

03088
1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

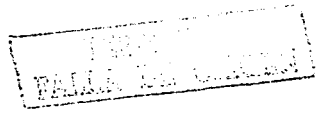
**FACULTAD DE QUÍMICA
DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**IDENTIFICACIÓN DE UNA NUEVA ISOFORMA DE LA PROTEÍNA
TRANSFERIDORA DE ÉSTERES DE COLESTEROL Y EVALUACIÓN
DE LOS NIVELES DE CETP PLASMÁTICA EN POBLACIÓN MEXICANA.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
ANA LUCÍA ALONSO GARCÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO, D.F., 2003





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.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

PAGINACIÓN DISCONTINUA



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Of. No. EMDB/422/2001

BIOL. ANA LUCIA ALONSO GARCIA
Alumna del Doctorado en Biotecnología,
Sede Facultad de Química
P r e s e n t e -

Los miembros del Comité Académico reunido el día 4 de julio del año en curso, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA con la réplica de la tesis "Identificación de una nueva Isoforma de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP); y evaluación de los niveles de CETP plasmática en población mexicana", dirigida por el Dr. Jalme Mas Oliva.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dr. Armando Gómez-Puyou
VOCAL	Dr. Armando Tovar Palacio
VOCAL	Dr. Alejandro Zentella Dehesa
VOCAL	Dr. Gerardo Gamba Ayala
SECRETARIO	Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
SUPLENTE	Dr. Rolando Hernández Muñoz
SUPLENTE	Dr. Rogello Rodríguez Sotres

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 9 de julio de 2001.
LA COORDINADORA DE SEDE

Amelia Farres Gonzalez-Saravia
DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA

C.c.p. Archivo

AFGS*1gg



AGRADECIMIENTOS

Universidad Nacional Autónoma de México

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

A los miembros del jurado:

**Dr. Armando Gómez-Puyou
Dr. Armando Tovar Palacio
Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Dr. Gerardo Gamba Ayala
Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
Dr. Rolando Hernández Muñoz
Dr. Rogelio Rodríguez Sotres**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico el contenido de
este contenido de mi trabajo académico.
NOMBRE: Ana Leticia Sierra
FECHA: 31-01-2003
FIRMA: [Firma]



Gracias...

Por que en todo este tiempo he recibido más de lo que puedo contar.

A todos a aquellos que voluntaria e involuntariamente contribuyeron a la realización de este trabajo...

A quien quiso ser obstrucción y terminó siendo motivación...

A quien quiso ser motivación y terminó siendo compañero, amigo, maestro, colaborador y cómplice...

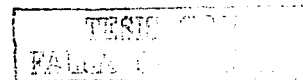
A quien no pretendía ser algo y terminó siendo más de lo que hubiera imaginado...

Al Dr. Jaime Mas Oliva y al Dr. Alejandro Zentella Dehesa, cuyas enseñanzas van más allá de lo académico.

A mi familia por todos los años de apoyo y paciencia.

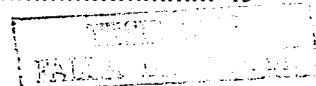
A la incontable cantidad de amigos que encontré en el camino, especialmente a los amigos que no me permitieron capitulaciones: Vicky, Blanca, Juan, Marco, Rocío y Juan Antonio.

Al Sr. Rosas, con todo mi respeto, por el arresto final dado con el ejemplo.

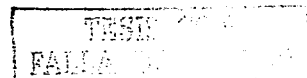


ÍNDICE

<i>Lista de Abreviaturas</i>	VI
<i>Presentación</i>	IX
I. Capítulo I: Identificación de una Nueva Isoforma de CETP	1
I.1 Introducción	2
I.2 Materiales y métodos	
I.2.1 Aislamiento de RNAm, Transcripción Reversa Acoplada a PCR (RT-PCR) y Análisis de Secuencias. ..	7
I.2.2 Pruebas Tipo Northern y Southern	9
I.2.3 Clonación de DNAc de CETP y CETPI, y Obtención de Proteínas Recombinantes	10
I.2.4 Análisis de Epítopes, Diseño de Péptidos Antigénicos y Producción de Anticuerpos	10
I.2.5 Inmunotransferencia Tipo Western	11
I.3 Resultados	
I.3.1 Una Nueva Versión del RNAm de CETP es Expresada en el Intestino Delgado	13
I.3.2 CETPI Carece del Sitio de Unión a Ésteres de Colesterol	18
I.3.3 En el Intestino Delgado se Traducen CETP y CETPI	20
I.3.4 CETPI Está Presente en Plasma Humano y de Conejo	21
I.4 BIBLIOGRAFÍA	25
I.5 ANEXO Expresión de RNAm de Hígado e Intestino Delgado de Conejo, en Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>. ..	29
I.5.1. Introducción	30
I.5.2 Materiales y Métodos	31
I.5.3 Resultados	33
I.5.4 BIBLIOGRAFÍA	37
II. Capítulo II: Sistema Para la Cuantificación de la Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol en Muestras Biológicas y Sintéticas	38
II.1 Introducción	39
II.2 Materiales y métodos	
II.2.1 Obtención de Antígenos Estándar	44
II.2.2 El Anticuerpo IgY Anti-CETP H486-S496	49
II.2.3 Muestras de Plasma	49
II.2.4 Sistema de Detección y Cuantificación de CETP	49

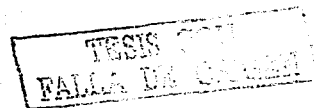


II.3 Resultados	
II.3.1 Ventajas del Diseño del Péptido Sintético CETP H486-S496	51
II.3.2 Propiedades del Anticuerpo IgY Anti-CETP H486-S496	53
II.3.3 Condiciones Óptimas Para la Prueba de ELISA	54
II.4 BIBLIOGRAFÍA	59
II.5 ANEXO	63
III. Capítulo III: Evaluación De Los Niveles De CETP Plasmática En Población Mexicana	75
III.1 Introducción	76
III.2 Materiales y métodos	
III.2.1 Población	83
III.2.2 Reclutamiento de Pacientes	85
III.2.3 Perfil de Lípidos	85
III.2.4 Obesidad	86
III.2.5 Cuantificación de CETP	86
III.2.6 Análisis Estadístico	87
III.3 Resultado	
III.3.1 Población	88
III.3.2 Distribución Muestral	89
III.3.3 Categorías de CETP y Puntos de Corte	91
III.3.4 Interacciones con CETP	91
III.3.5 Observaciones Sobre el Perfil de Lípidos	93
III.4 BIBLIOGRAFÍA	98
III.5 ANEXO	101
IV. Conclusiones y Perspectivas	103
IV.1 Capítulo I	103
IV.2 Capítulo II	103
IV.3 Capítulo III	104

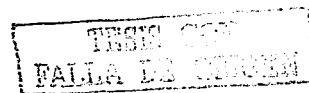


LISTA DE ABREVIATURAS

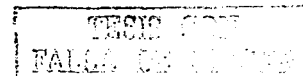
AA	Aminoácidos
ANOVA	Análisis de varianza
Apo A	Apoproteína A
Apo B	Apoproteína B
Apo C	Apoproteína C
Apo E	Apoproteína E
BCA	Ácido bicinconínico (Bicinchoninic acid)
BSA	Albúmina sérica bovina (Bovine serum albumin)
C	Corazón
C/EBP	CCAAT/proteína de unión a enhancer (CCAAT/enhancer-binding protein)
CETP	Proteína transferidora de esteres de colesterol (Cholesterol ester transfer protein)
CETP Δ 16	Proteína transferidora de esteres de colesterol, exón 16 deletado
CETP Δ 9	Proteína transferidora de esteres de colesterol, exón 9 deletado
CETPI	Isoforma de la proteína transferidora de esteres de colesterol, identificada en intestino
CHI	Plasma de gallina
CT	Colesterol total
DEP	Dependiente
dl	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNac	Ácido desoxirribonucleico complementario
DO	Densidad óptica
DS	Densidad óptica
ECV	Enfermedad cardio-vascular
ELISA	Análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
ES	Error estándar
FE	Factores etiológicos
fmol	Femtomo
FR	Factores de riesgo
GAPDH	Gliceraldehído-3-Fosfato deshidrogenasa
GST	Gutation-S transferasa
H	Hígado
HDL	Lipoproteína de alta densidad (High density lipoprotein)
HUM	Plasma humano
IA	Índice aterogénico



ID	Intestino delgado
ID1	Producto de 461pb amplificado con los oligonucleótidos RAB5-RAB6
ID-1	Secuencia de Identificación-1
ID2	Producto de 569pb amplificado con los oligonucleótidos RAB5-RAB6
ID-2	Secuencia de Identificación-2
ID-3	Secuencia de Identificación-3
ID-4	Secuencia de Identificación-4
ID-5	Secuencia de Identificación-5
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia (Intermediate density lipoprotein)
IMC	Índice de masa corporal
INDEP	Independiente
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática
IRMA	Ensayo inmunoradiométrico (Immunoradiometric assay)
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltones
Kg	Kilogramos
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
LCAT	Lecitín colesterol acil transfería (Lecitin cholesterol acil transferase)
LDL	Lipoproteína de baja densidad (Low density lipoprotein)
Log10	Logaritmo base 10
LPL	Lipoproteína lipasa
LPs	Lipoproteínas
m	Metros
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µm	Micrometros
ng	Nanogramos
nl	Nanolitros
nm	Nanometros
nt	Nucleótidos
°C	Grados Celsius
OPD	Cloruro de O-fenilenediamina (O-phenylenediamine dihydrochloride)
pb	Pares de bases



PBS	Buffer salino fosfato
PBST	PBS-Tween 0.1%
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCT	Patent cooperation treaty
PHD	Profile network prediction HeiDelberg
PI	Punto isoelectrico
PLTP	Proteína transferidora de fosfolípidos
PM	Peso molecular
pm	Picomoles
PMSF	Fluoruro fenil metil – sulfonil
QM	Quilomicrones
RAB	Plasma de conejo
RMQ	Remanente de quilomicrones
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
RNA _r	Ácido ribonucleico ribosomal
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa (Reverse transcription coupled to the polymerase chain reaction)
TBS	Tris- amortiguador salino (Tris-buffered saline)
Tg	Triacilgliceroles
T _m	Temperatura de fusión
U	Útero
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
X ²	Ji cuadrada
XEN	Extracto crudo de ovocito de <i>Xenopus laevis</i>



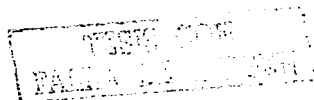
PRESENTACIÓN

Para leer esta tesis....

El presente trabajo se expone en un formato diferente al tradicionalmente usado en las presentaciones de Tesis, esto responde a la necesidad de organizar la información que contiene de manera que facilite su comprensión y seguimiento. Afín a esta intención, el trabajo se distribuye en tres capítulos, establecidos de acuerdo al área de investigación al que están enfocados, Básica, Aplicada y Clínica. En cada uno de ellos se incluye su respectiva **Introducción, Materiales y métodos, Resultados y Bibliografía**, las imágenes se encuentran Intercaladas en los textos, en correspondencia a las descripciones que de ellas se hacen, esto con el fin de facilitar el análisis de la información presentada.

El primer capítulo se refiere a la descripción de una nueva isoforma de CETP, cuyas implicaciones en la homeostasis de lípidos puede ser de gran interés. Las herramientas generadas en éste fueron base para el trabajo aplicado que se presenta en el Capítulo II, en él se describe y valida un sistema de diagnóstico de riesgo de aterosclerosis, basado en la cuantificación de CETP plasmática. Este sistema ya fue registrado y publicado en la Oficina Internacional de Registro de Patentes, y se encuentra en trámite de registro en las oficinas Mexicana, Estadounidense, Canadiense y de la Comunidad Europea. La validación de este sistema como herramienta de diagnóstico nos llevó al desarrollo de un estudio clínico en una población piloto mexicana, el cual se presenta en el Capítulo III. Los resultados incluyen una evaluación clínica de riesgo de aterosclerosis, entre los parámetros considerados se incluyó la concentración de CETP. El resultado de este cometido refrenda la utilidad de la cuantificación de CETP como herramienta útil para la evaluación de riesgo de aterogénesis; al mismo tiempo propone criterios para diagnóstico para este nuevo parámetro y cita por primera vez los valores promedio para la población mexicana.

En la última sección se proponen una serie de proyectos enfocados a la descripción del mensajero de CETPI, a corroborar y esclarecer las implicaciones de su carácter tejido específico, estructura, función y efecto sobre la homeostasis de lípidos. En cuanto a la investigación aplicada, se pretende llevar el escalamiento del sistema de cuantificación en el ámbito de producción industrial en colaboración con la empresa SILANES S.A.. En el área clínica se desea confirmar nuestras observaciones al ampliar en miles los sujetos incluidos en el estudio. También se desea refrendar el método de diagnóstico, actualmente en uso, contra la introducción de CETP entre los parámetros de riesgo de aterosclerosis en nuestra población.

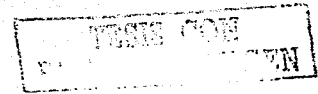


Capítulo I

Identificación de una Nueva Isoforma de CETP¹

Resumen

La proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) se encuentra en el plasma mediando la transferencia de ésteres de colesterol y triacilglicérolos entre lipoproteínas. Los últimos 26 aminoácidos del extremo carboxilo forman una hélice anfipática, cuya región hidrofóbica está directamente involucrada en el mecanismo de transferencia de ésteres de colesterol (Matsunaga *et al*, 1993 y Wang *et al*, 1993). Alteraciones en esta región llevan a la reducción o pérdida de la actividad de transferencia de lípidos (Tall *et al*, 1995). En el primer capítulo de esta tesis describimos una nueva versión del RNA mensajero de CETP de conejo, identificada sólo en el intestino delgado. Dicha isoforma incluye 108 bases del intrón previo al exón 16, a la que llamamos *Secuencia I*². La presencia de un codón de terminación dentro de este intrón evita la traducción del exón 16, substituyendo la secuencia original del carboxilo terminal por una secuencia con estructura al azar. Esta secuencia, con carácter hidrofílico, no contiene la región responsable de la transferencia de lípidos neutros. Anticuerpos dirigidos contra esta proteína, a la que llamamos CETPI, demuestran su presencia tanto en plasma humano como de conejo.



¹Premio "Dr. Jesús Kumate Rodríguez" Mejor trabajo de Investigación. Asociación Mexicana de Biomedicina Molecular. Congreso de Genética y Biomedicina Molecular 2000 Monterrey, N.L.

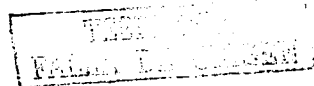
²La secuencia de nucleótidos originada y reportada en esta tesis ha sido depositada en el banco de datos DDBJ, con los números de acceso dbj ABO73620.1 [gi:20330511] y BAB91137.1.

I.1 Introducción

La transferencia de los ésteres de colesterol insoluble entre partículas lipoprotéicas es un paso vital en la homeostasis normal del colesterol. Uno de los pasos en este proceso es la transferencia de ésteres de colesterol por la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP), que es también conocida como proteína transferidora de lípidos I (Day *et al*, 1994). CETP se encuentra en el plasma mediando la transferencia de ésteres de colesterol y triacilgliceroles entre lipoproteínas de alta densidad. Es una proteína multifuncional que promueve el homointercambio de ésteres de colesterol entre lipoproteínas de alta densidad (HDL) y baja densidad (LDL); heterointercambio de ésteres de colesterol y triacilgliceroles entre HDL y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL); transferencia de masa neta de ésteres de colesterol de HDL a LDL y VLDL, y transferencia de masa neta de triacilgliceroles de VLDL a HDL; de esta manera afecta la composición, tamaño y estructura esférica de las HDL (Rye *et al*, 1995)

CETP tiene un papel importante en el desarrollo de enfermedad coronaria arterial. En condiciones normales, los organismos que la expresan tienden a tener altos niveles de LDL y VLDL, asociadas con la progresión de la aterosclerosis (Marotti *et al*, 1993). Por otro lado, especies que carecen de manera normal de CETP tienen resistencia al desarrollo de enfermedad coronaria arterial; sólo cuando se crean transgénicos de estas especies, con el gen de CETP, se observa el decremento en el tamaño y niveles de HDL, tales animales son entonces susceptibles a sufrir enfermedad coronaria arterial inducida por dieta (Rye *et al*, 1995).

En el humano, el peso molecular de la CETP deducido a partir de su DNAC es de 53 kDa, aunque en geles desnaturalizantes la CETP extraída de plasma presenta dos diferentes formas moleculares, 65 y 71 kDa, lo que puede deberse a diferentes grados de glucosilación. La clonación del DNAC del CETP humano revela una secuencia de 476 aminoácidos con un alto contenido de residuos hidrofóbicos esparcidos y cuatro sitios potenciales de glucosilación en los residuos 88, 240, 341 y 396 (Stevenson *et al*, 1993 y Tall, 1995). Tanto la asparagina 88 como la 396 aparentan ser sitios requeridos para la secreción eficiente de CETP. La unión de carbohidratos a la asparagina 88 puede tener influencia en la forma en que se pliega la proteína. La glucosilación variable de la asparagina 341 provoca un doblete en geles de poliacrilamida (formas moleculares de 65 y 71 kDa), tanto para la CETP plasmática como para una CETP recombinante. Esta glucosilación variable puede influir en la transferencia de ésteres de colesterol en el plasma (Stevenson *et al*, 1993). Debido a que las dos formas tienen una actividad diferente, proporciones de estas glicofomas de CETP en estados metabólicos diferentes, pueden provocar cambios en la actividad específica del CETP plasmática y esto, a su vez, puede influir en los niveles de colesterol (Jiang *et al*, 1995).





En los últimos 26 aminoácidos del extremo carboxilo, la CETP presenta un alto contenido de estructura α -hélice anfipática, cuya región hidrofóbica está directamente involucrada en el mecanismo de transferencia de ésteres de colesterol (Matsunaga *et al*, 1993 y Wang *et al*, 1993). Modificaciones en los aminoácidos 470-475 de la CETP humana (490-495, en conejo), llevan a la reducción o pérdida de la actividad de transferencia de lípidos, sin afectar la capacidad de asociación con lipoproteínas (Matsunaga *et al*, 1993; Tall *et al*, 1995 y Wang, *et al*, 1993). Al parecer, los residuos hidrofóbicos en esta región son necesarios para la unión con lípidos neutros y esta unión se incrementa si la lipoproteína tiene carga negativa, por lo que la unión de la CETP a lipoproteínas involucra interacciones hidrofóbicas e iónicas. Un triplete de residuos de lisina, en la posición 376-378 se ha propuesto como el sitio probable de unión a lipoproteínas (Jiang *et al*, 1995; Lagrost, 1994).

CETP es una glucoproteína hidrofóbica, termoestable, con punto isoeléctrico que varía entre 4.6 y 5.4. Se trata de una proteína muy conservada en muchas especies de mamíferos. Los plasmas de humano y de conejo contienen altos niveles de actividad de CETP, mientras que en los plasmas de rata, ratón y cerdo es singularmente menor (Lagrost *et al*, 1994). En conejo, el peso molecular calculado de CETP es de 54.4 kDa y el observado en la proteína plasmática es de entre 68 y 70 kDa. Los 496 aminoácidos de CETP de conejo tienen una homología en secuencia del 81% contra los 476 aminoácidos de la CETP humana; dos terceras partes de estas sustituciones son conservativas; estos datos implican una alta similitud estructural entre la CETP humana y la de conejo (Nagashima *et al*, 1988).

Usando una secuencia parcial de aminoácidos de la CETP purificada, Drayna *et al* (1987) clonaron y secuenciaron el DNAC codificante para CETP de una biblioteca de hígado humano, la que fue empleada para detectar RNAm de CETP en diversos tejidos humanos. Lusic *et al* (1987) usaron esta sonda contra DNA de un panel de células somáticas híbridas humano/ratón para ubicar el gen de CETP en el cromosoma 16. Hibridaciones *in situ* de la misma sonda con cromosomas en metafase regionalizaron el gen a la posición 16q12-21 cerca del locus LCAT (Lecitín Colesterol Acil Transferasa) (Lusic *et al*, 1987; Lagrost, 1994; Tall, 1995). El gen de la CETP es un locus de copia única en el genoma, de alrededor de 25Kb, compuesto por 16 exones que abarcan sólo el 8% del total de la secuencia del gen correspondiendo a 1.9Kb (Agellon *et al*, 1990). El RNAm de CETP de conejo tiene homología de 85% con el humano, y presenta 230pb más que éste, por lo que se estima que contiene 2.2Kb (Nagashima *et al*, 1988).

El hígado es la fuente principal de RNAm de CETP plasmática, aunque el tejido adiposo, músculo esquelético, intestino delgado, glándulas adrenales, bazo y corazón también presentan el RNAm de esta proteína. A pesar de que el hígado posee los niveles más altos del RNAm, es el tejido

adiposo el que probablemente más contribuye a los niveles de CETP plasmáticos, dada su proporción en la masa corporal, comparativamente superior a la del hígado (Tall, 1995; Nagashima *et al*, 1988).

Existe una inducción diferencial en la producción del mensajero de CETP en tejidos periféricos (Oliveira *et al*, 1996), generando un patrón de respuesta, en el que los niveles del RNAm de CETP de algunos tejidos se incrementan en relación inversa a los niveles de HDL en plasma. Estos resultados sugieren una inducción local de la síntesis de CETP, que puede ayudar al reciclaje del colesterol depositado en los tejidos periféricos, durante la lipólisis de las lipoproteínas (Jiang *et al*, 1991; Nagashima *et al*, 1988 y Tall *et al*, 1995). Por otro lado, en trabajos con ratones transgénicos se observó que la expresión intestinal podría indicar un rol en la absorción de colesterol y metabolismo de quilomicrones en animales recién nacidos. La expresión hepática podría coincidir con la inducción de enzimas de la biosíntesis de lípidos y un incremento en la secreción de VLDL, mientras que el aumento de expresión en el bazo puede coincidir con la maduración del sistema inmune. Este descubrimiento hecho por Yang *et al* (1996) sugiere que la expresión del CETP puede estar muy influenciada por los cambios en el desarrollo.

En estudios con dietas altas en colesterol se ha encontrado también un patrón complejo de respuesta, con una inducción diferencial en la producción del RNAm de CETP en tejidos periféricos, que resultan en el incremento equivalente en la actividad de CETP en plasma (Oliveira *et al*, 1996). En general, los niveles de RNAm de CETP en tejidos periféricos se incrementan en respuesta al aumento del colesterol en la dieta (Jiang *et al*, 1991; Lagrost, 1994 y Oliveira *et al*, 1996); sin embargo, en algunos tejidos los niveles del RNAm de CETP se incrementan en relación inversa a los niveles de HDL. Esto último sugiere una inducción local en la síntesis de CETP, que puede ayudar al reciclaje de colesterol depositado en los tejidos periféricos durante la lipólisis de las lipoproteínas (Jiang *et al*, 1991; Nagashima *et al*, 1988 y Tall *et al*, 1995). Este "transporte reverso de colesterol" podría también ser importante en la susceptibilidad o resistencia a la aterosclerosis (Kondo *et al*, 1989). En contraste, los niveles de RNAm de otras enzimas que modifican lipoproteínas, lipasa hepática y lipasa de lipoproteínas, no son afectadas en forma significativa por la dieta rica en colesterol. Estas observaciones sugieren que la expresión del gen del CETP puede estar regulado por factores ambientales como el cambio de la cantidad de colesterol en la dieta (Lagrost, 1994).

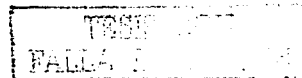
El promotor del gen de CETP tiene una secuencia muy parecida al sitio de unión del factor de transcripción CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP). La expresión del gen de CETP está estrechamente relacionada con el nivel intracelular del C/EBP (Agellon *et al*, 1992). Sperker *et al* (1993), confirmaron que el C/EBP induce la transcripción del gen de CETP. Estos datos sugieren que



el control de su expresión puede constituir una importante fuente de variación de su actividad de transferencia en un número de especies (Lagrost, 1994 y Dessi *et al*, 1997).

No sólo la variación de los niveles de RNAm sino también la alteración de la secuencia de transcripción y los eventos postranscripcionales pueden provocar variaciones en la actividad de la CETP plasmática. Hasta el momento, se han reportado varias mutaciones en el mensajero de CETP, algunas de las cuales derivan en cortes y empalmes alternativos que se reflejan en alteraciones de los niveles de HDL, LDL y VLDL en el plasma. En humanos con deficiencia genética de CETP se reportan niveles de HDL muy por encima de los niveles de sujetos normales y bajos niveles de LDL. Esta deficiencia se asoció con los defectos identificados en el gen del CETP. La primera deficiencia descrita se debe al cambio de una G por una A en la posición +1 del intrón 14 del RNA mensajero de CETP, la cual produce un corte defectuoso que no permite la síntesis de la proteína. Esta deficiencia causa hiperalfalipoproteinemia y los individuos que la presentan parecen tener una menor incidencia de enfermedad coronaria. La sustitución en el intrón 14 presenta una reducción al 50% en los niveles y actividad de transferencia de CETP (Inazu *et al*, 1992; Brown *et al*, 1989 y Lagrost, 1994).

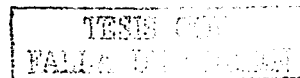
Gotoda *et al* (1993), describen una mutación de una C por una T en el exón 10 del gen del CETP de pacientes japoneses con hiperalfalipoproteinemia. Esta sustitución resulta en el reemplazo del codón 309 CAA normal para la glutamina por un codón terminal TAA prematuro. La CETP producida carece del carboxilo terminal con 168 residuos de aminoácidos y está asociada con el decremento de los niveles de RNAm de CETP (Lagrost, 1994). Sakai *et al* (1996), reportan una mutación debida a un defecto en el corte del intrón 10, lo cual resulta en una carencia del exón 10 en el DNAC del paciente, así como también la inserción de una secuencia de 31 bp en el intrón 13, indicando una alteración en la selección del sitio de corte. La carencia del exón 10 puede tener un efecto en la selección del sitio de corte del intrón 13, activando un aceptor de corte escondido en este intrón. Esta hipótesis está sustentada por estudios que sugieren que la secuencia exónica y la estructura del RNA precursor tiene información esencial, requerida para la selección del sitio de corte preciso. Por lo tanto, la alteración de la estructura secundaria causada por la carencia del exón 10 puede afectar la selección del sitio de corte en los sitios aceptores de los intrones 9 y 13. Sakai *et al* (1996) detectaron una mutación presente en el sitio de corte del intrón 14, que no pudo ser identificada porque sus transcripciones son rápidamente degradadas por las células. Una mutación adicional fue identificada por Takahashi *et al* (1993), en esta hay una sustitución de A por G en el exón 15, la cual induce la sustitución del ácido aspártico 442 por una glicina, produciendo una CETP mutante, con tan solo el 36% de la actividad de la CETP completa. Esta sustitución en el exón 15 presenta un incremento al



triple en los niveles de HDL, una reducción en la masa de CETP (17-26% de lo normal) y en su actividad específica (5-7% de lo normal) (Lagrost, 1994).

Sólo se ha reportado una isoforma de CETP que se expresa a niveles normales de lípidos en plasma, descrita en humano, que carece del exón 9 (CETP Δ 9) y es inactiva en la transferencia de lípidos neutros. Esta isoforma es pobremente secretada, se retiene principalmente en el retículo endoplasmático y forma complejos heterodiméricos intracelulares con la CETP normal, evitando su secreción al medio extracelular, por lo que se considera como un mecanismo de regulación negativa de la forma de CETP completa (Inazu *et al*, 1992 y Quinet *et al*, 1993). Esto también sugiere la inducción local de la síntesis de CETP, que puede ayudar al reciclaje del colesterol depositado en los tejidos periféricos, durante la lipólisis de las lipoproteínas (Jiang *et al*, 1991; Nagashima *et al*, 1988; Tall *et al*, 1995). La abundancia de este mensajero es relativamente alta, representando del 15-35% de todo el RNAm producido en el hígado y en el tejido adiposo, y del 35-65% del producido en el bazo. La diferencia entre la CETP completa y la del exón 9 deletado es de 14Kb, siendo consistente con los 60 aminoácidos que conforman este exón; además, existe un incremento global en el índice de hidropatía en comparación con el de la CETP completa, debido a un cambio conformacional (Inazu *et al*, 1992).

En la presente tesis reportamos el hallazgo de una forma alterna de CETP, no descrita hasta ahora, a la que llamamos CETPI. Durante el estudio de la expresión de CETP en tejidos periféricos de conejo, detectamos esta nueva isoforma CETPI, sólo en el intestino delgado de conejos normolipidémicos. El mensajero de CETPI incluye 108 bases del intrón previo al exón 16. La presencia de un codón de terminación dentro de este intrón omite la traducción del exón 16, lo que lleva a la sustitución de los últimos 24 aminoácidos del carboxilo terminal por 18 aminoácidos codificados por el intrón. Este cambio en la estructura primaria implica la sustitución de la estructura de α -hélice anfipática original (Drayna *et al*, 1987), por una estructura al azar, hidrofílica y rica en prolinas. En esta tesis se demuestra la presencia de esta nueva isoforma de CETP, la CETPI, tanto en plasma humano como de conejo normolipidémicos.



I.2 Materiales y métodos

I.2.1 AISLAMIENTO DE RNAm, TRANSCRIPCIÓN REVERSA ACOPLADA A PCR (RT-PCR) y ANÁLISIS DE SECUENCIAS

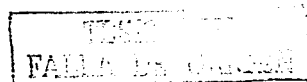
Se extrajo RNA total de hígado, bazo, corazón, intestino delgado, tejido adiposo y útero, obtenidos de tres conejos, hembras, blancos Nueva Zelanda, con niveles normales de lípidos en plasma. Se aisló la fracción de RNA poli(A⁺) de todos los tejidos por cromatografía en oligo(dt)-celulosa. La extracción se hizo por el método descrito por Sumikawa et al (1989). Se sintetizó DNAc utilizando el sistema comercial para RT-PCR (Perkin-Elmer, Branchburg, NJ, USA), a partir de 100ng de RNAm de hígado y 400ng de RNAm de los demás tejidos. También se sintetizó DNAc a partir de 3µg de RNA total de hígado y 7µg de RNA total de intestino delgado. En amplificaciones por PCR y reacciones de secuencia se utilizaron oligonucleótidos diseñados con el programa Mac Vector (Genetic Computer Group, Madison, WI, USA), con base en la secuencia de DNAc de CETP de conejo, publicada por Nagashima *et al* (1988) (Tabla 1 y Fig. 1). También se diseñaron oligonucleótidos, para reacciones control, con base a la secuencia de GAPDH de conejo, reportada por Appletquis *et al* (1995) (Tabla 1). Las reacciones de amplificación por PCR se hicieron con "HOT START" de 1 min. a 82°C, a 35 ciclos y con Tm. de 55°C, para todos los pares de oligonucleótidos.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y de secuenciación. De RAB1 a RAB6 diseñados sobre la secuencia de CETP de conejo (Nagashima *et al*, 1988). Los oligonucleótidos GA3PF y GA3PR se diseñaron con base a la secuencia de GAPDH de conejo (Appletquis *et al*, 1995).

DNAc	OLIGONUCLEÓTIPO	POSICIÓN	SECUENCIA
CETP	RAB1 SENTIDO	293-317	5' TGAACTACAGCTACACGAGTGCCTG 3'
CETP	RAB2 ANTISENTIDO	718-697	5' TGTGCGTGAAGTGACCCTTGTG 3'
CETP	RAB3 SENTIDO	575-597	5' CCAACATCATGGCTGACTTTGTC 3'
CETP	RAB4 ANTISENTIDO	1462-1443	5' GTGCTTGGGAAAACCGAAG 3'
CETP	RAB5 SENTIDO	1391-1414	5' TCATCAACCCCGAGATTATCACTC 3'
CETP	RAB6 ANTISENTIDO	1852-1828	5' TCGTTTACTTGAGAGGCAGAGAGAG 3'
GAPDH	GA3PF SENTIDO	79-104	5' TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTGG 3'
GAPDH	GA3PR ANTISENTIDO	1061-1040	5' GGTGGACCTCATGGCCACATG 3'

1	gcctgtccca	aaggcgccctc	ctacgagget	ggcatcgtgt	gtcgcacac	caagcccgc	
61	ctcttggtgt	tgaaccaaga	gacggccaag	gtggtccaga	cgccctcca	gcgcgcggc	
121	tatccggacg	tcagcggcga	gagggccgtg	atgctcctcg	gccgggtcaa	gtacgggctg	
181	cacaacctcc	agatcagcca	cctgtccatc	gccagcagcc	aggtggagct	ggtggacgcc	
241	aagaccatcg	acgtcgccat	ccagaacgtg	tccgtggtct	tcaaggggac	cctgaactac	RAB1
301	agctacacga	gtgcctgggg	gttgggcac	aatcagctcg	tcgactcga	gatcgactct	
361	gccattgacc	tccagatcaa	cacagagctg	acctgcgacg	ctggcagtg	gcgcaccaat	
421	gcccccgact	gctacctggc	tttcataaa	ctgctcctgc	acctccaggg	ggagcgcgag	
481	ccgggggtggc	tcaagcagct	cttcacaaac	tcatctcct	tcaccctgaa	gctgattctg	
541	aagcgacag	tctgcaatga	gatcaacacc	atctccaaca	tcatggctga	ctttgtccag	RAB3
601	acgagggccg	ccagcatcct	ctcagatgga	gacatcgggg	tggacatttc	cgtagcgggg	
661	gccccgtca	tcacagccac	ctacctggag	tcccatcaca	agggtcactt	caagcacaag	RAB2
721	aacgtctccg	aggccttccc	cctccgcgcc	ttcccgcccg	gtcttctggg	ggactccccg	
781	atgctctact	tctggttctc	cgatcaagtg	ctcaactccc	tggccagggc	cgcttccag	
841	gagggccgctc	tctgctcag	cctgacaggg	gatgagttca	agaaagtgct	ggagaccag	
901	ggtttcgaca	ccaaccagga	aatcttccag	gagctttcca	gaggccttc	caccggccag	
961	gcccaggtag	ccgtccaactg	ccttaagggtg	cccaagatct	cctgccagaa	ccgggggtg	
1021	gtggtgtctt	cttccgtcgc	cgtagcgttc	cgcttcccc	gcccagatgg	ccgagaagct	
1081	gtggcctaca	ggtttgagga	ggatatcatc	accaaccgtcc	agcctcta	ctcccagaaa	
1141	aagctcttcc	tacacctctt	ggatttccag	tgctgcccgg	accgcggaag	ggcaggcagc	
1201	tcagcaaatc	tctccgtggc	cctcaggact	gaggctaagg	ctgtttccaa	cctgactgag	
1261	agccgctccg	agtccttcca	gagctctctc	cgctcctga	tcgccacggg	gggcatcccg	
1321	gaggtcatgt	ctcggctcga	ggtggcgttc	acagcctca	tgaacagcaa	aggcctggac	
1381	ctcttcgaaa	tcatacaacc	cgagattatc	actctcgatg	gctgcctgct	gctgcagatg	RAB5
1441	gacttcgggtt	ttcccagca	cctgctgggtg	gatttctctc	agagcctgag	ctagcaggga	RAB4
1501	gctggagaca	caagacacgc	tgacgtctcc	gcccacggg	gtggagggtca	gggagtggtt	
1561	cgaggacgg	gcgatggctc	ccaactcctt	ctgtcctgaa	gacccttagc	atgaaagcag	
1621	catacctgg	gcaggcatct	ggctgagcgg	ctaagccact	ggtcaggaca	cctgctgcta	
1681	gggtgctccg	gatcccagct	gcctgctaac	gtgcaccctg	gggagcagcc	gtgctggctc	
1741	ccgccagcca	catcggagac	ccagactgag	gtcctggctc	ctggcttag	cctgccagct	
1801	gagtgccagc	taaactctctc	tggctgtctc	tctctgctc	tcaagtaaac	gaatatctca	RAB6
1861	aaaacaagag						

Figura 1. Posición de los oligonucleótidos diseñados sobre la secuencia de RNAm de CERP de conejo, publicada por Nagashima *et al* en 1988. Se muestran en rojo los oligonucleótidos sentido y en azul los oligonucleótidos antisentido.

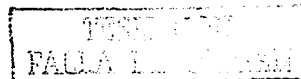


Se secuenciaron los productos de PCR amplificados con los pares de oligonucleótidos RAB1-RAB2, RAB3-RAB4, RAB5-RAB6 y GA3PF-GA3PR, tanto de hígado como de intestino delgado. En las reacciones de secuencia se utilizaron como cebadores los oligonucleótidos RAB3, RAB4, RAB5, RAB6, GA3PF y GA3PR, empleando los sistemas comerciales Secuense Version 2-0 (Amersham, Cleveland, OH, USA); AmpliTaq DNA polymerase (AmpCycle Sequencing Kit, Perkin Elmer, Branchburg, NJ, USA) y dsDNA Cycle Sequencing System (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA). Las secuencias de los productos de PCR fueron alineadas con las secuencias depositadas en los bancos de datos GeneBank, EMBL, DDBJ, PDB, y NCBI BLAST con lo que confirmó su identidad como mensajeros de CETP.

1.2.2 PRUEBAS TIPO NORTHERN Y SOUTHERN

Las identidades de los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos RAB5-RAB6 se verificaron con hibridaciones tipo Southern, utilizando como sonda el producto amplificado con RAB3-RAB4 (888pb) a partir de RNAm de hígado y, como sonda interna, el oligonucleótido RAB4. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% y transferidos a membranas de NYLON (HYBOND-N+, Amersham, U.K.). Las hibridaciones con la sonda RAB3-RAB4 de CETP se realizaron a 42°C con SDS 0.1% y formamida al 50%, las condiciones de lavado fueron SSC 0.5X / SDS 0.1% / 65°C / 30 min., posteriormente, se expusieron en placas autoradiográficas X-OMAT, (Kodak, Rochester, NY, USA). El marcaje de la sonda se hizo con α -dCTP-[³²P] usando Random Primer DNA Labeling Kit (Boehringer, Mannheim, Germany). Las membranas que se hibridaron con la sonda interna RAB4 (19 nt) a 37°C, se lavaron a 58°C con SSC 6X-SSC 2X y posteriormente se expusieron en placas autoradiográficas X-OMAT, (Kodak, Rochester, NY, USA). El marcaje radioactivo del oligonucleótido RAB4, se hizo con δ -ATP-[³²P] usando Pharmacia Biothec Oligolabelling Kit (Uppsala, Sweden).

Para las hibridaciones tipo Northern, se verificó la integridad de las muestras de RNA total por electroforesis en geles desnaturizantes de agarosa al 1% (formaldehído 16.5%). En geles gemelos se corrieron 100µg de RNA total de hígado y 100µg de RNA total de intestino delgado, y se transfirieron a membranas de NYLON (HYBOND-N, Amersham, U.K.). Se utilizó como sonda contra CETP el producto de PCR amplificado con el juego de oligonucleótidos RAB5-RAB6 (461pb) y, como sonda contra GAPDH (985pb), el producto amplificado con el juego GA3PF-GA3PR (Tabla 1), ambos obtenidos a partir de RNAm de hígado. El marcaje de las sondas se hizo con α -dCTP-[³²P] usando Random Primer DNA Labeling Kit (Boehringer, Mannheim, Germany). Las membranas fueron hibridadas simultáneamente con las sondas RAB5-RAB6 y GA3PF-GA3PR a 55°C con 1% SDS y formamida al 35%, los lavados se hicieron con SSPE 0.2X / SDS 0.1% / 42°C / 15 min.



Posteriormente, se expusieron en una pantalla para análisis en Phosphorimager screen (Storm System, Pharmacia Molecular Dynamics, Uppsala, Sweden). Las señales en esta pantalla fueron cuantificadas con ayuda del programa Image QuaNT (Molecular Dynamics, Uppsala, Sweden).

1.2.3 CLONACIÓN DE DNAc DE CETP Y CETPI, Y OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Los productos de PCR, generados con los oligonucleótidos RAB5-RAB6, fueron clonados en el vector pMosBlue T (Amersham, U.K), llamadas pMos Blue/CETP³ y pMos Blue/CETPI³. Posteriormente, fueron recuperados y subclonados en el vector de expresión pGex-2T (Pharmacia LKB Biothec, Uppsala, Sweden), generando dos plásmidos recombinantes a los que llamamos pGex-2T/CETP³ y pGex-2T/CETPI³. Estos plásmidos se transformaron en bacterias de la cepa *Escherichia coli* DH5 α , para la obtención de proteínas recombinantes, fusionadas a Gutation-S Transferasa (GST). Las bacterias transformadas se cultivaron durante 8 hrs. a 37°C, en 500ml de Super Luria Broth, con 50 μ g/ml de ampicilina. La inducción de los cultivos se hizo con 0.4mM de IPTG durante tres horas. Las bacterias transformadas fueron suspendidas en PBS / EDTA 50mM / Aprotinina 1% / PMSF 1mM / Benzamidina 5mM / Leupeptina 10 μ g/ml y, posteriormente, lisadas con 4 ciclos de 10" en sonicador por 30" en hielo. Los lisados fueron aplicados a columnas de glutation agarosa (Sigma, St. Louis, MO, USA) (Smith DB y Corcoran LM, 1995). De esta manera, se obtuvieron las proteínas recombinantes GST/CETPCOH³ y GST/CETPICOH, parcialmente purificadas.

1.2.4 ANÁLISIS DE EPITOPES, DISEÑO DE PÉPTIDOS ANTIGÉNICOS Y PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS

Las secuencias de los productos de PCR amplificados con el juego de oligonucleótidos RAB5-RAB6, a partir de RNAm de intestino delgado e hígado, fueron traducidas a secuencias de aminoácidos y analizadas con ayuda del programa DNASTar (Lasergene, Madison, WI, USA), del cual se obtuvo la predicción del índice de hidrofobicidad Kyte-Doolittle y la estructura secundaria con los algoritmos Chou-Fasman y Gamier-Robson. Los resultados de estos análisis se confirmaron por PHD (Profile network prediction HeiDelberg). Con base en esta información se diseñaron dos péptidos sintéticos que corresponden a los extremos carboxilo de CETP y CETPI. Estos fueron sintetizados en PeptidoGenic Research (Livermore, CA, USA). Estos péptidos incluyen un residuo adicional de cisteína en el extremo amino, para dirigir su acoplamiento a KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin).

Los péptidos acoplados a KLH se utilizaron para la producción de anticuerpos (IgY anti-CETP e IgY anti-CETPI) en gallina, usando un protocolo estándar de 63 días. El título de los anticuerpos en el plasma se determinó por técnica de ELISA. Las IgYs se aislaron de 12 huevos. Tanto el acoplamiento

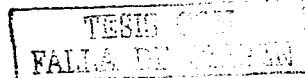
de los péptidos, como la producción de anticuerpos y la titulación por ELISA de la primera muestra de plasma se realizó por ADI (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, USA). Por otro lado, se obtuvieron anticuerpos anti-BSA (contra albúmina serica bovina) en gallinas blancas de la línea LEGOHRN, inoculando por vía subcutánea una vez a la semana. Los inóculos constaron de 200µg BSA/200µl PBS + 200µl de adjuvante completo de Freund (Sigma Immuno Chemicals, St. Louis, MO, USA) en la primera aplicación, y 200µg BSA/150µl PBS + 150µl de adjuvante incompleto de Freund (Sigma Immuno Chemicals, St. Louis, MO, USA) en tres aplicaciones subsecuentes. Antes de cada aplicación se tomó una muestra de sangre de 4ml, de cada muestra se separó el plasma y se titularon los anticuerpos por técnica de ELISA.

Las pruebas de reacción cruzada de los tres anticuerpos (IgY anti-CETP, IgY anti-CETPI y anti-BSA), se hicieron por técnicas de ELISA e inmunotransferencia tipo Western, contra los péptidos sintéticos libres y BSA, péptidos sintéticos acoplados a BSA, recombinantes fusionados a GST y plasma total de gallina.

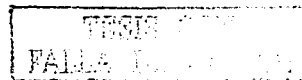
1.2.5 INMUNOTRANFERENCIA TIPO WESTERN

Se estandarizaron las condiciones para el uso de los anticuerpos IgY anti-CETP, IgY anti-CETPI y anti-BSA en pruebas de inmunotransferencia tipo Western. Estas pruebas se hicieron contra extractos crudos y depletados de lípidos, de hígado e intestino delgado, así como contra plasma total humano y de conejo. Los órganos empleados en estas pruebas fueron previamente perfundidos con buffer Ringer-Krebs pH 7.4. La preparación de extractos crudos se hizo con 0.5gr. de tejidos, homogenizados en 5ml buffer de suspensión (NaCl 100mM, Tris-HCl 10mM pH 7.6, EDTA 1mM pH 8, Aprotinina 1µg/ml y PMSF 100µg/ml). Los extractos crudos fueron depletados de lípidos con extracciones con acetona al 60%. La cuantificación de proteínas en extractos se hizo por el método de BCA (PIERCE, Rockford, IL, USA), y en muestras de plasma total por el método de Folin-Lowry (Lowry *et al*, 1951).

Los extractos crudos de hígado (20µg de proteína) y de intestino delgado (30µg de proteína), así como las muestras de plasma (40 µg de proteína) y BSA (3µg control positivo anti-BSA y 40µg control negativo anti-CETP y anti-CETPI), se sometieron a electroforésis en geles de 12.5% acrilamida-SDS. Este material se electrotransfirió a membranas de nitrocelulosa de 0.45µm (Trans-Blot Transfer Medium, BIO-RAD, Hercules, CA, USA), para pruebas de inmunotransferencia tipo Western con los anticuerpos ya mencionados. En el caso de las muestras de tejido se utilizó anti-CETP en diluciones 1:5,000 y anti-CETPI 1:30,000. En las muestras de plasma y controles negativos con BSA se utilizó anti-CETP 1:5,000 y anti-CETPI 1:15,000. Para el control positivo con BSA se usó anti-BSA 1:25,000.



En todos los casos se usó como anticuerpo secundario Anti-Chiken IgG, (H+L) conjugado a peroxidasa (PIERCE, Rockford, IL, USA) 1:10,000. Tanto los bloqueos como las incubaciones se hicieron con una suspensión de leche descremada en polvo al 2.5% en TBS-Tween 0.1%, a 37°C, 1hr. La visualización se hizo con SuperSignal Substrate (PIERCE, Rockford, IL, USA) en placas autoradiográficas X-OMAT, (Kodak, Rochester, NY, USA).



I.3 Resultados

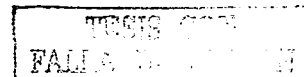
I.3.1 UNA NUEVA VERSIÓN DEL RNAm DE CETP ES EXPRESADA EN EL INTESTINO DELGADO

Mediante amplificaciones por RT-PCR, a partir de RNAm extraído de hígado, bazo, corazón, intestino delgado, tejido adiposo y útero, se obtuvieron los productos que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 1. (—) No hubo amplificación.

OLIGONUCLEÓTIDOS	HÍGADO (pb)	BAZO (pb)	CORAZÓN (pb)	I. DELGADO (pb)	T. ADIPOSO (pb)	ÚTERO (pb)
RAB1 – RAB2	462	---	462	462	462	462
RAB3 – RAB4	888	---	888	888	---	---
RAB5 – RAB6	461	---	461	461, 569	---	---
GA3PF - GA3PR	990	990	990	990	990	990

No se detectaron amplificaciones a partir de 300ng RNAm de bazo, muy probablemente, debido a que los niveles de RNAm de CETP en estos tejidos, están por debajo de la capacidad de detección de la metodología utilizada. Los fragmentos de 462, 888 y 461pb, que se obtuvieron a partir del resto de las muestras, corresponden a los tamaños esperados para el mensajero de CETP con los juegos de oligonucleótidos RAB1-RAB2, RAB3-RAB4 y RAB5-RAB6, respectivamente. Algunas de estas amplificaciones se muestran en la Figura 2A. Como puede observarse en esta figura, aparentemente no hay amplificación a partir del mensajero de útero y el mensajero de intestino delgado solo da señal con el juego RAB1-RAB2. Sin embargo, en la Figura 2B muestra una hibridación tipo Southern de este material utilizando la sonda RAB3-RAB4. Puede observarse que si hay amplificación con el juego de oligonucleótidos RAB1-RAB2, tanto en intestino delgado como en útero, y con el juego de oligonucleótidos RAB3-RAB4 para intestino delgado. Estos productos fueron secuenciados con lo que se determinó que corresponden a CETP con un 97% de identidad; cabe señalar que el 3% de diferencia se encuentra en la región no codificante del mensajero, de acuerdo con la secuencia reportada por Nagashima *et al*, (1988).



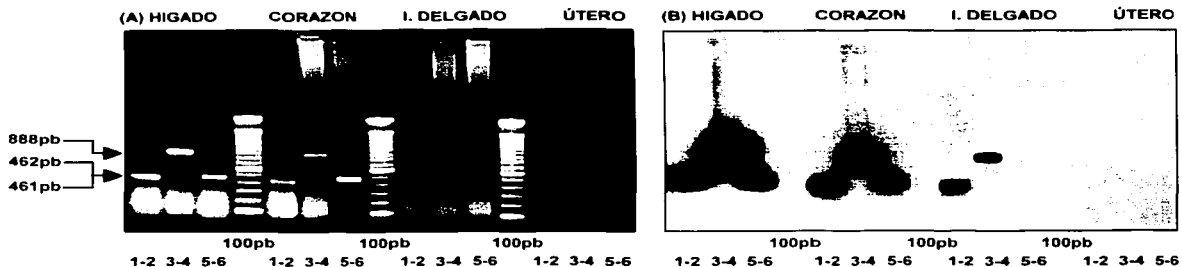


Figura 2. A) Productos de PCR amplificados con los juegos de oligonucleótidos RAB1-RAB2, RAB3-RAB4 y RAB5-RAB6. B) Hibridación tipo Southern, utilizando la sonda RAB3-RAB4. Los productos amplificados con el juego RAB1-RAB2 y RAB3-RAB4 corresponden al tamaño esperado. La amplificación con RAB5-RAB6 no alcanza niveles de detección para intestino delgado y útero.

Al no observarse amplificación en todos los tejidos con 300ng de RNAm, se repitieron las amplificaciones utilizando 400ng de RNAm de todos los tejidos; en la Figura 3 se presentan cuatro de estas amplificaciones. Puede observarse que la amplificación con los oligonucleótidos RAB5-RAB6, a partir de RNAm de hígado y corazón, genera un producto de 461pb al que denominamos ID1; este corresponde al tamaño esperado para la secuencia del DNAc de CETP de conejo reportada (Nagashima *et al*, 1988). En cambio, la RT-PCR, a partir de RNAm de intestino delgado, genera el producto ID1 y un segundo producto de alrededor de 570pb, al que denominamos ID2 (Fig. 3A). Por medio de hibridaciones tipo Southern, se comprobó que ambos productos amplificados corresponden al DNAc de CETP; este resultado se muestra en la Figura 3B.

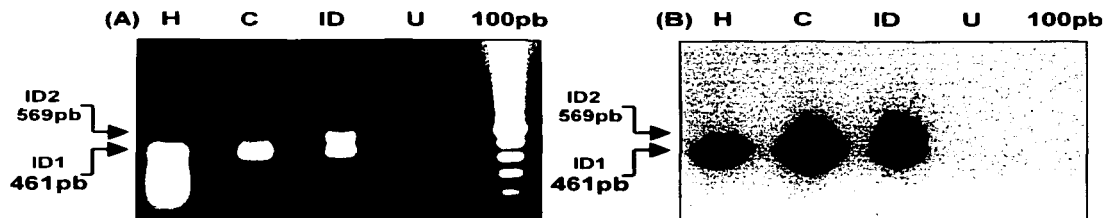
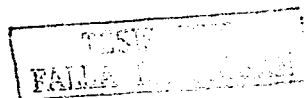


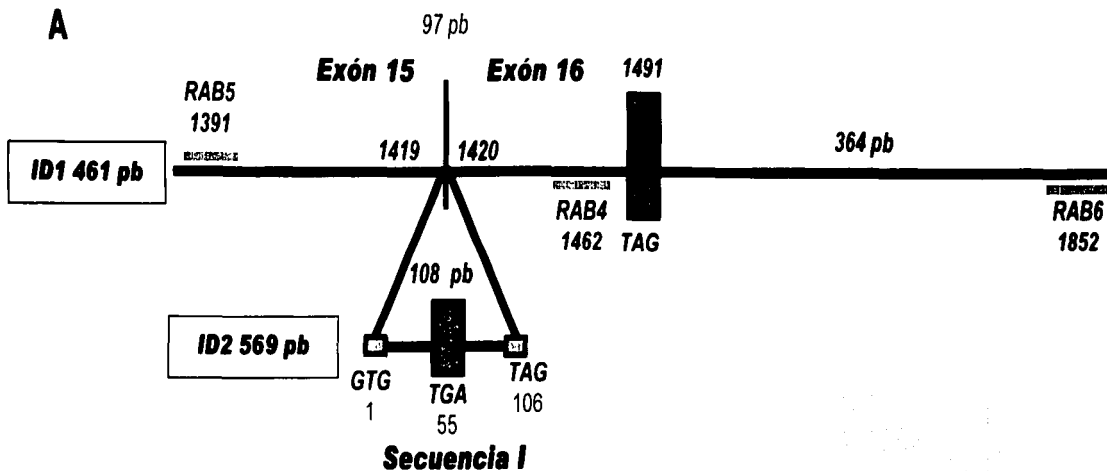
Figura 3. Fragmentos ID1 e ID2 de CETP, obtenidos a partir de RNAm de hígado (H), corazón (C), intestino delgado (ID) y útero (U). A) Gel de agarosa, productos amplificados por PCR con los oligonucleótidos RAB5-RAB6. B) Autoradiografía de la hibridación tipo Southern empleando la sonda RAB3-RAB4.

El análisis de las secuencias de los productos ID1 e ID2 con ayuda del programa DNASTar, demuestra que ambos se amplificaron a partir de mensajeros de CETP. La secuencia de nucleótidos del fragmento ID1 abarca de la base 1391, en el extremo 3' del exón 15, hasta la base 1852, en la región no codificante del exón 16. La secuencia del producto ID1 presenta una identidad del 100% con la región codificante del DNAc de CETP de conejo (Nagashima *et al*, 1988) y una identidad del 87% con la secuencia de la CETP humana (Agellon *et al*, 1990). La secuencia del producto ID2 es similar a la del ID1, sin embargo, incluye una sección de 108pb entre los exones 15 y 16 (Fig. 4).

Con base en este análisis de la secuencia de nucleótidos, construimos una representación esquemática de los productos ID1 e ID2, que mostramos en la Figura 4A. En esta representación ambos productos tienen identidad del 100%, pero ID2 incluye una sección de 108pb entre los nucleótidos 1419 y 1420, límite entre los exones 15 y 16, a la que llamamos *Secuencia I*. En la Figura 4B mostramos parte de la secuencia del producto ID2, desde el nucleótido 1391 en el exón 15 hasta el nucleótido 1449 en el exón 16 (la *Secuencia I* se muestra en mayúsculas). En la Figura 4A se señala el codón de terminación en la posición 1491, reportado para el mensajero de CETP de conejo (Nagashima *et al*, 1988), anterior a éste, se localiza la secuencia del oligonucleótido RAB4. Se localizaron otros dos codones de terminación, dentro de la *Secuencia I*, uno en la posición 55 y otro en su extremo 3', posición 106 (Fig. 4A y 4B).

Por lo anterior, sospechamos que el producto ID2 podría amplificarse a partir de RNAm no editado contaminante en la muestra de intestino delgado. Para descartar esta posibilidad, se repitió la amplificación utilizando un exceso de RNA total de hígado e intestino delgado. Si ID2 es un producto de RT-PCR, obtenido a partir de RNAm no editado, ID2 debería obtenerse en ambos tejidos. Lo anterior, considerando que el RNA total incluye a las poblaciones de RNA mensajeros editados y no editados. Los resultados de RT-PCR a partir de un exceso de RNA total fueron exactamente los mismos, es decir, el producto ID1 se obtiene a partir de las muestras de ambos tejidos, pero el producto ID2 solo pudo ser obtenido a partir de la muestra de intestino delgado. Concluimos, según nuestros resultados, que en el intestino delgado se expresa una variante del RNAm de CETP.





B

Exón 15

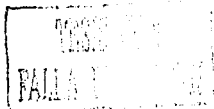
1419

Secuencia I

atc aac ccc gag att atc act ctc gat GTG AGT GCA AAG CCC CTG TCG GCC CGT TCT CCG GGA GGG
 CGG CCC CTG TCT CCA TGA GAC TGG CAA ACT GGC AGC CGA CCC AGC CTG CCC TTC TCG CCC
 TTG ACC TAG ggc tgc ctg ctg ctg cag atg gac ttc ggt
 106 1420 55

Exón 16

Figura 4. Representación esquemática de ID1 e ID2 mostrando la ubicación de la *Secuencia I* y de los codones de terminación. A) La secuencia de ID1 es idéntica a la secuencia de CETP de conejo. ID2 es homólogo a ID1 pero incluye a la *Secuencia I* de 108pb entre los nucleótidos 1419 y 1420, límite entre los exones 15 y 16 de CETP. B) Dentro de la *Secuencia I* (mayúsculas) se localizan dos codones de paro (subrayados), uno en posición 55 (TGA) y otro en su extremo 3', posición 106 (TAG). El codón de terminación en la posición 55 evita la traducción del exón 16.



Para tratar de establecer el peso aproximado de esta variante del mensajero de CETP se hicieron hibridaciones tipo Northern. En la Figura 5A se muestra el resultado de la hibridación con la sonda control GA3PF -GA3PR. En los carriles 1 y 2 (RNA total de hígado e intestino delgado, respectivamente), se observa una banda de alrededor de 1.3Kb, correspondiente al tamaño del RNAm de GAPDH de conejo. Puede usarse como referencia la movilidad relativa, en el gel de agarosa-formaldehído, de los RNAr 18s (1.7Kb) y 28s (4.7Kb), señalados en la Figura 5A. En la Figura 5B se muestra el resultado de la hibridación con la sonda RAB5-RAB6. En el carril 3 (RNA total de hígado) se observan una banda de alrededor de 2.2Kb, tamaño aproximado del mensajero de CETP de conejo. En el carril 4 (RNA total de intestino delgado), se observan esta misma banda, sin embargo no se encontró una segunda banda que pudiera corresponder al transcrito de ID2. Consideramos que la diferencia en tamaño esperada para el RNAm de CETP (de 2.3Kb) con respecto al RNAm de CETP (de 2.2Kb) no se pudo apreciar en el gel de agarosa al 1%.

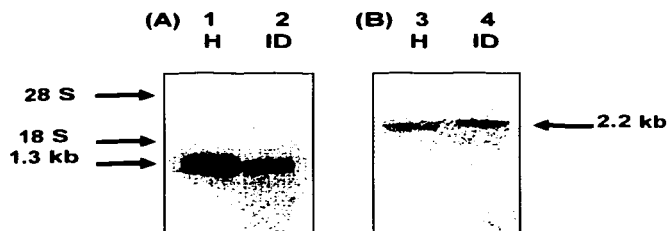
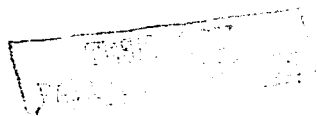


Figura 5. Hibridación tipo Northern con 100 μ g de RNA total de hígado (H) y 100 μ g de RNA total de intestino delgado (ID). A) Hibridación utilizando la sonda control GA3PF-GA3PR, se observa en ambos tejidos la banda correspondiente al mensajero de GAPDH de 1.3Kb. B) Hibridación usando la sonda RAB5-RAB6 contra CETP, puede apreciarse solo una banda de 2.2Kb en ambos tejidos, correspondiente el mensajero de CETP.

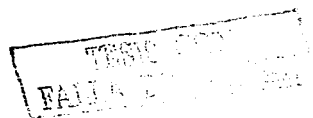
De acuerdo con la traducción de la secuencia de nucleótidos a secuencia de aminoácidos, ID1 corresponde a la versión ya reportada de CETP en conejo y puede traducirse en la proteína activa que se libera al plasma. En cambio, el RNAm de ID2 corresponde a una versión del mensajero de CETP no reportada hasta este momento, que se expresa en el intestino delgado de conejo. Como se verá más adelante, esta nueva versión del mensajero de CETP se traduce en una isoforma, desconocida hasta ahora, a la que denominamos CETP1.



L3.2 CETPI CARECE DEL SITIO DE UNIÓN A ÉSTERES DE COLESTEROL

En la Figura 6A se muestra una comparación de la secuencia de aminoácidos, de los extremos carboxilo de CETP y CETPI, traducidas de las secuencias nucleotídicas de los productos de RT-PCR ID1 e ID2. La traducción del RNAm de CETP se detiene hasta el codón de terminación en la posición 1491, mientras que el mensajero de CETPI puede detenerse en el codón 55 de la *Secuencia 1*, evitando de esta manera que se traduzca todo el exón 16. De acuerdo con esto, ambas secuencias son iguales hasta el residuo D472, último aminoácido codificado por el exón 15. A partir de este punto, la estructura primaria del extremo carboxilo de CETPI no tiene homología con la del extremo carboxilo de CETP. Estas diferencias en estructura primaria puede relacionarse con diferencias en sus propiedades, tales como el punto isoeléctrico, el peso molecular, la hidrofobicidad y la estructura secundaria (Fig. 6) (Bolaños-García *et al*, 1997).

La secuencia del extremo carboxilo de CETP en la Figura 6A, muestran en cursivas los residuos *F481*, *L488*, *F491* y *L495*, que por mutagénesis dirigida se ha demostrado que son importantes para mantener la actividad de transferencia de los ésteres de colesterol (Tall *et al*, 1995). Como puede observarse en el extremo carboxilo de CETPI, los últimos 24 aminoácidos de la forma original de CETP, incluyendo estos residuos, se substituyen por 18 aminoácidos codificados por la *Secuencia 1*. Según Matsunaga *et al* (1993) y Wang *et al* (1993), los últimos 26 aminoácidos del carboxilo terminal de CETP tienen un alto contenido de estructura alfa hélice anfipática y del residuo H486 al S496 se encuentra el motivo de unión al éster de colesterol. Nuestra predicción de estructuras secundarias, obtenida empleando los algoritmos Garnier-Robson, Chou-Fasman y PHD (Fig. 6B), concuerdan con estos reportes y sugieren fuertemente que CETPI no conserva dicha α -hélice anfipática, en su lugar, la estructura primaria de CETPI podría adquirir una estructura al azar, hidrofílica y rica en prolinas. Todo lo anterior, nos indica que CETPI carece del sitio de unión a ésteres de colesterol.

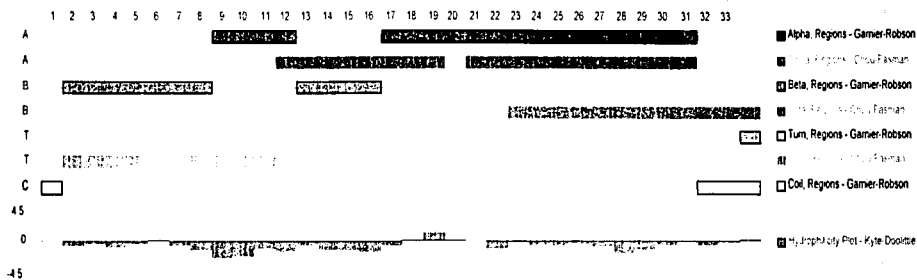


A

	SECUENCIA DE CARBOXILOS	ESTRUCTURA (Predicción)	PM (Daltons)	PI	PÉPTIDO
CETP 33AA	INPEIITLDGCLLLQMDFGFPKHL <u>LVDFLOSL</u> 472	ALFA HÉLICE	3731.10	3.99	SOLUBLE A pH 9.5
CETPI 27AA	INPEIITLDVSA KPLSA <u>RSPGGRPLSP</u> 472	AZAR	2785.60	9.00	SOLUBLE A pH 7.0

B

CETP



CETPI

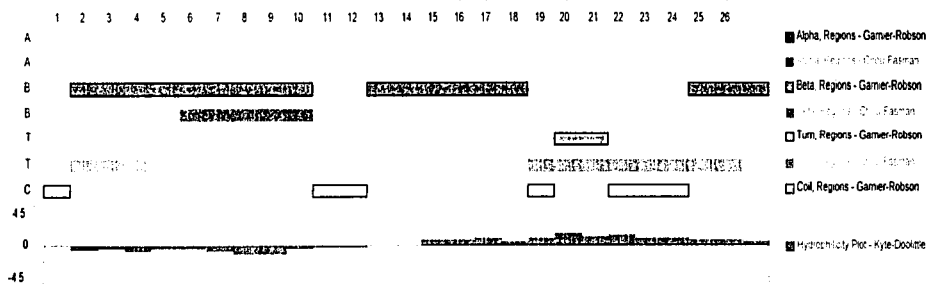


Figura 6. Comparación entre las secuencias de aminoácidos de CETP y CETPI. A) Secuencia de aminoácidos de los carboxilos terminales de CETP y CETPI, traducidos de los productos de RT-PCR ID1 e ID2, respectivamente. Las regiones subrayadas representan la secuencia de los péptidos sintéticos empleados en la producción de anticuerpos. B) De acuerdo con el análisis de las secuencias de aminoácidos, por medio de los algoritmos Garner-Robson, Chou-Fasman y PHD, CETPI carece de la estructura α -hélice anfipática, motivo de unión a ésteres de colesterol en CETP, en su lugar, el carboxilo de CETPI presenta estructura al azar, hidrofílica y rica en prolínas.

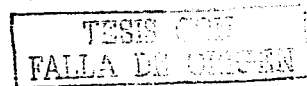
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Comparamos la secuencia de CETPI con la información depositada en los bancos de datos Gene Bank CDS Translations, PDB, Swiss-Prot, SPopdat y PIR, hasta el momento no se han reportado proteínas homologas en secuencia a CETPI. Por otro lado, el resultado dichas comparaciones confirma la predicción de estructura al azar del extremo carboxilo de CETPI.

I.3.3 EN EL INTESTINO DELGADO SE TRADUCEN CETP Y CETPI

Con base en las secuencias de aminoácidos diseñamos dos péptidos sintéticos, correspondientes al extremo carboxilo CETP y CETPI. Las secuencias de ambos péptidos se muestran subrayadas en la Figura 6A. Estos péptidos sintéticos se utilizaron para la producción de los anticuerpos policlonales anti-CETP IgY y anti-CETPI IgY. Estos anticuerpos fueron empleados en pruebas de inmunotransferencia tipo Western contra extractos crudos de hígado e intestino delgado. Se observó que la CETP de 68 kDa se expresa en ambos tejidos (Fig. 7A y 7B) y corresponde con el peso reportado para CETP de conejo de entre 68 y 70 kDa (Nagashima *et al*, 1988). El uso de anticuerpos anti-BSA IgY contra hígado, intestino delgado y el control positivo BSA, generan una señal de alrededor de 66 kDa (mostrado como referencia en la Fig. 5E). La Figura 7C muestra que el anticuerpo anti-CETPI IgY sólo reconoce una banda de alrededor de 52 kDa, 15 kDa menos que CETP. Esta banda sólo se detectó en extractos de intestino delgado. En la Figura 7D se muestra el resultado usando una mezcla de ambos anticuerpos, anti-CETP IgY y anti-CETPI IgY, en ésta se comprueba la presencia de CETP en los extractos de ambos tejidos y de CETPI sólo en el extracto de intestino delgado. En esta figura también puede apreciarse más claramente la diferencia en movilidad relativa de ambas proteínas.

La diferencia de 15 kDa entre CETP y CETPI que muestra la prueba de inmunotransferencia tipo Western, es mayor que la esperada para una diferencia de seis aminoácidos entre ambas proteínas, por lo tanto consideramos que pueden existir diferencias adicionales entre ellas. Las diferencias en secuencia y estructura secundaria entre CETP y CETPI (Fig. 6A y 6B) pueden tener importantes efectos sobre muchas propiedades fisicoquímicas. El punto isoeléctrico predicho para CETP (con 496 aminoácidos) es de 6.41, mientras que el punto isoeléctrico predicho para CETPI (con 490 aminoácidos) es de 7.09. Este cambio puede afectar la movilidad relativa de CETPI en gels de poliacrilamida. Empleando extractos depletados de lípidos, las diferencias en movilidad son constantes, por lo que descartamos la posibilidad de que la presencia de lípidos unidos a las proteínas pudiera ser responsable de su diferencia de movilidad en el gel. La posibilidad de otras modificaciones postraduccionales que pudieran afectar la movilidad relativa de CETPI está en este momento bajo consideración en nuestro laboratorio.



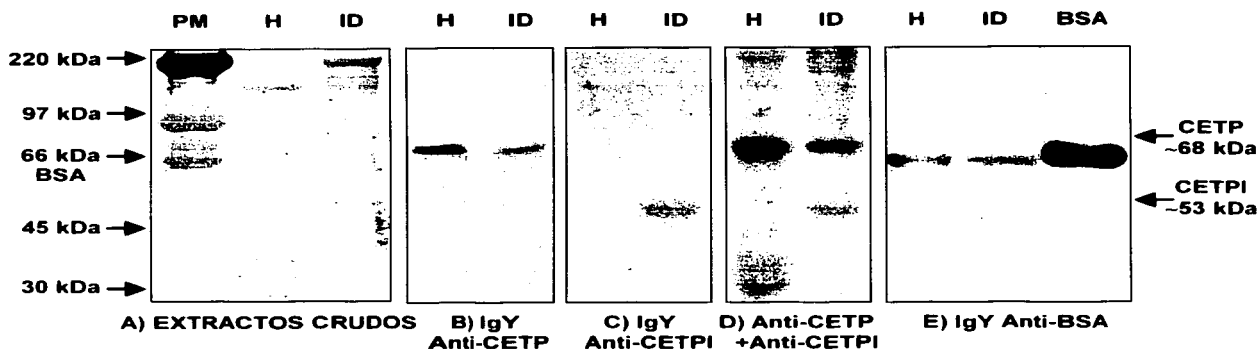


Figura 7. Inmunotransferencia. Identificación de CETP y CETPI en tejidos. Marcador de peso molecular (PM) extracto crudo de hígado (H) e intestino delgado (ID) (Panel A), incubados con anti-CETP IgY (Panel B), anti-CETPI IgY (Panel C) y la combinación de ambos (Panel D). Control anti-BSA IgY (Panel E).

1.3.4 CETPI ESTÁ PRESENTE EN PLASMA HUMANO Y DE CONEJO

Con el fin de establecer si CETPI es secretada al plasma, de manera similar a lo que ocurre con CETP, tomamos muestras de plasma a sujetos normolipídemicos, tanto humanos como conejos. Las muestras se utilizaron en pruebas de inmunotransferencia tipo Western y sus resultados se muestran en la Figura 8. La Figura 8A muestra el corrimiento de muestras de plasma de ambas especies. Usando el anticuerpo IgY anti-CETP establecimos la presencia de CETP en muestras de plasma humano y de conejo, con un peso molecular de 67 kDa y 68 kDa, respectivamente (Fig. 8B). Empleando el anticuerpo IgY anti-CETPI se demostró que CETPI también está presente en el plasma de ambas especies (Fig. 8B). Por otro lado, el anticuerpo anti-CETPI muestra que CETPI se encuentra en mayor concentración en plasma humano que en plasma de conejo (Fig. 8C). Considerando que la albúmina es una de las proteínas más abundantes en el plasma y que su peso es aproximando al de CETP, utilizamos los anticuerpos anti-CETP y anti-CETPI contra BSA, con el fin de descartar falsos positivos (Fig. 8B y 8C). Puede tomarse como referencia la Figura 8D, en la que se utilizó el anticuerpo anti-BSA contra plasma de las dos especies y BSA.

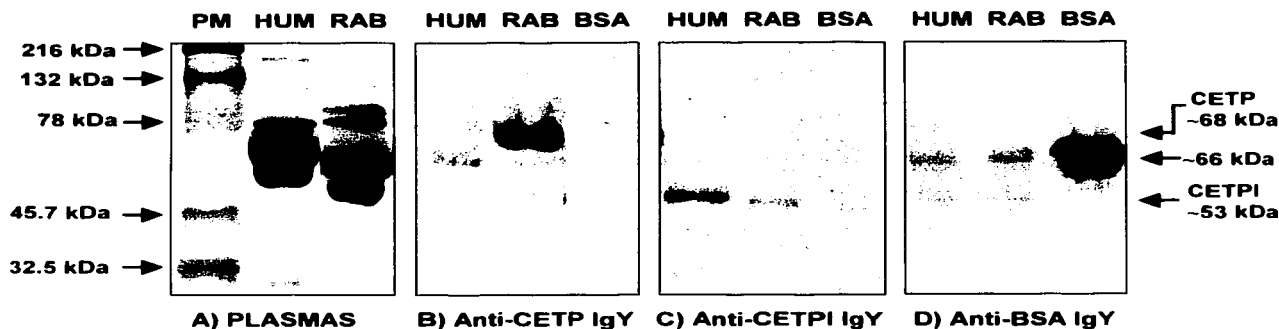


Figura 8. Inmunotransferencia. Identificación de CETP y CETPI en muestras de plasma humano y de conejo. Marcador de peso molecular (PM), plasma humano (HUM) y plasma de conejo (RAB) (Panel A). Muestras de plasma incubadas con anti-CETP IgY (Panel B). Muestras de plasma incubadas con anti-CETPI IgY (Panel C). Muestras de plasma de ambas especies incubadas con anti-BSA IgY (Panel D).

En este punto debemos considerar el intrón "O" humano, localizado entre los exones 15 y 16 (Agellon *et al*, 1990). La *Secuencia I* tiene 87% de homología con 20 nt del intrón "O" humano, cuyo tamaño reportado es de 180pb (Agellon *et al*, 1990). Si el intrón "O" se tradujera en su marco de lectura original generaría una secuencia 60 aminoácidos mayor a CETP. Por lo tanto, el peso molecular calculado (en su forma no glucosilada) sería de 59.4 kDa, 5.8 kDa mayor que el peso molecular observado. Basados en esta posibilidad, consideramos que el mensajero de CETPI humana puede ser producto de una edición y empalme alternativo. Un análisis de la secuencia muestra una gran cantidad de sitios crípticos de edición alternativa, la mayoría de ellos podrían generar proteínas cuyo peso molecular sería mayor a 56 kDa.

La tabla 3 muestra la comparación entre las secuencias de los extremos carboxilo terminal de CETP (ID1) de humano y de conejo, así como de los carboxilos terminales de CETPI (ID2) de conejo y de la posible versión de CETPI de humano. Esta última es una propuesta, que corresponde a una posibilidad de entre muchas otras que pueden ser generadas por edición alternativa. La secuencia propuesta podría carecer de la base 6 a la 96 del intrón "O". El codón de terminación de este producto podría encontrarse en la posición 1573 del exón 16, generando una variante 17 aminoácidos mayor que CETP, con un peso molecular de 56 kDa, 2.5 kDa mayor al peso observado. Por otro lado, la homología del residuo A6 al P12 de la *Secuencia I* de ambas especies, a la que estaría dirigido el anticuerpo anti-CETPI IgY, sería del 50%. Es interesante notar

que CETPI de ambas especies compartirían la estructura al azar, así como carácter hidrofílico. Aún con las observaciones anteriores, no podemos descartar la posibilidad de cambios postraduccionales aunados a la edición alternativa propuesta en esta tesis.

Tabla 3. Comparación de las secuencias de los carboxilos terminales de CETP y CETPI, humanas y de conejo.

ISOFORMA	SECUENCIAS DE EXTREMOS CARBOXILO	ESTRUCTURA (Predicción)	PM (kDa) (Predicción)	PI
ID1 humano 476 AA	GFLLLQMDFGFPE <u>HLLVDFLQSL</u> S	ALFA HÉLICE	53.1	5.80
ID1 conejo 497 AA	GCLLLQMDFGFPK <u>HLLVDFLQSL</u> S	ALFA HÉLICE	54.5	6.41
ID2 humano 483 AA	VKG_PLPAWLP <u>PPGGGLGVSP</u> ARPSLLLPLPSGLPAAADGLWLP	AZAR	56.1	6.28
ID2 conejo 491 AA	VSAKPLS <u>ARS</u> <u>P</u> GGRPLSP	AZAR	53.6	7.09

Esta tesis representa el primer reporte en la caracterización de CETPI, una nueva versión de CETP que parece ser liberada al plasma en sujetos normolipidémicos, tanto humanos como conejos. Basados en nuestros resultados, el mensajero de CETPI, identificado como ID2, puede traducirse en una isoforma de CETP que, al igual que esta, es liberada al plasma a niveles normales de lípidos. El RNAm de CETPI presenta un peso molecular aproximado a 2.2Kb y, con excepción de la *Secuencia 1*, muestra identidad con el extremo 3' del mensajero de CETP de conejo. Hasta el momento sólo hemos identificado al intestino delgado como fuente del transcrito de CETPI, por lo que, la CETPI observada en plasma puede ser originada en este tejido.

En este punto es interesante mencionar que muchas variantes de CETP reportadas hasta ahora se traducen en formas no funcionales, asociadas con hiperalfalipoproteinemia (Appletquis *et al*, 1995; Gotoda *et al*, 1997; Sakai *et al*, 1996 y Arai *et al*, 1996). Previo a esta investigación, se ha observado que sólo la isoforma CETP Δ 9 se expresa y se secreta pobremente en plasma, sin asociación con hiperalfalipoproteinemia (Inazu *et al*, 1992 y Quinet *et al*, 1993).

Por otro lado, CETPI muy probablemente carece del sitio de unión a ésteres de colesterol, aunque es probable que la capacidad de unión a fosfolípidos y en general la capacidad de asociarse a lipoproteínas no se vea alterada (Wang *et al*, 1993 y Kotake *et al*, 1997). Lo último es especialmente importante, puesto que CETP es responsable de aproximadamente el 30% del transporte de fosfolípidos en plasma (Yamashita *et al*, 2000 y Pattnaik *et al*, 1979), y puesto que los



grupos fosfato constituyen los sitios primarios de interacción entre CETP y las lipoproteínas (Lagrost *et al*, 1994; Abbey *et al*, 1985 y Hesler *et al*, 1988).

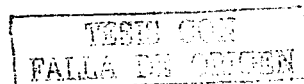
Este estudio es el primero en describir la presencia de CETPI en plasma humano, una nueva proteína que amplía las posibilidades en el estudio del metabolismo de lípidos, tanto a nivel de plasma como a nivel local de intestino delgado. Una de las preguntas interesantes a resolver en este momento concierne a la función de CETPI y a la manera como esta interviene en la homeostasis de lípidos. Las evidencias de su expresión tejido específica, aunada a la ausencia del sitio de unión a ésteres de colesterol, lleva a plantear la posibilidad de que CETPI intervenga en los procesos de intercambio y/o empaquetamiento de lípidos en el intestino delgado, aunado a esto es necesario esclarecer si tiene función en plasma y/o a nivel intracelular y de membrana plasmática.

Como paso inicial es necesario concluir la descripción del mensajero de CETPI sin embargo, no es requisito indispensable para iniciar el estudio de su función. A este respecto, ya se tienen avances en el establecimiento de metodologías que permiten la expresión de RNAm de CETP y CETPI en ovocitos de *Xenopus levis*, que sentarán las bases para el estudio de función, aun cuando la caracterización del mensajero no ha concluido. Dichos avances se presentan anexos a este capítulo.

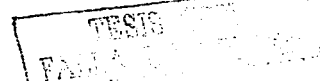


I.4 BIBLIOGRAFÍA

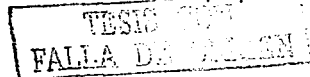
1. Abbey M, Bastiras S, Calvert GD: Immunoprecipitation of lipid transfer protein activity by an antibody against human plasma lipid transfer protein-I. *Biochim Biophys Acta* 833(1): 25-33, 1985
2. Agellon LB, Quinet EM, Gillette TG, Drayna DT, Brown ML, Tall AR: Organization of the human cholesterol ester transfer protein gene. *Biochemistry* 29(6): 1372-1376, 1990
3. Agellon LB, Zhang P, Jiang XC, Mendelsohn L, Tall AR: The CCAAT/enhancer-binding protein trans-activates the human cholesteryl ester transfer protein gene promoter. *J Biol Chem*; 267(31): 22336-22339, 1992
4. Applequist SE, Keyna U, Calvin MR, Beck-Engeser GB, Raman C, Lawn R: Sequence of the rabbit glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding cDNA. *Gene* 163(2): 325-326, 1995
5. Arai T, Yamashita S, Sakai N, Hirano K, Okada S, Ishigami M, Maruyama T, Yamane M, Kobayashi H, Nozaki S, Funahashi T, Kameda-Takemura K, Nakajima N, Matsuzawa Y: A novel nonsense mutation (G181X) in the human cholesteryl ester protein gene in Japanese hyperalphalipoproteinemic subjects. *J Lipid Res* 37(10): 2145-2154, 1996
6. Bolaños-García VM, Soriano-García M, Mas-Oliva J: CETP and exchangeable apoproteínas: Common features in lipid binding activity. *Mol Cell Biochem* 175(1-2): 1-10, 1997
7. Brown ML, Inazu A, Hesler CB, Agellon LB, Mann C, Whitlock ME, Marcel YL, Milne RW, Koizumi J, Mabuchi H: Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins. *Nature* 342(6348): 448-451, 1989
8. Day JR, Albers JJ, Lofton-Day CE, Gilbert TL, Ching AFT, Grant FJ, O'Hara PJ, Marcovina SM, Adolphson JL: Complete cDNA encoding human phospholipid transfer protein from human endothelial cells. *J Biol Chem* 269(12): 9388-9391, 1994
9. Dessì M, Motti C, Cortese C, Leonardis E, Giovannini C, Federici G, Piemonte F: Alternative splicing of human plasma cholesteryl ester transfer protein mRNA in Caco-2 cells and its modulation by oleic acid. *Mol Cell Biochem* 177(1-2): 107-112, 1997
10. Drayna D, Jarnagin AS, McLean J, Henzel W, Khor W, Fielding C, Lawn R: Cloning and sequencing of human cholesterol ester transfer protein cDNA. *Nature* 327(6123): 632-634, 1987
11. Gotoda T, Kinoshita M, Shimano H, Harada K, Shimada M, Ohsuga J, Teramoto T, Yazaki Y, Yamada N: Cholesteryl ester transfer protein deficiency caused by a nonsense mutation detected in the patient's macrophage mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 194(1): 519-524, 1993



12. Gotoda T, Kinoshita M, Ishibashi S, Inaba T, Harada K, Shimada M, Osuga J, Teramoto T, Yazaki Y, Yamada N: Skipping of exon 14 and possible instability of both the mRNA and the resultant truncated protein underlie a common cholesteryl ester transfer protein deficiency in Japan. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(7): 1376-1381, 1997
13. Hesler CB, Tall AR, Swenson TL, Weech PK, Marcel YL, Milne RW: Monoclonal antibodies to the Mr 74,000 cholesterol ester transfer protein neutralize all of the cholesterol ester and triglyceride transfer activities in human plasma. *J Biol Chem* 263(11): 5020-5023, 1988
14. Inazu A, Quinet EM, Wang S, Brown ML, Stevenson S, Barr ML, Moulin P, Tall AR: Alternative splicing of the mRNA encoding the human cholesterol ester transfer protein. *Biochemistry* 31(8): 2352-2358, 1992
15. Jiang XC, Bruce C, Cocke T, Wang S, Boguski M, Tall AR: Point mutagenesis of positively charged amino acids of cholesteryl ester transfer protein: conserved residues within the lipid transfer/lipopolysaccharide binding protein gene family essential for function. *Biochem* 34(21): 7258-7263, 1995.
16. Jiang XC, Moulin P, Quinet E, Goldberg IJ, Yacoub LK, Agellon LB, Compton D, Schnitzer-Polokoff R, Tall AR: Mammalian adipose tissue and muscle are major sources of lipid transfer protein mRNA. *J Biol Chem* 266(7): 4631-4639, 1991
17. Kondo I, Berg K, Drayna D, Lawn R: DNA polymorphism at the locus for human cholesteryl ester transfer protein (CETP) is associated with high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein levels. *Clin Genet* 35(1): 49-56, 1989
18. Kotake H, Agellon LB, Yokoyama S: Modification of the N-terminal cysteine of plasma cholesterol ester transfer protein selectively inhibits triglyceride transfer activity. *Biochim Biophys Acta* 1347(1): 69-74, 1997
19. Lagrost L: Regulation of cholesterol ester transfer protein (CETP) activity, review of in vitro an in vivo studies. *Biochim Biophys Acta* 1215(3): 209-236, 1994
20. Lusic AJ, Zollman S, Sparkes RS, Klisak I, Mohandas T, Drayna D, Lawn RM: Assignment of the human gene for cholesteryl ester transfer protein to chromosome 16q12-16q21. *Genomics* 1(3): 232-235, 1987
21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, Randall RJ: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
22. Marotti KR, Castle CK, Boyle TP, Lin AH, Murray RW, Melchior GW: Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein. *Nature* 364(6432): 73-75, 1993
23. Matsunaga A, Araki K, Moriyama K, Handa K, Arakawa F, Nishi K, Sasaki J, Arakawa K: Detection of a point mutation in cholesterol ester transfer protein gene by polymerase chain reaction-mediated site-directed mutagenesis. *Biochim Biophys Acta* 1166(1): 131-134, 1993

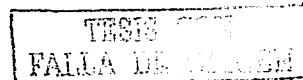


24. Nagashima M, McLean J, Lawn R J: Cloning and mRNA tissue distribution of rabbit cholesterol ester transfer protein. *J Lipid Res* 29(12): 1643-1649, 1988
25. Oliveira H, Chouinard R, Agellon L, Bruce C, Ma M, Walsh A, Breslow JL, Tall AR: Human cholesteryl ester transfer protein gene proximal promoter contains dietary cholesterol positive responsive elements and mediates expression in small intestine end periphery while predominant liver and spleen expression is controlled by 5'-distal sequences. *J Biol Chem* 271(50): 31831-81838, 1996
26. Pattnaik NM, Zilversmit DB: Interaction of cholesterol ester exchange protein with human plasma lipoproteins and phospholipid vesicles. *J Biol Chem* 254(8): 2782-2786, 1979
27. Quinet E, Yang TP, Marinos C, Tall A: Inhibition of the cellular secretion of cholesterol ester transfer protein by a variant protein formed by alternative splicing of mRNA. *J Biol Chem* 268(23): 16891-16894, 1993
28. Rye KA, Hime NJ, Barter PJ: The influence of cholesteryl ester transfer protein on the composition, size, and structure of spherical, reconstituted high density lipoproteins. *J Biol Chem* 270(1): 189-196, 1995
29. Sakai N, Santamarina-Fojo S, Yamashita S, Matsuzawa Y, Brewer HB Jr.: Exon 10 skipping caused by intron 10 splice donor site mutation in cholesteryl ester transfer protein gene results in abnormal downstream splice site selection. *J Lipid Res* 37(10): 2065-2073, 1996
30. Smith DB, Corcoran LM: Expression and purification of Glutathion-S Transferase Fusion Proteins. In Ausbel MF, Brent R, Kingston RE, Moore DDR, Seidman JG, Strhl K (ed) *Short Protocols in Molecular Biology*, WILEY, 3rd ed, pp16.18-16.31, 1995
31. Sperker B, Mark M, Budzinski RM: The expression of human cholesteryl ester transfer protein in HepG2 cells is induced by sodium butyrate. *Eur J Biochem* 218(3): 945-950, 1993
32. Stevenson SC, Wang S, Deng L, Tall A: Human plasma cholesteryl ester transfer protein consists of a mixture of two forms reflecting variable glycosylation at Asparagine 341. *Biochemistry* 32(19): 5121-5126, 1993
33. Sumikawa K, Parker I, Miledi R: Expression of neurotransmitter receptors and voltage-activated channel from brain mRNA in *Xenopus* oocytes. In: M. Conn (ed) *Methods in Neurosciences*. Academic Press, Orlando, 1989, pp 30-45
34. Takahashi K, Jiang XC, Sakai N, Yamashita S, Hirano K, Bujo H, Yamazaki H, Kusunoki J, Miura T, Kussie P, Matsuzawa Y, Saito Y, Tall A: A missense mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene with possible dominant effects on plasma high density lipoproteins. *J Clin Invest* 92(4): 2060-2064, 1993
35. Tall A: Plasma lipid transfer proteins. *Annu Rev Biochem* 64: 235-257, 1995
36. Wang S, Wang X, Deng L, Rassart E, Milne RW, Tall AR: Point mutagenesis of carboxyl-terminal amino acids of cholesteryl ester transfer protein. Opposite faces of an amphipathic



helix important for cholesteryl ester transfer or for binding neutralizing antibody. J Biol Chem 268(3): 1955-1959, 1993

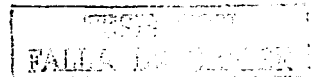
37. Yamashita S, Hirano K, Sakai N, Matsuzawa Y: Molecular biology and pathophysiological aspects of plasma cholesteryl ester transfer protein. Biochim Biophys Acta 1529(1-3): 257-275, 2000
38. Yang TP, Agellon LB, Walsh A, Breslow JL, Tall AR: Alternative splicing of the human cholesterol transfer protein in transgenic mice. J Biol Chem 271(21): 12603-12609, 1996



Capítulo I

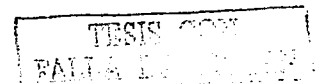
I.5 ANEXO

***Expresión de RNAm de Hígado e Intestino Delgado de Conejo, en
Ovocitos de Xenopus laevis***



I.5.1 Introducción

En este trabajo se presentan los avances en el desarrollo de protocolos dirigidos a la expresión de RNAm de CETP y CETPI, extraído de hígado e intestino delgado de conejo, en ovocitos de *Xenopus laevis*. Este sistema tiene ventajas sobre otros sistemas de expresión *in vitro* con organismos bacterianos, ya que proporciona los mecanismos de modificaciones postraduccionales propios de células eucariotes. Esto incluye el procesamiento de moléculas precursoras, fosforilación y glucosilación, el ensamblaje de subunidades y la inserción en la superficie de la membrana en la orientación correcta. También presenta la ventaja de permitir la traducción de mensajeros, aún cuando no se tienen clonados o se desconoce total o parcialmente su secuencia, como es el caso del mensajero de CETPI. Este sistema que permite estudiar la actividad de proteínas en un modelo confiable, al obtener su traducción y expresión funcional. Hasta el momento sólo se ha reportado la expresión de mensajeros de canales sensibles al voltaje y neuroreceptores, cuya expresión puede ser estudiada por registros electrofisiológicos. Aquí se desea establecer protocolos que permitan la expresión de mensajeros de proteínas no registrables electrofisiológicamente que, en combinación con otras técnicas, permitan relacionar la expresión de los mensajeros y la incorporación de lípidos los ovocitos y/o el intercambio entre membranas. Esto podría aportar información muy importante al conocimiento de los mecanismos de absorción de lípidos, incorporación en lipoproteínas y su transporte reverso.



I.5.2 Materiales y Métodos

OBTENCIÓN DE OVOCITOS DE *Xenopus laevis*

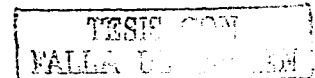
Los ovocitos se obtuvieron por cirugía a varios donadores, mediante un corte diagonal de aproximadamente un centímetro de largo en el plano anterior del abdomen. A través de este corte se extrajeron uno o dos lóbulos del ovario, que se conservaron en solución Barth's con 0.1mg/ml de gentamicina. Los ovocitos se separaron de los lóbulos del ovario con ayuda del microscopio estereoscópico (Motic DMW 143FBGG). De los ovocitos disecados se seleccionaron los que se encontraban en estadios IV, V y VI, y se incubaron toda la noche a 16-18°C en solución Barth's con gentamicina. De los sobrevivientes se seleccionaron los más viables para su microinyección.

AISLAMIENTO DE RNA^m y MICROINYECCIÓN

Se extrajo RNA total de hígado e intestino delgado de conejos, hembras, blancos Nueva Zelanda, normolipidémicos, así como de corteza cerebral de rata hembra, Wistar. La extracción de intestino delgado e hígado se hizo mediante el los métodos descritos por Sumikawa *et al* (1989) y Chomczynski *et al* (1987). La fracción de RNA poli(A⁺) fue aislada por cromatografía en oligo(dt)-celulosa (Sumikawa *et al*, 1989).

Los ovocitos se separaron en 5 lotes, uno para cada condición: control sin inyectar, control inyectado con agua, inyectados con RNA poli(A⁺) de corteza de rata, inyectados con RNA poli(A⁺) de hígado e inyectados con RNA poli(A⁺) de intestino delgado. El número de ovocitos por lote varió dependiendo de la sobrevivencia de la población después de cada disección y microinyección.

La microinyección se realizó con 50nl de RNA poli(A⁺) a una concentración de 2µg/µl, o en su caso, 50nl de agua. Se utilizaron pipetas de vidrio horneadas a 250°C por 4hrs, con un diámetro exterior de aproximadamente 20µm. Las pipetas se cargaron con aceite mineral antes sujetarse a un micromanipulador; ya sujetas se cargaron con RNA poli(A⁺). Los ovocitos se colocaron de manera individual sobre una capa de parafilm, manteniéndolos en un mínimo de solución Barth's (NaCl 87mM, NaHCO₃ 23mM, CaCl₂ 10mM, HEPES 5mM, KCl 9µM, pH 7.4). Las microinyecciones se realizaron con ayuda de un microscopio estereoscópico (Motic DMW 143FBGG); después los ovocitos se incubaron en solución Barth's con gentamicina a 70 µg/ml durante 5 días, cambiando la solución diariamente.



Al segundo día de la microinyección se trataron con colagenasa para eliminar la teca. Al 5º día se dividió cada lote en 2 grupos, uno de ellos incluyó alrededor del 40% de los ovocitos sobrevivientes al tratamiento con colagenasa. De entre estos se seleccionaron de 2 a 4 para ser utilizados en el registro electrofisiológico. El resto se trató de manera similar a la descrita para la producción de extractos crudos de tejidos. Este procedimiento es facilitado por el tratamiento con colagenasa, ya que en presencia de la teca la lisis no es total. Los ovocitos restantes (60%) se incubaron hasta el 7º día después de la inyección y se trataron de la misma manera que los ovocitos del 5º día.

La expresión se verificó mediante registros electrofisiológicos usando la técnica de patch clamp. En los controles positivos de expresión, inyectados con mensajeros de corteza cerebral de rata cuyas respuestas son bien conocidas (Sumikawa *et al*, 1989), se hicieron registros utilizando diferentes agonistas como son: acetilcolina, ácido glutámico, GABA, ácido kainico, dopamina, CaCl, Sub P, Sub K, Adenosina, UTP, ATP y Asp+Gly. En los ovocitos inyectados con RNAM de hígado e intestino delgado se probó esta batería de agonistas, tratando de identificar respuesta a al menos uno de ellos.

INMUNOTRANFERENCIA TIPO WESTERN

Se estandarizaron pruebas de inmunotransferencia tipo Western usando extractos crudos y depletados de lípidos de ovocitos. Para la preparación de extractos crudos se homogenizaron los ovocitos en proporción de 250µl de buffer de suspensión (NaCl 100mM, Tris-HCl 10mM pH 7.6, EDTA 1mM pH 8, Aprotinina 1µg/ml y PMSF 100µg/ml) por ovocito. Los extractos crudos fueron depletados de lípidos con extracciones con acetona al 60%. La cuantificación de proteínas en extractos se hizo por el método de BCA (PIERCE, Rockford, IL, USA).

Se llevó a cabo electroforesis de los extractos crudos de ovocito (40µg de proteína) así como el control negativo BSA (3µg) en geles de al 12.5% acrilamida-SDS. Este material se electrotransfirió a membranas de nitrocelulosa de 0.45µm (Trans-Blot Transfer Medium, BIO-RAD, Hercules, CA, USA), para pruebas con los anticuerpos anti-CETP 1:5,000, anti-CETPI 1:15,000 y anti-BSA 1:25,000. En todos los casos se usó como anticuerpo secundario Anti-Chicken IgG, (H+L) conjugado a peroxidasa (PIERCE, Rockford, IL, USA) 1:10,000. Tanto los bloqueos como las incubaciones se hicieron con una suspensión de leche descremada en polvo al 2.5% en TBS-Tween 0.1%, a 37°C, 1hr. La visualización se hizo con SuperSignal Substrate (PIERCE, Rockford, IL, USA) en placas autoradiográficas X-OMAT, (Kodak, Rochester, NY, USA).

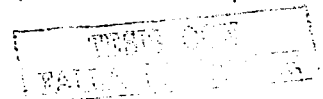
I.5.3 Resultados

SISTEMAS DE EXTRACCION DE RNA

El método de extracción de RNA que comúnmente se utiliza en este sistema de expresión, es el método clásico de extracción con tiocianato de guanidina (Chomczynski *et al*, 1987), y la consiguiente purificación del mensajero por cromatografía en Oligo(dt)-celulosa. Este método sólo nos fue útil para la expresión de RNAm extraídos de cerebro de rata (figura 1), de manera que fue necesario utilizar el método de fenol-cloroformo reportado por Sumikawa *et al* (1989), considerado como la segunda opción más viable para lograr la expresión de mensajeros provenientes de tejidos con alto contenido de proteínas. Sin embargo, con este método sólo se logró la expresión de mensajeros de intestino delgado. Se probó un tercer método que se basa en el método reportado por Chomczynski *et al* (1987), en el que se incluyó dos extracciones adicionales de fenol-cloroformo-isoamílico. Hasta el momento no hemos podido obtener registros en ovocitos microinyectados con RNAm de hígado extraído con alguno de los métodos probados. Actualmente, se están haciendo los ajustes necesarios para optimizar la expresión de mensajeros de hígado y se tienen en consideración otros sistemas de extracción a utilizar. Los resultados indican que será necesario establecer protocolos diferentes para cada tejido.

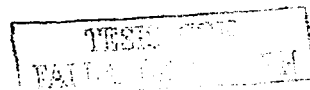
SISTEMA DE EXPRESION IN VITRO

Los registros electrofisiológicos se realizaron utilizando una gran variedad de sustancias tratando de encontrar respuesta a algunos de los receptores ya reportados para corteza de rata y canales sensibles a voltaje. Los ovocitos inyectados con RNAm de corteza cerebral (control positivo) muestran la expresión de una gran variedad de canales dependientes de voltaje y receptores a neurotransmisores; entre ellos acetilcolina (ACh), serotonina (5-HT), kainato y GABA (figura 1). En algunos de los lotes de ovocitos inyectados con agua así como en los no inyectados, se encontraron señales correspondientes a Angiotensina II y en algunos casos a ACh (figura 2). Al hacer los registros de los ovocitos inyectados con RNAm de intestino delgado se encontraron respuestas negativas a casi todas las sustancias (figuras 3B, 3C y 3D), excepto a la sustancia P (figuras 3A, 3E, 3G y 3H) y a ACh (3F). La intensidad de las señales varía dependiendo del donador, ya que cada uno tiene diferente capacidad de expresión de mensajeros y de respuesta a los neurotransmisores. Considerando que algunos de los controles negativos tienen expresión endógena de ACh, no podemos tener la completa seguridad de que la señal que observamos sea producto de la expresión del mensajero de intestino delgado; sin embargo, la expresión del receptor a sustancia P solo puede ser producto del material inyectado, por lo que podemos concluir que la expresión del RNAm de intestino delgado ha sido exitosa.



Los ovocitos inyectados con RNAm de hígado fueron expuestos a los mismos agonistas que el resto de los lotes, sin embargo, hasta el momento sólo hemos encontrado señales negativas. Es probable que los niveles de mensajeros en el hígado que se traducen en proteínas registrables se encuentren por debajo del límite de detección para esta técnica. Por ello, en este momento se estandariza como protocolo complementario la técnica de inmunotransferencia tipo Western para la detección de albúmina en lisados de los ovocitos microinyectados, empleando los anticuerpos IgY anti-BSA (I.2.4). A esta se agregará mas adelante la detección de CETP y CETPI mediante los anticuerpos IgY anti-CETP e IgY anti-CETPI (I.2.4). De manera simultánea se estandarizará un protocolo de inmunohistoquímica empleando los mismos anticuerpos, con el fin de determinar si las isoformas se retienen al interior de las células, en cuyo caso podrían funcionar como regulador negativo como ocurre con la versión CETP Δ 9 (Inazu *et al*, 1992; Quinet *et al*, 1993), y/o si una fracción de ellas se inserta en la membrana celular, lo que podría significar que intervienen en los procesos de intercambio de lípidos.

Una vez logrado esto, se propone la incubación de los ovocitos inyectados con lipoproteínas purificadas de plasma humano. El siguiente paso será exponer diferentes combinaciones de estos elementos a los que se habrá incorporado [3 H]Colesterol libre y/o [14 C]Colesterol esterificado (Ruiz-Noriega *et al*, 1994; Ortega *et al*, 1996; Ortega y Mas-Oliva, 1986; Ortega y Mas-Oliva, 1984). Esto permitirá establecer si existe transferencia de colesterol entre ellos e incluso medir la actividad de CETP. En el caso de CETPI se debe confirmar el resultado de la predicción de estructura, estableciendo en primer lugar si conserva o no la capacidad unión a colesterol libre, colesterol esterificado, triacilgliceroles y fosfolípidos, y, si ello esta asociado a la capacidad de transferencia. La estrategia a seguir para determinar la actividad de CETPI dependerá los resultados que se obtengan hasta este punto.



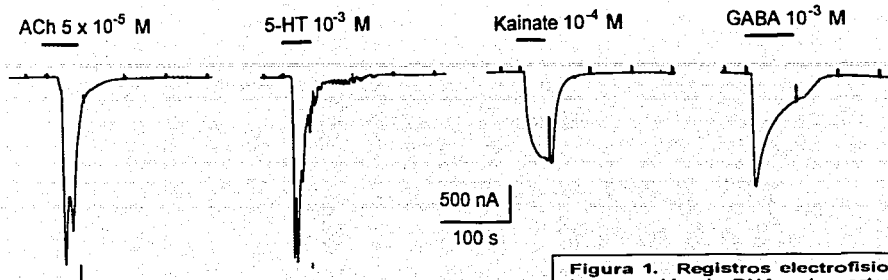


Figura 1. Registros electrofisiológicos de la expresión de RNAm de corteza cerebral de rata en ovocitos.

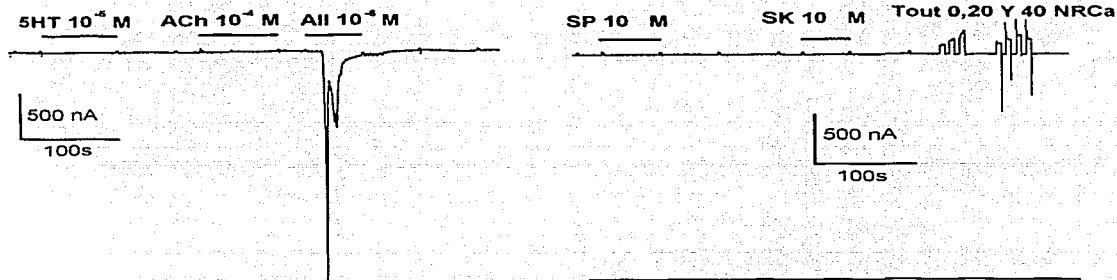


Figura 2. Registros electrofisiológicos de ovocitos controles negativos, existe respuesta endógena a Angiotensina II.

TESIS
 FALLA DE...

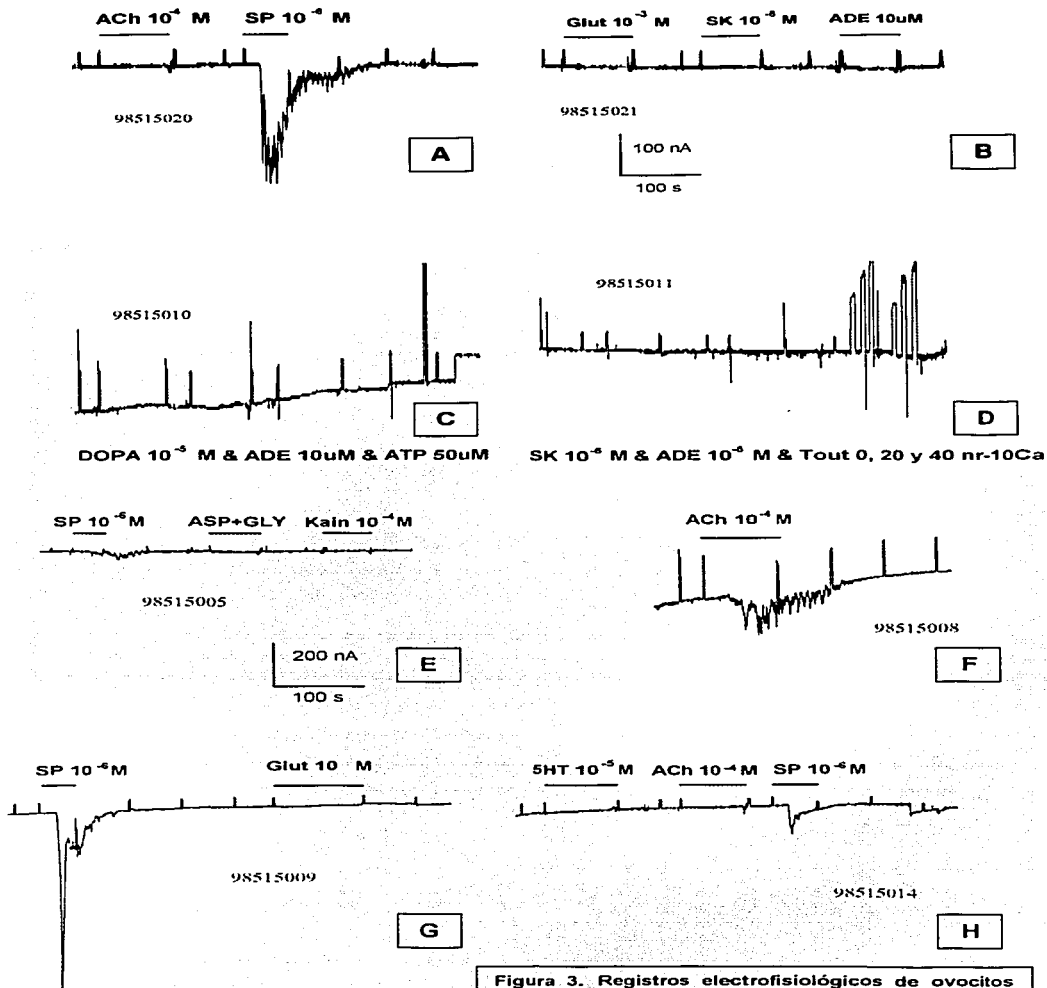
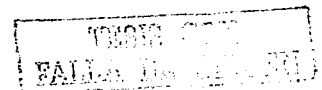
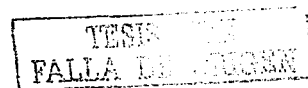


Figura 3. Registros electrofisiológicos de ovocitos inyectados con RNAm de intestino delgado. Se tienen respuestas positivas a Substancia P y ACh.

I.5.4 BIBLIOGRAFÍA

1. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
2. Ortega A, Mas-Oliva J: Cholesterol effect on enzyme activity of the sarcolemmal (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase from cardiac muscle. *Biochim Biophys Acta* 773(2): 231-236, 1984
3. Ruiz-Noriega M, Silva-Cardenas I, Delgado-Coello B, Zentella-Dehesa A, Mas-Oliva J: Membrane bound CETP mediates the transfer of free cholesterol between lipoproteins and membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 202(3): 1322-1328, 1994
4. Ortega A, Mas-Oliva J: Direct regulatory effect of cholesterol on the calmodulin stimulated calcium pump of cardiac sarcolemma. *Biochem Biophys Res Commun* 139(3): 868-874, 1986
5. Ortega A, Santiago-Garcia J, Mas-Oliva J, Lepock JR: Cholesterol increases the thermal stability of the Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase of cardiac microsomes. *Biochim Biophys Acta* 1283(1): 45-50, 1996
6. Sumikawa K, Parker I, Miledi R: Expression of neurotransmitter receptors and voltage-activated channel from brain mRNA in *Xenopus* oocytes. In: M. Conn (ed) *Methods in Neurosciences*. Academic Press, Orlando, 1989, pp 30-45





Capítulo II

Sistema Para la Cuantificación de la Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol en Muestras Biológicas y Sintéticas^{3,4,5}

Resumen

La aterosclerosis es un proceso que permanece asintomático durante décadas y los lineamientos para su seguimiento y tratamiento dependen de los llamados "factores de riesgo de aterogénesis", entre estos se incluye la presencia de Enfermedad Cardio-Vascular (ECV). Esto implica que en muchos casos el diagnóstico se logra hasta que las consecuencias de este padecimiento son irreversibles. Aún cuando los parámetros de diagnóstico que se utilizan actualmente permiten cierta confiabilidad, no se ha logrado establecer una relación clara entre muchos de ellos, por lo que actualmente sólo es posible diagnosticar una "elevada sospecha clínica de riesgo de aterosclerosis". Por ello, se considera que el método de diagnóstico utilizado actualmente tiene algunas limitaciones. En esta tesis se presenta un sistema para identificar y cuantificar la CETP que puede ser complementario al método de diagnóstico actualmente en uso. Al incluir este nuevo parámetro entre los de uso regular en clínica, se podrá incrementar significativamente la confiabilidad del diagnóstico de riesgo de aterogénesis, ya que se trata de un parámetro cuantitativo, del que se ha establecido una relación clara con muchos de los factores de riesgo. Además, facilita la detección oportuna de individuos con riesgo no diagnosticados o con síndromes atípicos, lo que reduciría de manera importante la incidencia del proceso aterosclerótico.

³Premio de la Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica, en el Área de Investigación Tecnológica, 1999.

⁴Todos los materiales y métodos descritos en el CAPÍTULO II de la presente tesis conforman una Aplicación Internacional de Patente (PCT), con número de publicación WO 02/32935 A1. Esta sección se basa en la información original de la Solicitud de Patente presentada ante las oficinas "Internacional", "Mexicana", "Canadiense" y de la "Comunidad Europea" para registro de patentes.

⁵El desarrollo comercial de esta patente será llevado a cabo en colaboración con Laboratorios SILANES S.A. de C.V.

II.1 Introducción

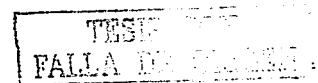
Desde los años 70's se ha establecido una correlación definitiva entre los niveles y tipos de lipoproteínas con la cardiopatía isquémica. Se ha observado que altos niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) puede resultar en un incremento de su incidencia, y que el retardamiento de la remoción de estas partículas aumenta su tiempo de permanencia en el plasma, exponiéndolas a modificaciones estructurales e incrementando su interacción con las paredes arteriales. Por otro lado, alteraciones de la apoproteína B (Apo B) reducen la capacidad de unión de estas partículas a sus receptores, por lo que son reconocidas mayoritariamente por receptores de macrófagos, tales como el receptor "basurero" o "scavenger". La incapacidad de los macrófagos de regular la internalización de LDL modificadas a través de este receptor, causa la acumulación de ésteres de colesterol y con esto la formación de células espumosas, fenómeno que favorece el desarrollo de la aterogénesis.

La aterosclerosis es un fenómeno que se inicia en la infancia y adolescencia y progresa conforme transcurre la vida. Sus consecuencias, como la oclusión arterial y sus manifestaciones clínicas (infarto agudo del miocardio, accidentes vasculares cerebrales, gangrena de miembros inferiores, etc.) se inician muchos años antes de su detección con la alteración de las paredes vasculares. Pacientes que presentan niveles de lípidos séricos superiores a los normales, usualmente presentan también mayor incidencia de este tipo de padecimientos, tal es el caso de individuos diabéticos, nefrópatas o hiperlipidémicos congénitos, entre muchos otros.

La detección oportuna y tratamiento adecuado de las dislipidemias reducirían de manera importante la incidencia de accidentes vasculares y otras manifestaciones clínicas asociadas al proceso aterosclerótico. Actualmente, los lineamientos para el seguimiento y tratamiento dependen tanto de los niveles de lípidos como de la presencia o ausencia de ECV establecida, así como de otros factores de riesgo coronario (Morato, 1996). Dichos factores indican la exposición del individuo a circunstancias que pueden determinar el riesgo de aterogénesis y sus manifestaciones clínicas. Estos son:

- ❖ Colesterol total y LDL elevados.
- ❖ Hipertensión arterial.
- ❖ Tabaquismo.
- ❖ Diagnóstico de cardiopatía isquémica.
- ❖ Hipoalfalipoproteinemia (Niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad o HDL).
- ❖ Diabetes.
- ❖ Obesidad.
- ❖ Historia familiar de enfermedad coronaria prematura.
- ❖ Sexo masculino.
- ❖ Proteinuria.
- ❖ Hipertrigliceridemia.

(Lerman, 1996)

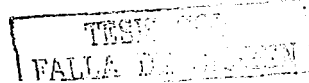


Para establecer si existe exposición del paciente a factores de riesgo de enfermedad coronaria se realizan, además interrogatorios dirigidos, exploración, determinación del perfil de lípidos, electrocardiograma y radiografía de tórax; cuando se sospecha de insuficiencia vascular periférica se incluye el Ultrasonido Doppler y arteriografía.

Estos parámetros permiten detectar a los pacientes que se encuentran dentro de los llamados "grupos de riesgo", en los que se incluyen individuos que debido a diferentes patologías coinciden en algún, algunos o todos los factores de riesgo coronario. Sin embargo, la primer fase en el tratamiento de las dislipidemias tiene como objetivo principal la prevención, es decir, el control de las variables metabólicas involucradas. Ya que la aterosclerosis es un proceso que permanece asintomático durante décadas, existe una gran cantidad de personas con riesgo de aterogénesis que no han sido detectadas, puesto que aún no presentan las manifestaciones clínicas (cardiopatía isquémica, insuficiencia coronaria y/o vascular periférica, y padecimientos relacionados a la oclusión arterial). Para cuando estas manifestaciones se presentan queda poco que hacer en cuanto a prevención ya que las consecuencias son en su mayoría irreversibles y las expectativas en cantidad y calidad de vida del paciente se han reducido drásticamente.

Por lo anterior, consideramos que el método de evaluación de riesgo de aterogénesis utilizado actualmente tiene limitaciones. La primera es el tamaño y tipo de población susceptible de ser evaluada, que se restringe debido al costo en tiempo y dinero que implica realizar las pruebas de diagnóstico, lo que a su vez dificulta la detección temprana de individuos con riesgo de aterogénesis; por lo tanto, la prevención de sus complicaciones es deficiente. Segunda, aún cuando los parámetros de diagnóstico que se utilizan actualmente permiten cierta confiabilidad, muchos de ellos son cualitativos y algunos de los cuantitativos están en discusión, por lo que solo se puede hablar de una "elevada sospecha clínica de riesgo de aterosclerosis", puesto que los resultados no son del todo confiables. Tercera, la homeostasis de los lípidos en humanos y en mamíferos es un fenómeno complejo, que responde a una gran variedad de condiciones y estímulos, por lo que no se ha logrado establecer hasta el momento una relación clara entre muchos de los fenómenos que intervienen en ella.

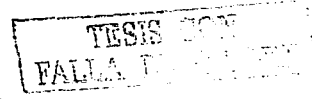
De entre los factores a evaluar para establecer el riesgo de aterogénesis, los más confiables dentro del perfil de lípidos, son niveles elevados en sangre de colesterol total y de LDL. Sin embargo, la combinación de estos con el resto de los parámetros requiere de un análisis que es impreciso, y que en clínica y experimentalmente ha mostrado no ser satisfactorios para evaluar el riesgo de aterogénesis. Un ejemplo de esto son los niveles de HDL, que durante más de 30 años se han considerado como un factor determinante en el diagnóstico. Mientras que trabajos recientes



confirman su utilidad como factor de riesgo (Moriyama *et al*, 1998; Agerholm-Larsen, Tybjaerg-Hansen *et al*, 2000 y Agerholm-Larsen, Nordestgaard *et al*, 2000), otros estudios epidemiológicos muestran resultados inconsistentes. De acuerdo con Hsu *et al* (2001) y Zhuang *et al* (2001), por mencionar solo algunos, no existe relación entre HDL y enfermedades asociadas a la aterosclerosis, al tiempo que recopilaciones realizadas por otros autores concluyen que la relación parece variar entre grupos étnicos y en función de diferentes combinaciones de factores tales como tabaquismo, obesidad, hipertensión e hipertrigliceridemia, entre otros (Von Eckardstein *et al*, 2001 y Grundy *et al*, 1999). En resumen, HDL *per se* no es un buen parámetro para evaluar el riesgo de aterogénesis, en cambio, la aterogénesis parece estar asociada a la proporción e interconversión entre los diferentes subtipos de HDL (ver Introducción, Capítulo III), fenómeno dependiente de la actividad de las proteínas PLTP y especialmente CETP (Von Eckardstein *et al*, 2001).

Por lo anterior, se hace necesario proponer nuevos factores que incrementen la confiabilidad del diagnóstico de riesgo de aterogénesis en uso, uno de ellos es la determinación de los niveles de CETP en el plasma. Esta proteína se ha sido estudiado ampliamente y es uno de los factores mejor conocidos que intervienen en la homeostasis de lípidos. La utilidad de CETP como parámetro de diagnóstico se basa en que tiene un papel importante en el metabolismo de las lipoproteínas y en el desarrollo de enfermedad coronaria arterial, ya que tiende a generar altos niveles de LDL y VLDL que se asocian con la progresión de la aterosclerosis (Marotti *et al*, 1993).

En años previos se ha reportado que en humanos con deficiencia genética de CETP los niveles de HDL están muy por encima de los niveles de sujetos normales (hiperalfalipoproteinemia) y que tales individuos parecen tener una menor incidencia de enfermedad coronaria (Inazu *et al*, 1992; Brown *et al*, 1989). Especies que carecen de manera normal de CETP tienen resistencia a este tipo de enfermedades y, sólo cuando se crean individuos transgénicos de estas especies con el gen de CETP humano, se observa el decremento en el tamaño y niveles de HDL y susceptibilidad a sufrir enfermedad coronaria arterial (Rye *et al*, 1995). Por otro lado, en estudios con dietas altas en colesterol, se ha encontrado un complejo patrón de respuesta de los niveles del RNAm de CETP en tejidos periféricos, que resultan en el incremento equivalente de la actividad de CETP en plasma (Oliviera *et al*, 1996); en consecuencia, la expresión de CETP aumenta la susceptibilidad a sufrir enfermedad coronaria arterial inducida por dieta, lo que le confiere el carácter de aterogénica (Rye *et al*, 1995). Simultáneamente, los resultados sugieren una inducción local de la síntesis de CETP que puede ayudar al reciclaje del colesterol depositado en los tejidos periféricos durante la lipólisis de las lipoproteínas (Jiang *et al*, 1991; Nagashima *et al*, 1988; Tall *et al*, 1995). Este transporte al que llamamos "Transporte Reverso de Colesterol", le confiere a la CETP el carácter de proteína anti-



aterogénica, por lo que es importante en la susceptibilidad o resistencia a la aterosclerosis (Kondo *et al*, 1989; Bruce *et al*, 1998).

La CETP es una proteína multifuncional que promueve el intercambio de ésteres de colesterol entre HDL y LDL, y el intercambio de ésteres de colesterol y triacilgliceroles entre HDL y VLDL. Su efecto sobre el catabolismo de las HDL tiene influencia sobre su contenido de ésteres de colesterol, así como sobre su composición, tamaño y estructura esférica (Rye *et al*, 1995; Bruce *et al*, 1998). De acuerdo con todo lo anterior y, a pesar de lo que se planteó en un principio, el factor que determina la capacidad aterogénica o anti-aterogénica de CETP no es su efecto sobre el nivel en plasma de HDL, sino la distribución de tamaños de su población, lo que correlaciona enormemente con los niveles de CETP (Brown *et al*, 1989 y Von Eckardstein *et al*, 2001).

Con base en estos antecedentes, es parte del objetivo de esta tesis presentar el diseño, validación y manejo de un sistema para la cuantificación de CETP, con el que se pretende aportar una herramienta que facilite la identificación oportuna de sujetos asintomáticos con riesgo de aterosclerosis, así como mejorar la eficiencia en la evaluación y manejo de los pacientes ya diagnosticados.

A la fecha se han diseñado varios sistemas para la cuantificación de CETP, de entre los primeros se encuentra una ELISA competitiva, reportada por Guyard -Dangremont *et al* (1994) cuyo diseño utiliza el anticuerpo monoclonal denominado TP1 dirigido contra el C-terminal. Este anticuerpo fue generado por Hesler *et al* en 1988. Clark *et al* (1995) utilizaron dos anticuerpo monoclonales para el desarrollo de dos sistemas, una ELISA en sándwich e IRMA. Thomas *et al* (1996) proponen un par de anticuerpos policlonales, ATM192 y J16-14, como herramientas útiles en técnicas de inmunotransferencia tipo Western y ELISA; sin embargo, están dirigidos contra los residuos 131-142 de los 425 aminoácidos que componen la CETP humana, por lo tanto no reconocen el extremo carboxilo. Sasai *et al* (1998) describen sistemas de ELISA en sándwich, utilizando anticuerpos monoclonales creados por Ko *et al* (1994), dirigidos contra el C-terminal de CETP. Según Saito *et al* (1998), el anticuerpo generado por Ko *et al* (1994), Mab 18-4F, reconoce el epítipo R451-S476, mientras que Mab TP2 reportado por Hesler *et al* (1988), reconoce alrededor del 64% del core central de Mab 18-4F. Otro ejemplo es el reportado por Chang *et al* en 1999, en el que se emplea una prueba de ELISA en sándwich para plasma humano, utilizando los anticuerpos monoclonales TP2 y TP20 originados por Hesler *et al* (1988), el primero de ellos como sustrato y el segundo biotinilado. Con base en estos trabajos se han venido utilizando estos sistemas de ELISA para cuantificación de CETP, tanto en células en cultivo, como en plasma humano; sin embargo, debido a las complicaciones técnicas y a la naturaleza de los equipos requeridos para su uso, estos sistemas son de uso restringido, y no se han podido aplicar en clínica. Tal es el caso de la patente.

estadounidense US05770355, registrada por Brocia *et al* (1998), titulada "Heart disease test kit and method of determining a heart disease risk factor and efficacy of treatment for heart diseases". Esta patente requiere de la síntesis de una partícula artificial y el uso de colesterol acoplado a una molécula fluorescente, lo que limita su uso a laboratorios que cuentan con el equipo necesario para medir fluorescencia.

En esta tesis presentamos el diseño, validación inicial y manejo de un sistema para la cuantificación de CETP, planteado con el propósito de adaptarse a las necesidades del uso en clínica, cuyo registro de patente está en progreso y del cual se ha hecho referencia al inicio del Capítulo II (Nota 4). En dicho registro de patente, se presenta como "Motivo de la Invención" el proporcionar un sistema para detectar y cuantificar los niveles de la CETP, en muestras biológicas y sintéticas, de manera sencilla y rápida, que permita mejorar la detección, diagnóstico y seguimiento de individuos con riesgo de aterosclerosis, con o sin manifestaciones clínicas relacionadas a esta patología, y que se encuentren o no incluidos en grupos de riesgo, esto mediante la incorporación de este sistema a protocolos y equipos de uso rutinario en laboratorios de clínica humana y veterinaria. Con base en el resultado de esta prueba, se puede hacer el seguimiento de los pacientes que ya fueron diagnosticados, evaluar la efectividad de los programas de prevención y, en su caso, la efectividad de las dietas y/o tratamientos.

II.2 Materiales y métodos

II.2.1 OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS ESTÁNDAR

Proteína Recombinante GST/CETPCOH

Se diseñó un juego de los oligonucleótidos que permite la amplificación específica del extremo 3' del DNAC de CETP, de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos de la Capítulo I (I.2.1) de la presente tesis (ver I.2.1). En el diseño se tomó en consideración que la secuencia de DNAC de CETP tiene un alto contenido de G-C (más del 65%), por lo que se establecieron los siguientes parámetros:

SECUENCIA:	DNAC de CETP de conejo, publicada por Nagashima <i>et al</i> en 1988.
SECUENCIA ANALIZADA:	Del nucleótido 1 al nucleótido 1870.
TAMAÑO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS:	De 18 a 30 bases.
TEMPERATURA DE FUSIÓN:	55-80 °C.
CONTENIDO DE G-C:	45-55%.
TAMAÑO DE LOS PRODUCTOS:	400-1000 pb.
NÚMERO MÁXIMO DE COHERENCIA EN BASES CONSECUTIVAS:	
	Oligonucleótido VS. Oligonucleótido (cualquiera) = 4.
	Oligonucleótido VS. Oligonucleótido (solo G-C) = 2.
	Extremo 3' VS. Extremo 3'= 2.

No se adaptaron o adicionaron sitios de restricción.

Las secuencias del juego de oligonucleótidos utilizados en el Capítulo II de esta tesis se presentan como secuencia de Identificación-1 (ID-1) (RAB5 en I.2.1, oligonucleótido sentido) y secuencia de Identificación-2 (ID-2) (RAB6 en I.2.1, oligonucleótido antisentido).

LOCUS:	CETP conejo; 24 nt
DEFINICION:	Oligonucleótido sentido, Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol (CETP) de conejo, RNAm.
FUENTE:	<i>Oryctolagus cuniculus</i> , de DNAC a RNAm.
ORGANISMO:	Conejo Blanco Nueva Zelanda (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) Eukariota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria; Lagomorpha; Leporidae; Oryctolagus
REFERENCIA:	De la base 1391 a la 1414
COMENTARIOS:	Ubicado en el extremo 3' del exón 15 del RNAm de CETP, región codificante. Contenido de G-C de 45.8%, temperatura de fusión 55.9°C.
	1391 1414
	TC ATC AAC CCC GAG ATT ATC ACT C

ID-1. Secuencia del oligonucleótidos sentido, compatible con el oligonucleótido antisentido con secuencia ID-2, en amplificaciones por PCR.

LOCUS:	CETP conejo; 25 nt
DEFINICION:	Oligonucleótido antisentido, Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol (CETP) de conejo, RNAm.
FUENTE:	<i>Oryctolagus cuniculus</i> , de DNAc a RNAm.
ORGANISMO:	Conejo Blanco Nueva Zelanda (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) Eukariota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria; Lagomorpha; Leporidae; Oryctolagus.
REFERENCIA:	Complementario a la secuencia de la base 1852 a la 1828
COMENTARIOS:	Ubicado en la región no codificante del exón 16 del RNAm de CETP contenido de G-C de 48.0%, temperatura de fusión 55.3°C.
	1852 1828
	TCGTTTACTTGAGAGGCAGAGAGAG

ID-2. Secuencia del oligonucleótidos antisentido, compatible con el oligonucleótido sentido con secuencia ID-1, en amplificaciones por PCR.

Este juego de oligonucleótidos genera un producto de PCR de 462 pb de la base 1391 a la 1852, que abarca desde el extremo 3' del exón 15 hasta la región no codificante del exón 16 del RNAm de CETP. La temperatura de alineamiento óptimo es de 59.9 °C, el porcentaje de G-C de 60.4% y la temperatura de fusión es de 83.2 °C. Las condiciones de amplificación se indican en 1.2.1.

El producto de PCR generado con este juego de oligonucleótidos fue clonado en el vector pMosBlueT (Amersham) y, posteriormente, fue subclonado en el vector de expresión pGex-2T (Pharmacia LKB Biothec). De esta manera se generó un plásmido recombinante con el extremo 3' del DNAc de CETP, denominado pGex-2T/CETP3, con secuencia de Identificación-3 (ID-3). El plásmido se transformó en *Escherichia coli* DH5 α para la obtención de la proteína recombinante GST/CETPCOH fusionada a glutathion-S Transferasa (GST) (ver 1.2.3). La secuencia de la sección correspondiente a CETP, en la proteína recombinante GST/CETPCOH, se presenta como secuencia de Identificación-4 (ID-4).

LOCUS: pMosBlueT; 3 nt - CETP conejo, 472 nt
DEFINICION: Extremo 3', del RNAm de CETP de conejo, con un codón del vector pMosBlueT en su extremo 5'. Fragmento subclonado de pMosBlueT a pGex-2T.
FUENTE: *Oryctolagus cuniculus*, de DNAc a RNAm.
ORGANISMO: Conejo Blanco Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*)
Eukariota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria; Lagomorpha; Leporidae; Oryctolagus.
REFERENCIA: De la base 1391 (exón 15) hasta la base 1852 (exón 16).
COMENTARIOS: Codón de terminación de CETP base 496 (negrillas). Codón marcado como pMos (subrayado) acarreado del vector pMosBlueT durante la subclonación en pGex-2T.

pMos	CETP	EXÓN	EXÓN
	1381	15	16
<u>GAT</u>	CTC TTC GAA ATC ATC AAC CCC GAG ATT ATC ACT CTC GAT	GGC	TGC CTG CTG CTG CAG ATG
GAC	TTC GGT TTT CCC AAG CAC CTG CTG GTG GAT TTC CTG CAG AGC CTG AGC TAG		
CAGGGAGCTGGAGACACAAGACACGCTGACGTCTCCGCCCATCGGGGTGGAGGTCAGGGAGTGGGTCCGGAG			
GACGGCGATGGCTCCCAACTCCTTCTGTCTGAAAGACCCCTAGCATGAAAGCAGCATACCCCTGGGCAGGCAT			
CTGGCTGAGCGGTAAGCCAAGCTGGTCAGGACACCTGCCTAGGGTGCTCCGGATCCCAGCTGCCCTGCTAAC			
GTGCACCCTGGGGAGCAGCCGTGCTGGTCCCGCCAGCCACATCGGAGACCCAGACTGAGGTCTCTGGCTCCT			
GGCTTTAGCCTGCCAGTGAGTGGCAGCTAAATCTCTCTGGCTGTCTCTCTCTGCCTCTCAAGTAAACGA			

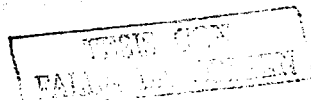
1852

ID-3. Secuencia de nucleótidos del fragmento de CETP recuperado de pMosBlue/CETP3' y subclonado pGex-2T. La clona pGex-2T/CETP3' incluye tres nucleótidos del vector pMos (subrayados) entre la región codificante para GST y la codificante para CETP.

LOCUS: CETP conejo; 33 aa
DEFINICIÓN: Sección correspondiente a CETP en la proteína de recombinante GST/CETPCOH.
FUENTE: *Oryctolagus cuniculus*
ORGANISMO: Conejo Blanco Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*)
Eukariota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria; Lagomorpha; Leporidae; Oryctolagus.
REFERENCIA: Del residuo Ile 464 al Ser 496
COMENTARIOS: Extremo carboxilo; motivo de unión a ésteres de colesterol; alto contenido de estructura α -hélice; responsable de la actividad de transferencia de los ésteres de colesterol. Los residuos Phe 481, Leu 488, Phe 491 y Leu 495 se muestran en negrillas.

NO. DE AA	33
SECUENCIA DE CETP	Ile Asn Pro Glu Ile Ile Thr Leu Asp Gly Cys Leu Leu Leu Gln Met Asp
EN GST/CETPCOH	Phe Gly Phe Pro Lys His Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser
ESTRUCTURA	ALFA HÉLICE
P.M. (Daltons)	3731.1
P.I.	3.99

ID-4. Secuencia de aminoácidos correspondiente a la sección de CETP, en la proteína recombinante GST/CETPCOH, codificada por la clona pGex2T-CETP 3'.



Péptido Sintético CETP H486-S496

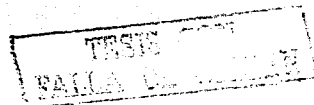
El diseño del péptido sintético tiene como fin la obtención de un anticuerpo con alta especificidad a CETP. El diseño se apoyó en la información obtenida a partir de la secuencia del carboxilo terminal de CETP, como se describe en 1.2.4. Con base en esta información y en los requerimientos del sistema de cuantificación de CETP, diseñamos un péptido sintético tomando en cuenta las siguientes consideraciones:

Que se encuentre incluido dentro del motivo de unión a lípidos neutros. Es decir, entre los últimos 26 residuos del carboxilo terminal de CETP (Wang *et al.*, 1992). De esta manera, el anticuerpo solo puede reconocer la versión de CETP que incluye este epitope. Lo anterior fue tomando en cuenta las observaciones se hicieron sobre CETPI en el Capítulo I.

Que incluya el mayor número posible, de los residuos reportados como importantes para mantener la capacidad de unión a lípidos. Entre los 26 aminoácidos del motivo de unión a lípidos se incluyen los residuos F481, L488, F491 y L495, importantes en la actividad de transferencia de ésteres de colesterol (Tall, 1995). Con esta restricción enfocamos el reconocimiento del anticuerpo contra el motivo de unión a lípidos neutros, implicando a los residuos determinantes de esta actividad.

Que su secuencia no tenga homología con otros epitopes de CETP o de otras proteínas expresadas en mamífero o gallinas. Aunque se pueden obtener anticuerpos usando cualquier modelo animal que no exprese CETP, para obtener el anticuerpo adecuado para este sistema se emplearon gallinas, así se aseguró una fuerte respuesta inmune debida a la diferencia filogenética. Por esta razón, el diseño del péptido no permitió homología con proteínas expresadas en gallinas. Por otro lado, el péptido sintético no tiene homología con otras proteínas de mamífero o de gallina, ni con ningún otro epitope de CETP, así el anticuerpo solo puede reconocer a CETP y solo en un epitope.

Que su tamaño permita el menor número posible de ventanas de reconocimiento por el sistema inmune. El tamaño de una ventana para una hélice antipática esta bien establecida en 11 aminoácidos, en una secuencia de residuos contiguos (Pellegrin *et al.*, 1994). El péptido sintético cumple con esta condición, por lo tanto, los anticuerpos policlonales generados contra él reconocen sólo un epitope, lo que le da la misma o mayor precisión que cualquiera de los anticuerpos monoclonales reportados hasta el momento para al C-terminal d CETP.



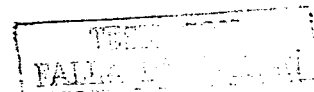
Que tenga un residuo cisteína en su extremo amino, para dirigir su acoplamiento a la proteína acarreadora. Se agregó el residuo cisteína y se acopló a la proteína acarreadora KLH, de manera que se dejó expuesta la ventana de reconocimiento al sistema inmune.

Que se encuentre en una región cuya respuesta inmune haya sido probada. En trabajos anteriores se ha demostrado específicamente que el motivo del extremo carboxilo de CETP humano genera respuesta inmune, obteniendo un anticuerpo monoclonal contra este motivo (Swenson *et al*, 1989). Sin embargo, no se ha determinado cada ventana de reconocida por este anticuerpo, dentro de los 26 aminoácidos que conforman este epitope. Por lo anterior, no se podía descartar la posibilidad de que la secuencia del péptido sintético, diseñado en este trabajo, coincidiera con ventanas de antigenicidad baja o negativa, por lo que nuestro diseño fue probado experimentalmente.

De acuerdo con lo anterior, se diseñó el péptido sintético CETP H486-S496 cuya secuencia se muestra como secuencia de Identificación-5 (ID-5).

LOCUS:	CETP conejo; 12 aa
DEFINICION:	Secuencia de péptido sintético, traducida de la secuencia de nucleótidos del producto de PCR, obtenido con los oligonucleótidos con secuencias de ID-1 e ID-2.
FUENTE:	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
ORGANISMO:	Conejo Blanco Nueva Zelanda (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) Eukariota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria; Lagomorpha; Leporidae; Oryctolagus.
REFERENCIA:	Del residuo His 486 al Ser 496 + Cys en extremo amino.
COMENTARIOS:	Extremo carboxilo; motivo de unión a ésteres de colesterol; alto contenido de estructura α -hélice; responsable de la actividad de transferencia de los ésteres de colesterol. Abarca los residuos Leu 488, Phe 491 y Leu 495 (negrillas).
NO. DE AA	12
PEPTIDO CETP H486-S496	Cys His Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser
ESTRUCTURA	ALFA HELICE
P.M. (Daltons)	1373.9
P.I.	5.09
SOLUBLE EN H ₂ O	a pH 9.5

ID-5. Secuencia del péptido sintético CETP H486-S496, diseñado para la producción del anticuerpo policlonal IgY Anti-CETP H486-S496. Este péptido tiene un residuo cisteína en el extremo amino, que se utilizó para acoplarlo a la proteína acarreadora. Los datos de peso molecular (P.M.), punto isoelectrónico (P.I.) y carga a pH7, fueron obtenidos con ayuda del programa DNASTar (Lasergene), el valor de pH al que el péptido se vuelve soluble en agua se obtuvo experimentalmente.



II.2.2 EL ANTICUERPO IgY Anti-CETP H486-S496

El anticuerpo policlonal Anti-CETP H486-S496, fue obtenido en gallinas blancas de la línea LEGOHRN, inoculadas con el péptido sintético CETP H486-S496. Aunque pueden obtenerse anticuerpos en varios modelos animales que no expresan CETP, se eligió usar gallinas con el fin de obtener títulos más altos. El procedimiento para su obtención se expuso en 1.2.4.

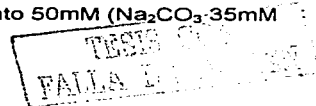
La especificidad del anticuerpo se probó usando diferentes antígenos control, tales como BSA, el péptido sintético CETP H486-S496 y su equivalente en CETPI (descrito en 1.2.4), ambos libres como acoplados a BSA. También se utilizaron las proteínas recombinantes GST/CETPCOH y GST/CETPICOH (descritas en 1.2.3). Además de los antígenos sintéticos, se utilizaron antígenos biológicos como plasma de humano, conejo, gallina y ratón; extractos crudos y depletados de lípidos de tejidos perfundidos (ver 1.2.5) y de ovocitos de *Xenopus laevis*. Con todos estos se realizaron pruebas de reacción cruzada, tanto por técnicas de ELISA como inmunotransferencia tipo Western con diferentes combinaciones de controles negativos y positivos, de acuerdo a la naturaleza de cada uno de ellos. Las condiciones de uso en pruebas de inmunotransferencia tipo Western, tanto del anticuerpo primario, anti-CETP H486-S496, como secundario, Anti-Gallina IgG, (H+L) conjugado a peroxidasa (PIERCE, Rockford, IL, USA), son las mismas que las reportadas en 1.2.5.

II.2.3 MUESTRAS DE PLASMA

Las muestras de plasma se obtuvieron de sujetos donadores en el Banco de Sangre en el Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" del ISSSTE. La población se restringió a sujetos de 17 años en adelante, tanto hombres como mujeres, clínicamente sanos, con al menos 10 horas de ayuno. La selección del grupo de estudio quedó a cargo de los médicos especialistas de esta unidad. En el Capítulo III de esta tesis se presentan los detalles referentes a los criterios de selección de muestras.

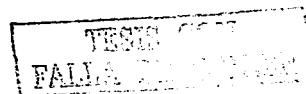
II.2.4 SISTEMA DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CETP

El sistema se basa en el método clásico de ELISA indirecta (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). En ella se utiliza una placa para cultivo celular de 96 pozos (NUNCLON™ Δ Surface, NUNC Denmark), en la que se acopló tanto el antígeno estándar (péptido sintético CETP H486-S496) como las muestras de plasma a cuantificar. Las concentraciones se refirieron en fmol/ml, esta unidad permitió equiparar la concertación del péptido sintético con la de CETP plasmática, lo que no sería posible si ambas se refirieran en $\mu\text{g/ml}$ debido a sus diferencias en peso molecular. La curva estándar abarcó de 2.500 a 0.019 fmoles, en 100 μl de buffer de acoplamiento 50mM (Na_2CO_3 -35mM



/ NaCO₃ 15mM) pH 9.6, en 8 diluciones seriales 1:2. De las muestras de plasma se emplean sólo 10nl (50 µl de dilución 1:5,000), los que no requieren de tratamiento previo alguno. El acoplamiento se hizo toda la noche a 4°C.

Después de retirar los antígenos, se lavó cuatro veces con agua desionizada y se boqueó con 200µl de Ovoalbúmina (0.5mg/ml) en buffer de acoplamiento, durante 2hrs a 37 °C. Al final de la incubación, las placas se lavaron cuatro veces con agua desionizada y se incubaron 100µl del anticuerpo primario policlonal anti-CETP H486-S496 en dilución 1:5000, en PBS-Tween 0.1% (PBST) Ovoalbúmina 0.5mg/ml, durante 2hrs a 37 °C. Después de cuatro lavados con agua desionizada se agregaron 100µl de anticuerpo secundario Anti-Gallina IgG, (H+L) conjugado a peroxidasa (PIERCE, Rockford, IL, USA), en dilución 1:2000, en PBST Ovoalbúmina 0.5mg/ml, durante 2hrs a 37 °C. Al final de la incubación las placas se lavaron cuatro veces con agua desionizada. El revelado se realizó con 100µl de OPD (O-Phenylenediamine Dihydrochloride, SIGMA) en buffer Fosfato-citrato 0.05M, pH5 (SIGMA) y agua oxigenada. Se incubó durante 15min en obscuridad y se detuvo la reacción con 50 µl de H₂SO₄ 1.5M para leer a 490nm. Todo el procedimiento se realizó utilizando placas con tapa y evitando gradientes de temperatura.



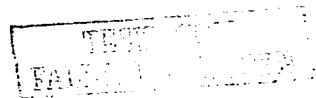
II.3 Resultados

II.3.1 VENTAJAS DEL DISEÑO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO CETP H486-S496

El sistema de detección y cuantificación de CETP requiere de un anticuerpo dirigido específicamente contra el sitio de unión a lípidos neutros, esto para garantizar que sólo se detectará la CETP que conserve este epítotope y, por lo tanto, que conserve la capacidad de unión a lípidos neutros, entre ellos los ésteres de colesterol. A lo anterior, se debe agregar que la variante CETP Δ 9 descrita por Quinet *et al* (1993) conserva el epítotope de unión a lípidos neutros, aunque es inactiva en la transferencia de lípidos. CETP Δ 9 es potencialmente detectable por el anticuerpo anti-CETP H486-S496, sin embargo, se sabe que es secretada pobremente al medio extracelular y no se tienen reportes de su presencia en plasma, por lo que su efecto en la cuantificación de CETP mediante este sistema será mínimo o nulo.

Por otro lado, en el capítulo anterior de esta tesis se describe una versión de la CETP carente del motivo de unión a ésteres de colesterol, CETPI o CETP Δ 16, que a su vez carece de la capacidad de unión a lípidos neutros. La versión CETP Δ 16 se encuentra en cantidades importantes en el plasma y podría ser detectada por anticuerpos dirigidos contra epítotopes anteriores al exon 16. Como ejemplo de esto, Jeong *et al* (1994) generaron una proteína de fusión GST y 31 aa del C-terminal de CETP humana, llamada GST/CETPIV. Esta clona incluye los aminoácidos 486 al 496, equivalentes a la secuencia de nuestro péptido sintético, y se uso para generar anticuerpos policlonales. Sin embargo, los anticuerpos dirigidos contra GST/CETIV pueden reconocer a la CETP (activa) y a la isoforma CETP Δ 16, que carece del motivo de unión a ésteres de colesterol. Esto se debe a que los anticuerpos anti-GST/CETPIV pueden reconocer una sección del exon 15 (NPEIITRD) de CETP humana, presente en ambas isoformas (CETP y CETP Δ 16), lo que lo hace inespecífico de CETP.

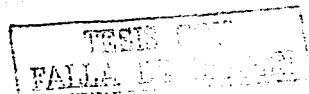
El anticuerpo, descrito en este y en el anterior capítulo, es específico para este sistema ya que no reconoce a CETP Δ 16, lo que se demostró experimentalmente en el Capítulo I. Evitar que el anti-CETP H486-S496 reconozca otra proteína presente en el plasma de mamíferos, o cualquier otro epítotope de CETP, es una medida de seguridad que evita falsos positivos y cuantificaciones erróneas. Por esto, se descartó como antígeno a la CETP completa, purificada de cualquier especie de mamífero, y en su lugar se utilizó un péptido sintético que puede obtenerse con alta pureza y, de acuerdo con su diseño, permite generar anticuerpos contra un epítotope específico.



El péptido sintético CETP H486-S496 con secuencia ID-5, tiene las siguientes características: Su secuencia corresponde del residuo H486 al S496 de CETP de conejo, es decir, los últimos once residuos de la proteína, la secuencia tiene estructura α -helice, por lo tanto presenta sólo una ventana de reconocimiento al sistema inmune. Por lo tanto, la región reconocida por este anticuerpo es menor a la de anticuerpos policlonales reportados por otros autores, entre ellos Roy *et al* en 1996, cuyos anticuerpos se han utilizado ampliamente en investigación y para cuantificación de CETP, trabajos que discutiremos mas adelante. La secuencia de CETP H486-S496 se encuentra dentro del motivo de unión a ésteres de colesterol e incluye residuos L488, F491 y L495, tres de los cuatro de especial importancia para mantener la capacidad de unión a lípidos. No tiene homología con otros epitopes de CETP ni con otras proteínas de mamífero o gallina; en cambio, la región carboxilo terminal de CETP elegida es altamente conservada en varias especies de mamíferos: 100% entre humano, conejo y mono, y 90% con hámster. En cuanto a su capacidad antigénica, quedó demostrada mediante la obtención del anticuerpo policlonal Anti-CETP H486-S496.

Saito *et al* (1999) reporta varios péptidos sintéticos con secuencias similares al nuestro. Sin embargo, por las características de sus secuencias algunos de ellos son insolubles, aun con el tratamiento de NH_3 que reportan los autores. Es especialmente interesante que uno de los péptidos insolubles tiene una secuencia casi idéntica a la nuestra, la diferencia radica en que no incluye el residuo cisteína en su extremo amino. Este residuo le confiere solubilidad a pH10, por lo que no requiere el tratamiento NH_3 . La solubilidad del péptido es una propiedad indispensable para el funcionamiento de este método de cuantificación.

Por otro lado, la purificación de la proteína recombinante es más sencilla y rápida que la purificación de CETP de plasma; se puede obtener mayor cantidad de proteína recombinante de cultivos bacterianos que CETP de plasma. La pureza de preparaciones recombinantes es mayor que de las purificaciones de plasma, a mayor pureza se reduce el riesgo de falsos positivos y cuantificaciones erróneas. La generación de proteínas recombinantes puede hacerse bajo condiciones controladas a diferencia de los que sucede en muestras biológicas que dependen de una gran cantidad de variables donde la mayoría de estas no pueden ser controladas. Por último, la proteína recombinante incluye solo el extremo carboxilo, por lo que no solo se evita la reacción cruzada contra otras proteínas, sino contra otros epitopes de CETP.



11.3.2 PROPIEDADES DEL ANTICUERPO IgY anti-CETP H486-S496

Se confirmó la especificidad de IgY anti-CETP utilizando diferentes antígenos control, negativos y positivos, en Inmunotransferencia tipo Western. Se utilizaron muestras de plasma normolipidémico, tanto humano como de conejo, que se muestran en la figura 1A. Como puede observarse, IgY anti-CETP reconoce una banda de 66 kDa que corresponde a CETP humana y una de 68 kDa que corresponde a CETP de conejo. Puede tomarse como referencia la figura 1D, en la que se muestra plasma humano y 3 μ g de BSA incubados con IgY anti-BSA, donde se observa una banda de 67 kDa correspondientes al peso molecular de BSA.

Otros antígenos fueron empleados como controles positivos y negativos, tanto en Inmunotransferencia tipo Western como en ELISA. La figura 1B muestra una Inmunotransferencia tipo Western con las proteínas recombinantes GST/CETPCOH (control positivo) y GST/CETPICOH (control negativo), en la que se observa una banda de 67 kDa que corresponde al peso de GST/CETPCOH. En la figura 1C se muestran los controles negativos plasma de gallina y extracto crudo de ovocito de *Xenopus laevis*. Puede observarse que no hay reconocimiento inespecífico en ninguno de los casos. Los péptidos sintéticos CETP H486-S496 y su equivalente en CETPI, tanto libres como acoplados a KLH, fueron utilizados como control positivo y negativo, respectivamente, en ELISA. Además de los controles ya mencionados, se incluyeron plasma de ratón y extractos crudos de *Escherichia coli* y de diferentes tejidos, así como el correspondiente control negativo de cada prueba con IgYs preinmunes (Datos no mostrados).

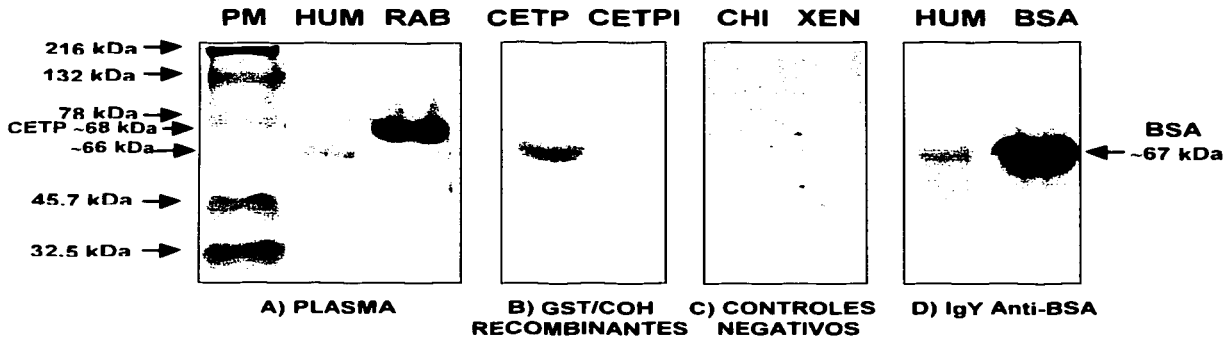


Figura 1. Inmunotransferencia. IgY anti-CETP contra plasma normolipidémico humano (HUM) y de conejo (RAB) (panel A), proteínas recombinantes control GST/CETPCOH y GST/CETPICOH (panel B), controles negativos plasma de gallina (CHI) y extracto crudo de ovocito *X. laevis* (XEN) (panel C). Control positivo IgY anti-BSA contra plasma humano (HUM) y BSA (panel D).

II.3.3 CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA PRUEBA DE ELISA

Capacidad de detección

Experimentalmente se establecieron los límites máximo y mínimo de detección de este sistema, usando como antígeno estándar al péptido sintético CETP H486-S496. Se probaron diferentes rangos de detección, y finalmente se determinó que el nivel máximo de detección confiable es de $0.01\mu\text{g}$ (7.27855×10^3 fmoles) y el mínimo de $1 \times 10^{-8} \mu\text{g}$ (7.27855×10^{-3} fmoles); estos resultados se muestran en la figura 2. Esta figura representa el resumen de un grupo de experimentos, donde los estándares, así como las diferentes combinaciones de controles positivos y negativos se aplicaron por duplicado. En ella se muestra la relación entre la concentración del péptido sintético (Log_{10}) contra el porcentaje de densidad óptica (DO) observado en cada caso. El valor de correlación entre estos datos es de 0.96.

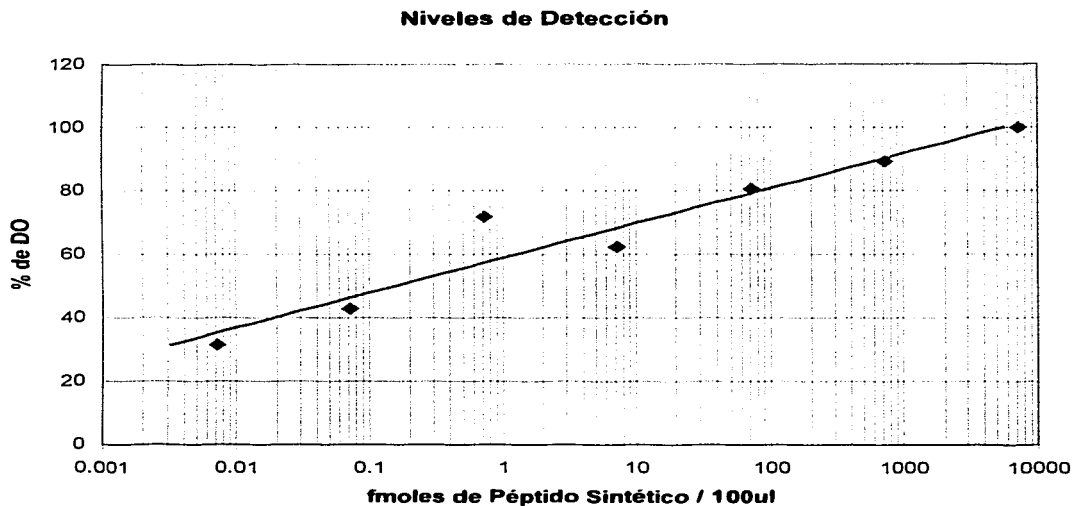
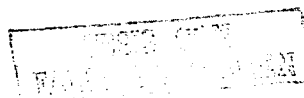


Figura 2. Capacidad de detección de anti-CETP IgY, en el sistema de cuantificación de CETP por técnica de ELISA. Log_{10} de la concentración del péptido sintético en $\text{fmol} / 100\mu\text{l}$ V.S. % de DO, $r = 0.96$. (♦) Datos experimentales, (—) Datos calculados.



Se probó también la capacidad de detección del sistema en diluciones de plasma humano. Con muestras provenientes de diferentes individuos, se probaron varios rangos de diluciones, finalmente se establecieron cuatro diluciones seriales de 1:2, que va de 1:1000 a 1:8000. En la figura 3 se observan los resultados obtenidos en tres experimentos diferentes con dos muestras de plasma, utilizando alícuotas de las mismas muestras. La concentración de CETP se reporta en fmol/50 μ l de dilución, cada muestra se tituló por triplicado. La gráfica representa la media de cada dilución con su respectiva desviación estándar.

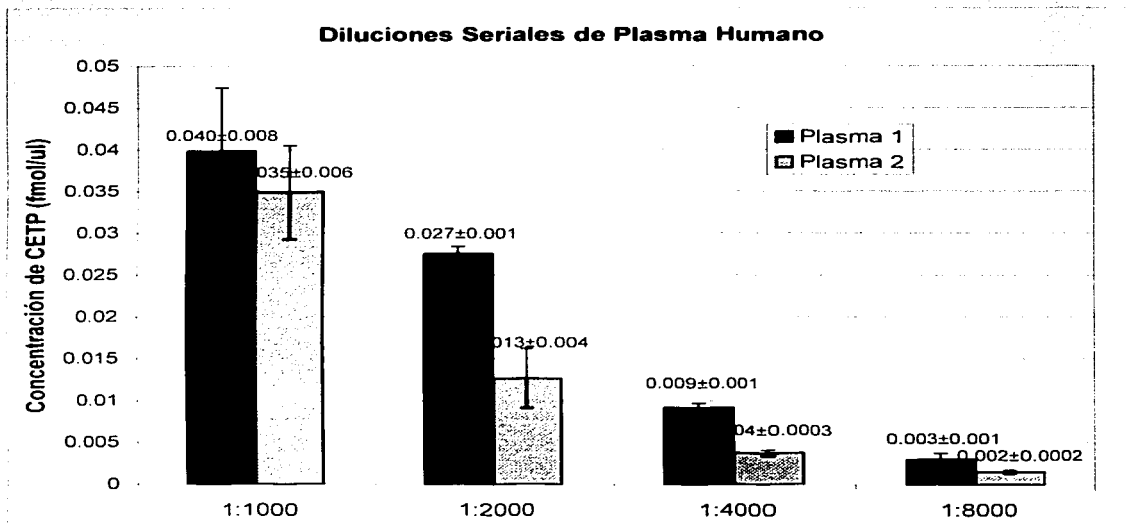


Figura 3. Concentración de CETP en diluciones seriales 1:2 de plasma humano, de 1:1000 a 1:80000. Se muestran las medias de tres experimentos realizados con alícuotas de las mismas muestras de plasma y sus correspondientes DS. Plasma 1 $r = 0.99$, Plasma 2 $r = 0.99$

Precisión y reproducibilidad del ensayo

De manera simultánea a las pruebas con plasma se calibró una curva estándar, acorde a la concentración de 1.1 μ g/ml de CETP plasmática reportada por Ritsch *et al* en 1993. La cantidad de CETP esperada, en 50 μ l de las diluciones mostrada en la figura 3, va de 5.5×10^{-2} a 6.87×10^{-3} μ g (1.04 a 0.13 fmoles) por pozo. En la curva se empleó el péptido sintético CETP H486-S496 en diluciones seriales 1:2, de 2.5 a 0.019 fmoles (el último punto corresponde a 0 fmoles) por pozo. En



todas las pruebas se incluyó una combinación de controles positivos y negativos, todos por duplicado. En la figura 4 se muestra un ejemplo de la curva estándar, en cada punto se graficó la media de 5 experimentos, realizados en diferentes fechas, incluidas sus respectivas desviaciones estándar.

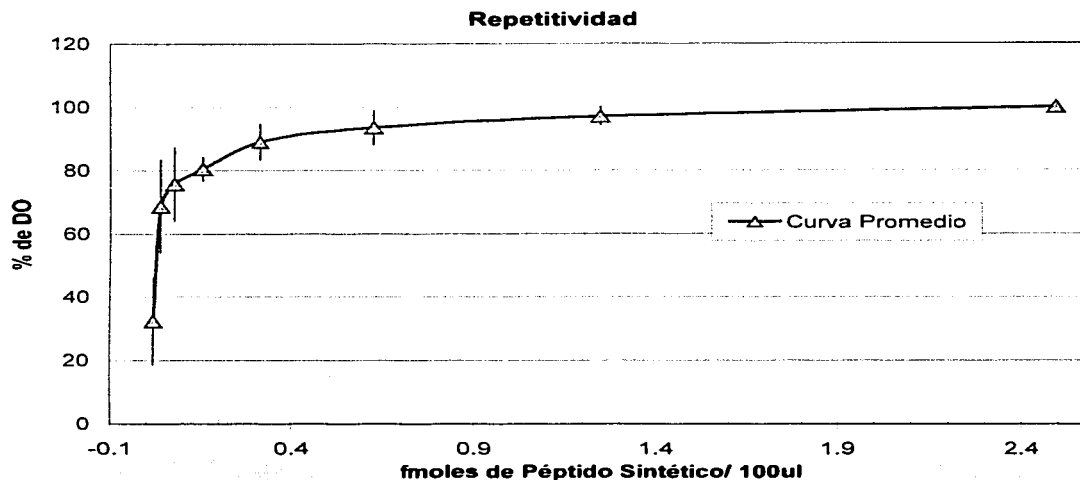
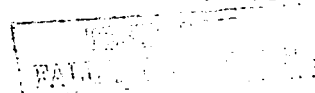


Figura 4. Curva estándar, calibrada a partir de la concentración de CETP esperada en las diluciones de plasma humano, con base en la prueba de capacidad de detección mostrada en la figura 3. Concentración de CETP en fmol/100µl V.S. % de Densidad Óptica.

Como puede observarse, los datos muestran un comportamiento logarítmico, el que puede ser descrito por la ecuación:

$$y = a - b \ln(x + c)$$

Donde las constantes $a = 90,50$, $b = -9,50$ y $c = 0,00037$ son aplicables a todos los ensayos, siempre y cuando se efectúen bajo los términos de concentración aquí referidos (2.5 a 0.0 fmol/100µl, usando el péptido sintético V.S. % de DO). Conforme a esta ecuación, se calculó la concentración de CETP en las muestras de plasma graficadas en la figura 3. La concentración del Plasma 1 es de $2.06 (\pm 0.61) \mu\text{g/ml}$ y la del Plasma 2 es de $1.264 (\pm 0.53) \mu\text{g/ml}$. Esto corresponde con los valores de CETP reportados en plasma humano que varían alrededor de 1.8 y 2 $\mu\text{g/ml}$ ($3.38976 \times 10^{-4} - 3.7664 \times 10^{-4} \text{ fmol/ml}$) (Kiyohara *et al*, 1998).



Determinación de CETP en muestras de plasma humano

Se hicieron ensayos utilizando las condiciones para la ELISA definidas en las secciones anteriores y referidas en Materiales y Métodos de este capítulo. Con ellas se hizo la determinación de 22 muestras de plasma humano. En la gráfica 5 se muestra el resultado de estas determinaciones, en ella se expresa la concentración de CETP en fmoles por pozo, es decir en 50 μ l de dilución 1:2,000. A partir de este valor se calculó la concentración de CETP plasmática para cada muestra.

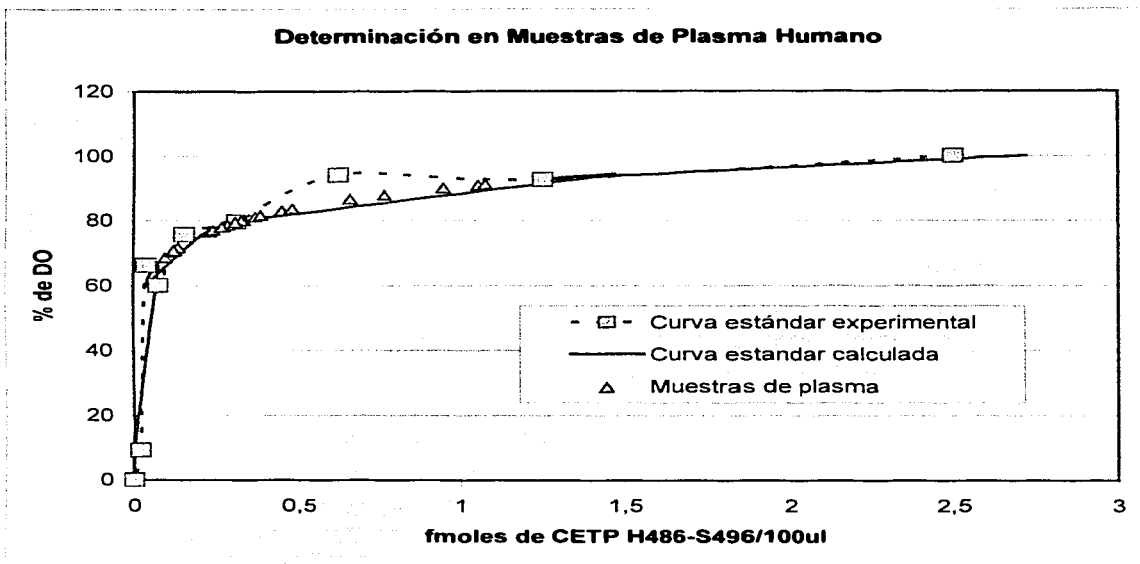


Figura 5. Curva estándar experimental y calculada de una prueba de ELISA, usada para la determinación de 22 muestras de plasma humano. Se usó el péptido sintético CETP H486-S496 como antígeno estándar.

De acuerdo con estos resultados, los niveles de la CETP en este grupo de sujetos es de 2.2 \pm 1.6 μ g de CETP/ml de plasma. La DS indica una amplia variación de datos en esta muestra. Este comportamiento difiere del reportado en otras poblaciones, lo que se discutirá en el capítulo siguiente.

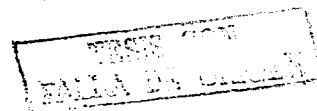


Lo reportado hasta este momento es una breve descripción de la validación y forma de uso del "Sistema de cuantificación de CETP", diseñado para manejar hasta 39 muestras en cada caja, por duplicado, en un protocolo que incluye la curva estándar y al menos un control negativo, todos por duplicado. Experimentalmente hemos descartado falsos positivos mediante el uso de una combinación de controles negativos y positivos, pero se debe incluir un control negativo con el fin de considerar el error experimental propio del usuario del sistema.

El Capítulo II de la presente tesis se basa en la información original que se presentó en una Aplicación Internacional de Patente (PCT), con número de publicación WO 02/32935 A1, misma que en este momento se encuentra en trámite en las oficinas "Internacional", "Mexicana", "Canadiense", de "Estados Unidos" y de la "Comunidad Europea" para registro de patentes, bajo el Tratado Internacional de Cooperación de Patentes. En ella se estipula que:

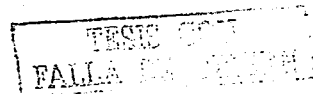
"La presente invención consiste en un sistema para detectar y cuantificar la CETP. Este sistema requiere el uso de la proteína recombinante GST/CETPCOH, el péptido sintético CETP H486-S496 y el anticuerpo policlonal Anti-CETP H486-S496. El uso de este sistema permite identificar evaluar y dar seguimiento a pacientes con dislipidemias, cuyos efectos estén relacionados con alteraciones del nivel de CETP circulante en plasma, con la finalidad de evaluar su riesgo de desarrollar aterosclerosis. Se pueden emplear muestras de diferentes orígenes, tanto biológico como sintético, preferentemente plasma o suero, extractos celulares o de tejidos, medios de cultivo y antígenos purificados o semipurificados".

El sistema descrito anteriormente es la base para el diseño de un kit de diagnóstico, útil para determinar los niveles de CETP en un gran número de muestras de manera rápida y sencilla, lo que no existe hasta el momento. Este kit se diseñó para su uso en clínica utilizando muestras de plasma o suero; sin embargo puede adaptarse con facilidad a muestras de diferentes orígenes, biológico como sintético. Puesto que CETP es una proteína muy conservada en mamíferos, el sistema es capaz de reconocer la CETP en plasma de especies que la expresen de manera natural, o en organismos transgénicos con este gen, entre tanto conserven homología con los últimos 11 residuos del carboxilo terminal. Por lo tanto, este sistema puede ser útil tanto en investigación como en el laboratorio clínico humano o veterinario. La utilidad de este "Sistema de cuantificación para CETP" en el diagnóstico de riesgo de aterogénesis tiene su evaluación inicial en un estudio piloto que se presenta en el siguiente capítulo de esta tesis.



II.4 BIBLIOGRAFÍA

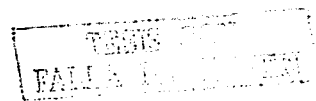
1. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Steffensen R, Jensen G, Tybjaerg-Hansen A: Elevated HDL cholesterol is a risk factor for ischemic heart disease in white women when caused by a common mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene. *Circulation* 101(16):1907-12, 2000
2. Agerholm-Larsen B, Tybjaerg-Hansen A, Schnohr P, Steffensen R, Nordestgaard BG: Common cholesteryl ester transfer protein mutations, decreased HDL cholesterol, and possible decreased risk of ischemic heart disease: The Copenhagen City Heart Study. *Circulation* 102(18):2197-203, 2000
3. Brocia R W (US), Swenson TL (US): Diagnostic kit for cholesterol ester transfer protein (CETP) activity measurement and synthetic particle used therein. US5618683. 1997-04-08
4. Brown ML, Inazu A, Hesler CB, Agellon LB, Mann C, Whitlock ME, Marcel YL, Milne RW, Koizumi J, Mabuchi H: Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins. *Nature* 342(6248): 448-451, 1989
5. Bruce C, Chouinard RA, Tall AR: Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. *Annu Rev Nutr* 18:297-330, 1998
6. Chang CK, Tso TK, Snook JT, Zipf WB, Lozano RA: Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for plasma cholesteryl ester transfer protein concentration. *Clin Biochem* 32(4):257-262, 1999
7. Clark RW, Moberly JB, Bamberger MJ: Low level quantification of cholesteryl ester transfer protein in plasma subfractions and cell culture media by monoclonal antibody-based immunoassay. *J Lipid Res* 36(4):876-89, 1995
8. Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S Jr, Fuster V: AHA/ACC scientific statement: Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol* 34(4):1348-59, 1999
9. Guyard-Dangremont V, Lagrost L, Gambert P, Lallemand C: Competitive enzyme-linked immunosorbent assay of the human cholesteryl ester transfer protein (CETP). *Clin Chim Acta* 231(2):147-160, 1994
10. Hesler CB, Tall AR, Swenson TL, Weech PK, Marcel YL, Milne RW: Monoclonal antibodies to the Mr 74,000 cholesteryl ester transfer protein neutralize all of the cholesteryl ester and triglyceride transfer activities in human plasma. *J Biol Chem* 15;263(11):5020-3, 1988
11. Hsu LA, Ko YL, Hsu KH, Ko YH, Lee YS: Genetic variations in the cholesteryl ester transfer protein gene and high density lipoprotein cholesterol levels in Taiwanese Chinese. *Hum Genet* 110(1):57-63, 2002



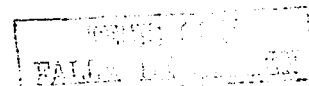
12. Inazu A, Quinet EM, Wang S, Browun ML, Stevenson S, Barr ML, Moulin P, Tall AR: Alternative splicing of the mRNA encoding the human cholesteryl ester transfer protein. *Biochemistry* 31(8): 2352-2358, 1992
13. Jeong NW, Yoon WH, Choi MS, Huh TL, Yoon CS, Kwak JW, Bok SH, Perk YB: Production of specific antibodies against human cholesteryl ester transfer protein using C-terminal active peptide obtained by fusional expression of cholesteryl ester transfer protein cDNA. *Mol Cell* 4: 529-533, 1994
14. Jiang XC, Moulin P, Quinet E, Goldberg IJ, Yacoub LK, Agellon LB, Compton D, Schnitzer-Polokoff R, Tall AR: Mammalian adipose tissue and muscle are major sources of lipid transfer protein mRNA. *J Biol Chem* 266(7): 4631-4639, 1991
15. Kiyohara T, Kiriyama R, Zamma S, Inazu A, Koizumi J, Mabuchi H, Chichibu K: Enzyme immunoassay for cholesteryl ester transfer protein in human serum. *Clin Chim Acta* 271(2):109-118, 1998
16. Ko KW, Ohnishi T, Yokoyama S: Triglyceride transfer is required for net cholesteryl ester transfer between lipoproteins in plasma by lipid transfer protein. Evidence for a hetero-exchange transfer mechanism demonstrated by using novel monoclonal antibodies. *J Biol Chem* 269: 28206-28213, 1994
17. Kondo I, Berg K, Drayna D, Lawn R: DNA polymorphism at the locus for human cholesterol ester transfer protein (CETP) is associated with high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein levels. *Clin Genet* 35: 49-56, 1989
18. Lerman GI: Cardiopatía isquémica aterosclerosa. En *Atención integral del paciente diabético*, Lerman GI Ed. Interamericana, p. 233-240, 1994
19. Marotti KR, Castle CK, Boyle TP, Lin AH, Murray RW, Melchior GW: Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein. *Nature* 364(6432): 73-75, 1993
20. Morato HL, Posadas RC: Diagnóstico y tratamiento de las dislipidemias. En *Atención integral del paciente diabético*, Lerman GI Ed. Interamericana, p. 223-232, 1994
21. Moriyama Y, Okamura T, Inazu A, Doi M, Iso H, Mouri Y, Ishikawa Y, Suzuki H, Iida M, Koizumi J, Mabuchi H, Komachi Y: A low prevalence of coronary heart disease among subjects with increased high-density lipoprotein cholesterol levels, including those with plasma cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Prev Med* 27(5 Pt 1):659-667, 1998
22. Nagashima M, McLean J, Lawn RM: Cloning and mRNA tissue distribution of rabbit cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res* 29: 1643-1649, 1988
23. Oliviera H, Chouinard R, Agellon L, Bruce C, Ma M, Walsh A, Breslow JL, Tall AR: Human cholesteryl ester transfer protein gene proximal promoter contains dietary cholesterol positive responsive elements and mediates expression in small intestine end periphery while



- predominant liver and spleen expression is controlled by 5'-distal sequences. *J Biol Chem* 271(50): 31831-81838, 1996
24. Pellequer JL, Westhof E, Van-Regenmortel MV: Epitope predictions from the primary structure of proteins. *En Peptide Antigens*, Wisdom GB Ed. IRL PRESS, p. 7-25, 1994
 25. Quinet E, Yang TP, Marinos C, Tall A: Inhibition of the cellular secretion of cholesteryl ester transfer protein by a variant protein formed by alternative splicing of mRNA. *J Biol Chem* 268(23):16891-16894, 1993
 26. Ritsch A, Auer B, Föger B, Schwarz S, Patsch JR: Polyclonal antibody-based immunoradiometric assay for quantification of cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res* 34: 673-679, 1993
 27. Roy P, MacKenzie R, Hiramata T, Jiang XC, Kussie P, Tall A, Rassart E, Milne R: Structure-function relationships of human cholesteryl ester transfer protein: analysis using monoclonal antibodies. *J Lipid Res* 37(1):22-34, 1996
 28. Rye KA, Hime NJ, Barter PJ: The influence of cholesteryl ester transfer protein on the composition, size, and structure of spherical, reconstituted high density lipoproteins. *J Biol Chem* 270(1): 189-196, 1995
 29. Sasai K, Okumura-Noji K, Hibino T, Ikeuchi R, Sakuma N, Fujinami T, Yokoyama S: Human cholesteryl ester transfer protein measured by enzyme-linked immunosorbent assay with two monoclonal antibodies against rabbit cholesteryl ester transfer protein: plasma cholesteryl ester transfer protein and lipoproteins among Japanese hypercholesterolemic patients. *Clin Chem* 44(7):1466-1473, 1998
 30. Saito K, Kobori K, Hashimoto H, Ito S, Manabe M, Yokoyama S: Epitope mapping for the anti-rabbit cholesteryl ester transfer protein monoclonal antibody that selectively inhibits triglyceride transfer. *J Lipid Res* 40:2013-2021, 1999
 31. Swenson T, Hesler CB, Brown ML, Quinet E, Trotta PP, Haslanger MF, Gaeta FC, Marcel YL, Milne RW, Tall AR: Mechanism of cholesteryl ester transfer protein inhibition by a neutralizing monoclonal antibody and mapping of the monoclonal antibody epitope. *J Biol Chem* 264:14318-14326, 1989
 32. Tall A: Plasma lipid transfer proteins. *Annu Rev Biochem* 64: 235-257, 1995
 33. Thomas AP, Smith AM, Cumming RI, Jones C, Thomas RC, Pleasants KT, Barakat H: Mouse monoclonal antipeptide antibodies specific for cholesteryl ester transfer protein (CETP). *Hybridoma* 15(5): 359-64, 1996
 34. Von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G: High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(1): 13-27, 2001

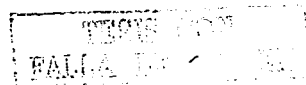


35. Wang S, Deng L, Milne RS, Tall-AR: Identification of a sequence within the C-terminal 26 amino acids of cholesteryl ester transfer protein responsible for binding a neutralizing monoclonal antibody and necessary for neutral lipid transfer activity. J Biol Chem 267(25):17487-17490, 1992
36. Zhuang Y, Wang J, Qiang H, Li Y, Lui X, Li L, Chen G: Serum cholesteryl ester transfer protein concentrations in healthy Chinese subjects and cardio-cerebrovascular disease patients. Clin Chim Acta 305(1-2):19-25, 2001



Capítulo II

II.5 ANEXO



(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



EL PAIS QUE SE INDICA EN ESTE TITULO ES EL PAIS QUE SE HA DESIGNADO COMO PAIS DE ORIGEN DE LA SOLICITUD

(43) Fecha de publicación internacional
25 de Abril de 2002 (25.04.2002)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 02/32935 A1

- (51) Clasificación Internacional de Patentes: C07K 7/06, 19/00, 14/47, A61K 39/395, G01N 33/57, 33/557, 33/68
- (21) Número de la solicitud internacional: PCT/MX00/00053
- (22) Fecha de presentación internacional:
13 de Diciembre de 2000 (13.12.2000)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
9911575 13 de Diciembre de 1999 (13.12.1999) MX
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NIEN-ICO [MX/MX]; Edificio "B", 3er Piso, Zona Cultural, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, México, D.F. 04510 (MX).
- (72) Inventores: c
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): ALONSO GARCIA, Ana Lucía [MX/MX]; Calle Justo Alvarez 96, Col. Constitución de la República, México, D.F. 07469 (MX); MAS OLIVA, Jaime [MX/MX]; Calle Laja 103, Col. Jardines del Pedregal, México, D.F. 01900 (MX).
- (81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NG, NZ, OL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Estados designados (regional): patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), patente europea (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:
con informe de búsqueda internacional
- Para códigos de las letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

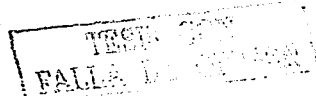


WO 02/32935 A1

(54) Title: IMMUNOENZYMATIC QUANTIFICATION METHOD
(54) Título: METODO INMUNOENZIMATICO PARA CUANTIFICAR

(57) Abstract: The invention relates to an immunoenzymatic method for the quantification of protein C1EP in plasma, which requires the utilization of fusion protein GST/C1EP, the synthetic peptide C1EP 11486-S496 and polyclonal antibody anti-C1EP 11486-S496. The method is used in the study of pathologies involving alterations in the C1EP levels in plasma or in seric lipids and makes it possible to detect, evaluate and follow-up patients suffering from dyslipidemia and/or risk of atherogenesis.

(57) Resumen: Método inmunoenzimático para cuantificar la proteína C1EP en plasma que requiere el uso de la proteína de fusión GST/C1EP, el péptido sintético C1EP 11486-S496 y el anticuerpo policlonal anti-C1EP 11486-S496. Este método se aplica en el estudio de patologías que implican alteraciones de los niveles de C1EP en plasma o niveles de lípidos séricos y permite la detección, evaluación y seguimiento de pacientes con dislipidemia y/o riesgo de atherogenesis.



Presentation: Image:

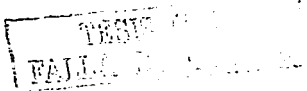
Français

1 of 1

PCT

World Intellectual Property Organization
International Bureau(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT
COOPERATION TREATY (PCT)

<p>(51) International Patent Classification⁷ C07K 7/06, 19/00, 14/47, A61K 39/395, G01N 33/57, 33/557, 33/68</p>	A1	<p>(11) International Publication Number WO 02/32935</p> <p>(43) International Publication Date 25 April 2002 (25.04.2002)</p>
<p>(21) International Application Number PCT/MX00/00053</p> <p>(22) International Filing Date 13 December 2000 (13.12.2000)</p> <p>(30) Priority Data 9911575 13 December 1999 (13.12.1999) MX</p> <p>(71) Applicant: UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO Edificio "B", 3er Piso, Zona Cultural, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, México, D.F. 04510; (MX) [MX/MX]. (for all designated States except US)</p> <p>(72)(75) Inventors; and Inventors/Applicants: ALONSO GARCIA, Ana Lucía Calle Justo Alvarez 96, Col. Constitución de la República, México, D.F. 07469; (MX) [MX/MX]. MAS OLIVA, Jaime Calle Laja 103, Col. Jardines del Pedregal, México, D.F. 01900; (MX) [MX/MX].</p> <p>(74) Agent OJESTO MARTINEZ PORCAYO, Daniel Edificio "B", 3er Piso, Zona Cultural, C.P. 04510 Mexico, D.F., Delegación Coyoacán; (MX).</p>	<p>(81) Designated States (national) AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW</p> <p>(84) Designated States (regional) ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)</p> <p>For information on time limits for entry into the national</p>	



for entry into the national
phase please click here
Published
with international search
report

(54) Title IMMUNOENZYMATIC QUANTIFICATION METHOD
No Image Available.

(57) Abstract

The invention relates to an immunoenzymatic method for the quantification of protein CETP in plasma, which requires the utilization of fusion protein GST/CETP, the synthetic peptide CETP H486-S496 and polyclonal antibody anti-CETP H486-S496. The method is used in the study of pathologies involving alterations in the CETP levels in plasma or in seric lipids and makes it possible to detect, evaluate and follow-up patients suffering from dyslipidemia and/or risk of atherogenesis.



Presentation:

Front



Image:

Small



Français



TESTE COE
FALLA DE INGEN

CONVENIO DE COLABORACION PARA DESARROLLO DE TECNOLOGIA QUE CELEBRAN POR UNA PARTE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO EN LO SUCESIVO "LA UNAM", REPRESENTADA EN ESTE ACTO POR SU COORDINADOR DE LA INVESTIGACION CIENTIFICA, DR. RENE DRUCKER COLIN, CON LA ASISTENCIA DEL DIRECTOR DEL INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR, DR. GEORGES DREYFUS CORTES Y POR LA OTRA PARTE, LABORATORIOS SILANES, S.A. DE C.V., EN LO SUCESIVO "SILANES" REPRESENTADA EN ESTE ACTO POR SU VICEPRESIDENTE DE INVESTIGACION Y DESARROLLO, LIC. JUAN LOPEZ DE SILANES, AL TENOR DE LAS SIGUIENTES DECLARACIONES Y CLAUSULAS:

DECLARACIONES

I. DECLARA "LA UNAM":

1. Ser una corporación pública, organismo descentralizado del Estado, dotado de plena capacidad jurídica y que tiene por fines impartir educación superior para formar profesionistas, investigadores, profesores universitarios y técnicos útiles a la sociedad, organizar y realizar investigaciones, principalmente acerca de las condiciones y problemas nacionales, y extender con la mayor amplitud posible los beneficios de la cultura, según lo dispuesto por el artículo 1º de su Ley Orgánica en vigor, publicada en el Diario Oficial de la Federación del 6 de enero de 1945.
2. Que su representación legal corresponde al Rector, Dr. Juan Ramón de la Fuente Ramírez, de conformidad con los artículos 9º de su Ley Orgánica y 30 del Estatuto General de la Universidad Nacional Autónoma de México en vigor, teniendo facultades para delegar su representación según lo dispuesto por el artículo 34, fracción I de dicho Estatuto.
3. Que el Dr. René Drucker Colín, en su carácter de Coordinador de la Investigación Científica, se encuentra plenamente facultado para suscribir el presente convenio, de conformidad con el *Acuerdo que delega y distribuye competencias para efectos de la suscripción de convenios, contratos y demás instrumentos consensuales en que la Universidad sea parte*, expedido por el Rector y publicado en la Gaceta UNAM del 5 de junio de 2000.
4. Que dentro de su estructura académico-administrativa se encuentra el Instituto de Fisiología Celular, el cual cuenta con la infraestructura y los recursos suficientes para dar cumplimiento al objeto de este convenio.

5. **Que para la ejecución del objeto materia del presente convenio, señala como su domicilio el del Instituto de Fisiología Celular, ubicado en el Circuito Exterior s/n de Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C.P. 04510, México, Distrito Federal.**
6. **Que para los efectos legales de este instrumento señala como su domicilio el ubicado en el 9º piso de la Torre de Rectoría, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C.P. 04510, México, Distrito Federal.**

II. DECLARA "SILANES":

1. **Que es una sociedad anónima de capital variable, constituida legalmente de acuerdo con las leyes mexicanas, según consta en la Escritura Pública número 32,899 de fecha 22 de febrero de 1982, otorgada ante la fe del Notario Público número 88 del Distrito Federal, Lic. Jorge Tinoco Ariza, e inscrita en el Registro Público de la Propiedad y del Comercio con el folio mercantil 059, de fecha 28 de septiembre de 1983.**
2. **Que el Sr. Lic. Juan López de Silanes en su carácter de Vicepresidente de Investigación y Desarrollo, está facultado para la firma del presente convenio, como lo acredita con la Escritura Pública número 34,760 de fecha 12 de septiembre de 1983, otorgada ante la fe del Notario Público número 88 del Distrito Federal, Lic. Jorge Tinoco Ariza, e inscrita en el Registro Público de la Propiedad y del Comercio del Distrito Federal con el folio mercantil número 5,970 de fecha 18 de octubre de 1983, sin que hasta el momento se le hayan revocado o limitado dichas facultades.**
3. **Que dentro de las actividades de su objeto social se encuentran:**
 - a) **La fabricación, producción, maquila, representación, comisión, importación, exportación, distribución, adquisición, enajenación y comercio en general de toda clase de productos químicos, farmacéuticos y productos de tocador en general, así como todo objeto susceptible de comercio.**
 - b) **La adquisición, enajenación, importación y comercio en general de toda clase de materias primas o productos químicos o farmacéuticos elaborados, así como toda clase de maquinaria, equipo e implementos necesarios para la explotación en la industria química farmacéutica y de sus derivados.**
 - c) **La adquisición de los bienes, muebles e inmuebles que sean necesarios para su mejor desarrollo y también para celebrar todos los actos y convenios civiles o mercantiles que tengan relación con su objeto social.**
4. **Que ha decidido colaborar con el Instituto de Fisiología Celular de "LA UNAM" para el cumplimiento del objeto del presente convenio.**

- 5 Que para todos los efectos derivados de este instrumento señala como su domicilio legal el ubicado en Amores número 1304, Colonia Del Valle, Delegación Benito Juárez, C.P. 03100, México, D.F.

III. DECLARAN AMBAS PARTES:

UNICO. Que están interesadas en compartir sus recursos y capacidades a fin de colaborar para desarrollar un sistema que permita cuantificar la proteína transferidora de ésteres de colesterol en muestras biológicas.

Expuesto lo anterior, están conformes en sujetar sus compromisos a los términos y condiciones insertos en las siguientes:

CLAUSULAS

PRIMERA. OBJETO

El objeto del presente convenio es la colaboración entre las partes con el fin de continuar el desarrollo tecnológico y la protección industrial de un sistema para cuantificar la proteína transferidora de ésteres de colesterol en muestras biológicas denominado de aquí en adelante como "EL SISTEMA".

SEGUNDA. ALCANCES

Los alcances del presente convenio comprenderán:

- a) Continuar con el desarrollo y perfeccionamiento de "EL SISTEMA" y evaluar su desempeño en sueros humanos de acuerdo a lo referido en el Anexo 1 que forma parte integral del presente convenio.
- b) Continuar con el trámite de propiedad industrial de "EL SISTEMA" mediante el ingreso de una solicitud PCT.
- c) Comercializar y/o difundir los resultados obtenidos.

TERCERA. COMPROMISOS DE "LA UNAM"

Para el cumplimiento del objeto del presente convenio "LA UNAM", a través del Instituto de Fisiología Celular, se compromete a:

- a) Perfeccionar "EL SISTEMA" con el apoyo técnico de "SILANES" y probarlo en suero de pacientes para determinar su sensibilidad y especificidad.

- b) **Elaborar un reporte por escrito de los resultados obtenidos con las evaluaciones de "EL SISTEMA" y entregar una copia a "SILANES".**
- c) **Iniciar el trámite PCT de la solicitud de patente mexicana de "EL SISTEMA" para cuantificar la proteína transferidora de ésteres de colesterol en muestras biológicas y sintéticas antes del 13 de diciembre de 2000, solicitando la asesoría de un despacho especializado en estos trámites y decidiendo la estrategia conjuntamente con "SILANES".**
- d) **Hacer difusión en diversos medios académicos de los resultados obtenidos con las evaluaciones realizadas de "EL SISTEMA".**

CUARTA. COMPROMISOS DE "SILANES"

Para el cumplimiento del objeto del presente convenio "SILANES" se comprometa a:

- a) **Pagar la totalidad de los gastos incurridos por el trámite de la solicitud PCT de "EL SISTEMA", incluyendo el pago de los derechos correspondientes y el pago de los honorarios del despacho especializado que apoye en el trámite de patentamiento.**
- b) **Colaborar con el grupo de investigación de "LA UNAM" para orientar la optimización de "EL SISTEMA" hacia una prueba con posibilidad de comercialización.**
- c) **Si se considera oportuno, apoyará al grupo académico para que presenten los resultados de interés mutuo en eventos o congresos de corte académico.**

QUINTA. RESPONSABLES

Las partes designan como responsables para la realización del objeto del presente convenio a:

Por "LA UNAM", al Dr. Jaime Mas Oliva, Jefe del Laboratorio 324 de Biomembranas del Instituto de Fisiología Celular.

Por "SILANES", al Dr. Jorge Paniagua Solís, Director de Investigación en Inmunología.

Los responsables por cada una de las partes, serán los contactos institucionales por medio de los cuales serán presentadas todas las comunicaciones oficiales derivadas de la operación del presente convenio. Además, serán los responsables de las actividades encomendadas a su institución.

SEXTA. PROPIEDAD INTELECTUAL

La propiedad de "EL SISTEMA" para cuantificar la proteína transferidora de ésteres de colesterol en muestras biológicas objeto del presente convenio pertenece a "LA UNAM" y será tramitada por ella otorgando a los inventores los créditos correspondientes. "SILANES" podrá licenciar o comprar la tecnología para lo cual se estará a lo dispuesto en la Cláusula Séptima del presente instrumento.

SEPTIMA. OPCION DE VENTA O LICENCIAMIENTO

Si como consecuencia del desarrollo de las actividades objeto del presente convenio surge tecnología de interés para "SILANES, "LA UNAM" hará una oferta a "SILANES" mediante la cual ésta podrá optar por comprar o licenciar dicha tecnología, de acuerdo con lo siguiente:

- 7.1 **Venta de Tecnología.** Si "SILANES" opta por comprar la tecnología, pagará a "LA UNAM" una cantidad que será fijada de común acuerdo entre ambas partes, en un convenio por separado, en el cual se tomará en consideración y se deducirá el monto que "SILANES" haya aportado para el desarrollo de las actividades consagradas en el convenio específico del cual se generó o dio como resultado dicha tecnología. "LA UNAM" transferirá a "SILANES" la tecnología, incluyendo un "libro negro" y prestará asesoría y capacitación al personal técnico que designe "SILANES" para la asimilación de la tecnología. Este caso implica una transferencia de los derechos de propiedad industrial sobre la tecnología por parte de "LA UNAM" a "SILANES".
- 7.2 **Licenciamiento.** Si "SILANES" opta por obtener una licencia, pagará a "LA UNAM" por la obtención de la licencia un monto que será fijado de común acuerdo por ambas partes, en un convenio por separado, en el cual se tomará en consideración y se deducirá el equivalente a sus aportaciones para el desarrollo del proyecto. Adicionalmente, pagará a "LA UNAM" una regalía sobre las ventas netas que realice "SILANES", sus filiales o sublicenciarios de los productos producidos mediante o que contengan dicha tecnología, "LA UNAM" a cambio, transferirá a la empresa la tecnología incluyendo un "libro negro" y prestará capacitación y asesoría al personal técnico que designe "SILANES" para la asimilación de la tecnología.

El monto de las regalías será fijado por ambas partes atendiendo principalmente a factores como la exclusividad de la licencia, la posibilidad de poder sublicenciar o no la tecnología, el carácter nacional o internacional de la licencia, etc.

Dentro de un plazo de treinta (30) días hábiles a partir de que "LA UNAM" haga la oferta, "SILANES" deberá notificar por escrito su decisión de ejercer o no la opción que aquí se le otorga. El silencio se entenderá en sentido negativo.

Si la decisión por parte de "SILANES" es negativa, "LA UNAM" quedará en libertad de ofrecer la tecnología a cualquier tercero.

Si "SILANES" decidió ejercer la opción de venta o de licenciamiento de la tecnología. Dentro de los siguientes sesenta (60) días hábiles, las partes negociarán de buena fe los términos para dicha venta o licenciamiento de tecnología y plasmarán sus acuerdos en un convenio por separado. El plazo máximo para lograr tener firmado dicho convenio será de ciento ochenta (180) días naturales contados a partir de la decisión de "SILANES", transcurrido este tiempo, la primera opción de venta o licenciamiento que aquí se otorga perderá validez.

OCTAVA. VIGENCIA

El presente convenio se mantendrá vigente a partir de la fecha de su firma y hasta concluir el perfeccionamiento de "EL SISTEMA", al término del cual se propondrá a "SILANES" si opta por una licencia de la tecnología resultante o se procede con la venta de la misma a "SILANES".

NOVENA. PUBLICACIONES

El personal académico de "LA UNAM" directamente involucrado en el objeto del presente convenio podrá publicar los aspectos de interés académico que se deriven del mismo. Si estos aspectos fueran de interés comercial, solo podrán ser publicados con el consentimiento por escrito de "SILANES":

DECIMA. RESCISION

Las partes convienen que será motivo de rescisión:

- a) Que alguna declaración de este convenio sea falsa.
- b) El incumplimiento de algunos de los compromisos consignados en el presente instrumento, siempre que no se trata de los supuestos previstos en la Cláusula Décima Segunda.
- c) Que "SILANES" sea declarada en estado de quiebra, suspensión de pagos, concurso de acreedores o cualquier otro tipo de insolvencia.

DECIMA PRIMERA. PROCEDIMIENTO DE RESCISION

Si una de las partes considera que su contraparte ha incurrido en alguna de las causas de rescisión que se consignan en este convenio, lo comunicará por escrito con el fin de que la misma, en un plazo de treinta días hábiles, exponga lo que a su derecho convenga respecto al incumplimiento de sus compromisos. Si después de analizar las razones aducidas, la parte demandante estima que las mismas no son satisfactorias, optará por exigir el cumplimiento del convenio, o bien la rescisión del mismo.

DECIMA SEGUNDA. RESPONSABILIDAD CIVIL.

Queda expresamente pactado que ni "LA UNAM" ni sus investigadores tendrán responsabilidad civil por daños y perjuicios que pudieran causar a "SILANES" como consecuencia del caso fortuito o fuerza mayor, particularmente por paro de labores académicas o administrativas, en virtud de lo cual "LA UNAM" se encuentre impedida para cumplir oportunamente con los compromisos derivados del objeto y alcances de este convenio, comprometiéndose a reiniciar sus actividades una vez que las causas de fuerza mayor hayan desaparecido.

Si así lo consideran las partes, podrán continuar trabajando en las instalaciones de "SILANES" hasta que desaparezcan las condiciones de fuerza mayor que impidieran trabajar en las instalaciones de "LA UNAM":

DECIMA TERCERA. RELACIONES LABORALES

Las partes acuerdan que el personal aportado por cada una de ellas para la ejecución del presente convenio, se entenderá relacionado exclusivamente con aquella que lo empleó, por ende, cada una de ellas asumirá su responsabilidad por este concepto y en ningún caso serán consideradas como patrones solidarios o sustitutos.

DECIMA CUARTA. IMPUESTOS.

El presente convenio no causa impuesto alguno por lo que respecta a "LA UNAM", toda vez que el artículo 17 de su Ley Orgánica ordena que los ingresos de la Universidad y los bienes de su propiedad no están sujetos a impuestos o derechos federales, locales o municipales. Tampoco estarán gravados los actos o contratos en que ella intervenga si los impuestos, conforme a la ley respectiva, debiesen estar a cargo de la Universidad.

La interpretación cabal del artículo mencionado es que "LA UNAM" goza de un régimen fiscal especial de no sujeción impositiva, como ha sido reconocido por el Poder Judicial de la Federación en la Jurisprudencia 1.5°.A.8. del Quinto Tribunal Colegiado en Materia Administrativa del Primer Circuito, publicada en la Gaceta del Semanario Judicial de la Federación número 19-20, julio-septiembre de 1989, en la página 123, bajo el rubro "UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO, NO ES SUJETO TRIBUTARIO", con base en las ejecutorias de los amparos en revisión 35/88, 5/89, 25/89, 45/89 y 85/89.

DECIMA QUINTA. INTERPRETACION Y CONTROVERSIAS

Las partes convienen que el presente instrumento es producto de la buena fe, en razón de lo cual, los conflictos que pudieran presentarse respecto de su operación, formalización o cumplimiento, serán resueltos de común acuerdo.



En caso de subsistir la controversia, las partes se sujetarán a la jurisdicción de las leyes y Tribunales Federales de la Ciudad de México, Distrito Federal, renunciando si fuero que por su actual o futuro domicilio, o que por cualquier otra circunstancia, pudiera corresponderles.

Leído que fue el presente instrumento y enteradas las partes de su contenido y alcances, lo firman por triplicado en la Ciudad de México, Distrito Federal, a los SIETE días del mes de DICIEMBRE de DOSMIL.

POR "LA UNAM"



DR. RENE DRUCKER COLIN
COORDINADOR DE LA
INVESTIGACION CIENTIFICA

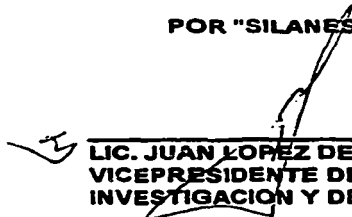


DR. GEORGES DREYFUS CORTES
DIRECTOR DEL INSTITUTO DE
FISIOLOGIA CELULAR



DR. JAIME MAS OLIVA
RESPONSABLE DEL PROYECTO

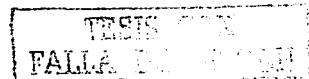
POR "SILANES"



LIC. JUAN LOPEZ DE SILANES
VICEPRESIDENTE DE
INVESTIGACION Y DESARROLLO



DR. JORGE F. PANIAGUA SOLIS
DIRECTOR DE INVESTIGACION
EN INMUNOTÉCNOLÓGIA

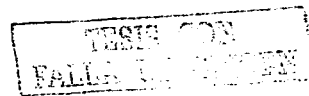


Capítulo III

Evaluación De Los Niveles De CETP Plasmática En Población Mexicana

Resumen

Como parte del desarrollo del sistema de cuantificación de CETP, expuesto en el Capítulo II de esta tesis, realizamos el presente estudio, en el se establecieron por primera vez valores normales de CETP en una muestra piloto de población mexicana y su relación con lípidos plasmáticos. En esta sección se expone la evaluación de dicha muestra, que permitió hacer una aproximación de sus niveles de CETP, de algunos de los factores considerados como etiológicos y de riesgo de aterogénesis, así como de la interacción entre todos ellos. Este tipo de trabajo nos permite analizar el efecto de estas interacciones sobre la actividad de CETP y como esta puede, de manera simultánea, favorecer la vía aterogénica tanto como el transporte reverso del colesterol. En este trabajo, el sistema propuesto en el capítulo anterior muestra ser una herramienta útil en el diagnóstico y seguimiento de pacientes, con dislipidemias asociadas a alteraciones de los niveles lípidos séricos y/o de CETP en plasma. Al mismo tiempo, apoya o refuta el valor de algunos de los parámetros tradicionalmente utilizados en la evaluación de riesgo de aterogénesis, aportando información sobre la interacción entre ellos y CETP, asimismo presenta una propuesta inicial del valor de CETP como parámetro de diagnóstico.



III.1 Introducción

DINÁMICA DE LIPOPROTEÍNAS

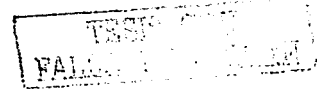
El metabolismo lipoprotéico se divide en una vía exógena que involucra los lípidos contenidos en la dieta y una vía endógena que incluye el transporte, almacenamiento y utilización de los lípidos sintetizados por el organismo. Además de estas dos vías, puede considerarse por separado el metabolismo de las HDL, responsable del fenómeno de transporte reverso de colesterol (figura 1).

Las lipoproteínas (LPs) son complejos solubles de lípidos y proteínas especializadas denominadas apoproteínas (Apo). Su función es la de transportar lípidos desde los tejidos en que son sintetizados a aquellos en que se utilizan y almacenan. El contenido de apoproteínas permite la estabilidad y solubilidad de las partículas, algunas funcionan como ligandos para los receptores en la superficie celular, cofactores para lipasas e inhibidores competitivos de endocitosis y metabolismo (Tabla 1). Los cambios en composición y la proporción entre los componentes de las LPs determinan la distribución de lípidos entre los diferentes tejidos (Fielding *et al*, 1996).

Tabla 1. Clasificación de lipoproteínas de acuerdo a su densidad y composición (Fielding *et al*, 1996).

LIPOPROTEÍNA	CLASES DE APOPROTEÍNAS	DENSIDAD (g/L)	COMPOSICIÓN (%w/w)				
			PROTEÍNA	FOSFOLÍPIDOS	COLESTEROL LIBRE	COLESTEROL ESTERIFICADO	TRIACILGLICEROLIOS
Pre (H)HDL	A-I	>1.21	70	25	5	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE
HDL-3		1.12-1.21	55	25	3	16	1
HDL-2		1.063-1.12	43	30	5	20	2
HDL-1	A-I, A-II, Cs, E	<1.063	32	36	6	23	2
Quilomicrones	B-48, A-I, A-II, Cs, E	~ 0.96	2	105	<1	<1	93
Remanentes de Quilomicrones		<1.109	8	10	4	4	74
VLDL	B-100, Cs, E	<1.006	10	15	6	14	53
IDL	B-100, Cs, E	1.006-1.019	18	22	7	23	31
LDL	B-100	1.019-1.063	21	21	9	42	4

Funcionalmente existen dos clases de LPs: La primera consiste en partículas que transportan lípidos (principalmente triacilgliceroles) del hígado e intestino delgado hacia los tejidos extrahepáticos (figura 1). Estas partículas contienen apoproteínas B (Apo B). En esta clasificación incluye a los Quilomicrones (QM) que se componen de triacilgliceroles generados a partir de los ácidos grasos de cadena larga, obtenidos de los triacilgliceroles de la dieta y reesterificados en la mucosa intestinal. Este tipo de lipoproteína es el único involucrado en la vía exógena. Los QM son secretados en la linfa, de donde son vertidos al plasma, al circular por el plasma se generan remanentes de



quilomicrones (RQM) por lipólisis, que posteriormente son retirados y degradados por el hígado. Los QM contienen la Apo B 48 (Fielding *et al*, 1996) (figura 1).

El hígado genera las partículas involucradas en la vía endógena (figura 1), como las LPs de muy baja densidad (VLDL), ricas en triacilgliceroles. Estas partículas contienen otra forma de Apo B (Apo B 100) y varias formas de Apo C (Cs). Después de depositar mucho de sus triacilgliceroles en los tejidos periféricos, algunas VLDLs son devueltas al hígado, endocitadas y finalmente catabolizadas. Los remanentes de VLDLs continúan en la circulación, son llamados lipoproteínas de densidad intermedia (IDLs) y contienen además Apo E. Cuando las IDLs pierden la mayor parte de sus triacilgliceroles así como la Apo E, se transforman en lipoproteínas de baja densidad (LDLs). Estas partículas contienen sólo Apo B 100. La transformación en este grupo de partículas se debe al decremento continuo de tamaño e incremento de densidad (Fielding *et al*, 1996) (figura 1).

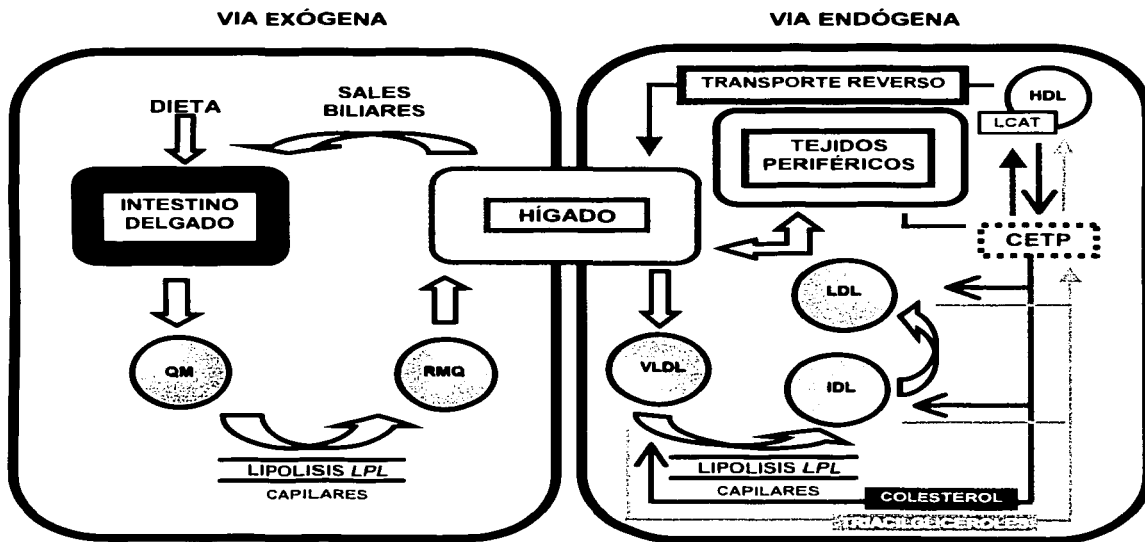


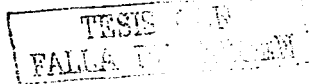
Figura 1. Dinámica de lipoproteínas. En el metabolismo lipoproteico, la vía exógena involucra los lípidos de la dieta y la vía endógena incluye el transporte, almacenamiento y utilización de los lípidos sintetizados por el organismo. Además de estas dos vías, el metabolismo de las HDL es responsable del fenómeno de transporte reverso de colesterol.

La segunda clase de partículas transporta principalmente colesterol de los tejidos periféricos hacia el hígado. Esta clase se compone de las LPs de alta densidad (HDL) que contienen Apo A1. La Apo A1 es secretada del hígado e intestino delgado y se transforma en Apo A1 pobre en lípidos (pre β -HDL) por contacto con lipoproteínas ricas en triacilgliceroles. Esta pre β -HDL tiene alta densidad y pocos lípidos, y son receptoras efectivas del colesterol libre de la superficie celular de los tejidos periféricos. Su densidad decrece al acumular lípidos, convirtiéndose en pre β -HDL discoidal. La maduración de estas partículas está determinada por la Lecitin:colesterol Acil Transferasa (LCAT), responsable de la esterificación del colesterol libre. Una vez esterificado el colesterol pasa de la superficie al interior de la HDL, transformándose en HDL-3. La transferencia de más colesterol libre y fosfolípidos de las LPs Apo B a las HDL-3 y la actividad de LCAT, transforman a estas partículas en HDL-2, las que finalmente transportan el colesterol de vuelta al hígado. Este fenómeno de transporte de colesterol de tejidos periféricos al hígado es denominado "Transporte Reverso". Sin embargo, parte del colesterol asociado a HDL puede ser transferido de nuevo a LPs que contienen Apo B (Fielding *et al*, 1996).

Las lipasas y las proteínas transferidoras de lípidos son las responsables de la transformación secuencial de las LPs (figura 1). De entre las lipasas destaca la lipoproteína lipasa (LPL), que es funcional en el endotelio de los capilares en músculo y tejido adiposo, se une a la Apo C en la superficie de las LPs y retira los triacilgliceroles que, posteriormente, son catabolizados por el tejido muscular (Fielding *et al*, 1996). La proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) y la proteína transferidora de fosfolípidos (PLTP) son responsables de vincular el metabolismo entre LPs Apo B y Apo A1. En el plasma, la CETP es responsable de todo el intercambio de lípidos neutros (ésteres de colesterol y triacilgliceroles) y de aproximadamente el 30% de la transferencia de fosfolípidos entre las LPs. En cambio, PLTP facilita en intercambio solo de fosfolípidos entre LPs y no tiene actividad de transferencia de lípidos neutros (Tall, 1995).

ATEROSCLEROSIS

La aterosclerosis es una enfermedad crónica, caracterizada por la lesión sistémica de las arterias, que se define como el engrosamiento focal de la íntima vascular, constituido por acúmulos de grasa, capas de tejido conjuntivo y una zona de necrosis, encontrándose con frecuencia atrofia de la media (para algunos autores el componente necrótico no es indispensable) (Fielding, 1996). Desde el punto de vista etiopatológico (figura 2), para la formación del ateroma debe ocurrir la acumulación en la íntima y, en ocasiones en la media vascular, de lípidos intra y extra celulares, formando estrias grasas que no se levantan por encima de la íntima vascular. La mayor parte del colesterol es depositado por LDLs que atraviesan el endotelio y se unen a receptores en la superficie



de las células del músculo liso, en donde son degradadas. Algunas de las LDL no degradadas son modificadas extracelularmente, por lo que no pueden ser reconocidas por dichos receptores. Los macrófagos remueven estas partículas modificadas a través del receptor "pepenador" o "sacavenger" transformándose en las llamadas células espumosas. Otras LDL modificadas forman un depósito extracelular de colesterol en la lámina elástica de la íntima. Parte de este depósito es fagocitado por los macrófagos o las células espumosas, algunos de ellos terminan agregándose al depósito enriqueciéndolo, mientras otros macrófagos o células espumosas tratan de fagocitarlo repitiendo el ciclo indefinidamente. Las partículas HDL en el plasma atraviesan el endotelio y remueven el colesterol de células involucradas en el ateroma. De acuerdo con lo anterior, la acumulación de colesterol en el ateroma se debe a un desbalance entre el influjo (vía LDL) y el eflujo (vía HDL) de lípidos a través del endotelio. Al ateroma le sigue la proliferación focal de células de músculo liso, al cual se agregan mas depósitos de lípidos y de tejido conjuntivo o fibromuscular, provocando la elevación de la matriz extracelular, constituida principalmente por colágena y elastina. El resultado de este proceso es la placa ateromatosa, la que se levanta por encima de la superficie de la íntima estrechando la luz de vaso. El ateroma puede romperse hacia la luz, ulcerarse, calcificarse y favorecer procesos trombóticos, fuente potencial de embolias.

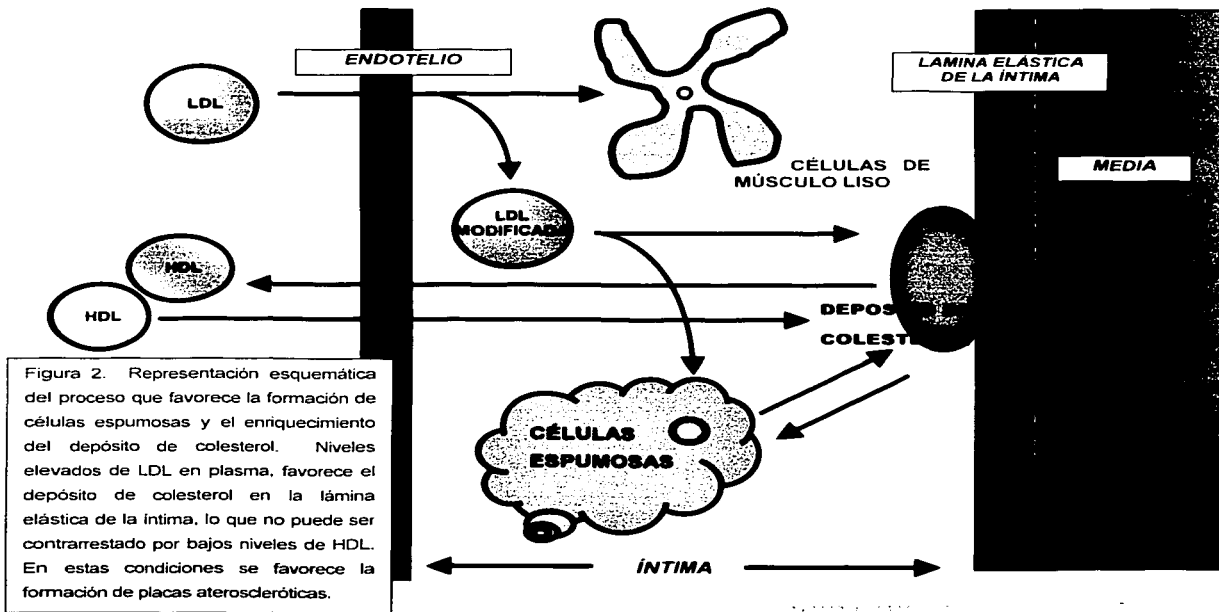


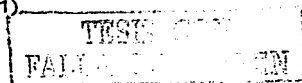
Figura 2. Representación esquemática del proceso que favorece la formación de células espumosas y el enriquecimiento del depósito de colesterol. Niveles elevados de LDL en plasma, favorece el depósito de colesterol en la lámina elástica de la íntima, lo que no puede ser contrarrestado por bajos niveles de HDL. En estas condiciones se favorece la formación de placas ateroscleróticas.

El proceso ateroscleroso se inicia en la infancia y adolescencia, y progresa conforme transcurre la vida. Su desarrollo es asintomático durante muchos años y cuando se presentan las manifestaciones clínicas (como infarto agudo al miocardio, accidentes vasculares cerebrales o gangrena de miembros inferiores) las consecuencias son en su mayoría irreversibles. Esto sucede alrededor de la cuarta y quinta década de la vida, siendo de tres a cuatro veces más común en hombres que en mujeres. Es de especial interés en población mexicana, dado que las cardiopatías isquémicas constituyen la tercer causa de muerte en edad productiva en nuestro país (INEGI, 1998). Por otro lado, la aterosclerosis es una de las principales causas de morbi-mortalidad en pacientes diabéticos, quienes tienen de dos a cuatro veces más riesgo de presentar enfermedad coronaria y cuatro a cinco veces más de enfermedad vascular cerebral y periférica (Lerman, 1996). Dado que la insulina participa como regulador en el metabolismo de lípidos, en el diabético con descontrol glucémico es muy común observar dislipidemias que coexisten con otros importantes factores de riesgo. Las dislipidemias se encuentran hasta casi en el 70% de los casos y contribuyen, en parte, al desarrollo de la aterosclerosis temprana observada en estos pacientes (Morato, 1996).

FACTORES DE RIESGO Y FACTORES ETIOLÓGICOS

La hipercolesterolemia, la *diabetes mellitus* y el tabaquismo tienen una relación clara con la aterosclerosis, por lo que se tratan en realidad de factores etiológicos (FE), ya que la relación causa efecto está bien probada. El concepto de factores de riesgo implica factores modificables y es, por este falso concepto, que se niega erróneamente la relación etiológica de los factores antes mencionados. El estrés, el sedentarismo y la obesidad son factores de riesgo (FR) ya que su papel etiológico está en franca discusión. Se ha establecido que niveles elevados de LDL, alteraciones en la Apo B y bajos niveles de HDL son FE bien probados; sin embargo, sólo se puede hablar de una "elevada sospecha clínica de riesgo de aterosclerosis".

Por otro lado, los niveles de HDL, que durante más de 30 años han sido considerados como un factor etiológico para el desarrollo de la aterosclerosis, muestran ahora resultados inconsistentes en trabajos epidemiológicos más recientes. En ellos se concluye que no existe relación entre HDL y enfermedades asociadas a la aterosclerosis (Hsu *et al*, 2002 y Zhuang *et al*, 2001) o que la relación parece variar entre grupos étnicos y en función de diferentes combinaciones de factores tales como tabaquismo, obesidad, hipertensión e hipertrigliceridemia, entre otros (Von Eckardstein *et al*, 2001 y Grundy *et al*, 1999). En resumen, el valor de HDL como parámetro para evaluar el riesgo de aterogénesis está en duda. En cambio, la aterogénesis parece estar asociada a la proporción e interconversión entre los diferentes subtipos de HDL, fenómeno dependiente de la actividad de las proteínas trasferidoras PLTP y, especialmente, CETP (Von Eckardstein *et al*, 2001).

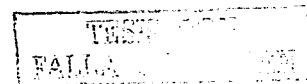


Sin la verdadera comprensión de los factores que intervienen en la etiología de este padecimiento, no se puede establecer una relación clara entre muchos de los parámetros que se consideran como FE o FR, por lo que la determinación de dicho riesgo no se establece sobre bases sólidas. A esto se suman las limitaciones, ya discutidas en el capítulo anterior, en cuanto al tamaño y tipo de población susceptible de ser evaluada. De acuerdo con esto, consideramos que los reportes clínicos rutinarios deben incluir parámetros cuantitativos que aumenten su confiabilidad, como el nivel de CETP plasmática.

CETP EN LA ATEROSCLEROSIS Y EL TRANSPORTE REVERSO

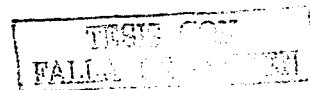
CETP mejora la remoción de ésteres de colesterol del plasma, estimulando su transferencia de HDL a VLDL, LDL y QM, que son retiradas del plasma por el hígado con procesos mediados por receptor (Fielding, 1996); sin embargo, concentraciones altas de colesterol asociados a LDL, así como deficiencia en la capacidad de remoción de estas partículas de plasma, son factores aterogénicos. Este efecto sobre el metabolismo de las LPs y en el desarrollo de enfermedad coronaria arterial, se debe a que CETP induce niveles altos de LDL y VLDL, ambas asociadas con la progresión de la aterosclerosis (Marotti *et al*, 1993).

Trabajos experimentales han mostrado que en humanos con deficiencia genética de CETP se reportan niveles de HDL muy por encima de los niveles de sujetos normales (hiperalfalipoproteinemia), tales individuos parecen tener una menor incidencia de enfermedad coronaria (Inazu *et al*, 1992; Brown *et al*, 1989; Tall, 1995; Lagrost, 1994). De igual manera, especies que carecen de normalmente de CETP tienen resistencia a este tipo de enfermedades. Sólo cuando se crean transgénicos de estas especies, con el gen de CETP, se observa el decremento en el tamaño y niveles de HDL; tales animales son entonces susceptibles a sufrir ECV inducida por dieta (Rye *et al*, 1995). Sin embargo, algunos autores aseguran que la relación de CETP con los niveles de HDL e incidencia de ECV es significativamente afectada por factores como tabaquismo, obesidad (Freeman *et al*, 1994) y alcoholismo (Gudnason *et al*, 1997), así como con diferentes polimorfismos de CETP (Corbex *et al*, 2000; Vohl *et al*, 1999). Por otro lado, en estudios con dietas altas en colesterol se ha encontrado un patrón complejo de respuesta de los niveles del RNAm de CETP en tejidos periféricos, que resultan en el incremento equivalente de la actividad de CETP en plasma (Oliveira *et al*, 1996; Ritsch *et al*, 1993). A pesar de variaciones alélicas (McPherson *et al*, 1996), los resultados sugieren una inducción local de la síntesis de CETP que puede ayudar al reciclaje del colesterol depositado en los tejidos periféricos durante la lipólisis de las LPs (transporte reverso de colesterol) (Jiang *et al*, 1991; Nagashima *et al*, 1988; Tall, 1995; Kondo *et al*, 1989).



La CETP juega un papel importante en el transporte reverso de colesterol. Esto puede verse en ratones transgénicos con CETP humana, en ellos se reduce la síntesis de colesterol en el hígado, lo que puede indicar un incremento en la síntesis de colesterol en los tejidos periféricos y, por lo tanto, un rápido retorno de colesterol al hígado. Se sabe además que en respuesta a la hiperlipidemia, tanto endógena como exógena, se estimula la expresión de CETP y el eflujo de colesterol de los tejidos periféricos a HDL, lo que incluye la estimulación de LCAT el que optimiza el eflujo de colesterol libre y esterificado de los tejidos periféricos (Tall, 1995; Lagrost, 1994). Por lo tanto, CETP es una molécula clave en el proceso de transporte reverso y puede tener una función anti-aterogénica.

Con base en la información y herramientas recabadas en los capítulos anteriores, se planteó como objetivo principal de el Capítulo III de esta tesis, el confirmar la utilidad de los niveles de CETP plasmática como factor de riesgo en el diagnóstico de aterogénesis, así como evaluar el valor del sistema de cuantificación propuesto en el capítulo anterior, como herramienta útil en el diagnóstico de riesgo de colesterol. Simultáneamente a esto, se evaluaron las condiciones generales de la población piloto en cuanto a FE Y FR, se estableció, por primera vez en población mexicana, los valores normales de CETP plasmática y, al integrar la información obtenida, determinamos si estadísticamente existe relación entre ellos, así como los rangos en los que los niveles de CETP se asocian con alteraciones en otros FR.



III.2 Materiales y métodos

III.2.1 POBLACIÓN

Criterios de Inclusión

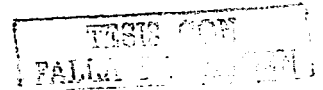
Estos criterios se establecieron para abarcar a sujetos clínicamente sanos, que conformen una muestra piloto representativa en edad y sexo.

- I. Se incluyeron sujetos de ambos sexos, diagnosticados como sanos, tanto por exploración clínica como a través de exámenes rutinarios de laboratorio
- II. Sujetos mayores de 17 años.
- III. Sujetos que a la exploración física presentaron peso corporal normal o sobrepeso de cualquier índole.
- IV. Sujetos sin medicación alguna y con al menos 10 horas de ayuno
- V. Cualquier otro criterio general de inclusión de sujetos sanos fue considerado por los médicos del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" del ISSSTE

Criterios de no Inclusión

No se incluyeron de este protocolo a todos aquellos sujetos que presentaron alguno de los siguientes puntos. El objeto de estos criterios fue el de excluir de la población piloto a los sujetos no representativos del grupo de estudio, debido a que han presentado manifestaciones clínicas propias del proceso ateroscleroso, o que presentaron algún tipo de padecimiento asociado al metabolismo de lípidos.

- I) No se incluyeron a los pacientes que presentaron algún tipo de enfermedad metabólica o crónica degenerativa así como infecciosa.
 - i Enfermedades hepáticas
 - (a) Cirrosis hepática en cualquiera de sus variedades (metabólica o infecciosa)
 - (b) Hepatitis viral, medicamentosa o metabólica
 - (c) Cualquier enfermedad parasitaria que afecte al hígado como la amibiasis.
 - (d) Cualquier enfermedad de las articulaciones y huesos como por ejemplo: artritis reumatoide
 - ii Cualquier enfermedad metabólica congénita o adquirida como:
 - (a) *Diabetes mellitus*
 - iii Cualquier tipo de desorden hormonal como:
 - (a) Hipo e Hipertiroidismo
 - (b) Cualquier enfermedad que afecte a las suprarrenales



(c) Cualquier enfermedad que afecte a la hipófisis

(d) Cualquier otra enfermedad que altere la secreción de una o varias hormonas

iv Cualquier enfermedad del sistema nervioso central y/o periférico o trastornos psicológicos como:

(a) Enfermedad cerebral degenerativa

(b) Enfermedades psicósomáticas

(c) Esquizofrenia, autismo, delirio, etc.

II) Sujetos que presentaron algún tipo de enfermedad infecciosa viral o bacteriana aguda, como:

i Herpes en sus diversas manifestaciones

ii Gangrena en algún miembro torácico o pélvico

iii Resfriado con ingesta de medicamentos

iv Hepatitis viral

v Cualquier otra enfermedad infecciosas aguda que a criterio del médico especialista considere que altera el perfil metabólico y clínico del sujeto

III) Pacientes que presentaron algún tipo de enfermedad infecciosa viral o bacteriana crónica tal como:

i SIDA

ii Tuberculosis

iii Parasitosis intestinal

iv Cualquier enfermedad de piel y sus anexos tal como lepra, xantomatosis etc.

v Cualquier otra enfermedad infecciosa crónica, que a criterio de los médicos especialistas altere importantemente el perfil normal del sujeto en estudio

IV) Pacientes que estaban recibiendo medicamentos por más de tres meses. Algunos de ellos pueden ser:

i Hormonas en todas sus variedades

ii Substituyentes hormonales (tales como los análogos de esteroides)

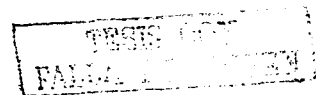
iii Medicamentos para tratar enfermedades infecciosas crónicas

iv Medicamentos para tratamiento de enfermedades infecciosas agudas que hayan sido usados por más de siete días

v Anticancerígenos

vi Medicamentos de uso controlado como son antipsicóticos, etc.

vii Cualquier medicamento que altere los niveles normales del colesterol en la sangre



- V) No se incluyeron sujetos femeninos que reciban terapia hormonal.
- VI) No se incluyeron los sujetos que presentaron algún tipo o variedad de cáncer.
- VII) No se incluyeron los pacientes que presentaron algún tipo de enfermedad del trabajo tal como siderosis, intoxicación por plomo, etc.
- VIII) No se incluyó todo paciente que presentó drogadicción, alcoholismo crónico y, en general, que ingiera o se administre algún otro medicamento no controlado.
- IX) No se incluyeron los pacientes que por voluntad propia expresen no ser incluidos dentro de este protocolo.

III.2.2 RECLUTAMIENTO DE PACIENTES

Con el fin de establecer los valores normales del CETP plasmática en población mexicana, se eligió como grupo de estudio a los sujetos donadores en el Banco de Sangre en el Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" del ISSSTE. Para determinar que sujetos eran susceptibles de ser incluidos en el grupo de estudio, se emplearon los mismos criterios que se aplican rutinariamente para la selección de donadores de sangre. La selección del grupo de estudio quedó a cargo de los médicos especialistas de esta unidad. Este trabajo fue un estudio transversal en una población piloto, extraída del grupo de estudio por muestreo aleatorio simple sin reemplazo. La población piloto abarcó un total de 162 muestras de plasma. Cada sujeto incluido fue sometido a un interrogatorio (historia clínica) completo, que incluye sus condiciones somáticas generales como edad, peso y talla entre otras. Basados en dichos criterios y en los FR de aterogénesis, se establecieron como variables a evaluar: edad, sexo, obesidad y perfil de lípidos. Este último se realizó en los laboratorios de análisis clínicos generales y especiales en esta unidad. A estas variables agregamos la cuantificación del nivel de CETP plasmática.

III.2.3 PERFIL DE LÍPIDOS

Para todas las muestras de plasma, en clínica se determinaron los niveles de colesterol total (CT), triacilgliceroles (Tg) y colesterol asociado a HDL, y se calcularon el Índice Aterogénico (IA) (CT/HDL) y el nivel de colesterol asociado a LDL, (formula Friedewald, $LDL = CT - (HDL + Tg/5)$). Este cálculo se realizó cuando el nivel de Tg fue menor a 400 mg/dl, niveles superiores a éste se midieron directamente en el laboratorio. Los criterios utilizados regularmente en clínica para considerar un caso de dislipidemia se muestran en la tabla 2.

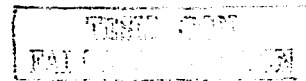


Tabla 2. Para concluir si existen de desordenes metabólicos asociados a niveles de lípidos plasmáticos, se consideran este criterio que es de uso regular en clínica y se fue establecido en correlación con la incidencia de ECV.

	DESEABLE	LIMITROFE	ALTO RIESGO
Colesterol total (mg/dl)	< 200	200 – 239	> 240
Colesterol LDL (mg/dl)	< 130	130 – 159	> 160
Colesterol HDL (mg/dl)	> 45	35-45	< 35
Triacilgliceroles (mg/dl)	< 200	200 - 399	> 400
IA	≤4.2		>4.2

Se considera como dislipidemia cuando al menos tres de las variables coinciden en las categorías LIMÍTROFE y ALTO RIESGO, por ejemplo LDL \geq 130 mg/dl, Tg \geq 200 mg/dl y HDL \leq 35 mg/dl. En clínica, se evalúa además la presencia o ausencia de ECV, sin embargo en este estudio no se considera este factor, puesto que la población piloto solo incluye sujetos que no han sido ubicados dentro de los grupos de riesgo y por lo tanto no han sido sujetas a este tipo de evaluación.

III.3.4 OBESIDAD

La obesidad se define como el exceso de tejido adiposo, y una forma de evaluar su magnitud es por medio de índice de masa corporal (IMC) o índice Quelet. Para obtenerlo, se utiliza la formula Bray (peso / talla²). Los criterios para apreciar su magnitud o grado de riesgo se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Clasificación de grados de obesidad según el IMC

OBESIDAD	LEVE	MODERADA	GRAVE	EXTREMA
	25-30	30-35	35-40	>40

III.2.5 CUANTIFICACIÓN DE CETP

A los datos recabados de cada sujeto se agregó la determinación del nivel de CETP plasmática, que se realizó mediante el método clásico de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), como se describe en Materiales y métodos, Capítulo II (II.2.2). Como estándar se utilizó el péptido sintético CETP H486-S496, cuyas características se describen en II.2.1. Se incluyo un control negativo en todas las pruebas. Tanto los estándares como el control negativo se manejaron por duplicado, las muestras de plasma se manejaron en duplicados o triplicados, arbitrariamente.

III.2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se hizo la estadística descriptiva de cada parámetro para analizar las propiedades de muestra inicial y la muestra piloto (distribución, medias y desviaciones estándar, mínimo y máximo, etc.). Se compararon ambas muestras por medio de una Prueba de t para muestras independientes empleando 95% de intervalo de confianza. Para verificar la relación entre los niveles de cada parámetro, así como para confirmar las observaciones hechas sobre las gráficas de regresión o correlación se hicieron Análisis de Varianza (ANOVA) Bifactoriales, para dos niveles o más, empleando 95% de intervalo de confianza. Con apoyo en curvas de regresión y pruebas de correlación, se determinaron puntos de corte en los que niveles de CETP plasmática coinciden con valores IDEAL, LÍMITROFE y ALTO RIESGO de los FE más importantes, como CT, LDL e IA. Dichas relaciones fueron comprobadas principalmente por ANOVA Bifactorial, para dos niveles o más, con 95% de intervalo de confianza.

Se empleó una prueba de independencia, basada en el porcentaje de los sujetos que se ubican dentro de cada nivel (o categoría) por variable; en diferentes combinaciones, se estableció si la incidencia de cada categoría en una variable está determinada o afectada por la incidencia de cada categoría de otra variable. La prueba de independencia es una prueba de X^2 (Ji cuadrada), el porcentaje de probabilidad de error de la prueba se establece con valores críticos de $\alpha = 0.975$.

III.3 Resultados

III.3.1 POBLACIÓN

Se tomó una muestra inicial del grupo de estudio que estuvo compuesta por 256 sujetos, 94 de las muestras de plasma de estos sujetos fueron empleadas en las estandarizaciones iniciales del sistema de cuantificación, descritas en el capítulo anterior, el resto constituye la muestra piloto de 162 sujetos, lo que representa más del 63% del total de la muestra inicial, en la que se hizo la cuantificación de CETP. De acuerdo a los resultados, los niveles de la CETP se encuentran entre 0.39 y 9.66 $\mu\text{g/ml}$ (7.344 y 181.917 pm/ml), la media es de 2.3 $\mu\text{g/ml}$ (± 1.6) (tabla 4) lo que equivale a 43.3 pm/ml . En la tabla 4 se comparan los parámetros estadísticos de todas las variables evaluadas. La prueba de t muestra que no hay diferencia significativa entre las medias de la muestra inicial y la muestra piloto (tabla 4 y figura 3).

Tabla 4. Comparación de los parámetros estadísticos para cada una de las variables incluidas en este estudio. Para todas las variables, excepto CETP, se muestra en la columna derecha los parámetros correspondientes a la muestra inicial con $n=256$ y en la columna de la izquierda se muestran los parámetros para la muestra piloto con $n=162$.

	EDAD (años)		PESO (Kg)		TALLA (m)		IMC		CT (mg/dl)		Tg (mg/dl)		HDL (mg/dl)		LDL (mg/dl)		IA		CETP ($\mu\text{g/ml}$)
MEDIA	32.7	35.1	73.7	72.4	1.67	1.66	26.14	26.39	210	211	227	216	49	49	115.5	119.2	2.10	2.00	2.31
DS	13.83	15.99	13.9	13.5	0.088	0.095	4.5	4.31	39	43	136	132	9	10	37.2	39.4	1.23	1.09	1.59
ES	1.11	1.01	1.1	0.9	0.007	0.006	0.36	0.27	3	3	11	8	1	1	3.0	2.5	0.99	0.69	0.13
COEF. DE VARIACIÓN	0.42	0.46	0.2	0.2	0.053	0.057	0.17	0.16	0.2	0.2	1	1	0.2	0.2	0.3	0.3	0.59	0.54	0.69
MÍNIMO	17	17	45	38.3	1.43	1.29	18.22	18.22	101	100	49	46	29	16	21.2	21.2	1.36	1.22	0.39
MÁXIMO	79	88	150	150	1.91	1.91	51.3	51.3	322	345	813	813	72	107	197.8	212.8	7.74	7.74	9.66
n	256	162	256	162	256	162	256	162	256	162	256	162	256	162	256	162	256	162	162

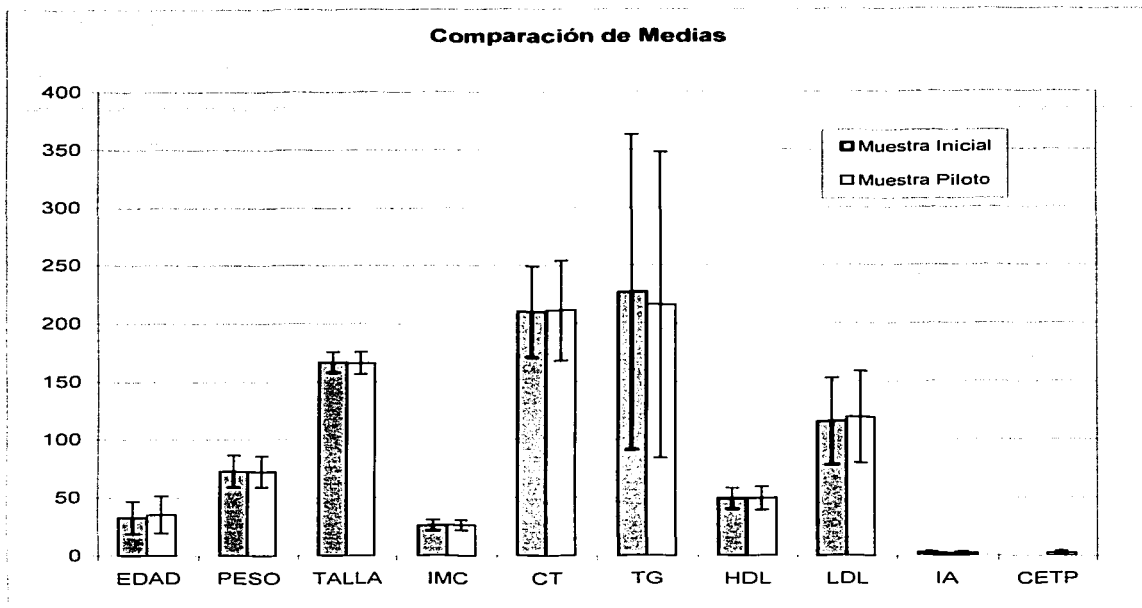


Figura 3. Representación grafica de la comparación entre las medias de la muestra inicial (izquierda) y de la muestra piloto (derecha), no se observa diferencia significativa en ninguna de las variables.

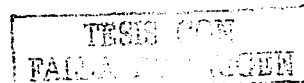
III.3.2 DISTRIBUCIÓN MUESTRAL (VER ANEXO)

Al analizar cada variable por separado concluimos que las variables CT, LDL, HDL e IA tienen distribuciones normales. Las variables EDAD e IMC no tienden a la distribución normal, esto se debe a los criterios de exclusión que se utilizaron en el estudio, por lo que su efecto para fines de este no se considerará importante, aunque es interesante observar que la mayor parte de los sujetos son menores a 40 años, así que el riesgo de incidencia de ECV en el grupo de estudio es en general baja, según lo reportado por el estudio Framingham y por el último censo poblacional en México (INEGI, 1998). La variable Tg no tienen distribución normal y sus valores de Tg tienen una dispersión muy amplia, aunque es posible observar que la mayor parte de ellos se ubica dentro del rango DESEABLE, se plantea que para trabajos derivados de éste deberá ampliarse el tamaño de la muestra. Tanto en IMC como CT y Tg presentan medias que son superiores a los límites deseables pero ninguna de ellas se encuentra dentro del rango de ALTO RIESGO.

En cuanto a los niveles de CETP, no se observó una distribución normal, por lo que se consideraron varias causas para esto: Una de ellas es que la capacidad de detección del sistema no permite cuantificaciones menores a 0.35 μg de CETP/ml de plasma; sin embargo, como se observa en la figura 3 del Capítulo II, la capacidad mínima de detección es de 1.06×10^{-7} $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (2.0×10^{-3} fmoles/ μl) de CETP, en dilución de plasma 1:8000, lo que equivale a 8.5×10^{-4} μg de CETP/ μl de plasma. La segunda posibilidad es que el tamaño de la muestra no la hace representativa. No obstante, al comparar este trabajo con el reportado por Zhuang *et al* (2001), realizado en 1128 sujetos sanos, se observa el mismo patrón de distribución muestral, no normal, para las concentraciones de CETP plasmática. Es decir, muy probablemente, CETP tiene una distribución muestral unimodal.

Como ya se mencionó, los niveles de CETP en población mexicana tienen una media de 2.3 (± 1.6) $\mu\text{g}/\text{ml}$ y el rango de datos va de 0.35 y 9.66 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Ritsch *et al* (1993) reportan, por un método inmunoradiométrico en 30 sujetos europeos normolipidémicos, una media de 1.1 (± 0.22) $\mu\text{g}/\text{ml}$ y un rango entre 0.644 a 1.694 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Por otro lado, Clark *et al* (1995), usando el sistema IRMA en 44 sujetos normolipidémicos estadounidenses, reporta una media de 2.1 (± 0.36) $\mu\text{g}/\text{ml}$, con un rango entre 1.28 a 2.97 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Además de las diferencias entre las medias de estas poblaciones, se puede observar que el rango de datos en la población mexicana es más amplio, esto puede observarse también en la población reportada por Zhuang *et al* (2001) con una media de 1.84 (± 1.55) $\mu\text{g}/\text{ml}$ con un rango que va de 0.23 a 7.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$, determinado en 1128 sujetos saludables por un método de ELISA en sándwich. Al igual que nuestras observaciones, este grupo reportó individuos con niveles de CETP muy por encima de lo esperado, por lo que, aunque la media es cercana a lo reportado en otras poblaciones, la mayor parte de los valores están por debajo de ella, describiendo una distribución muestral unimodal.

Las observaciones sobre los niveles de HDL son de especial interés, a pesar de que la mayor parte de la población presenta niveles muy por arriba de lo DESEABLE, en muchos casos se combinan con niveles desfavorables de otros parámetros, lo que aunado a lo reportado en trabajos recientes, según se discutió en el capítulo anterior, pone en duda su utilidad como indicador de protección contra aterogénesis. Esta observación se discutirá más adelante apoyado en el análisis estadístico.



III.3.3 CATEGORIAS DE CETP Y PUNTOS DE CORTE

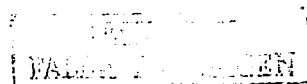
Por otro lado, estudios anteriores no han establecido límites en los que los niveles de CETP correlacionen con las categorías del resto de los FE o FR. Por ello, fue necesario establecer estos parámetros con base en las observaciones experimentales y en el análisis estadístico, las que se mostrarán más adelante. En este trabajo se establecieron cuatro categorías para los niveles de CETP plasmática. Las categorías así como sus puntos de corte entre ellas se asentaron considerando la correlación mostrada entre los niveles de CETP y las diferentes categorías de las variables CT, LDL e IA. Dichas categorías se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Puntos de corte y categorías para la variable CETP

	DESEABLE	LIMITROFE	ALTO RIESGO	SOBRE-EXPRESION
CETP µg/ml	≤ 0.80	0.81 – 1.80	1.81 – 5.99	≥ 6.0

III.3.4 INTERACCIONES CON CETP

La concentración de CT es el factor etiológico más confiable puesto que guarda una relación clara con el resto de las variables. En el caso de LDL se observa también una fuerte correlación. Es por esta razón que se emplearon ambos parámetros como base para evaluar la eficiencia de los niveles de CETP como herramienta en el diagnóstico de aterosclerosis. En la figura 3, se muestra una representación gráfica del análisis de regresión de CT vs. CETP ($R=0.117$), con líneas en verde se señalan los puntos de corte entre las categorías DESEABLE y LÍMITROFE para ambas variables, las líneas en rojo indican los cortes entre las categorías LÍMITROFE y ALTO RIESGO. Para CETP se estableció una cuarta categoría llamada SOBREENPRESIÓN, que incluye valores superiores a $6\mu\text{g/ml}$ (línea en amarillo). Los datos de LDL se dividieron en tres grupos correspondientes a sus categorías, DESEABLE (+), LÍMITROFE (+) y de ALTO RIESGO (+). De acuerdo con el ANOVA respectiva a esta gráfica, los niveles de CT y LDL tienen diferencias significativas entre las categorías LÍMITROFE y ALTO RIESGO de CETP. Es interesante observar que los niveles de CT no tienen diferencia significativa entre las categorías de CETP DESEABLE y LÍMITROFE, cuando se aplica el punto de corte de CT es a 200 mg/dl (en uso para diagnóstico en clínica), sin embargo, si se lleva el punto de corte se lleva a 225 mg/dl, las diferencias entre ambas categorías se vuelven significativas.



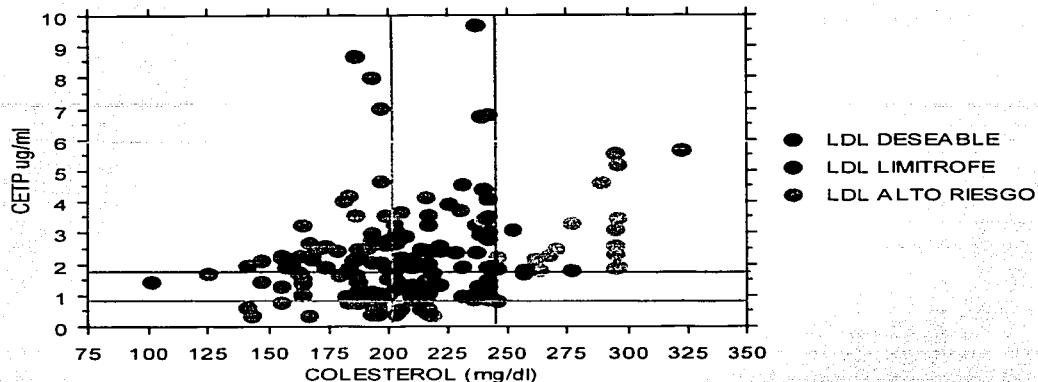


Figura 3. Representación grafica de la correlación CT vs. CESTP. Para ambas variables, las líneas en verde indican los puntos de corte entre las categorías DESEABLE y LIMITROFE, y las líneas en rojo indican los puntos de corte entre las categorías LIMITROFE y ALTO RIESGO. La línea en Amarillo representa el punto de corte entre la categoría ALTO RIESGO y SOBREENEXPRESIÓN de CESTP. Se muestran también las categorías DESEABLE (•), LIMITROFE (◐) y ALTO RIESGO (◑) de LDL.

Como puede verse en la figura 3, todos los sujetos con niveles de CESTP dentro del rango DESEABLE tienen niveles de colesterol menores a 225 mg/ml y solo el 17 % de estos presentaron niveles de LDL por arriba de este, mientras que CT no muestra casos de ALTO RIESGO. De los sujetos incluidos dentro del rango LIMITROFE de CESTP, 45% tienen niveles de CT DESEABLE, 51% LIMITROFE y solo el 4% de ALTO RIESGO. Los niveles de LDL, dentro de la misma categoría de CESTP, son del 73% en el rango DESEABLE, 27% en el LIMITROFE y no se presentaron casos de ALTO RIESGO.

Dentro del rango de ALTO RIESGO de CESTP la población se distribuye en proporciones iguales en todas las categorías de CT (alrededor del 30%), y mientras que los niveles de LDL en el rango DESEABLE se reduce del 73 al 54%, el LIMITROFE se incrementa solo del 27 al 28% y la categoría ALTO RIESGO se eleva del 0 al 18%. Podemos decir con base en estos resultados, que al incrementarse los niveles de CESTP se incrementan, en general, los niveles de CT y LDL y que, de acuerdo con el análisis estadístico, al incrementarse el porcentaje de riesgo en las diferentes categorías de CESTP, se incrementan simultáneamente el porcentaje de riesgo en las categorías de CT y LDL. Por otro lado, cuando los niveles de CESTP caen dentro del rango SOBREENEXPRESIÓN, los valores de CT y LDL vuelven a los rangos DESEABLE y LIMITROFE. Esto puede deberse a deficiencias en la actividad de CESTP que estimula la sobreexpresión de la proteína.

III.3.5 OBSERVACIONES SOBRE EL PERFIL DE LÍPIDOS

De acuerdo con los resultados de los ANOVAs, las variables, CT, LDL, HDL y CETP se incrementan de manera simultánea y, al contrario de lo esperado, HDL no muestra diferencias significativas contra todas las categorías de CT, LDL, Tg ni CETP. Por lo tanto, podemos considerar que, al menos en la población de estudio, los niveles de HDL no son un buen parámetro para evaluar el riesgo de aterogénesis. En cambio, el IA muestra una relación muy clara con el resto de los parámetros. El ANOVA del IA contra todas estas variables mostró diferencias significativas en todas sus categorías. En el caso específico de IA vs. CETP, como puede observarse en la figura 4, valores de CETP por arriba del rango DESEABLE pueden coincidir con IA de ALTO RIESGO, aún cuando sus niveles de CT y LDL se encuentran dentro del rango DESEABLE. Este IA de ALTO RIESGO se incrementa de 0% con CETP DESEABLE a 48% y 57% con CETP LIMITROFE y ALTO RIESGO, respectivamente. Es decir, que sujetos considerados como sanos por sus niveles de CT y LDL, pueden estar en realidad bajo condiciones de riesgo de aterogénesis, debido a la combinación IA de ALTO RIESGO con CETP de LIMITROFE o de ALTO RIESGO, ambos factores indicadores de que el balance metabólico del colesterol se inclina hacia la vía de depósito.

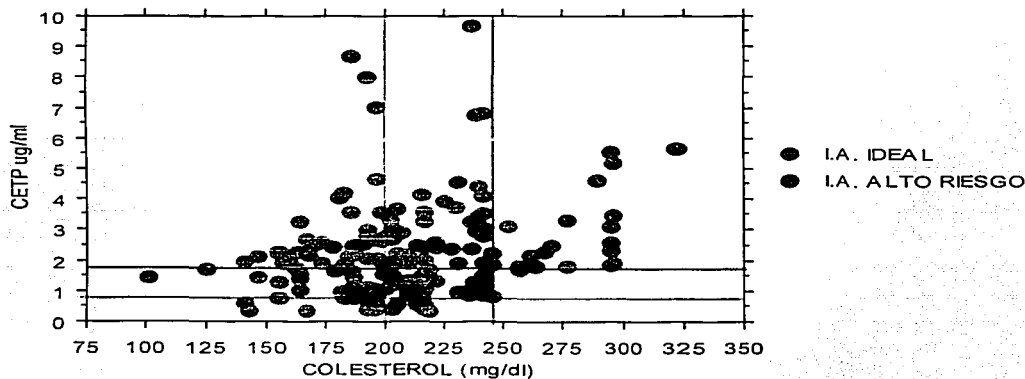
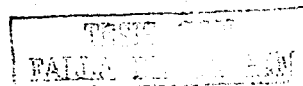


Figura 4. Representación gráfica de la regresión CT vs. CETP. Para ambas categorías las líneas en verde representan los puntos de corte entre las categorías DESEABLE y LIMITROFE, las líneas en rojo representan las líneas de corte entre las categorías LIMITROFE y ALTO RIESGO. Solo para CETP, la línea en amarillo indica el punto de corte entre las categorías alto riesgo y sobreexpresión. Los datos correspondientes para cada categoría se muestran con los siguientes colores: IDEAL (◐) y ALTO RIESGO (●).



Los ANOVAs de Tg contra CT, LDL e IA indican que la categoría ALTO RIESGO de Tg son significativamente superiores las otras dos categorías y que estos valores coinciden con valores de ALTO RIESGO para el resto de las variables. En la correlación de CETP vs. Tg, los valores dentro del rango LÍMITROFE de Tg tienen una media de CETP de $3.3 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$, significativamente mayor que las medias de los rangos DESEABLE y ALTO RIESGO, con $2.0 \pm 0.14 \mu\text{g/ml}$ y $2.3 \pm 0.20 \mu\text{g/ml}$, respectivamente. A concentraciones de CETP dentro del rango SEBREEXPERSION, Tg vuelven a ubicarse en el rango LÍMITROFE. El comportamiento de los niveles de CETP vs. Tg puede depender de la combinación de varios factores, sin embargo, hay que considerar que Tg no tiene distribución muestral normal, por lo que este resultado no indica, claramente, cual podría ser la tendencia de esta relación en una muestra de mayor tamaño.

En cuanto a los FR considerados en este estudio, la variable SEXO no mostró diferencias significativas entre sus categorías para ninguna de las variables. En la variable EDAD, los niveles de CT y LDL fueron especialmente altos en la segunda (15-19 años) y sexta (50-59 años) décadas de vida, con una media de 220 ± 6.4 y $237 \pm 14.6 \text{ mg/dl}$ para CT, y $120.5 \pm 5.74 \text{ mg/dl}$, $145.4 \pm 9.4 \text{ mg/dl}$ para LDL, respectivamente. El IMC sólo mostró diferencias significativas contra IA y HDL en que las medias, dentro de el rango de ALTO RIESGO (IA 5.33 ± 0.31 , HDL $36.8 \pm 2.67 \text{ mg/dl}$), coinciden con obesidad severa.

Los resultados expuestos hasta este punto indican la tendencia general de la población en sus diferentes variables; sin embargo, la prueba de independencia indica la confiabilidad de una variable al establecer si su incidencia determina la incidencia de otra en el mismo sujeto. Es decir, la prueba determina si el nivel de una variable está determinando o afectando por el nivel de otra. El porcentaje de probabilidad de error de la prueba se estableció con los valores críticos $\alpha = 0.975$. Los resultados de esta prueba se muestran en la tabla 6.

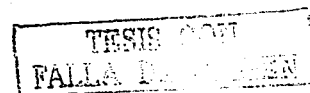
De acuerdo con estos resultados, CT es dependiente con casi todas las variables, especialmente con IA y LDL. Esta última es positiva aun con $\alpha = 0.99$, lo que corresponde a lo esperado, puesto que CT se considera como el factor etiológico más confiable y el valor de LDL se calcula con base a este. Los niveles de CETP mostraron estar asociados con los niveles de CT, LDL e IA ($\alpha = 0.975$). En la relación con Tg, la probabilidad se restringe al $\alpha = 0.90$, aunque no debe perderse de vista que la distribución muestral de Tg indica que al aumentar el tamaño de la muestra esta relación puede cambiar. La relación de independencia que mostró HDL con respecto a CETP y a otras variables del perfil de lípidos, se contraponen al valor de HDL como factor etiológico, como ya se mencionó antes. En un principio se esperaba que, asociado a este un aumento, se redujeran los

niveles de CETP. Sin embargo, bajo las mismas condiciones, en esta muestra piloto de población mexicana no se observa una relación entre ambos parámetros. Esta relación se establece más bien en la capacidad aterogénica dictada por el IA. Cabe recordar que el presente trabajo es el primero en su tipo que se realiza en población mexicana y, en general, latinoamericana; por lo que, no tenemos un parámetro de comparación al respecto.

Tabla 6. Prueba de independencia. Basada en el porcentaje de incidencia de cada categoría entre cada par de variables, indica si el nivel de una variable afecta (Dep) o no (Indep) estadísticamente el nivel de la otra.

$\alpha = 0.975$	CETP	CT	Tg	LDL	HDL	IMC
CT	Dep					
Tg	Indep	Dep				
LDL	Dep	Dep	Dep			
HDL	Indep	Dep	Indep	Indep		
IMC	Indep	Indep	Dep	Indep	Dep	
IA	Dep	Dep	Indep	Dep	Dep	Indep

Algunos reportes establecen una relación clara entre obesidad y Tg, que coincide con alteraciones en el metabolismo de las LPs con predominio de VLDL y HDL, y que la hipertrigliceridemia generada por esta condición es secundaria a la hiperglucemia asociado con hiperinsulemia y resistencia a la insulina, por lo que es un factor de riesgo importante para *diabetes mellitus* no insulino dependiente, con una incidencia de 80 al 85 %. Hay que destacar que este tipo de diabetes sigue con frecuencia un curso asintomático, por lo que del 30 al 40% de personas que la padecen no han sido diagnosticadas. No tenemos datos suficientes para asegurar que el comportamiento de la población se debe a su componente diabético, pero no podemos dejar de lado esta posibilidad.

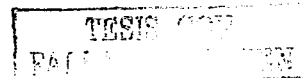


Dado que la mayoría de los casos diagnosticados de dislipidemias y aterosclerosis fueron detectados hasta que se presentaron las manifestaciones clínicas, la mayoría de los estudios poblacionales basan en la incidencia de cardiopatía isquémica aterosclerosa o en la insuficiencia vascular periférica. De acuerdo con el estudio Framingham, la mayor incidencia anual de entidades cardiovasculares, por cada 1000 habitantes, es de 46 hombres no diabéticos, 88.9 hombres diabéticos, 22.9 mujeres no diabéticas y 73.4 mujeres diabéticas. Hay que considerar que el corte de este estudio se restringe a un rango de 45-74 años. Por otro lado, la insuficiencia vascular periférica reporta una incidencia hombre / mujer de 30:1 en no diabéticos y de 2:1 en diabéticos, y en estos últimos la mortandad hospitalaria con amputación es de 1.5-3% (Reza, 1994). Tomando esta información como parámetro, debe establecerse si en nuestra población piloto presenta mayor incidencia de niveles de riesgo a partir de la cuarta década de vida y si la incidencia es mayor en el sexo masculino.

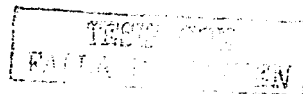
De acuerdo con lo anterior, puede decirse que la población de estudio presenta niveles de FR por encima de lo recomendable, donde algunos de los sujetos en el estudio presentan una grave hipercolesterolemia o hipertrigliceridemia y no han sido diagnosticados. La concentración de CETP está en relación con las concentraciones de otros FE como CT, LDL y Tg, aunque la relación con esta última variable parece ser menos estrecha. La concentración promedio de CETP en población mexicana es de 2.3 $\mu\text{g/ml}$ (± 1.6) lo que equivale a 41.98 pm/ml, que es superior a la reportada en población europea y cercana a la reportada en población estadounidense. Comparada con ambos casos nuestra población de estudio presenta un rango más amplio que va de 0.346 a 9.664 $\mu\text{g/ml}$.

La cuantificación de CETP, usando estos parámetros, como método de diagnóstico de aterogénesis permite un 97.5% de confiabilidad, es decir que la incidencia de cada categoría de CETP tendrá un 95% de coincidencia con las categorías equivalentes de dos de los más importantes FE como CT y LDL, y del 90 % con las de Tg, considerando que al ampliar en tamaño de la muestra esta relación podría mejorar observándose un porcentaje más alto.

Al incluir la cuantificación de CETP en el método de diagnóstico de riesgo de aterogénesis, se incrementa significativamente su certeza, puesto que no es un valor subjetivo como la obesidad, ni se deduce con base a otros factores como es el caso colesterol asociado a LDL y muestra, además, relación con el resto de los FR de aterosclerosis, lo que no sucede en el caso de HDL. Se trata de un valor cuantitativo, que se mide directamente en el plasma y cuyos parámetros para el diagnóstico de riesgo se asocian con los parámetros de FE importantes tales como CT y LDL y, aunque un poco menor, con Tg.

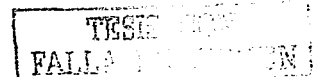


Es de gran importancia agregar que además de mejorar la certeza en el diagnóstico, CETP puede indicar si el balance metabólico se inclina hacia la vía aterogénica o hacia el transporte reverso, de manera que desordenes metabólicos que hubieran sido diagnosticados como de riesgo de aterosclerosis, ahora pueden entenderse como condiciones que protegen contra la aterosclerosis y viceversa. El uso rutinario en clínica de los niveles de CETP, permite identificar individuos que no tienen manifestaciones clínicas de aterosclerosis ni se encuentran dentro de los grupos de riesgo. Lo anterior facilita la detección de individuos con riesgo no diagnosticados, con síndromes atípicos y con prevalencia en la actividad de transporte reverso, es decir protegidos de la aterosclerosis. También facilita el seguimiento de pacientes ya diagnosticados y la evaluación de la efectividad de los tratamientos a los que son sometidos.

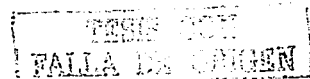


III.4 BIBLIOGRAFÍA

1. Brown ML, Inazu A, Hesler CB, Agellon LB, Mann C, Whitlock ME, Marcel YL, Milne RW, Koizumi J, Mabuchi H, Takeda R, Tall AR: Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins. *NATURE* 342(6248): 448-51, 1989
2. Clark RW, Moberly JB, Bamberg MJ: Low level quantification of cholesteryl ester transfer protein in plasma subfractions and cell culture media by monoclonal antibody-based immunoassay. *J Lipid Res* 36(4): 876-89, 1995
3. Corbex M, Poirier O, Fumeron F, Betoulle D, Evans A, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Tiret L, Cambien F: Extensive association analysis between the CETP gene and coronary heart disease phenotypes reveals several putative functional polymorphisms and gene-environment interaction. *Genet Epidemiol* 19(1): 64-80, 2000
4. Fielding PE, Fueling CJ: Dynamics of lipoproteins transport in the circulatory system. En *Biochemistry of Lipid, Lipoproteins and Membranes*. Vance DE, Vance J, p427-458, 1996
5. Freeman DJ, Griffin BA, Holmes AP, Lindsay GM, Gaffney D, Packard CJ, Shepherd J: Regulation of plasma HDL cholesterol and subfraction distribution by genetic and environmental factors. Associations between the TaqI B RFLP in the CETP gene and smoking and obesity. *Arterioscler Thromb* 14(3): 336-344, 1994
6. Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S Jr, Fuster V: AHA/ACC scientific statement: Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol* 34(4):1348-59, 1999
7. Gudnason V, Thormar K, Humphries SE: Interaction of the cholesteryl ester transfer protein I405V polymorphism with alcohol consumption in smoking and non-smoking healthy men, and the effect on plasma HDL cholesterol and apoA1 concentration. *Clin Genet* 51(1): 15-21, 1997
8. Hsu LA, Ko YL, Hsu KH, Ko YH, Lee YS: Genetic variations in the cholesteryl ester transfer protein gene and high density lipoprotein cholesterol levels in Taiwanese Chinese. *Hum Genet* 110(1):57-63, 2002
9. Inazu A, Quinet EM, Wang S, Brown ML, Stevenson S, Barr ML, Moulin P, Tall AR: Alternative splicing of the mRNA encoding the human cholesterol ester transfer protein. *Biochemistry* 31(8): 2352-3258, 1992
10. INEGI, SSA/DGEI: Principales causas de mortalidad en edad productiva, Estados Unidos Mexicanos. En *Estadísticas Vitales, Capítulo: Mortalidad*. 1998
11. Jiang XC, Moulin P, Quinet E, Goldberg IJ, Yacoub LK, Agellon LB, Compton D, Schnitzer-Polokoff R, Tall AR: Mammalian adipose tissue and muscle are major sources of lipid transfer protein mRNA. *J. Biol. Chem.* 266(7): 4631-4639, 1991

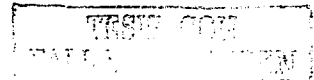


12. Kondo I, Berg K, Drayna D, Lawn R: DNA polymorphism at the locus for human cholesteryl ester transfer protein (CETP) is associated with high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein levels. *Clin Genet* 35(1): 49-56, 1989
13. Lagrost L: Regulation of cholesterol ester transfer protein (CETP) activity, review of in vitro and in vivo studies. *Biochim Biophys Acta* 1215(3): 209-236, 1994
14. Lerman GI: Cardiopatía isquémica aterosclerosa. En *Atención integral del paciente diabético*. Lerman GI editor. Interamericana-McGraw Hill, Mexico, D.F., Mexico. 233-240, 1996
15. Marotti KR, Castle CK, Boyle TP, Lin AH, Murray RW, Melchior GW: Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein. *Nature* 364(6432): 73-75, 1993
16. McPherson R, Grundy SM, Guerra R, Cohen JC: Allelic variation in the gene encoding the cholesterol ester transfer protein is associated with variations in the plasma concentrations of cholesterol ester transfer protein. *J. Lipid Res.* 37: 1742-1748, 1996
17. Morato HL, Posadas RC: Diagnóstico y tratamiento de las dislipidemias. En *Atención integral del paciente diabético*. Lerman GI, editor. Interamericana-McGraw Hill, México, D.F., México. 223-232, 1996
18. Nagashima M, McLean J, Lawn RM: Cloning and mRNA tissue distribution of rabbit cholesterol ester transfer protein. *J. Lipid Res.* 29: 1643-1649, 1988
19. Oliveira H, Chouinard R, Agellon L, Bruce C, Ma M, Walsh A, Breslow JL, Tall AR: Human cholesteryl ester transfer protein gene proximal promoter contains dietary cholesterol positive responsive elements and mediates expression in small intestine end periphery while predominant liver and spleen expression is controlled by 5'-distal sequences. *J. Biol. Chem* 271(50): 31831-31838, 1996
20. Reza AAA: Insuficiencia vascular periférica. En *Atención integral del paciente diabético*. Lerman GI editor. Interamericana-McGraw Hill, México, D.F., México. 241-248, 1994
21. Ritsch A, Auer B, Föger B, Schwarz S, Patsch JR: Polyclonal antibody-based immunoradiometric assay for quantification of cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res* 34: 673-679, 1993
22. Rye KA, Hime NJ, Barter PJ: The influence of cholesteryl ester transfer protein on the composition, size, and structure of spherical, reconstituted high density lipoproteins. *J Biol. Chem* 270(1): 189-196, 1995
23. Tall A: Plasma lipid transfer proteins. *Annu Rev Biochem* 64: 235-25., 1995
24. Vohl MC, Lamarche B, Pascot A, Leroux G, Prud'homme D, Bouchard C, Nadeau A, Despres JP: Contribution of the cholesteryl ester transfer protein gene TaqIB polymorphism to the



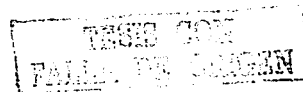
reduced plasma HDL-cholesterol levels found in abdominal obese men with the features of the insulin resistance syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23(9): 918-925, 1999

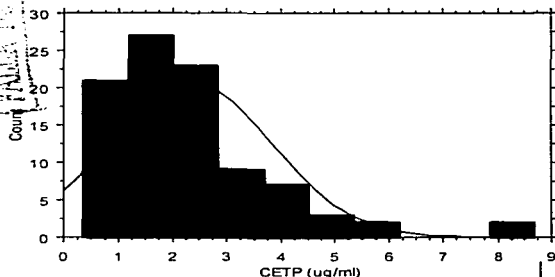
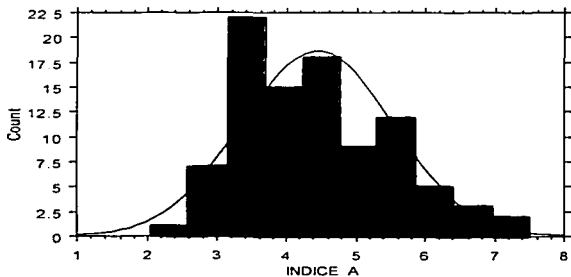
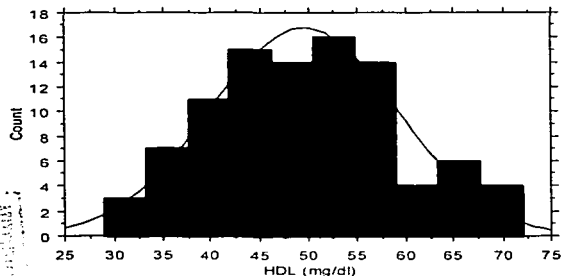
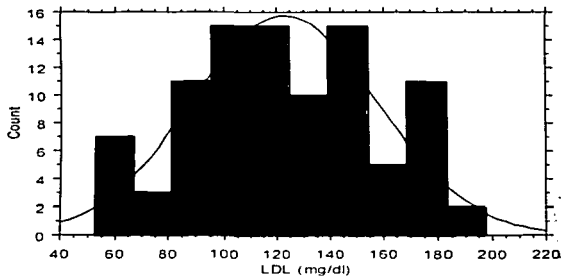
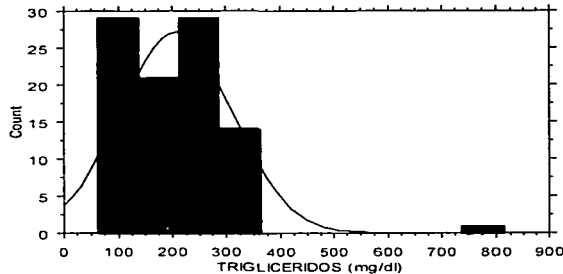
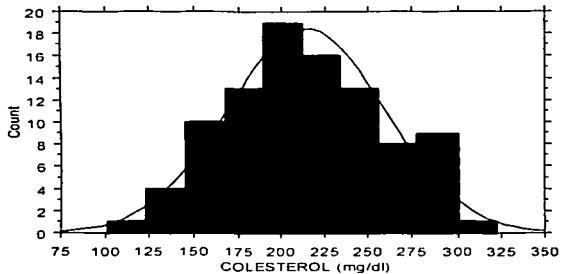
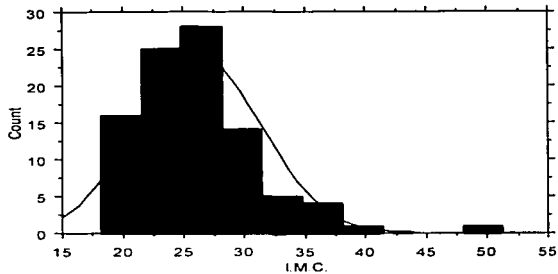
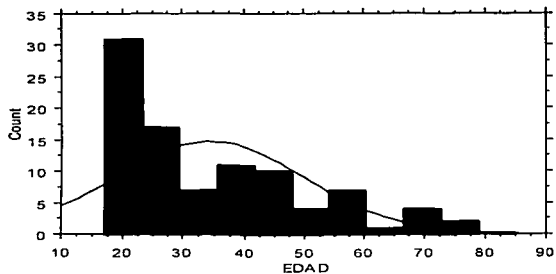
25. Von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G: High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(1): 13-27, 2001
26. Zhuang Y, Wang J, Qiang H, Li Y, Lui X, Li L, Chen G: Serum cholesteryl ester transfer protein concentrations in healthy Chinese subjects and cardio-cerebrovascular disease patients. *Clin Chim Acta* 305(1-2):19-25, 2001



Capítulo III

III.5 ANEXO





IV. Conclusiones y Perspectivas

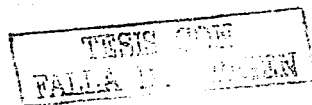
IV.1 Capítulo I

- La isoforma CETPI se expresa en individuos normolipidémicos, es decir, no parece estar asociada con niveles anormales de lípidos en plasma.
- CETPI muy probablemente carece de la capacidad de transferencia de ésteres de colesterol. Por otro lado, hasta el momento no hay evidencias de diferencias en los sitios de unión a fosfolípidos y Tg entre CETP y CETPI, por lo que, CETPI podría conservar su capacidad de unión a ambos.
- Los resultados hasta el momento indican que la expresión de CETPI es tejido específica de CETPI en intestino delgado, por lo tanto, la CETPI presente en plasma puede tener como única fuente a este órgano.
- Esto significa que CETPI podría intervenir en la homeostasis de colesterol con una función diferente a la de CETP.

Este trabajo plantea nuevos cuestionamientos acerca del papel de CETPI en la homeostasis de lípidos. Una de las principales preguntas a responder es si las diferencias en estructura entre CETP y CETPI conllevan diferencias en su función. Otra es confirmar el carácter tejido específico de CETPI, para ello debe ampliarse el análisis de tejidos hasta cubrir su totalidad, aunado a esto se pretende determinar si existen diferencias en los niveles de expresión de ambas isoformas en condiciones normo e hiperlipidémicas, tanto por causas endógenas como exógenas, para lo cual se planea el uso de la técnica de PCR en tiempo real. En este momento ya se tienen avances en el estudio de función, anexo al Capítulo I se presenta un resumen de un trabajo en proceso enfocado a dilucidar la función de CETPI.

IV.2 Capítulo II

- El sistema de cuantificación de CETP, es útil para muestras biológicas y sintéticas.
- El anticuerpo primario confiere al sistema de cuantificación de CETP afinidad y especificidad adecuadas para este uso.

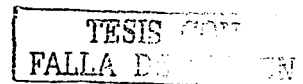


- La capacidad de detección permite evaluar muestras de plasma humano con concentraciones de CETP mas allá de los niveles máximos y mínimo reportados por otros autores.
- El sistema permite el manejo de un gran número de muestras, así como la obtención de resultados en un tiempo relativamente corto.

En asociación con la empresa SILANES S.A., se pretende llevar el escalamiento de este sistema de cuantificación en el ámbito de producción industrial, lo que implica su validación bajo las normas de eficiencia y confiabilidad a las que debe sujetarse una industria de este tipo. Por otro lado el escalamiento implica a su vez un escalamiento en la capacidad de manejo de muestras de plasma. Ambos objetivos se realizaran de manera simultánea en colaboración con dicha empresa.

VI.3 *Capítulo III*

- El nivel medio de CETP en población mexicana es diferente a la reportada en población europea y estadounidense, además presenta un rango de valores más amplio, similar a lo reportado en poblaciones asiáticas. Esta observación nos hace considerar que, al aplicar parámetros establecidos para otras poblaciones corremos el riesgo de llegar a diagnósticos erróneos, por lo tanto, deben establecerse parámetros propios para nuestra población.
- Las categorías de los niveles de CETP que se establecieron en este trabajo (DESEABLE, LIMITROFE, ALTO RIESGO y SOBRE-EXPRESION) son adecuadas para la muestra en que se realizó el estudio. Sin embargo, es necesario ampliar el tamaño de la muestra para confirmar estas observaciones.
- La variable HDL mostró no ser un buen parámetro para el diagnóstico de riesgo. Esto apoya lo reportado en trabajos epidemiológicos recientes que ponen en duda su utilidad como parámetro de riesgo.
- Niveles de alto riesgo de cualquiera de las variables CT, LDL, IA y CETP promueve niveles de alto riesgo de, al menos, otra de ellas. La combinación de niveles elevados de dos o más de estos factores refuerzan la probabilidad de presentar alguno de los problemas asociados a la aterosclerosis.



- Cuando los niveles de CETP caen dentro del rango SOBREENPRESIÓN, el resto de las variables muestran niveles deseables o de bajo riesgo. Para explicar lo anterior se propone que deficiencias en la actividad de CETP inducen su sobreexpresión, sin embargo, esto no logra igualar el nivel de actividad que se asocia con niveles de alto riesgo de las otras variables. Esta hipótesis deberá ser refrendada en trabajos posteriores.

Basados en las observaciones hechas en este estudio, se considera que en trabajos posteriores deberá ampliarse el tamaño de la muestra, con el fin de hacerla representativa para todos los parámetros. Por otro lado, las observaciones hechas en cuanto a la media y rango de datos de CETP plasmática, deben ser confirmadas en muestras de mayor tamaño. Esto podría implicar a su vez, la necesidad de hacer estudios más específicos, en los que se consideren factores tales como condición socioeconómica y grupo étnico, entre otras. Este trabajo también muestra la necesidad de un estudio longitudinal en nuestra población a fin de confirmar nuestras observaciones, sin embargo, este objetivo sólo podría ser cumplido en colaboración con instituciones de salud en México. Por el momento, no se considera el desarrollo de un estudio longitudinal, sin embargo se pretende establecer un vínculo de esta naturaleza en colaboración con SILANES S.A., como apoyo al proyecto de escalamiento propuesto para el sistema de cuantificación de CETP.



Characterization of a naturally occurring new version of the cholesterol ester transfer protein (CETP) from small intestine

Ana L. Alonso¹, Alejandro Zentella-Dehesa² and Jaime Mas-Oliva¹

¹Departamentos de Bioquímica, ²Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México.

Received 26 March 2002; accepted 16 September 2002

Abstract

The cholesterol ester transfer protein (CETP) is found in plasma mediating the transfer of cholesterol esters and triacylglycerides between lipoproteins. The last 26 amino acids of its carboxy-end correspond to an amphipathic α -helix whose hydrophobic side has been directly involved in the transfer of lipids [1–3]. Alterations in this region lead to the reduction or loss of lipid transfer activity [3–5]. To date, the only variant of the CETP messenger that has been reported lacks exon 9 [6–8], which translates into an inactive isoform regarding neutral lipid transfer [6–8]. In this study, we describe a new version of the messenger RNA of rabbit CETP identified exclusively in the small intestine of wild type (WT) rabbits. This isoform includes several of the intron bases prior to exon 16. The presence of a stop codon within this sequence prevents translation of exon 16, substituting the original carboxy-end sequence and therefore generating a random structure that does not contain the region responsible for neutral lipid transfer. Antibodies generated against a peptide within the carboxy-end sequence of the new isoform show the presence of this new protein in human plasma. (Mol Cell Biochem 245: 173–182, 2003)

Key words: alpha-helix, CETP, cholesterol, isoform, small intestine

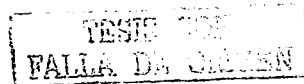
Introduction

The cholesterol ester transfer protein (CETP) mediates cholesterol esters and triacylglycerides transfer among high-density lipoproteins (HDL), low-density lipoproteins (LDL), and very-low-density lipoproteins (VLDL). In humans, although the molecular weight of CETP obtained from its cDNA is 53 kDa, employing denaturing gels CETP isolated from plasma shows two different molecular forms (66 and 74 kDa). This phenomenon may be due to several degrees of glycosylation present in residue 341 [9]. CETP is a highly conserved protein in several mammalian species. CETP in the rabbit presents 496 amino acids, with a sequence homology of 81% against the 476 amino acids of human CETP, in which two thirds of these substitutions are conservative [10]. These

data implicate an important structural similarity between human and rabbit CETP [11,12]. The last 26 amino acids of the carboxy-end for CETP present a well-defined amphipathic α -helix structure, whose hydrophobic side has been directly involved in cholesterol ester transfer [1, 2]. Modifications on the region contained between amino acids 470–475 of human CETP and 490–495 in rabbit lead to the reduction or loss of lipid transfer activity without affecting their capacity to associate with lipoproteins [4, 13].

Since rabbit CETP mRNA presents an homology of 85% with its human form and contains a large sequence of 230 pb, it is estimated to have 2.2 kb in length [7]. The CETP messenger is composed of 16 exons containing 8% of the gene sequence [14]. To date, various mutations in the CETP messenger have been reported, some of which derive in alternative splicing that correlates with alterations of HDL and LDL

Address for offprints: J. Mas-Oliva, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México (E-mail: jmas@fisiologia.unam.mx)



levels in plasma. Only one isoform of CETP described in the human has been reported so far. This isoform that lacks exon 9 (CETP Δ 9) is poorly secreted at normal plasma lipid levels and has shown to be inactive in the transfer of neutral lipids. Mice bearing the Δ 9 CETP transgene have also shown to be able to secrete this isoform into plasma [8]. This isoform seems to be retained in the endoplasmic reticulum and forms intracellular heterodimers with normal CETP. This mechanism has been considered as a regulatory process in the secretion of the complete form of CETP [6,7]. On the other hand, although the highest levels for the CETP messenger have been found in the liver, it has been also reported in a great variety of peripheral tissues, including the small intestine [4, 10]. These results suggest a local induction in the synthesis of CETP, mechanism that might aid in the recycling of cholesterol deposited in peripheral tissues during lipoprotein lipolysis [4, 10, 15, 16].

The present study reports the presence and initial characterization of an alternative form of CETP not described to date. During our investigation, the mRNA of this new isoform called CETPI was only found associated to the small intestine in the rabbit. The CETPI messenger includes at least part of the intron prior to exon 16. Due to the presence of a stop codon within this intron, the translation of exon 16 does not take place, leading to the substitution of the last 24 amino acids of CETP at its carboxy-end. This change in its primary structure implicates the substitution of the original amphipathic α -helix structure [13, 17] by a hydrophilic random structure rich in prolines. The presence of CETPI has been demonstrated in this study to be present in human and rabbit plasma.

Materials and methods

³²PmRNA Isolation, reverse transcription coupled to the polymerase chain reaction (RT-PCR), and sequence analysis

Total RNA extractions from adipose tissue, brain cortex, endothelium, heart, kidney, liver, lung, muscle, pancreas, small intestine, spleen, ovary and uterus from female white New Zealand WT rabbits presenting normal plasma lipid levels, were performed using the method described by Sumikawa *et al.* [18]. The fraction of poly(A⁺) RNA from all tissues was isolated by column chromatography using oligo(dt)-cellu-

lose. cDNAs were synthesized employing a commercial system for RT-PCR (Perkin-Elmer, Branchburg, NJ, USA) using 100 ng of liver mRNA and 400 ng of mRNA from other tissues. Additionally, cDNAs were synthesized from 3 μ g of total liver RNA and 7 μ g from small intestine RNA. Primers employed in polymerase chain reaction (PCR) amplifications and sequence reactions were designed with the MacVector software (Genetic Computer Group, Madison, WI, USA), based on the cDNA sequence for the rabbit CETP published by Nagashima *et al.* [10] (Table 1). Primers were also designed for control reactions, based on the rabbit glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA sequence reported by Appletquis *et al.* [19] (Table 1). PCR amplifications were carried out in 35 cycles and 55°C with primer pairs RAB5-RAB6 and GA3PF-GA3PR. For the sequence reactions, the RAB4, RAB5, RAB6, GA3PF, and GA3PR primers were used employing the following commercial systems: Secucase Version 2-0 (Amersham, Cleveland, OH, USA); AmpliTaq DNA polymerase (AmpiCycle Sequencing Kit, Perkin Elmer, Branchburg, NJ, USA) and dsDNA Cycle Sequencing System (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA). The nucleotide sequences were determined from both DNA strands. The sequences of all PCR products were aligned with the analysis performed using the following data banks: GeneBank, EMBL, DDBJ, and protein data bank (PDB).

³²cDNA Probes for Northern and Southern-blot analysis

The identities of PCR products amplified with the RAB5-RAB6 primers were verified with Southern-blot hybridizations, using the RAB4 primer as an internal probe. PCR products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gels and transferred to NYLON membranes (HYBOND-N+, Amersham, UK). Membranes were hybridized with the RAB4 probe (19 nt) at 37°C and washed at 58°C with NaCl-Trisodium Citrate Buffer pH 7.0. They were later exposed on X-OMAT autoradiographic plates (Kodak, Rochester, NY, USA). Radioactive labeling of the RAB4 primer was carried out with δ -ATP-[³²P] using the Pharmacia Biothec Oligolabelling Kit (Uppsala, Sweden).

For Northern-blot hybridizations, the integrity of total RNA and mRNA samples were verified by electrophoresis in 1% denaturing agarose gels. Using denatured twin gels, 100 mg of total liver and small intestine RNA were electrophoresed and transferred to NYLON membranes (HYBOND-N, Amersham, UK). The amplified PCR product with the pair of primers RAB5-RAB6 was used as a probe against CETP, and GA3PF-GA3PR as a probe against GAPDH, both obtained from liver mRNA. Labeling of the probe was carried out with [α -³²P] deoxycytidine 5'-triphosphate using the Random Primed DNA Labeling Kit (Boehringer, Mannheim, Ger-

¹The original nucleotide sequence reported in this paper has been deposited in the DDBJ database under the accession no. 20011025040619.79609

²Several protocols and materials described in this paper have been registered according to the International Patent Cooperation Treaty, with International Publication Number WO 02/32935. This application has been registered at the European Patent Office (WIPO) with a priority date of 1999.

107

Table 1. Primers used in PCR and sequencing reactions

CDNA	Primers	Position	Sequence
CETP	RAB4 Antisense	1462-1443	5' GTGCTTGGGAAAACCGAAG 3'
CETP	RAB5 Sense	1391-1414	5' TCATCAACCCGAGATTATC ACTC 3'
CETP	RAB6 Antisense	1852-1828	5' TCGTTTACTGGAGAGCAGAGAG 3'
GAPDH	GA3PF Sense	79-104	5' TGAAGGTCTGGAGTCAACCGATTGG 3'
GAPDH	GA3PR Antisense	1061-1040	5' GGTGACCTCATGGCCACATG 3'

many). The membranes were simultaneously hybridized with the RAB5-RAB6 and GA3PF-GA3PR probes, and later analyzed while exposed on a Phosphorimager screen (Storm System, Pharmacia Molecular Dynamics, Uppsala, Sweden).

²Cloning of CETP and CETPI, cDNAs and recombinant proteins

PCR products generated with RAB5-RAB6 primers were cloned in the pMosBlue T vector (Amersham, UK). They were later subcloned in the pGex-2T expression vector (Pharmacia LKB Biotec, Uppsala, Sweden), generating one control and two recombinant plasmids called pGex-2T, pGex-2T/ID1 and pGex-2T/ID2 respectively. These plasmids were transformed in *Escherichia coli* DH5 α strain for the obtention of recombinant proteins fused to glutathione-S-transferase (GST). The transformed bacteria were cultured during 8 h at 37°C in 500 ml of Super Luria Broth with 50 μ g/ml of ampicillin. The partially purified recombinant proteins CETP 3'/GST, CETPI 3'/GST and control GST were obtained following the next protocol. Culture induction was performed with 0.4 mM of IPTG during 3 h. The transformed bacteria were suspended in phosphate-buffered saline (PBS), ethylenediaminetetraacetate (EDTA) 50 mM, aprotinin 1%, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 1 mM, benzamidine 5 mM, leupeptine 10 μ g/ml and later sonicated in cycles for 10 sec and 30 sec on ice. The lysed products were applied to agarose glutathione columns (Sigma, St. Louis, MO, USA).

²Epitope analysis, peptide antigen design, and antibody production

The sequences of the different PCR products amplified with the pair of primers RAB5-RAB6 from small intestine and liver mRNA, were translated into amino acid sequences and analyzed with the help of the DNAsar software (Lasergene, Madison, WI, USA). Predictions for the Kyte-Doolittle hydrophobicity index and secondary structure were achieved employing the Chou-Fasman and Garnier-Robson algorithms. Results of these analyses were confirmed by PHD (Profile Network Prediction, Heidelberg). Based on this information, two synthetic peptides with the CETP and CETPI carboxy-

end sequences were designed. These peptides were synthesized by PeptidoGenic Research and Co. (Livermore, CA, USA). They included an additional cysteine residue in the amino-end in order to allow direct coupling with KLH (Key-hole Limpet Hemocyanin). The peptides coupled to KLH were used for the production of anti-CETP IgY and anti-CETPI IgY antibodies in white Leghorn chickens, utilizing a standard protocol of 63 days carried out by ADI (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, USA). Antibody titers in plasma were determined by enzyme-linked immunosorbent (ELISA). IgYs were isolated from 12 eggs. Anti-BSA IgY antibodies (bovine serum albumin antibodies) were also obtained from white Leghorn chickens inoculated subcutaneously once a week in the presence of complete Freund's adjuvant (Sigma Immuno Chemicals, St. Louis, MO, USA) on first application, and with incomplete Freund's adjuvant (Sigma Immuno Chemicals, St. Louis, MO, USA) in three subsequent applications. Prior to each application, blood was withdrawn, plasma separated and antibody presence filtered by ELISA.

The specificity of the antibodies used studied by ELISA and Western-blot analysis, was determined using cross-reaction tests with three antibodies (anti-CETP IgY, anti-CETPI IgY and anti-BSA IgY). Each antibody was tested against both free synthetic peptides CETP and CETPI, BSA, synthetic peptides coupled to BSA, and recombinants fused to GST (control GST, CETP 3'/GST and CETPI 3'/GST). Each test included preimmune chicken antibodies as a control (data not shown).

²Electrophoresis and immunoblotting

Western-blot tests were performed against crude and lipid-depleted extracts of liver and small intestine in addition to human and rabbit plasmas. Organs employed in these tests were previously perfused with Krebs-Ringer buffer (pH 7.4). Preparation of crude extracts was performed with 0.5 g of tissue homogenized in 5 ml suspension buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL pH 7.6, 1 mM EDTA-NaOH pH 8.0, 1 μ g/ml aprotinin, and 100 μ g/ml PMSF). Crude extracts were lipid-depleted employing 60% acetone extractions. Protein quantification in the lipid-depleted extracts was performed employing the BCA Protein Assay Reagent method (PIERCE,

WALLEN

Rockford, IL, USA) and in total plasma samples using the Folin-Lowry method. Crude liver (20 µg protein) and small intestine (30 µg protein) extracts, as well as plasma samples (40 µg protein) were subjected to electrophoresis in 12.5% sodium dodecyl sulfate-acrylamide gels. Three µg of BSA were used for the anti-BSA IgY positive control and 40 µg of BSA as negative control for anti-CETP IgY and anti-CETP1 IgY. This material was electrotransferred to 0.45 µm nitrocellulose membranes (Trans-Blot Transfer Medium, BIO-RAD, Hercules, CA, USA). In tissue samples, anti-CETP IgY was used in 1:5,000 dilutions and anti-CETP1 IgY in 1:30,000. In plasma samples and negative controls with BSA, anti-CETP IgY 1:5,000 and anti-CETP1 IgY 1:15,000 were used. For positive control with BSA, anti-BSA IgY at a dilution of 1:25,000 was employed. In all cases, a peroxidase-conjugated IgG anti-chicken secondary antibody (PIERCE, Rockford, IL, USA) was used in a dilution 1:10,000. All incubations with the different antibodies were carried out using a suspension of 2.5% powdered skimmed milk in tris-buffered saline - Tween 0.1% (TTBS), 37°C for 1 h. Visualization was carried out using SuperSignal Substrate (Pierce, Rockford, IL, USA) on X-OMAT autoradiographic plates (Kodak, Rochester, NY, USA).

Results and discussion

A new version of the CETP messenger expressed in the small intestine

The product we call ID1 was obtained by means of RT-PCR amplifications from mRNA extracted from representative tissues such as liver, heart, small intestine, and adipose tissue. No amplification products were obtained from spleen and uterus mRNA, perhaps due to the fact that mRNA levels of CETP in these tissues are below the detection capacity of

the methodology used. The ID1 product had the expected size of 461 pb for amplifications utilizing the RAB5-RAB6 pair of primers, according to the rabbit CETP cDNA sequence reported by Nagashima *et al.* [10] (Fig. 1A). RT-PCR from small intestine mRNA additionally generates a second product of 569 pb that we call ID2 (Fig. 1A). Employing Southern-blot analysis it is confirmed that although very close to each other, both amplified products correspond to CETP cDNA (Fig. 1B). Figure 1C shows the control assay using liver and small intestine without the presence of reverse transcriptase in the mixture reaction. We can conclude that the amplification shown by ID1 and ID2 was obtained from mRNA and not from contaminant DNA.

Sequence analysis of ID1 and ID2 showed that both products were amplified from CETP messengers. The nucleotide sequence of the ID1 fragment comprises from base 1391 located at the 3' end of exon 15 to base 1852 found in the non-encoding region of exon 16. The ID1 product sequence presents an identity of 100% with the encoding region sequence of rabbit CETP cDNA [10], and of 87% with the reported human CETP sequence [17]. The ID2 product sequence also has an identity of 100% with the reported CETP cDNA sequence; however, it includes a section of 108 pb between exons 15 and 16 that we call Sequence I (Fig. 2).

This is situated between nucleotides 1419 and 1420 at the limit between exons 15 and 16. Figure 2B shows part of the ID2 product sequence, i.e. from nucleotide 1391 in exon 15 to nucleotide 1449 in exon 16 (Sequence I is shown in upper-case letters). Figure 2A, shows the stop codon in position 1491 reported for the messenger of rabbit CETP [10]. Two more stop codons are found within Sequence I, one in position 55 and the other at the 3' end at position 106 (Fig. 2). According to the translation of nucleotide sequences to amino acid sequences, ID1 corresponds to the previously reported version of rabbit CETP and can be translated into the active protein that is liberated in plasma. On the other hand, the mRNA of ID2 corresponds to a version of the CETP

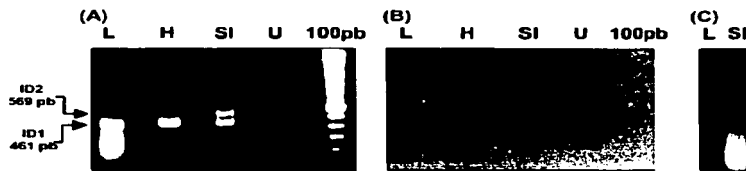


Fig. 1. Southern-blot analysis of RT-PCR products showing ID1 and ID2 amplifications. (A) Agarose gel products amplified by RT-PCR with RAB5-RAB6 primers from mRNA of liver (L), heart (H), small intestine (SI), and uterus (U). (B) Southern-blot radiography employing the RAB4 probe. The small intestine expresses a variant of CETP mRNA represented by the ID2 amplification product. (C) Control assay for liver and small intestine performed without reverse transcriptase.

RECEIVED
FALLA DE 1991

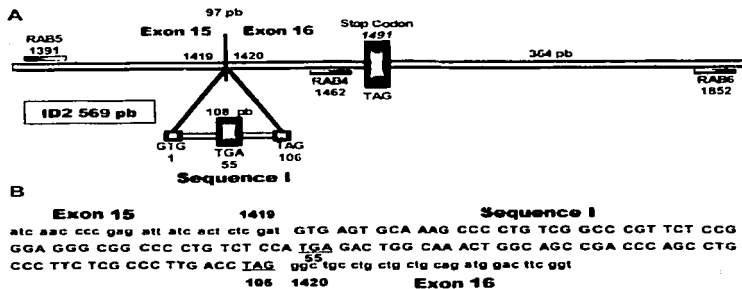


Fig. 2. Schematic representation of ID1 and ID2 showing the localization of Sequence I and stop codons. A) ID1 and ID2 present an identity of 100% when compared to the rabbit CETP¹ sequence. ID2 includes Sequence I containing 108 pb between CETP exons 15 and 16 and nucleotides 1419 and 1420. (B) Within Sequence I (upper-case letters), there are two stop codons (underlined), one in position 55 (TGA) and the other in its 3' end at position 106 (TAG). Translation stops at codon 55 of Sequence I preventing the entire exon 16 from being formed.

messenger not reported to date, which is expressed in the small intestine of the rabbit and translates into the new isoform CETP¹.

Considering that Sequence I is an intron, the ID2 product could have been amplified from non-edited mRNA contaminant in the small-intestine sample. In order to discard this possibility, RT-PCR was performed using an excess of total RNA, of both liver and small intestine. These results showed that the ID1 product is obtained from the samples in both tissues; nonetheless, the ID2 product could only be obtained from the sample of small intestine, similar to the results obtained with mRNA (Fig. 1). Therefore, we conclude that the small intestine expresses a variant of CETP mRNA, represented by the ID2 amplification product.

In order to attempt to establish the approximate molecular weight for this variant of the CETP messenger, Northern-blots were carried out. Figure 3A shows the result of hybridization with the GA3PF-GA3PR control probe. Lanes 1 and 2 (total liver and small intestine RNA respectively) correspond to a band of approximately 1.3 kb that matches the size of rabbit GAPDH mRNA. Figure 3B demonstrates the result of hybridization with the RAB5-RAB6 probe. In lane 3 (total liver RNA), a single band with 2.2 kb can be observed corresponding to the approximate size of the rabbit CETP messenger. The agarose-formaldehyde gel of 18s (1.7 kb) rRNA and 28s (4.7 kb) rRNA shown in Fig. 3A can be used as a reference for relative mobility. In lane 4 (total RNA of small intestine) the same band is observed; however, a second band with lower mobility that could correspond to the transcript of ID2 could not be clearly found. Since the ex-

pected size for CETP¹ mRNA is 2.3 kb compared to 2.2 kb for CETP, such a small difference in size is difficult to resolve in 1% agarose gel.

CETP¹ lacks a cholesterol esters binding domain

Figure 4A shows a comparison between the amino acid sequence of the carboxy-ends of CETP and CETP¹ translated from the nucleotide sequences for the RT-PCR ID1 and ID2 products. Translation of the CETP mRNA ends at the stop codon in position 1491, while the CETP¹ messenger stops at

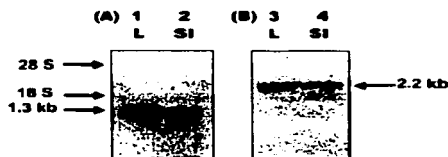
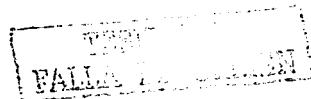


Fig. 3. Northern-blot hybridization of total RNA isolated from different tissues employing the Rab5-Rab6 probe. (A) Hybridization with the GA3PF-GA3PR control probe with total liver RNA (L) (lane 1) and total small intestine RNA (SI) (lane 2). A band of approximately 1.3 kb was observed, corresponding to the size of rabbit GAPDH mRNA. (B) Hybridization with the RAB5-RAB6 probe against CETP¹; a band around 2.2 kb was observed in lanes 3 and 4.



A

Isotform	Carboxy-end Sequences	Structure (Prediction)	M.W. (kDa)	I.P.	Peptide
CETP 33 AA	INPEIITLDGCLLLQMDFGFPKHL <u>LVDFLQSL</u> S	Alpha Helix	3731.10	3.99	Soluble at pH 9.5
CETPI 27 AA	INPEIITLDVSAKPLS <u>A RSPGG RPLSP</u>	Random	2785.60	9.00	Soluble at pH 7.0

B

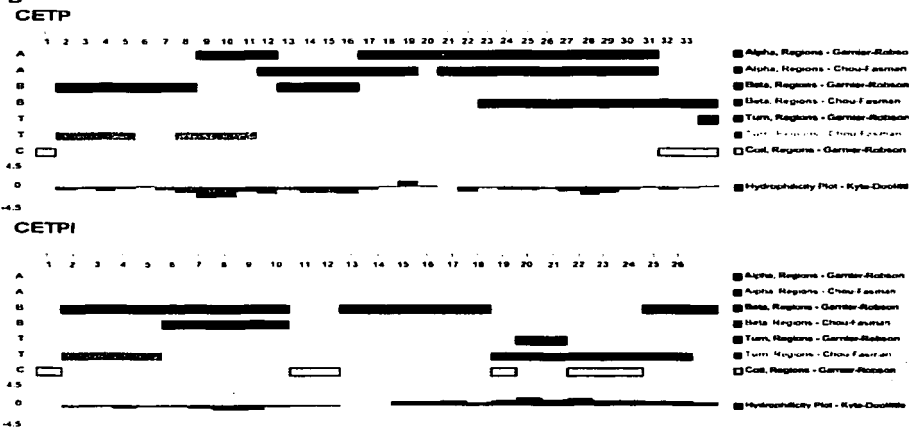
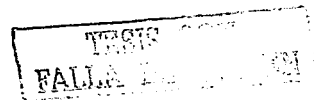


Fig. 4. Comparison between the amino acid sequences of the carboxy-ends of CETP and CETPI. (A) Amino acid sequences translated from ID1 and ID2 RT-PCR product sequences. The underlined regions represent the synthetic peptides designed for antibody production. (B) According to the analysis of the amino acid sequences using the Garnier-Robson, Chou-Fasman, and PHD algorithms, CETPI lacks the C-terminal amphipathic α -helix structure. In its place, the CETPI carboxy-end presents a hydrophilic random structure.

codon 55 of Sequence I, preventing the entire exon 16 from being translated. Therefore, both sequences are identical up to residue D472, the last amino acid encoded by exon 15. The remainder of the primary structure of the carboxy-end of CETPI lacks any homology with the carboxy-end of CETP. These differences in primary structure might be related to their well known properties, such as isoelectric point, molecu-

lar weight, hydrophobicity, and probably secondary structure (Fig. 4) [13].

Contained in the sequence of the CETP carboxy-end, residues F481, L488, F491, and L495 are shown in *italics* in Fig. 4A. These residues have been shown via directed mutagenesis to be important in maintaining the transfer activity of cholesterol esters [4]. As observed in the carboxy-end of



CETPI, the last 24 amino acids of the original form of CETP, including the previously mentioned residues, are substituted with 18 amino acids encoded by Sequence I. According to our calculations the last 26 amino acids of the carboxy-end of CETP have a high content of amphipathic α -helix structure in agreement with other authors [1-7]. Our prediction concerning its secondary structure employing the Garnier-Robson, Chou-Fasman, and PIIID algorithms, shows that CETPI does not preserve such an amphipathic α -helix (Fig. 4B). Instead, the secondary structure of the carboxy-end of CETPI acquires a random structure that is hydrophilic and rich in prolines. This information suggests that CETPI most probably lacks a binding site for cholesterol esters, as previously analyzed by us [13].

CETP and CETPI translate in small intestine

Based on the amino acid sequences shown in Fig. 4A, we designed two synthetic peptides corresponding to the carboxy-ends of CETP and CETPI. The sequences for both peptides are shown underlined in Fig. 4A. These synthetic peptides were used in the production of polyclonal antibodies anti-CETP IgY and anti-CETPI IgY. In Western-blot tests employing the anti-CETP IgY antibody against crude extracts of liver and small intestine, we observed that CETP shows a band around 68 kDa, which is expressed in both tissues (Figs 5A and 5B). The use of the anti-BSA IgY antibody against liver, small intestine and BSA itself, give a signal around 66 kDa (shown as reference in Fig. 5E). Figure 5C show that the anti-CETPI IgY antibody only recognizes a single band around 53 kDa, 15 kDa less than CETP that is only detected in extracts from small intestine. Figure 5D shows the result using the mixture of both, the anti-CETP IgY and the anti-

CETPI IgY antibodies. The difference in 15 kDa between CETP and CETPI seen in our Western-blot analysis is larger than the change in size expected for a difference of only six amino acid residues. Therefore, we might conclude that additional differences must exist between the two proteins in order to explain this change in mobility. The differences in sequence and predicted secondary structure between CETP and CETPI might be responsible for several of their physicochemical properties (Fig. 4). The isoelectric point predicted for CETP (with 496 aminoacids) is 6.41 compared to the isoelectric point predicted for CETPI (with 490 aminoacids) of 7.09. This change could also affect the relative mobility of CETPI in polyacrylamide gels. Employing lipid-depleted samples, the difference in mobility remained constant; therefore, discarding the possibility that the presence of lipid bound to the proteins might affect their migration in the gels. The possibility of posttranslational modifications that might affect the relative mobility of the CETPI is at the moment under consideration in our laboratory.

The presence of CETPI in plasma

To establish whether CETPI is secreted into plasma in a manner similar to the case of CETP, we studied plasma samples from both; normolipidemic human subjects, and normal rabbits. Plasma samples shown in Fig. 6 were studied by Western-blot analysis. Figure 6A shows plasma samples from both species, human and rabbit. Using the anti-CETP IgY antibody, we established that CETP is present in both human and rabbit plasma with an approximate molecular weight around 66 and 68 kDa respectively (Fig. 6B). Employing the anti-CETPI IgY antibody we demonstrated that CETPI is also present in the plasma of both species (Fig. 6C). On other hand



Fig. 5. Identification of CETP and CETPI in tissue extracts by immunoblot analysis. Molecular weight marker (MW) and crude extracts from liver (L) and small intestine (SI) (panel A), incubated with anti-CETP IgY (panel B), anti-CETPI IgY (panel C) and the combinations of both (panel D). Control anti-BSA IgY (panel E).

TISSUE CULTURE
FALLA DE 1984

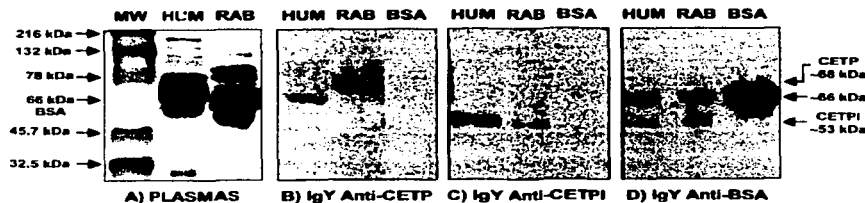


Fig. 6. Identification of CETP and CETPI in human and rabbit plasmas by immunoblot analysis. Molecular weight marker (MW), Human plasma (HUM) and rabbit plasma (RAB) (panel A). Human plasma (HUM) and rabbit plasma (RAB) using the anti-CETP IgY antibody (panel B). Human plasma (HUM) and rabbit plasma (RAB) using the anti-CETPI IgY antibody (panel C). Both plasmas and a BSA control were also incubated with the anti-BSA IgY (panel D).

the antibody anti-CETPI IgY showed that CETPI presents a higher concentration in human than rabbit plasma (Fig. 6C). Taking into consideration that albumin is one of the most abundant proteins in plasma, and CETP presents a very similar molecular weight, we also used the anti-CETP IgY and the anti-CETPI IgY antibodies against BSA in order to discard the possibility of false positives (Fig. 6B and 6C). Reference can be taken from Fig. 6D, in which the anti-BSA IgY antibody was utilized against plasma obtained from the two species.

At this point it has to be considered human intron 'O' located between exons 15 and 16 [14]. If this intron is translated in the original reading frame it could generate a sequence 60 amino acids larger than CETP. Therefore, the minimum calculated molecular weight (non-glycosylated form) for human CETPI would be 59.4 kDa, 6.4 kDa larger than the molecular weight observed in rabbit CETPI. Based on this possibility, we considered that the human CETPI messenger could be related to a spliced product. Although cryptic splice sites are found, these would generate proteins with a molecular weight much larger than 56 kDa. Table 2 shows the comparison between the carboxy-end sequence of human (ID1) and rabbit CETP (ID1), as well as the carboxy-end sequence of rabbit (ID2) and a putative version of human CETPI (ID2). The latest form of human CETPI corresponds to one possibility amongst several others originated by alternative splicing, lacking a segment from base 6 to base 96 of intron 'O'.

The stop codon in this product is suggested to be localized in base 1573 of exon 16. This variant would generate a protein 17 amino acids larger than CETP, with a minimum molecular weight of 56 kDa. Although, between the human and rabbit CETP there is an homology that corresponds to 91.7%, the sequence homology for CETPI in both species corresponds to 50% from residue A6 to P12 of Sequence 1, the region recognized by the antibody anti-CETPI IgY. It is interesting to note that CETPI either from rabbit or human sources seems to present a random configuration rich in prolines as well as a hydrophilic character. Taking into account that it seems we are dealing with a new variant of CETP with a main difference of six aminoacids that produces a clear effect of its main properties, it remains to be established if posttranscriptional or posttranslational modifications are associated to CETPI.

At present, several mutations in the CETP messenger have been reported, some of which reflect several alterations in the levels of HDL, LDL and VLDL in plasma. A change of a guanine for an alanine in position +1 of intron 14 in the CETP mRNA, does not allow the synthesis of CETP to take place. This simple change causes hypoalphalipoproteinemia promoted by a reduction of 50% in the level of CETP [20,21]. On other hand, Gotoda *et al.* [22] describe a change of a cysteine for a thime in exon 10 of the CETP gene of patients showing hypoalphalipoproteinemia. This substitution results in the replacement of codon 309 CAA(Q) for a premature ter-

Table 2. Sequence comparison of CETP and CETPI carboxy-ends from human and rabbit

Isoform	Carboxy-end Sequences	Structure (prediction)	M.W. (kDa) (prediction)	I.P.
ID1 human 476 AA	GIFLLQMDFGFPE HLLVDELOSLS	Alpha Helix	53.10	5.80
ID1 rabbit 497 AA	GCLLLQMDFGFPK HLLVDELOSLS	Alpha Helix	54.52	6.41
ID2 human 483 AA	VKGLPAWLDTGGGLGVSPARPSLLLLPLPSGLPAAADGLWLP	Random	56.06	6.28
ID2 rabbit 491 AA	VSAKPLSARSEKGRPLSE	Random	53.57	7.09

TESIS
FALLA DE 1991

minimal codon TAA. In this case the CETP synthesized lacks 168 aminoacids at the carboxy-end region of the protein [21]. Sakai *et al.* [23], reported a cutting defect in intron 10 that excludes exon 10 in the cDNA and promotes the insertion of a 31 pd sequence in intron 13 [23].

Takahashi *et al.* [24], also reported a nucleotide substitution that decreases CETP activity. Only one isoform of human CETP has been described lacking exon 9 (CETP $\Delta 9$). This isoform seems to be retained at the level of the endoplasmic reticulum forming intracellular heterodimeric complexes with the normal form of CETP [6,7]. This association has been thought to be related to a regulatory mechanism in the steps previous to the secretion of CETP.

The CETPI messenger presents an approximate size of 2.2 kb and with the exception of Sequence I shows 100% identity with the reported 3' end of rabbit CETP. Since we have identified the only source for the CETPI transcript to be the small intestine, CETPI found in plasma most probably is originated in this tissue. Based on our results, the CETPI messenger identified as ID2 is translated into an isoform of CETP that is also liberated in the plasma of rabbit and humans, at normal lipid levels. The messenger of CETPI includes 108 bases of the intron previous to exon 16. This change substitutes the last 24 aminoacids in the carboxy-end of CETP for 18 new ones with the subsequent change in the secondary structure of the isoform.

Although CETPI most probably lacks the capacity to bind cholesterol esters, it is possible that the capacity of CETPI to bind phospholipids and in general to associate to lipoproteins might not be altered [2, 12]. Moreover, since CETP is responsible for approximately 30% of the phospholipid transport in plasma [23, 24] and that the phosphate groups constitute the primary site for the interaction of CETP with lipoproteins [25–27], this characteristic might be conserved in CETPI.

For the first time we describe the presence of CETPI in human plasma, a novel protein that places new boundaries in the study of lipid metabolism, both at the plasma level as well as the local level of the small intestine.

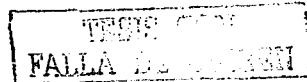
Acknowledgements

We would like to express our gratitude to Ricardo Miledi and Rogelio Arellano for their assistance in all RNA protocols. Our appreciation to Blanca Delgado, Rodolfo Paredes and Hector Malagón for their technical assistance, as well as Ma. Elena Gutierrez for her secretarial help. This study has been supported by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) México, to Jaime Mas-Oliva. A special acknowledgment to Jorge Paniagua (Laboratorios

Silanes) and Ernesto Trens for their interest and support in the development and application submission for an International Patent based on the present study.

References

1. Matsunaga A, Araki K, Moriyama K, Handa K, Arakawa F, Nishi K, Sasaki J, Arakawa K: Detection of a point mutation in cholesterol ester transfer protein gene by polymerase chain reaction-mediated site-directed mutagenesis. *Biochim Biophys Acta* 1166: 131–134, 1993
2. Wang S, Kussie P, Deng L, Tall A: Defective binding of neutral lipids by carboxyl-terminal deletion mutant of cholesterol ester transfer protein. *J Biol Chem* 270: 612–618, 1993
3. Bolaños-García VM, Soriano-García M, Mas-Oliva J: Stability of the C-terminal peptide of CETP mediated through an (L1+4) array. *Biochim Biophys Acta* 1384: 7–15, 1998
4. Tall A: Plasma lipid transfer proteins. *Annu Rev Biochem* 64: 235–257, 1995
5. Saito K, Kobori K, Hashimoto H, Ito S, Manabe M, Yokoyama S: Epitope mapping for the anti-rabbit cholesteryl ester transfer protein monoclonal antibody that selectively inhibits triglyceride transfer. *J Lipid Res* 40: 2013–2021, 1999
6. Inazu A, Quinet EM, Wang S, Brown ML, Stevenson S, Barr ML, Moulin P, Tall AR: Alternative splicing of the mRNA encoding the human cholesterol ester transfer protein. *Biochemistry* 31: 2352–2358, 1992
7. Quinet E, Yang TP, Marinou C, Tall A: Inhibition of the cellular secretion of cholesterol ester transfer protein by a variant protein formed by alternative splicing of mRNA. *J Biol Chem* 268: 16894–16898, 1993
8. Yang TP, Agellon LB, Walsh A, Breslow JL, Tall AR: Alternative splicing of the human cholesterol transfer protein in transgenic mice. *J Biol Chem* 271: 12603–12609, 1996
9. Stevenson SC, Wang S, Deng L, Tall A: Human plasma cholesterol ester transfer protein consists of a mixture of two forms reflecting variable glycosylation at Asparagine 341. *Biochemistry* 32: 5121–5126, 1993
10. Nagashima M, McLean J, Lawn RJ: Cloning and mRNA tissue distribution of rabbit cholesterol ester transfer protein. *J Lipid Res* 29: 1643–1649, 1988
11. Ko KW, Okawa K, Ohnishi T, Kay CM, Yokoyama S: Purification, characterization, and conformational analysis of rabbit plasma lipid transfer protein. *Biochemistry* 32: 6629–6636, 1993
12. Kotake H, Agellon LB, Yokoyama S: Modification of the N-terminal cysteine of plasma cholesterol ester transfer protein selectively inhibits triglyceride transfer activity. *Biochim Biophys Acta* 1347: 69–74, 1997
13. Bolaños-García VM, Soriano-García M, Mas-Oliva J: CETP and exchangeable apolipoproteins: Common features in lipid binding activity. *Mol Cell Biochem* 175: 1–10, 1997
14. Agellon LB, Quinet EM, Gillette TG, Drayna DT, Brown ML, Tall AR: Organization of the human cholesterol ester transfer protein gene. *Biochemistry* 29: 1372–1376, 1990
15. Jiang XC, Moulin P, Quinet E, Goldberg JJ, Yaoub LK, Agellon LB, Compton D, Schnitzer-Polokoff R, Tall AR: Mammalian adipose tissue and muscle are major sources of lipid transfer protein mRNA. *J Biol Chem* 266: 4631–4639, 1991
16. Wallace AJ, Mann JJ, Sutherland WH, Williams S, Chisholm A, Skeaff CM, Gudnason V, Talmud PJ, Humphries SE: Variants in the cholesterol ester transfer protein and lipoprotein lipase genes are predictors of plasma cholesterol response to dietary change. *Atherosclerosis* 152: 327–336, 2000



17. Drayna D, Jamagin AS, McLean J, Henzel W, Khor W, Fielding C, Lawn R: Cloning and sequencing of human cholesterol ester transfer protein cDNA. *Nature* 327: 632-634, 1987
18. Sumiwaka K, Parker I, Miledi R: Expression of neurotransmitter receptors and voltage-activated channel from brain mRNA in *Xenopus* oocytes. In: M. Conn (ed). *Methods in Neurosciences*. Academic Press, Orlando, 1989, pp 30-45
19. Appletiquis SE, Keyna U, Calvin MR, Beck-Engeser GB, Raman C, Lawn R: Sequence of the rabbit glyceroltriphosphatase 3-phosphate dehydrogenase-encoding cDNA. *Cience* 163: 325-326, 1995
20. Brown ML, Inazu A, Hester CB, Agellon LB, Mann C, Whitlock ME, Marcel YL, Milne RW, Koizumi J, Mabuchi H *et al.*: Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins. *Nature* 342: 448-451, 1989
21. Lagrost L: Regulation of cholesterol ester transfer protein (CETP) activity: review of *in vitro* and *in vivo* studies. *Biochim Biophys Acta* 1215: 209-236, 1994
22. Gotoh T, Kinoshita M, Shimano H, Harada K, Shimada M, Ohsuga J, Teramoto T, Yazaki Y, Yamada N: Cholesteryl ester transfer protein deficiency caused by a nonsense mutation detected in the patient's macrophage mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 519-524, 1993
23. Sakai N, Santamarina-Fojo S, Yamashita S, Matsuzawa Y, Brewer HB: Exon 10 skipping caused by intron 10 splice donor site mutation in cholesteryl ester transfer protein gene results in abnormal downstream splice site selection. *J Lipid Res* 37: 2065-2073, 1996
24. Takahashi K, Jiang XC, Sakai N, Yamashita S, Hirano K, Hujo H, Yamazaki H, Kusunoki J, Miura T, Kussie P, Matsuzawa Y, Saito Y, Tall A: A missense mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene with possible dominant effects on plasma high density lipoproteins. *J Clin Invest* 92: 2060-2064, 1993
25. Yamashita S, Hirano K, Sakai N, Matsuzawa Y: Molecular biology and pathophysiological aspects of plasma cholesteryl ester transfer protein. *Biochim Biophys Acta* 1529: 257-275, 2000
26. Pattnaik NM, Zilversmit DB: Interaction of cholesterol ester exchange protein with human plasma lipoproteins and phospholipid vesicles. *J Biol Chem* 254: 2782-2786, 1979
27. Abbey M, Bavtiras S, Calvert GD: Immunoprecipitation of lipid transfer protein activity by an antibody against human plasma lipid transfer protein-I. *Biochim Biophys Acta* 833: 25-33, 1985
28. Hester CB, Tall AR, Swenson TL, Weech PK, Marcel YL, Milne RW: Monoclonal antibodies to the Mr 74,000 cholesterol ester transfer protein neutralize all of the cholesterol ester and triglyceride transfer activities in human plasma. *J Biol Chem* 263: 5020-5023, 1988

