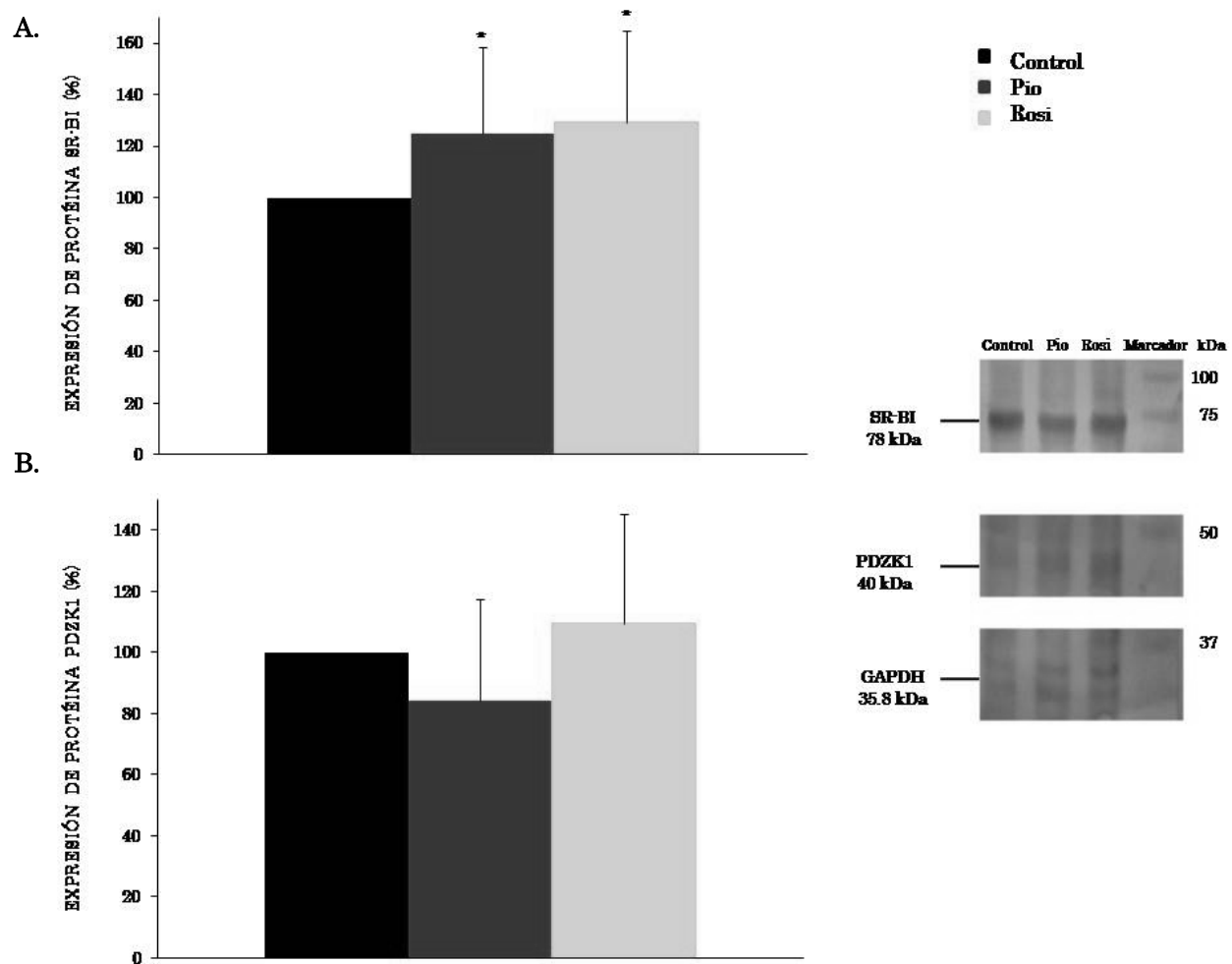


Figura 9. Expresión proteínica del receptor SR-BI y la proteína de anclaje PDZK1. Determinación de la expresión de A. SR-BI y B. PDZK1 en cultivo de células de hepatoma de rata, Fu5AH. Las células son tratadas 48 h antes del experimento con ■ pioglitazona (Pio, 2.0 $\mu\text{g/mL}$) o con ■ rosiglitazona (Rosi, 0.4 $\mu\text{g/mL}$) y las ■ células control (DMSO); sin tratamiento.

Los datos se expresan como la media $\pm$ DE.

t Student. * $P < 0.05$ Grupo tratado vs grupo control.

DISCUSION

Los efectos pleiotrópicos de la pioglitazona y de la rosiglitazona en los lípidos y en particular sobre las HDL son controversiales, ya que producen modificaciones diversas que pueden llegar a ser opuestas. En el presente estudio se demostró que las TZD modificaron de manera distinta tanto la estructura como el metabolismo y funcionalidad de las HDL. Ambas glitazonas provocaron un incremento en la proporción relativa de partículas pequeñas, HDL3, pero el aumento que provocó la rosiglitazona fue más discreto y sólo se observó en las partículas de tipo HDL3c. A pesar de estas pequeñas diferencias observamos un incremento en la síntesis y catabolismo de la apo A-I de las HDL en el tratamiento con las TZD, observando una mayor diferencia con pioglitazona que con rosiglitazona. En cuanto a la composición química de estas partículas también existen diferencias después del tratamiento con TZD; la pioglitazona originó partículas enriquecidas en apo A-I y con una disminución en la proporción de apo C's, triglicéridos y fosfolípidos. Por el contrario, la rosiglitazona disminuye la proporción de proteína, especialmente de apo A-I, e incrementa la proporción de fosfolípidos. Dichos cambios estructurales probablemente contribuyen a la modificación de la carga de superficie y del metabolismo de las partículas de HDL observados. Sin embargo, estos cambios estructurales no se pueden atribuir a modificaciones en los factores plasmáticos de remodelación de las HDL, pero podrían explicar el incremento de actividad PON, con rosiglitazona. Por último, otro factor metabólico que se modifica por el tratamiento con las TZD es la eliminación de los ésteres de colesterol de las HDL; la tasa de catabolismo de los EC es menor en los conejos tratados con cualquiera de las glitazonas respecto al grupo control, pero el mayor efecto se observó con pioglitazona. Este efecto se observa a pesar del incremento significativo del receptor hepático SR-BI con los tratamientos de TZD.

En este contexto, nuestros resultados sugieren que además de regular el metabolismo de la glucosa, las TZD podrían regular el metabolismo y la funcionalidad de las HDL. Estos cambios, podrían explicar de una manera parcial las propiedades antiaterosclerosas de las TZD.

Las TZD, a través de la activación de los PPAR γ , regulan la expresión de una amplia gama de genes involucrados en la regulación de la glucosa, inflamación, aterosclerosis y metabolismo de lípidos; enzimas y proteínas que participan directa o indirectamente en la remodelación dinámica de las HDL.^{64,65} Dichas proteínas incluyen a la lipasa hepática (LH), lipoproteína lipasa (LPL), los receptores SR-BI, ABCA-1 y ABCG-1, y la apo E.⁴⁴

La pioglitazona y la rosiglitazona inducen un incremento de la tasa de producción y de catabolismo de la apo A-I, pero la tasa de catabolismo después del tratamiento con pioglitazona es notablemente mayor en comparación con la rosiglitazona. El mismo comportamiento se observó en la tasa de síntesis de la apo A-I. Millar et al.⁶⁶ encontraron que la rosiglitazona no modifica la PR de la apo A-I en sujetos con síndrome metabólico y C-HDL bajo. Por otra parte, en estudios previos se ha documentado que la expresión del gen de la apo A-I es regulada por los PPAR α ,⁶⁷ no por PPAR γ que son los receptores de las TZD. Sin embargo, los análisis farmacológicos han puesto en evidencia que las TZD, principalmente la pioglitazona, tienen efecto como agonistas duales sobre PPAR α /PPAR γ , perfil farmacodinámico comparable con un glitazar.⁶⁸ Lo anterior explicaría el aumento de la síntesis de apo A-I en ambos casos, y principalmente el incremento más marcado en la tasa de producción de la apo A-I con pioglitazona comparado con rosiglitazona. Es importante enfatizar que el incremento en la producción de apo A-I se alcanza con dosis de pioglitazona o de rosiglitazona tres veces mayor de la que se utiliza habitualmente en humanos.²¹ Esta circunstancia favorecería el equilibrio hacia la reacción cruzada de las TZD con los PPAR α . Sin embargo, Hillaire-Buys et al.⁶⁸ han descrito que a concentraciones utilizadas en la clínica este efecto también se puede observar; la reacción cruzada con PPAR α podría atribuirse a que los metabolitos de la pioglitazona (M3 y M4) son farmacológicamente activos mientras los de rosiglitazona no presentan actividad.⁶⁹

Como se mencionó previamente, el catabolismo de la apo A-I de las HDL también incrementó con ambas TZD, sin embargo el efecto fue mayor en el caso de la pioglitazona en comparación con la rosiglitazona. La trascendencia de este hallazgo radica en las concentraciones de apo A-I plasmática; tomando en cuenta que la magnitud del incremento de PR de la apo A-I con pioglitazona es similar a la magnitud del incremento del catabolismo, la concentración plasmática de la proteína permanece sin cambios durante el tratamiento.²¹ En contraste, en el presente estudio demostramos que la magnitud del incremento del PR con rosiglitazona supera al FCR, y en consecuencia los niveles de apo A-I en plasma aumentan de manera significativa durante el tratamiento con este fármaco. Estos resultados, podrían sugerir que la rosiglitazona, tiene un efecto mayor sobre la expresión del gen de la apo A-I.

En resumen, bajo las condiciones del presente estudio, la rosiglitazona induce un aumento en las concentraciones plasmáticas de apo A-I debido a un incremento de la tasa de producción de la proteína que sobrepasa al incremento de la tasa de síntesis, y este comportamiento cinético diferencia a ambas TZD.

Diversos estudios metabólicos han sugerido que la estructura de las HDL está relacionada con los parámetros cinéticos de la apo A-I.^{14,70} Algunos pacientes con concentraciones plasmáticas de C-HDL por debajo de 10 mg/dL y que no tienen historia familiar ni personal de EAC, se caracterizan por catabolizar rápidamente la apo A-I de las HDL.^{14,15} Asimismo, los fibratos, fármacos con capacidades antiaterogénicas, inducen un aumento del catabolismo de la apo A-I de las HDL.²⁰ La etiología del hipercatabolismo en estos casos no se ha dilucidado completamente, pero puede estar relacionado con el tamaño de la partícula. En estudios previos de nuestro laboratorio²¹ se demostró que el FCR de la apo A-I de las HDL, se asocia directamente con la proporción relativa de partículas pequeñas, HDL3c. Por otra parte, estudios con ratas hipotiroideas demuestran que las partículas grandes de tipo HDL2b y HDL2a se catabolizan más lento que las partículas pequeñas de tipo HDL3c.⁷⁰

Nuestros resultados apoyan esta hipótesis ya que el efecto de la pioglitazona y la rosiglitazona sobre el metabolismo de las HDL es diferencial; el desplazamiento de la distribución relativa de las HDL hacia partículas de menor tamaño que provocó la rosiglitazona fue más discreto que el observado con pioglitazona,²¹ y sólo se observó un incremento significativo de las HDL3c. Análogamente, como ya se mencionó, el aumento del FCR con rosiglitazona fue inferior al observado con pioglitazona,⁷¹ sugiriendo una correlación positiva entre el tamaño de las partículas HDL y su catabolismo. Tomando en cuenta las evidencias previas y los resultados del presente estudio, la proporción relativa de las HDL puede ser indicativo de la tasa de catabolismo de estas partículas; a mayor proporción de HDL pequeñas, mayor el catabolismo. Estos resultados podrían dar lugar a una evaluación del riesgo cardiovascular a través de la determinación de las subpoblaciones de HDL; a pesar de que el impacto benéfico de un catabolismo acelerado de las HDL es aun controversial,^{72,73,74} cuando está asociado a una síntesis acelerada de la apo A-I concurre con un bajo riesgo de EAC.^{14,15,70} Así, el papel antiateroscleroso de las TZD^{65,75} podría estar relacionado, al menos en parte, con el comportamiento cinético que inducen en las HDL.

Además del desplazamiento en la distribución de tamaños de HDL hacia partículas más pequeñas y modificaciones en su metabolismo, debemos tomar en cuenta otros factores que podrían explicar el metabolismo de las HDL, como los cambios en la composición química de estas partículas. Durante el tratamiento con rosiglitazona observamos un incremento muy notable en la proporción de fosfolípidos asociado a la disminución del contenido relativo de proteína en las partículas. Se ha sugerido que el contenido de lípidos de las partículas HDL contribuye a establecer los parámetros cinéticos de éstas. Lamarche et al.²⁵ han descrito que en

estados de hipertrigliceridemia, se incrementa la población de HDL pequeñas enriquecidas con triacilglicerol en comparación con sujetos controles. En el mismo sentido, Lewis⁷⁶ describió un hipercatabolismo de la apo A-I de las HDL, en estados de hipertrigliceridemia. Por otra parte, Pérez-Méndez et al.⁷⁷ han demostrado también que el catabolismo de las HDL enriquecidas con ácido palmítico y/o fosfatidilcolina es más lento; a pesar de que en este estudio no se puede distinguir si el aumento de tamaño de la partícula HDL es el responsable de la disminución del catabolismo, o es un efecto directamente atribuible a la fosfatidilcolina y al ácido palmítico.

En el presente trabajo, nuevamente se observa el cambio de la composición química de las HDL que aparece de manera análoga a la modificación de los parámetros cinéticos, apoyando la idea de que la composición química se relaciona con la velocidad de recambio de estas partículas.

Es importante destacar que existen varios factores adicionales que posiblemente estén relacionados con las modificaciones de la tasa de catabolismo como: la carga eléctrica de superficie asociado a la composición de la partícula HDL. El aumento de carga de superficie se ha relacionado con una disminución del catabolismo de la apo A-I de las HDL.⁷⁸ Se ha sugerido que la electronegatividad de las HDL radica principalmente en la presencia de lípidos cargados negativamente.⁷⁸ En el mismo sentido, Desrumaux et al.⁷⁹ sugieren que la apo A-I incrementa la densidad de carga de las HDL. Nuestros resultados con rosiglitazona apoyan parcialmente esta hipótesis, un aumento significativo del contenido de fosfatidilcolina que se presenta simultáneamente con una tendencia a una carga de superficie mayor en las HDL. Por otra parte, el tratamiento con pioglitazona, incrementa la proporción de apo A-I, lo que las convierte en partículas más electronegativas. Independientemente del origen, la carga eléctrica de superficie de las HDL estaría relacionada con la eliminación renal de las HDL que implica la filtración a través de la membrana glomerular recubierta de proteínas de matriz que tienen una fuerte carga negativa.¹ Así, el incremento de electronegatividad de la partícula dificultaría su depuración renal disminuyendo el catabolismo de la partícula. En este sentido, nuestros resultados son aparentemente contradictorios; ya que ambas TZD incrementan la carga de superficie de las HDL e incrementa su catabolismo, alcanzando el mayor efecto con la pioglitazona. Sin embargo, estudios en nuestro laboratorio han demostrado que el enriquecimiento con fosfolípidos solo disminuye la tasa de catabolismo renal de la apo A-I en un 35%.⁷⁷ Por otro lado, se ha demostrado que el incremento en la carga eléctrica favorece el complejo formado por fosfolípidos y apo A-I, teniendo como resultado una disminución en el

catabolismo de las HDL. Estos resultados nos sugieren que la composición de las partículas de HDL se vuelve determinante para la vía de eliminación de estas partículas y podría explicar, en parte, el incremento en la concentración plasmática de la apo A-I y la disminución del catabolismo de esta apolipoproteína con el tratamiento de rosiglitazona, comparado con pioglitazona.

Con base en estas observaciones, postulamos que el hipercatabolismo de la apo A-I de las HDL es el resultado de una reducción del tamaño y de la composición de estas lipoproteínas; en contraste, la carga eléctrica podría compensar parcialmente el hipercatabolismo de la apo A-I.

El hecho de que la composición química de las HDL se altere durante el tratamiento con TZD, sugiere que no sólo el metabolismo sino muy probablemente también la funcionalidad de estas lipoproteínas se modifique. En este sentido, el tratamiento con rosiglitazona incrementa la actividad paraoxonasa mientras que, la pioglitazona no tiene efecto sobre la actividad de esta enzima. El efecto diferencial de ambas TZD puede estar relacionado nuevamente con el contenido de fosfolípidos de las HDL; Deakin et al.⁸⁰ demostró que la proporción de fosfolípidos es importante para el reclutamiento de la enzima PON1 por parte de las HDL que se encuentra anclada a la membrana del hepatocito. Asimismo, Kontush et al.¹⁸ describen que las HDL pequeñas, que tienen una proporción de fosfolípidos elevada con respecto a las HDL grandes, tienen una capacidad mayor de transportar paraoxonasa y evitar la oxidación de las LDL *in vitro*. De esta manera, nuestros resultados sugieren que los fosfolípidos-HDL podrían ser un potencial blanco terapéutico más importante que el colesterol-HDL. Esta propuesta debe ser explorada específicamente en estudios posteriores.

El contenido de fosfolípidos de las HDL también se ha relacionado con su capacidad de promover el eflujo de colesterol; Jian et al.⁸¹ han demostrado que las HDL enriquecidas en fosfolípidos aumentan la capacidad de estas lipoproteína de captar el colesterol excedente de las células. Asimismo, las partículas HDL de menor tamaño tipo pre- β 1, constituidas casi exclusivamente de fosfolípidos y apo A-I,⁸² son los mejores aceptores del colesterol excedente de las células periféricas.⁸³ Por lo anterior, durante el desarrollo del presente estudio postulamos que el metabolismo de colesterol-HDL en los animales tratados con TZD tendría un comportamiento diferente en función del fármaco. Para explorar esta posibilidad, realizamos los estudios cinéticos de los ésteres de colesterol-HDL *in vivo*. Nuestros resultados demostraron que el tratamiento con pioglitazona disminuye la tasa de catabolismo de los EC de las HDL. Estos resultados apoyan lo descrito por Julia et al.⁸⁴ ya que demuestran que un incremento de triacilgliceroles y/o de fosfolípidos, específicamente de esfingomielina, disminuyen la captación

de ésteres de colesterol por el receptor hepático SR-BI. Pero favorecen el eflujo de ésteres de colesterol mediante este receptor. Esto explicaría parcialmente la disminución de la tasa de catabolismo de los ésteres de colesterol después del tratamiento con pioglitazona.

Posteriormente analizamos el comportamiento cinético de la fracción HDL de manera independiente a la fracción de las lipoproteínas que contienen apo B (VLDL, IDL, LDL); nuestros resultados demuestran que el decaimiento radiactivo en la fracción HDL es menor, particularmente en los últimos tiempos de la cinética, tanto con el tratamiento con pioglitazona como con rosiglitazona, respecto al grupo control, sugiriendo que la eliminación del colesterol-HDL es menor. Estos resultados son congruentes con el incremento en las concentraciones plasmáticas del C-HDL en el tratamiento con pioglitazona, pero a priori no apoyan el papel antiaterogénico de las HDL durante el tratamiento con TZD porque el colesterol se estaría eliminando lentamente del plasma. Generalmente se acepta que la eliminación de C-HDL del compartimento plasmático ocurre principalmente vía transferencia hacia las lipoproteínas que contienen apo B mediada por la CETP y en segundo lugar vía el receptor hepático SR-BI.⁵ En este contexto, observamos que la transferencia de estos ésteres de colesterol de las HDL hacia las LpB está disminuida después del tratamiento con cualquiera de las TZD. Este resultado es congruente con la eliminación lenta de los ésteres de colesterol de las HDL en los animales tratados con TZD y además sugiere un esquema metabólico anti-aterogénico por el rol proaterogénico de las LpB. Se puede descartar que la transferencia lenta de ésteres de colesterol hacia las LpB sea consecuencia de la disminución de la actividad CETP porque la actividad de esta proteína no se modifica en el conejo tratado con TZD. Por lo tanto, es posible que la disminución de la transferencia de ésteres de colesterol esté relacionada con los cambios de estructura de las HDL que no es favorable a la actividad CETP.⁷⁷

A pesar de que la disminución de la transferencia hacia las LpB sea una explicación a la eliminación lenta de los ésteres de colesterol-HDL, no se puede descartar la posibilidad de que, también la vía directa de eliminación a través del SR-BI se regule a baja por el tratamiento con TZD. El SR-BI, es otro factor que está regulado por las TZD y juega un papel importante en la mediación del intercambio de colesterol de las células a las HDL y otras lipoproteínas. En estudios realizados en ratones transgénicos para SR-BI, se ha demostrado que la estimulación de este receptor se asocia a la producción de partículas pequeñas y densas, al contrario de cuando disminuye la expresión de este receptor, ya que incrementa el tamaño de partícula.⁸⁵ Una de las principales funciones del receptor SR-BI es remover selectivamente los ésteres de colesterol contenidos en las HDL principalmente de las partículas HDL grandes lo que resulta

en la formación de partículas pequeñas que se catabolizan más rápidamente. Considerando estas evidencias postulamos que el tratamiento con TZD modifica la estructura y el metabolismo de las HDL por medio de la sobreexpresión del receptor SR-BI.

Nuestros resultados también demuestran que la expresión de la proteína de SR-BI incrementa con ambos tratamientos de TZD. Sin embargo, Yesilaltay et al.⁸⁶ reportan que la estabilidad de este receptor en la membrana del hepatocito es dependiente de una proteína acopladora llamada PDZK1, pero no necesariamente va a favorecer la funcionalidad del SR-BI, ni su interacción con las HDL. Tachibana et al.⁸⁷ han sugerido que el gen PDZK1 pueda estar regulado por los PPAR α . En líneas celulares de hepatoma de rata se han identificado PPRE en la región promotora del gen del PDZK, administrando agonista de los PPAR α . En nuestro laboratorio se ha demostrado que la pioglitazona puede tener una acción de glitazar y podría promover la expresión y funcionalidad del PDZK1. Al contrario de lo propuesto, el tratamiento con TZD no modifica la expresión de la proteína PDZK1 en células de hepatoma de rata, Fu5AH. Los resultados anteriores sugieren que la funcionalidad del receptor hepático SR-BI este probablemente modificada y se refleje en el transporte reverso del colesterol.

Nuestros resultados demuestran que el influjo de colesterol no incrementa aun cuando se incrementa la expresión del SR-BI; por el contrario, el influjo disminuye con la rosiglitazona mientras la pioglitazona no lo modifica.

Lo anterior sugiere que las TZD juegan un papel fundamental en las modificaciones de la concentración plasmática de C-HDL, así como la síntesis y catabolismo de la apo A-I, composición y funcionalidad de las HDL.

CONCLUSIONES

En este trabajo se demostró que las diferencias entre pioglitazona y rosiglitazona sobre las concentraciones plasmáticas de C-HDL tienen su origen en cambios del metabolismo, tamaño y composición de las partículas HDL. Fortaleciendo así, la idea de que la estructura fisicoquímica de las HDL tienen una relación directa con su metabolismo y su función antiaterosclerosa. Además este estudio nos permite postular que las propiedades antiaterogénicas de las HDL no sólo dependen de las concentraciones plasmáticas de C-HDL, si no de las características fisicoquímicas de las diferentes subpoblaciones de HDL.

BIBLIOGRAFIA

1. Pérez-Méndez O, Carreón-Torres JE, Franco M, Juárez-Oropeza MA. HDL physicochemical characteristics as determinants of their plasma concentrations: what we have learned from thiazolidinediones. "HDL Cholesterol: Roles, Effects, and Elevation." Frank Columbus, Editor. Nova Science Publishers, Inc. 2008.
2. Kwiterovich Peter O. Jr. Fundamental aspects of dyslipidemia and atherosclerosis. Dyslipidemia. Lippincott Williams&Wilkins, Inc. 2010.
3. Von Eckardstein A, Huang Y, Assmann G. Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol*. 1994;5:404-416.
4. Kwiterovich Peter O. Jr. Metabolic disorders of dyslipidemia. Dyslipidemia. Lippincott Williams&Wilkins, Inc. 2010.
5. 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.
6. Hernández-Mijares A, Morillas-Ariño C, Martínez-Triguero ML. Metabolismo de las lipoproteínas. *Endocrinol Nutr*. 2003;50:16-23.
7. Ochoa-Sosa CA. Metabolismo de las lipoproteínas. En Posadas-Romero C. Dislipidemias y Aterosclerosis. 1era. Ed. Interamericana – McGraw-Hill. México. 1995:43-54.
8. Aguilar-Salinas CA, Vazquez-Chavez C, Gamboa-Marrufo R, Garcia-Soto N, de Jesus Rios-Gonzalez J, Holguin R, Vela S, Ruiz-Alvarez F, Mayagoitia S. Obesity, diabetes, hypertension, and tobacco consumption in an urban adult Mexican population. *Arch Med Res*. 2001;32:446-53.
9. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002;106:3143-421.
10. Pietzsch, J, Lattke P, Julius U. Oxidation of apolipoprotein B-100 in circulating LDL is related to LDL residence time. In vivo insights from stable-isotope studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;10:E63-E67.

11. Mertens A and Paul Holvoet. Oxidized LDL and HDL: antagonist in atherothrombosis. *FASEB J.* 2001;15:2073-2084.
12. Gardner CD, Fortmann SP, Krauss RM. Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. *J Am Med Assoc.* 1996;276:875-881.
13. Rye KA, Bursill CA, Lambert G, Tabet F, Barter PJ. The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J Lip Res.* 2009;50:S195-200.
14. Pérez-Méndez O, Castro G, Fruchart JC, Luc G. Kinetic and metabolic studies of apo A-I and Apo-II in an hypoalphalipoproteinemia patient. *Eur J Neurology.* 1995;2:77.
15. Pérez-Méndez O, Bruckert E, Franceschini G, Duhal N, Lacroix B, Bonte JP, Sirtori C, Fruchart JC, Turpin G, Luc G. Metabolism of apolipoproteins A-I and A-II in subjects carrying similar apo A-I mutations, apo A-I Milano and apo A-I Paris. *Atherosclerosis.* 2000;148:317-326.
16. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, Huang Y. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk: the PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis.* 1996;124:S11-S20.
17. Barkowski RS, Frishman WH. HDL metabolism and CETP inhibition. *Cardiol Rev.* 2008;16:154-62.
18. 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.
19. Argmann CA, Sawyez CJ, McNeil CJ, Hegele RA, Huff MW. Activation of peroxisoma proliferator –activated receptor gamma and retinoid X receptor results in net depletion of cellular cholesteryl esters in macrophages exposed to oxidized lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:475-482.

20. Huesca-Gómez C, Luc G, Fruchart JC, Pérez-Méndez O. Ciprofibrate increases synthesis and catabolic rates of HDL apo A-I and apo A-II in patients with hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis*. 2004;5:65.
21. Carreón-Torres E, Juárez-Meavepeña M, Cardoso-Saldaña G, Huesca-Gómez C, Franco M, Fievet C, Luc G, Juárez-Oropeza MA, Pérez-Méndez O. Pioglitazone increases the fractional catabolic and production rates of high-density lipoproteins apo AI in the New Zealand White Rabbit. *Atherosclerosis*. 2004;181:233-240.
22. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res*. 2004;95:764-772.
23. Pascot A, Lemieux I, Prud'homme D, Tremblay A, Nadeau A, Couillard C, Bergeron J, Lamarche B, Després JP. Reduced HDL particle size as an additional feature of the atherogenic dyslipidemia of abdominal obesity. *J Lipid Res*. 2001;42:2007-14.
24. Arsenault BJ, Lemieux I, Després JP, Gagnon P, Wareham NJ, Stroes ES, Kastelein JJ, Khaw KT, Boekholdt SM. HDL particle size and the risk of coronary heart disease in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk prospective population study. *Atherosclerosis*. 2009;206:276-81.
25. Lamarche B, Uffelman DK, Carpentier A, Cohn J, Steiner G, Barrett H, Lewis GF. Triglyceride enrichment of HDL enhances in vivo metabolic clearance of HDL apo A-I in healthy men. *J Clin Invest*. 1999;103:1191-1199.
26. Asztalos BF. High-density lipoprotein metabolism and progression of atherosclerosis: new insights from the HDL Atherosclerosis Treatment Study. *Curr Opin Cardiol*. 2004;19:385-391.
27. Sviridov D, Nestel P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2002;161:245-254.
28. Prediman KS, Sanjay K, Jan N, Bojan C. Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins an idea whose time for testing is coming, part I. *Circulation*. 2001;104:2376-2386.

29. Deakin S, Leviev I, Gomaraschi M, Calabresi L, Franceschini G, James RW. Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. *J Biol Chem.* 2002;277:4301-4308.
30. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest.* 1998;101:1581-90.
31. Ribas V, Sánchez-Quesada JL, Antón R, Camacho M, Julve J, Escolà-Gil JC, Vila L, Ordóñez-Llanos J, Blanco-Vaca F. 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;95:789-97.
32. Calabresi L, Franceschini G, Sirtori CR, De Palma A, Saresella M, Ferrante P, Taramelli D. Inhibition of VCAM-1 expression in endothelial cells by reconstituted high-density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;238:61-65.
33. Baker PW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. Phospholipid composition of reconstituted high density lipoproteins influences their ability to inhibit endothelial cell adhesion molecule expression. *J Lipid Res.* 2000;41:1261-7.
34. Pérez-Méndez O. Lipoproteínas de alta densidad (HDL). ¿Un objetivo terapéutico en la prevención de la aterosclerosis *Arch Cardiol Mex.* 2004;74:53-67.
35. Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res.* 2006;98:1352-64.
36. Callegari E, Norata GD, Inoue H, Catapano AL. Oxidized-HDL3 modulates the expression of Cox-2 in human endothelial cells. *Int J Mol Med.* 2006;18:209-13.
37. Norata GD, Callegari E, Inoue H, Catapano AL. HDL3 induces cyclooxygenase-2 expression and prostacyclin release in human endothelial cells via a p38 MAPK/CRE-dependent pathway: effects on COX-2/PGI-synthase coupling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:871-7.
38. Yki-Järvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med.* 2004;351:1106-18.

39. Barbier O, Torra IP, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart JC, Glineur C, Staels B. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:717-726.
40. Reginato MJ, Lazar MA. Mechanisms by which thiazolidinediones enhance insulin action. *Trends Endocrinol Metab.* 1999;10:9-13.
41. Vosper H, Guennadi AK, Tracey L, Graham, Colin NA. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists, hyperlipidemia, and atherosclerosis. *Pharma and Therap.* 2002;95:47-62.
42. Marx N, Duez H, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. *Circ Res.* 2004;94:1168-1178.
43. Klappacher WG, Glass C. Roles of peroxisome proliferators-activated receptor γ in lipid homeostasis and inflammatory responses of macrophages. *Curr Opin Lipidol.* 2002;13:305-312.
44. Akiyama TE, Sakai S, Lambert G, Nicol ChJ, Matsususe K, Pimprale S, Lee YH, Ricote M, Glass ChK. et al. Conditional distribution of the peroxisomes proliferator-activated receptor γ 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.
45. Goldberg RB, Kendall DM, Deeg MA, Buse JB, Zagar AJ, Pinaire JA, Tan MH, Khan MA, Perez AT, Jacober SJ; GLAI Study Investigators A comparison of lipid and glycemic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care.* 2005;28:1547-54.
46. Khan MA, St Peter 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;25:708-11.
47. Van Wijk JP, De Koning EJ, Martens EP, Rabelink TJ. Thiazolidinediones and blood lipids in type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1744-1749.
48. Rye KA, Clay MA, Barter PJ. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis.* 1999;145:227-38.

49. Davidson WS, Sparks DL, Lund-Katz S, Phillips MC. The molecular basis for the difference in charge between pre-beta⁻ and alpha-migrating high density lipoproteins. *J Biol Chem.* 1994;269:8959-65.
50. Yancey PG, de la Llera-Moya M, Swarnakar S, Monzo P, Klein SM, Connelly MA, Johnson WJ, Williams DL, Rothblat GH. High density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI. *J Biol Chem.* 2000;275:36596-604.
51. Tailleux A, Torpier G, Caron B. Immunological properties of apo B-containing lipoprotein particles in human atherosclerotic arteries. *J Lipid Res.* 1993;34:719-728.
52. Lowry OH, Rosebrough HJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-275.
53. Williams PT, Krauss RM, Nichols AV, Vranizan KM, Wood PD. Identifying the predominant peak diameter of high-density and low-density lipoproteins by electrophoresis. *J Lipid Res.* 1990;31:1131-1139.
54. Huesca-Gómez C, Carreón-Torres E, Nepomuceno-Mejía T, Sánchez-Solorio M, Galicia-Hidalgo M, Mejía AM, Montaña LF, Franco M, Posadas-Romero C, Pérez-Méndez O. Contribution of cholesteryl ester transfer protein and lecithin: cholesterol acyltransferase to HDL size distribution. *Endocrin Res.* 2004;30:403-415.
55. Bilheimer DW, Eisenberg D, Levy RI. The metabolism of very low density lipoproteins. Preliminary in vitro and in vivo observations. *Biochim Biophys Acta.* 1972;260:212-221.
56. Lewis GF, Lamarche B, Uffelman KD, Heatherington AC, Honig MA, Szeto LW, Barrett PH. Clearance of postprandial and lipolytically modified human HDL in rabbits and rats. *J Lipid Res.* 1997;38:1771-1778.
57. Sparks DL, Phillips MC. Quantitative measurement of lipoprotein surface charge by agarose gel electrophoresis. *J Lipid Res.* 1992;33:123-30.
58. 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.

59. Tollefson HJ, Albers JJ. Isolation, characterization and assay of plasma lipid transfer proteins. En Albers JJ, Segrest JP, Eds. *Methods in enzymology*. New York: Academic Press Inc. 1994;797-781.
60. Murdoch SJ, Carr MC, Hokanson JE, Brunzell JD, Albers JJ. PLTP activity in premenopausal women. Relationship with lipoprotein lipase, HDL, LDL, body fat, and insulin resistance. *J Lipid Res*. 2000;41:237-44.
61. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour PH, Arrol S, Ishola M, Durrington PN. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 1991;86:193-9.
62. Kee P, Caiazza D, Rye KA, Barrett PH, Morehouse LA, Barter PJ. 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;26:884-90.
63. Badeau RM, Metso J, Tikkanen MJ, Jauhiainen M. 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;1771:1329-34.
64. Djaouti L, Jourdan T, Demizieux L, Chevrot M, Gresti J, Vergès B, Degrace P. Different effects of pioglitazone and rosiglitazone on lipid metabolism in mouse cultured liver explants. *Diabetes Metab Res Rev*. 2010;26:297-305.
65. Ishibashi M, Egashira K, Hiasa K, Inoue S, Ni W, Zhao Q, Usui M, Kitamoto S, Ichiki T, Takeshita A. Antiinflammatory and antiarteriosclerotic effects of pioglitazone. *Hypertension*. 2002;40:687-93.
66. Millar JS, Ikewaki K, Bloedon LT, Wolfe ML, Szapary PO, Rader DJ. Effect of rosiglitazone on HDL metabolism in subjects with metabolic syndrome and low HDL. *J Lipid Res*. 2011;52:136-42.
67. Duez H, Lefebvre B, Poulain P, Torra IP, Percevault F, Luc G, Peters JM, Gonzalez FJ, Gineste R, Helleboid S, Dzavik V, Fruchart JC, Fievet C, Lefebvre P, Staels B. Regulation of

human apoA-I by gemfibrozil and fenofibrate through selective peroxisome proliferator-activated receptor modulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:585–591.

68. Hillaire-Buys D, Faillie JL, Montastruc JL, Petit P. Stay vigilant: a glitazone (pioglitazone) can hide a glitazar!. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012. En prensa. DOI 10.1007/s00228-012-1299-1.

69. Kalliokoski A, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Niemi M. No significant effect of SLCO1B1 polymorphism on the pharmacokinetics of rosiglitazone and pioglitazone. *Br J Clin Pharmacol.* 2008;65:78-86.

70. Huesca-Gómez C, Franco M, Luc G, Montaña L, Massó F, Posadas-Romero C, Pérez-Méndez O. Chronic hypothyroidism induces abnormal structure of high-density lipoproteins and impaired kinetics of apolipoprotein A-I in the rat. *Metabolism.* 2002;51:443-450.

71. Carreón-Torres E, Rendón-Sauer K, Monter-Garrido M, Toledo-Ibelles P, Gamboa R, Menjivar M, López-Marure R, Luc G, Fievet C, Cruz D, Vargas-Alarcón G, Pérez-Méndez O. Rosiglitazone modifies HDL structure and increases HDL-apo AI synthesis and catabolic rates. *Clin Chim Acta.* 2009;401:37-41.

72. 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.

73. Pietzsch J, Julius U, Nitzsche S, Hanefeld M. In vivo evidence for increased apolipoprotein A-I catabolism in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetes.* 1998;47:1928-34.

74. Frénais R, Ouguerram K, Maugeais C, Mahot P, Maugère P, Krempf M, Magot T. High density lipoprotein apolipoprotein AI kinetics in NIDDM: a stable isotope study. *Diabetologia.* 1997;40:578-83.

75. Jawahar LM, Bo H, Jiawei C, Dayuan L. Pioglitazone inhibits LOX-1 expression in human coronary artery endothelial cells by reducing intracellular superoxide radical generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:2203-2208.

76. Lewis GF. Determinants of plasma HDL concentrations and reverse cholesterol transport. *Curr Opin Cardiol.* 2006;21:345-52.

77. Pérez-Méndez O, Alvarez-Salcedo P, Carreón Torres E, Luc G, Arce Fonseca M, de la Peña A, Cruz Robles D, García JJ, Vargas-Alarcón G. Palmitic acid in HDL is associated to low apo A-I fractional catabolic rates in vivo. *Clin Chim Acta*. 2007;378:53-8.
78. Morton, RE; Greene, DJ. CETP and lipid transfer inhibitor protein are uniquely affected by the negative charge density of the lipid and protein domains of LDL. *J Lipid Res*. 2003;44:2287-2296.
79. Desrumaux C, Athias A, Masson D, Gambert P, Lallemant C, Lagrost L. Influence of the electrostatic charge of lipoprotein particles on the activity of the human plasma phospholipid transfer protein. *J Lipid Res*. 1998;39:131-42.
80. Deakin S, Leviev I, Gomaraschi M, Calabresi L, Franceschini G, James RW. Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. *J Biol Chem*. 2002;277:4301-8.
81. Jian B, de la Llera-Moya M, Ji Y, Wang N, Phillips MC, Swaney JB, Tall AR, Rothblat GH. Scavenger receptor class B type I as a mediator of cellular cholesterol efflux to lipoproteins and phospholipid acceptors. *J Biol Chem*. 1998;273:5599-606.
82. Tchoua U, Gillard BK, Pownall HJ. HDL superphospholipidation enhances key steps in reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*. 2010;209:430-5.
83. Favari E, Calabresi L, Adorni MP, Jessup W, Simonelli S, Franceschini G, Bernini F. Small discoidal pre-beta1 HDL particles are efficient acceptors of cell cholesterol via ABCA1 and ABCG1. *Curr Opin Lipidol*. 2010;21:229-38.
84. Julia Z, Duchene E, Fournier N, Bellanger N, Chapman MJ, Le Goff W, Guerin M. Postprandial lipemia enhances the capacity of large HDL2 particles to mediate free cholesterol efflux via SR-BI and ABCG1 pathways in type IIB hyperlipidemia. *J Lipid Res*. 2010;51:3350-8.
85. Cai L, Wang Z, Meyer JM, Ji A, van der Westhuyzen DR. Macrophage SR-BI regulates LPS-induced pro-inflammatory signaling in mice and isolated macrophages. *J Lipid Res*. 2012;53:1472-81.

86. Yesilaltay A, Daniels K, Pal R, Krieger M, Kocher O. Loss of PDZK1 causes coronary artery occlusion and myocardial infarction in Paigen diet-fed apolipoprotein E deficient mice. PLoS One. 2009;4:e8103.
87. Tachibana K, Anzai N, Ueda C, Katayama T, Yamasaki D, Kirino T, Takahashi R, Ishimoto K, Komori H, Tanaka T, Hamakubo T, Ueda Y, Arai H, Sakai J, Kodama T, Doi T. Regulation of the human PDZK1 expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. FEBS. 2008;582:3884-8.

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 (μL)	0	0	0	0	0	0	20
ST (μL)	0	10	20	40	80	100	0
H_2O (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



Rosiglitazone modifies HDL structure and increases HDL-apo AI synthesis and catabolic rates

Elizabeth Carreón-Torres^a, Karla Rendón-Sauer^a, Mariana Monter-Garrido^a, Paola Toledo-Ibelle^a, Ricardo Gamboa^b, Marta Menjivar^c, Rebeca López-Marure^b, Gerald Luc^d, Catherine Fievet^d, David Cruz^a, Gilberto Vargas-Alarcón^a, Oscar Pérez-Méndez^{a,*}

^a Department of Molecular Biology, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Mexico City, Mexico

^b Department of Physiology, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Mexico City, Mexico

^c Department of Biology, School of Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^d Department of Atherosclerosis, SERLIA-INSERM URS45, Institut Pasteur de Lille and University Lille II, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 July 2008

Received in revised form 2 October 2008

Accepted 4 November 2008

Available online 12 November 2008

Keywords:

HDL subclasses

Paraoxonase-1

Thiazolidinediones

Lipoprotein turnover

ABSTRACT

Background: Rosiglitazone is an agonist of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma that may modify HDL metabolism in humans, but this effect has not been completely elucidated. Therefore, we determined the effect of rosiglitazone on apo AI turnover, HDL structure, and PON1 plasma activity.

Methods: Kinetic studies of HDL-apo AI radiolabeled with ¹²⁵I were performed in 7 chow-fed, male, New Zealand white rabbits after 6 weeks of 0.32 mg/kg/d rosiglitazone-treatment vs. vehicle-treated rabbits (n = 11). HDL size distribution was determined by polyacrylamide gradient electrophoresis and paraoxonase-1 (PON1); plasma activity was assessed spectrophotometrically using phenylacetate as substrate.

Results: Fractional catabolic rate (FCR) of HDL apo AI was higher in the rosiglitazone-treated group than in the control group (0.031 ± 0.004 vs. 0.025 ± 0.006 pools/h, respectively, p < 0.05). The mean apo AI production rate (PR) was 62% higher in the rosiglitazone group as compared to controls (0.918 ± 0.238 vs. 0.564 ± 0.160 mg/kg/h, p < 0.01). Accordingly, apo AI plasma levels in rosiglitazone-treated animals were about 37% higher than in the control group. Rosiglitazone-induced changes in apo AI turnover appeared concomitantly with a significant increase of phospholipids and a decrease in cholesteryl esters content of the HDL. Compositional changes resulted in a relative increase of the HDL3b and HDL3c subfractions and a significant enhancement of the plasma PON1 activity (488.5 ± 138.2 vs. 595.2 ± 179.4 μmol/min/ml, p < 0.05).

Conclusions: Rosiglitazone increased apo AI plasma concentrations, resulting from an enhancement of apo AI synthesis, and induced the synthesis of smaller HDL particles with a concomitant increase of plasma PON1 activity. These modifications may contribute to the anti-atherogenic potential of rosiglitazone.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Several clinical and epidemiological studies have demonstrated a negative correlation between HDL-cholesterol (HDL-C) and the development of coronary heart disease (CHD) risk [1,2]. The causal relationship between plasma HDL-C concentration and CHD has been explained by the role that these lipoproteins play in reverse cholesterol transport, as well as the potentially anti-atherogenic properties of HDL, such as their anti-inflammatory, anti-oxidative, anti-aggregatory, anti-coagulant, and pro-fibrinolytic effects (for review see Ref. [3]).

HDL comprises a heterogeneous group of lipoproteins that may be classified by decreasing size in HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL3b, HDL3c [4,5]. These HDL subclasses have a different capacity to promote cholesterol efflux from peripheral tissues, as well as different anti-oxidative properties [6–9]. HDL anti-oxidative properties are mainly due to their associated enzyme, the paraoxonase-1 (PON1) [6,7,10]. This enzyme catalyzes the conversion of the pro-atherogenic LDL-lipoperoxides, characteristic of the early stages of atherosclerotic processes, to the corresponding lipohydroxides that are biologically innocuous [10].

Thiazolidinediones (i.e., rosiglitazone and pioglitazone) are oral anti-diabetic drugs, agonists of the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARγ). The PPARγ is a member of the nuclear receptor superfamily that has been implicated in the regulation of genes expression related with HDL metabolism, such as the ABC-A1 and ABC-G1 transporters, apo E, and the scavenger receptors (SR)-BI [11,12], suggesting that HDL remodeling is strongly modified by PPARγ

* Corresponding author. Physiology Department, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" Juan Badiano I, Sección XVI, 14080 Mexico D.F. Mexico. Tel.: +52 55 55 73 29 11x1278; fax: +52 55 55 73 09 26.

E-mail address: opmendez@yahoo.com (O. Pérez-Méndez).

activators. Thiazolidinediones therapy, particularly with pioglitazone, results in an elevation of HDL-C plasma levels [13]. However, pioglitazone at high doses strongly modifies HDL metabolism, increasing up to twice the fractional catabolic and production rates of HDL-apo A-I in New Zealand white rabbits [14]. Such strong metabolic modifications have no apparent repercussions on apo A-I levels since the augmented synthesis counterbalances the accelerated catabolism. In agreement with the high rate of elimination of the HDL from the plasma compartment, pioglitazone induces a shift of HDL size distribution to small HDL3c particles [14–16]. In contrast to pioglitazone, HDL-C plasma levels increase only slightly during rosiglitazone treatment [17,18], suggesting that both thiazolidinediones exert a differential effect on HDL metabolism; however, there is very little information in this field.

Therefore, in the present study we investigated the effects of rosiglitazone treatment on the rate of HDL apo A-I production and clearance from the circulation in male New Zealand White (NZW) rabbits, an animal model displaying a lipoprotein profile similar to that of humans. This model has been successfully used to mimic human apolipoprotein turnover [14,19–21]. Our studies were performed with a 0.32 mg/kg/d dose of rosiglitazone, equivalent to three-times the dose used in humans (8 mg/d). The aim of using such high doses of rosiglitazone was to generate data that could be compared with the results of the previous studies concerning the effect of pioglitazone on HDL metabolism [14]. Since HDL structure may influence apo A-I catabolic rates and HDL functions, we further determined hydrodynamic diameter, chemical composition of HDL, as well as PON1 activity that is related to HDL antioxidant properties.

2. Methods

2.1. Animals

NZW male rabbits (3 to 3.5 kg) were randomly distributed into control or rosiglitazone groups. Rosiglitazone-treated rabbits received a daily oral dose also equivalent to three-times the dose used in humans, 0.34 mg/kg body weight of rosiglitazone in 1 ml water as vehicle. Control rabbits received only 1 ml vehicle. Animals had free access to a standard chow diet and water. Assessments were made after 6 weeks of treatment. All procedures were performed in accordance with the Scientific and Ethics Committees of the Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

2.2. Isolation and analysis of HDL structure

Ten-hour fasting blood samples were drawn from the marginal ear vein for the HDL structure analysis. Plasma was immediately separated by centrifugation at 4 °C and lipoprotein fractionation was started within 2 h. HDLs were separated by ultracentrifugation in a Beckman optima TLX table centrifuge at 110,000 rpm for 3 h at 10 °C in 3.2 ml polycarbonate tubes, as previously described [15]. HDLs were dialyzed against 0.09 mol/l Tris/0.08 mol/l boric acid/3 mmol/l EDTA (TBE) buffer, pH 8.4.

The homogeneity and hydrodynamic diameter of HDL were estimated as previously described [22] with slight modifications. Briefly, HDL samples were separated according to their size by non-denaturing 3–30% gradient polyacrylamide gel electrophoresis using reference globular proteins (thyroglobulin, 17 nm; ferritin, 12.2 nm; catalase, 10.4 nm; lactate dehydrogenase, 8.2 nm; and albumin, 7.1 nm; high molecular weight calibration kit, Pharmacia, Uppsala) [22]. Gels were stained for proteins with Coomassie Blue 250 and the relative proportion of each HDL subclass was estimated by optical densitometry, considering the following size intervals: HDL3c, 7.75–8.45 nm; HDL3b, 8.45–8.98 nm; HDL3a, 8.98–9.94 nm; HDL2a, 9.94–10.58 nm; and HDL2b, 10.58–12.96 nm. The variation coefficient of the method was <7%. Total cholesterol, free cholesterol, phospholipids, and triglycerides in isolated HDL particles were determined as described in the Analytical methods section.

2.3. Rabbit apo A-I radiolabeling and turnover studies

Turnover studies were performed as previously described [14]. Briefly, rabbit apo A-I was isolated from delipidated HDL by anion exchange chromatography. Apo A-I radiolabeling was carried out by the iodine monochloride method as modified by Bilheimer et al. [23]. Labeled 125 I-apo A-I was reincorporated to newly-isolated HDL from control or rosiglitazone-treated rabbits, as described previously [15]. Labeled HDLs were dialyzed against sterile 0.15 M NaCl solution. The solution was sterilized using 0.22 µm filters and stored at 4 °C until use.

For apo A-I turnover studies, animals were maintained in a 12:12-h light–dark cycle and fed standard chow diet throughout the study. Animals received 1.75 mg of HDL protein isolated from control or rosiglitazone-treated rabbits, containing about 7×10^5 cpm of 125 I in a total 0.5 ml volume by a bolus injection into the right marginal

ear vein. Blood samples (1 to 2 ml) were obtained from the opposite marginal vein 10 min after injection and then at 1, 3, 6, 9, 12, 24, 32, 48, and 72 h. The radioactivity of each sample was measured in serum (0.5 ml) for 1 min [14]. Measured gamma counts were corrected for natural radioactivity decay. 125 I decay curves were constructed by considering the radioactivity in the 10-min serum sample as 100%.

Fractional catabolic rate (FCR) was computed by fitting the percentages of initial radioactivity kinetics to a biexponential function using the computer program SAAMII, as described elsewhere [20]. Apo A-I production rates (PR) were determined using the formula $PR = FCR \times \text{plasma apo A-I concentration (mg/l)} \times \text{total plasma volume (dl.)} / \text{body weight (kg)}$ [24]. The plasma volume was assumed to be 0.0328 L/kg body weight [25].

2.4. Analytical methods

Total cholesterol, free cholesterol, triglycerides, phospholipids, and glucose were determined by commercially available procedures (Boehringer–Mannheim, Germany and Wako Chemicals GmbH, Germany). Apo A-I was quantified by laser immunonephelometry using anti-rabbit apo A-I polyclonal antibodies obtained from goats by immunization with the electrophoretically-purified protein, as previously described [14]. A plasma pool from normal rabbits was used as reference concentration. Total lipoprotein proteins were estimated according to Lowry [26]. Cholesteryl esters were calculated as the difference between total and free cholesterol multiplied by a factor of 1.68 [27].

2.5. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity assays

Plasma CETP was determined using $[(1\alpha, 2\alpha(n)-^3\text{H})\text{-CE}]\text{-HDL}$ as donor particles and apo B-containing lipoproteins as acceptor particles as previously described [21]. CETP activity was expressed as the percentage of radioactivity transferred from the donor to the acceptor lipoprotein by 10 µl of plasma during the 16-h incubation at 37 °C.

2.6. Paraoxonase-1 activity assessment

PON1 activity was measured using phenylacetate as substrate [28]. Initial rates of hydrolysis were determined spectrophotometrically at 270 nm. The assay mixture included 1 mmol/l phenylacetate and 0.9 mmol/l CaCl_2 in 20 mmol/l Tris–HCl, pH 8.0, and 10 µl serum (diluted 1:40). The ΔA_{270} for the reaction was 1310 L/m cm. Arylesterase activity was expressed as the number of micromoles of phenylacetate hydrolyzed/(min/ml serum).

To determine whether PON1 activity is associated mainly to the small particles, 300 µl of plasma heparin was separated by size exclusion chromatography using a Bio-Prep SE1000/17 column coupled to a Bio-Rad Duo Flow chromatography system. Protein elution was accomplished with 2 mmol/l CaCl_2 in 20 mmol/l Tris–HCl, pH 8.0, at a flow rate of 1 ml/min. Fractions of 0.5 ml were collected and kept in ice; PON1 activity was assessed within 1 h after elution as described above using 10 µl of each elution fraction. The column was calibrated with HDL isolated by ultracentrifugation from a pool of control rabbit plasma. For the calibration, cholesterol was determined in the elution fractions by enzymatic colorimetric methods commercially available.

2.7. Statistical analysis

Data are expressed as the mean $\pm$ SD. Comparison among groups were made using Student *t* test for independent samples. For the parameters that were studied before and after 6 weeks of rosiglitazone-treatment, paired *t* tests were performed within each group. Significance of differences was set at $p < 0.05$.

3. Results

Rosiglitazone-treatment did not produce hepatic toxicity since alanine aminotransferase (ALT) remained unchanged, 82.8 ± 29.9 vs. 64 ± 10.0 IU/l, before and after the six weeks of treatment, respectively; $n = 12$, $p = \text{NS}$. Under these conditions, rosiglitazone treatment induced

Table 1

Mean glucose and lipid plasma concentrations of control ($n = 12$) and rosiglitazone-treated ($n = 12$) rabbits before and during 6 weeks of rosiglitazone treatment (paired experiments)

	Control ^a		Rosiglitazone 0.34 mg/kg	
	Before	During	Before	During
Total cholesterol	0.67 ± 0.16	0.64 ± 0.21	0.80 ± 0.39	0.73 ± 0.27
HDL-cholesterol	0.40 ± 0.20	0.35 ± 0.16	0.37 ± 0.21	0.40 ± 0.20
Triglycerides	0.44 ± 0.06	0.49 ± 0.11	0.46 ± 0.09	$0.66 \pm 0.21^*$
Glucose	6.65 ± 0.58	6.27 ± 0.24	6.17 ± 1.04	6.36 ± 1.25

Values are mmol/l, mean $\pm$ SD.

*Significant intragroup difference between baseline and posttreatment values. $p < 0.05$.

^a Controls only received vehicle.

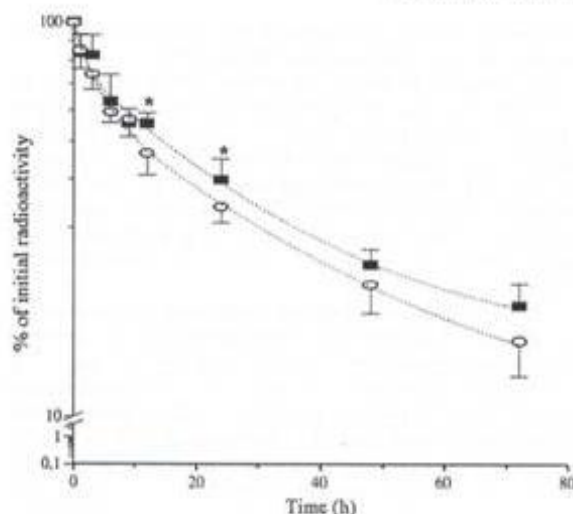


Fig. 1. Mean die-away curves of HDL 125 I-apo A-I radioactivity isolated from animals treated with rosiglitazone and control animals. Results for HDL from the control group (closed squares, $n=11$), HDL from the rosiglitazone-treated group (open circles; $n=7$) and modeled data (dashed line) are shown. Measured gamma counts were corrected for natural radioactivity decay. 125 I decay curves were constructed by considering the radioactivity in the 10-min plasma sample as the 100%. Values are mean $\pm$ SD. * $p < 0.05$ vs. control group.

a significant increase in triglycerides plasma levels of about 40%, whereas total HDL-cholesterol and plasma glucose remained unchanged by the treatment in comparison to the basal conditions (Table 1).

Fig. 1 illustrates the radioactivity decay curves of labeled apo AI in control and rosiglitazone-treated animals. The kinetic parameters, FCR and PR, derived from the die-away curves are summarized in Table 2. There was a faster clearance of HDL apo AI in the rosiglitazone-treated group (mean FCR, 22% greater) than that observed in the control group; the difference between groups reached statistical significance ($p=0.030$). The mean PRs of apo AI in the rosiglitazone-treated group was 62% higher than in the control group (Table 2). The increase in apo AI clearance in the rosiglitazone-treated group was overcompensated by the very important elevation of the PR, resulting in apo AI plasma levels 37% higher than those of the controls (Table 2). In paired measurements before and after rosiglitazone-treatment performed in an independent group of rabbits ($n=9$), apo AI plasma levels also increased significantly from 679 ± 244 to 886 ± 372 mg/l, $p=0.021$, for the pre- and post-treatment condition.

High FCR has been associated to the intravascular presence of small HDL particles [14,16]. Therefore, we performed the HDL size distribution as described in the methods section, using plasma samples before and during rosiglitazone treatment. HDL from control rabbits showed a mean peak with a Gaussian-like size distribution ranging from 8.18 ± 0.46 to 12.21 ± 0.61 nm, with maximal absorbance at 9.92 ± 0.50 nm. The main peak was shifted towards 9.59 ± 0.55 nm in the treated rabbits ($p < 0.05$, paired experiments) whereas the HDL diameter range was not significantly modified (data not shown). The relative HDL size

Table 3
Relative HDL size distribution of control and rosiglitazone-treated rabbits before and during 6 weeks of treatment (% of total HDL protein, determined by optical densitometry) (paired experiments)

	Control ($n=12$)	Rosiglitazone 0.34 mg/kg ($n=12$)
HDL2b	45.9 ± 8.8	41.0 ± 10.5^a
HDL2a	21.2 ± 2.5	21.0 ± 6.7
HDL3a	24.7 ± 8.1	25.4 ± 8.4
HDL3b	6.3 ± 4.4	6.2 ± 4.5
HDL3c	1.9 ± 1.0	3.9 ± 2.9^b

^a $p < 0.05$ vs. control group.

^b $p < 0.001$ vs. control group.

distribution was estimated considering the area under the curve as 100% of HDL protein, and the partial areas between size intervals as the percent of total HDL (Table 3). The relative size distribution was slightly shifted to small HDL subclasses by rosiglitazone; there was a lower proportion of the large HDL2b particles in the treated group than in controls. In contrast, the proportion of small HDL3c particles increased with rosiglitazone treatment, whereas the relative proportion of the other HDL subclasses remained unchanged.

Modifications of HDL turnover and size distribution appeared in parallel with changes in HDL composition during rosiglitazone treatment (Table 4). Rosiglitazone induced a marked decrease of about 30% in the cholesteryl esters and a similar increase in phospholipids content. In agreement with these observations, the apo AI-to-HDL cholesterol plasma levels ratio significantly increased from 3.1 to 4.8 ($p < 0.05$). In contrast, HDL-triglycerides had a tendency to increase during rosiglitazone treatment (Table 4). Such triglycerides enrichment was not associated to an enhanced CETP activity; CETP activity before and after rosiglitazone treatment was $31.6 \pm 6.7\%$ and $32.3 \pm 6.0\%$, respectively, $p > 0.05$.

Since HDL structure is related to their capacity to bind PON1 [6,7], we further investigated whether the changes in HDL size distribution induced by rosiglitazone were associated to modifications of PON1 plasma activities. In paired experiments ($n=12$), rosiglitazone induced a significant increase of about 20% in plasma PON1 activity, from 488.5 ± 138.2 to 595.2 ± 179.4 $\mu\text{mol/min/ml}$, as measured using phenylacetate as substrate, $p < 0.01$. We further fractionated HDL from rabbit plasma before and after treatment by size exclusion chromatography and PON1 was determined in each elution fraction (Fig. 2). The PON1 elution profile was shifted 0.5 ml towards smaller particles in treated rabbits as compared to the elution profile of PON1 before rosiglitazone treatment.

4. Discussion

In this study we demonstrated that rosiglitazone enhances the clearance and synthesis of HDL apo AI, and induces a slight shift of HDL size distribution towards smaller particles in normal NZW rabbits. We used a dose of rosiglitazone corresponding to three-times the common recommended dosage used in humans (8 mg/d). Under these conditions, hepatic function remained normal since ALT activity during rosiglitazone-treatment was comparable to the baseline values.

Table 2
Mean FCRs and PRs of HDL apo AI control ($n=11$) and rosiglitazone ($n=7$) kinetics (unpaired experiments)

	Control	Rosiglitazone 0.34 mg/kg
FCR (pool/h)	0.025 ± 0.006	0.031 ± 0.004^a
PR (mg/kg/h)	0.564 ± 0.16	0.918 ± 0.238^b
Apo AI (mg/l)	602 ± 82	828 ± 201^a

Mean $\pm$ SD.

^a $p < 0.05$ vs. control group.

^b $p < 0.005$ vs. control group.

Table 4
Mean lipid composition (% of HDL total dry mass) before ($n=12$) and during rosiglitazone treatment ($n=12$) of rabbits (paired experiments)

	Before treatment	During treatment
Free cholesterol	2.7 ± 1.1	3.1 ± 1.1
Esterified cholesterol	21.8 ± 1.8	15.3 ± 2.9^a
Triglycerides	5.1 ± 2.8	6.9 ± 2.8
Phospholipids	23.7 ± 6.2	30.7 ± 6.5^a
Protein	46.7 ± 6.9	43.8 ± 6.2

Mean $\pm$ SD.

^a Paired *t* test, $p < 0.05$ vs. before treatment.

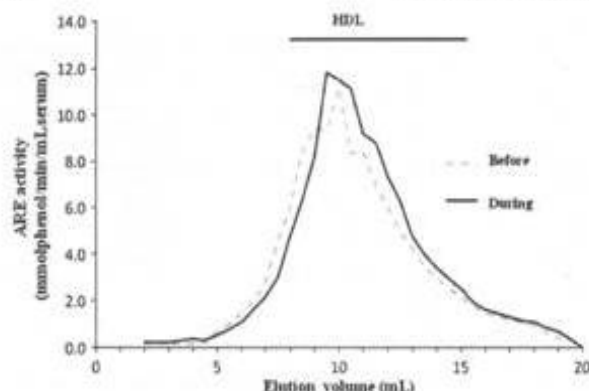


Fig. 2. PON1 activity elution profiles before (dotted line) and after (solid line) rosiglitazone treatment. The profiles correspond to the mean of three representative plasma samples. The line at the top represents the ultracentrifugation-isolated HDL elution volumes.

Rosiglitazone-treatment induced a significant enhancement of the FCR of HDL-apo AI, concomitantly with an increase in its PR. The increase in apo AI production rates was proportionally higher to that of the FCR; according to these findings, rosiglitazone administration for 6 weeks resulted in higher apo AI plasma levels in treated animals than in controls. However, HDL-cholesterol plasma levels were not affected by rosiglitazone treatment. Both effects are congruent with the significant decrease of the relative HDL cholesteryl esters content in the lipoprotein composition (Table 4). It is likely that apo AI overexpression is only reached when the rosiglitazone dose is higher than that usually used in humans. This point may be considered for possible reevaluation of the therapeutic doses of this drug.

Apo AI gene has been reported to be regulated by PPAR α agonists due to the presence of the corresponding response element in its regulatory sequence, and pioglitazone may enhance apo AI synthesis by acting as a weak PPAR α ligand [14,29]. Therefore, a cross-reactivity between PPAR α and rosiglitazone at high doses cannot be discarded, thus explaining the enhancement of apo AI production rates by rosiglitazone in our study. Whether rosiglitazone acts, in general, as a weak PPAR α ligand or a species-dependent cross-reactivity is present should be further investigated.

In analogy with rosiglitazone, pioglitazone at doses about three-times higher than those used in humans (45 mg/d) also induces an increase in both HDL-apo AI FCR and PR [14]. However, such modifications were not of the same magnitude since rosiglitazone induced a 22% increase in the FCR, whereas mean HDL-apo AI FCR in pioglitazone-treated animals increased about 100% [14]. Even if pioglitazone duplicated the apo AI catabolic rates, plasma apo AI concentrations remained similar to the basal levels after treatment because the apo AI production rates also increased 100% [14]. In contrast, rosiglitazone in this study induced a huge increase in apo AI synthesis that was not counterbalanced by catabolism, thus apo AI plasma levels increased in the treated animals. This kinetic difference between rosiglitazone and pioglitazone has not been previously documented.

In contrast with our results, rosiglitazone at the common doses (i.e., 8 mg/d) induces a slight decrease in apo AI plasma levels of about 5.6 mg/dL in patients with type 2 diabetes (T2D) [18]. Patients with T2D have an increased proportion of small HDL [30,31], and this kind of particles is associated with an enhanced apo AI catabolism [14,16,32]. We speculate that during rosiglitazone treatment there is an apo AI catabolism (as shown in this study) that exceeds the augmentation of apo AI synthesis (if there is any augmentation at normal doses of rosiglitazone), resulting in lower plasma levels of this protein in a T2D background. However, it should be emphasized that rosiglitazone doses used in this study are three-times those used in humans. To our knowledge, there are no reports concerning apo AI plasma concentrations in humans at high doses of rosiglitazone; in

consequence, it cannot be discarded that rosiglitazone acts as a glitazar in humans at the doses used in this study.

Since rosiglitazone induces an increase in HDL-apo AI PR, and newly synthesized HDLs emerge in the blood as small particles [9], the higher relative proportion of small HDL3c in treated animals may be explained by the augmentation of apo AI synthesis [14]. Furthermore, small HDL particles have been suggested to be catabolized faster in comparison with large particles [14–16]. Our results support this hypothesis since we observed an enhanced HDL-apo AI catabolism in treated rabbits, associated to the aforementioned high proportion of small HDL3c particles.

We demonstrated previously that pioglitazone induced a shift of the HDL size distribution towards small particles [14], as observed in this study with rosiglitazone. Nevertheless, the effects of pioglitazone on the size distribution were markedly more accentuated than those obtained with rosiglitazone in this study, i.e., HDL2b decreased from $43.3 \pm 8.4\%$ to $36.0 \pm 4.9\%$ and HDL3c reached levels of $12.0 \pm 1.9\%$ after 1.75 mg/kg/d of pioglitazone [14]. In agreement with these results, pioglitazone increased the apo AI FCR four-times more than rosiglitazone, suggesting again the transcendental role of HDL size on its catabolism.

In agreement with our results, it has been reported that rosiglitazone significantly increases plasma triglycerides associated with an increase in both large- and medium-sized VLDL and IDL [17,18]. Since apo CIII, an LPL inhibitor, increases during rosiglitazone treatment, it has been proposed that this is the metabolic pathway for TG elevation during rosiglitazone treatment [33].

There was a tendency of HDL to be enriched with triglycerides during rosiglitazone treatment that is not associated to an increased CETP activity; it could be argued that such enrichment is not consistent with the observed higher proportion of small HDL particles induced by rosiglitazone since triglycerides are a component of the HDL core. Nevertheless, it must be taken into account that there are more HDL particles in the plasma from treated rabbits because there is an increase in plasma apo AI. As a consequence, the HDL components increase in general, including triglycerides. In this context, the surface components of HDL, such as phospholipids and free cholesterol, increased significantly during rosiglitazone treatment in agreement with an elevation of HDL particles in plasma. Moreover, considering that small HDL are richer in surface components than larger particles, the augmentation of phospholipids and free cholesterol within these lipoproteins pool is congruent with an increased HDL3c and a diminished HDL2b.

Although the size is probably the one HDL characteristic that determines the FCR, other physicochemical properties of these lipoproteins, such as phospholipids content, contribute to establish their catabolism [15,20,21]. A high phospholipids content in HDL has been associated with a delayed HDL apo AI FCR in two different models [15,21]. However, we demonstrated that HDL became enriched with phospholipids during rosiglitazone treatment in association with an increased FCR. Consequently, phospholipids content seems to have little effect in rosiglitazone treated rabbits. HDL-receptors, such as ABC-A1 and SR-B1 that could be regulated by TZDs, may also contribute to the increased FCRs observed in rosiglitazone-treated animals [11,12,34,35]. This possibility should be addressed in future studies.

Finally, we focused on the HDL structure metabolism and its kinetic origin, because it has been suggested that the anti-atherosclerotic properties of HDLs are associated to their structure [3,6,7,9]. In this study, we have shown that the small HDL3c subclass increased in rosiglitazone-treated rabbits, and such modifications appeared concomitantly with a significant increase in PON1 plasma activity. Previous reports have demonstrated that small HDL particles carried more PON1 per particle than the larger HDL [7], probably because of the surface tension that is a determinant factor for PON1 desorption from hepatocyte membranes and binding to HDL [6]. In this context, the shift of the elution profile of PON1 activity towards smaller HDL particles, suggest that plasma PON1 activity increases during rosiglitazone treatment is

associated to the elevation of small HDL particles. If this hypothesis is further verified, the reduction of HDL size would be a therapeutic goal for anti-dyslipidemic drugs.

In summary, rosiglitazone-treatment at elevated doses in New Zealand White rabbits induced a significant increase in the FCR of HDL apo A-I, as well as a proportionally higher increase in its PR that resulted in significantly higher apo A-I plasma levels than in controls. These metabolic abnormalities appeared concomitantly with a slight reduction of the HDLs size and an enrichment of these particles with phospholipids. These findings contribute to a better understanding of the physicochemical properties of HDLs that should be considered for therapeutic goals, independently from the HDL-cholesterol plasma levels increase.

Acknowledgments

This study was supported by CONACYT grant No. 47275.

References

- [1] Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, Huang Y. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk: the PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 1996;124(Suppl):S11–20.
- [2] Bloomfield RH, Davenport J, Babikian V, et al. VA-HIT Study Group. Reduction in stroke with gemfibrozil in men with coronary heart disease and low HDL cholesterol: The Veterans Affairs HDL Intervention Trial (VA-HIT). *Circulation* 2001;103:2828–33.
- [3] Feig JL, Shamir R, Fisher EA. Atheroprotective effects of HDL: beyond reverse cholesterol transport. *Curr Drug Targets* 2008;9:196–203.
- [4] Williams PT, Krauss RM, Nichols AV, Vranizan KM, Wood PD. Identifying the predominant peak diameter of high-density and low-density lipoproteins by electrophoresis. *J Lipid Res* 1990;31:1131–9.
- [5] Tian L, Wu X, Fu M, Qin Y, Xu Y, Jia L. Relationship between plasma apolipoprotein B concentrations, apolipoprotein B/apolipoprotein A-I and HDL subclasses distribution. *Clin Chim Acta* 2008;388:148–55.
- [6] Deakin S, Leviev I, Gomaschi M, Calabresi L, Franceschini G, James RW. Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. *J Biol Chem* 2002;277:4301–8.
- [7] Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1881–8.
- [8] Baldi S, Frascerra S, Ferrannini E, Natali A. LDL resistance to oxidation: effects of lipid phenotype, autologous HDL, and alanine. *Clin Chim Acta* 2007;379:95–100.
- [9] Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre- β -migrating high density lipoprotein pathway. *Biochemistry* 1988;27:25–9.
- [10] Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Paro SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998;101:1581–90.
- [11] Akiyama TE, Sakai S, Lambert G, et al. Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux. *Mol Cell Biol* 2002;22:2607–19.
- [12] Malerød L, Sporstøl M, Juvet UK, Mousavi A, Gjoen T, Berg T. Hepatic scavenger receptor class B, type I is stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and hepatocyte nuclear factor alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305:557–65.
- [13] Herx M, Johns D, Kevirigoe J, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial of the effects of pioglitazone on glycemic control and dyslipidemia in oral antihyperglycemic medication-naïve patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Ther* 2003;25:1074–95.
- [14] Carreón-Torres E, Juárez-Meavepeña M, Cardoso-Saldaña G, et al. Pioglitazone increases the fractional catabolic and production rates of high-density lipoproteins apo A-I in the New Zealand White Rabbit. *Atherosclerosis* 2005;181:233–40.
- [15] 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;51:443–50.
- [16] Elkhaili L, Majd Z, Bakir R, et al. Fish-eye disease: structural and in vivo metabolic abnormalities of high-density lipoproteins. *Metabolism* 1997;46:474–83.
- [17] Goldberg RB, Kendall DM, Deeg MA. A comparison of lipid and glycemic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care* 2005;28:1547–54.
- [18] Deeg MA, Buse JB, Goldberg RB, et al. Pioglitazone and rosiglitazone have different effects on serum lipoprotein particle concentrations and sizes in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care* 2007;30:2458–64.
- [19] Lamarche B, Uffelman KD, Steiner G, Barreth PH, Lewis G. 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;39:1162–72.
- [20] Lewis GF, Lamarche B, Uffelman KD, et al. Clearance of postprandial and lipolytically modified human HDL in rabbits and rats. *J Lipid Res* 1997;38:1771–8.
- [21] Pérez-Méndez O, Álvarez-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;378:53–8.
- [22] Huesca-Gómez C, Carreón-Torres E, Nepomuceno-Mejía T, et al. Contribution of cholesteryl ester transfer protein and lecithin: cholesterol acyl transferase to HDL size distribution. *Endocr Res* 2004;30:403–15.
- [23] Bilheimer DW, Eisenberg D, Levy RI. The metabolism of very low density lipoproteins. preliminary in vitro and in vivo observations. *Biochim Biophys Acta* 1972;260:212–21.
- [24] Rashid S, Uffelman KD, Barreth PH, Lewis GF. Effect of atorvastatin on high-density lipoprotein apolipoprotein A-I production and clearance in the New Zealand white rabbit. *Circulation* 2002;106:2955–60.
- [25] Brousseau ME, Santamarina-Fojo S, Zech LA, et al. Hyperalphalipoproteinemia in human lecithin cholesterol acyltransferase transgenic rabbits. In vivo apolipoprotein A-I catabolism is delayed in a gene dose-dependent manner. *J Clin Invest* 1996;97:1844–51.
- [26] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
- [27] Tailleux A, Torpier G, Caron B, et al. Immunological properties of apoB-containing lipoprotein particles in human atherosclerotic arteries. *J Lipid Res* 1993;34:719–28.
- [28] Gan KL, Smolen A, Eckerson HW, La Du BN. Protein purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos* 1991;19:100–6.
- [29] Sakamoto J, Kimura H, Moriyama S, et al. Activation of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) subtypes by pioglitazone. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;278:704–11.
- [30] 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.
- [31] Garvey WT, Kwon S, Zheng D, et al. Effects of insulin resistance and type 2 diabetes on lipoprotein subclass particle size and concentration determined by nuclear magnetic resonance. *Diabetes* 2003;52:453–64.
- [32] Pietzsch J, Julius U, Nitzsche S, Hanefeld M. In vivo evidence for increased apolipoprotein A-I catabolism in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetes* 1998;47:1928–34.
- [33] Deeg MA, Tan MH. Pioglitazone vs rosiglitazone: effects on lipids, lipoproteins, and apolipoproteins in head-to-head randomized clinical studies. *PPAR Res* 2008;520:465–2008.
- [34] Kozarsky KF, Donahue MH, Rigotti A, Iqbal SN, Edelman ER, Krieger M. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature* 1997;387:414–7.
- [35] Webb NR, Cai L, Ziemba KS. The fate of HDL particles in vivo after SR-BI-mediated selective lipid uptake. *J Lipid Res* 2002;43:1890–8.