

209



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

## RESISTENCIA A LA OXIDABILIDAD *IN VITRO* DE LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD (LDL) EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO II

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A  
LUMBRERAS MENDOZA JANETT



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

276699



Universidad Nacional  
Autónoma de México

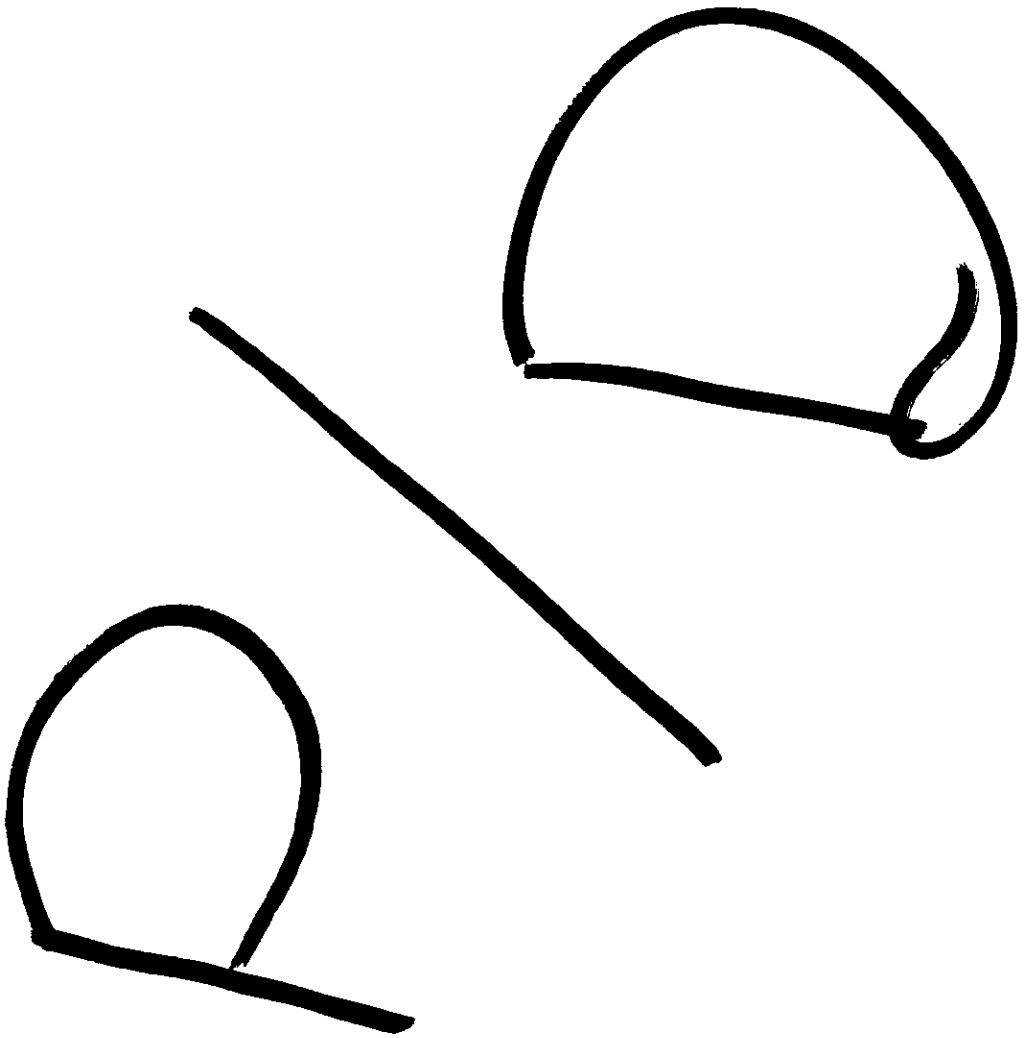


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**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.

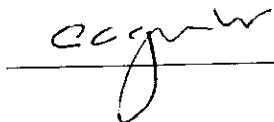


## JURADO ASIGNADO

Presidente      Profra. PENICHE VILLALPANDO LAURA  
Vocal            Profra. NARANJO RODRÍGUEZ ELIA BROSLA  
Secretario      Profr. AGUILAR SALINAS CARLOS ALBERTO  
1er. Suplente   Profra. CASTILLO MARTÍNEZ ALICIA  
2do. Suplente   Profra. REYNA RODRÍGUEZ MA. DEL SOCORRO CECILIA

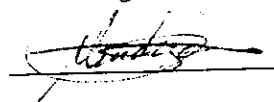
Sitio donde se desarrolló el tema  
INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"  
DEPARTAMENTO DE ENDOCRINOLOGÍA Y METABOLISMO

Asesor del tema  
Dr. AGUILAR SALINAS CARLOS ALBERTO



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'C. Aguilar', written over a horizontal line.

Sustentante  
LUMBRERAS MENDOZA JANETT



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Janett Lumbreras', written over a horizontal line.

ENTONCES NO SEREMOS YA NIÑOS  
A LOS QUE MUEVE CUALQUIER OLEAJE O  
CUALQUIER VIENTO DE DOCTRINA, Y A  
QUIENES LOS HOMBRES ASTUTOS PUEDEN  
ENGAÑAR PARA ARRASTRARLOS AL ERROR.  
MAS BIEN, CON UN AMOR AUTÉNTICO  
CRECEREMOS DE TODAS MANERAS HACIA  
AQUEL QUE ES LA CABEZA, CRISTO. EL  
DA ORGANIZACIÓN Y COHESIÓN AL CUERPO  
ENTERO, POR MEDIO DE UNA RED DE  
ARTICULACIONES, QUE SON LOS MIEMBROS,  
CADA UNO CON SU ACTIVIDAD PROPIA. PARA  
QUE EL CUERPO CREZCA Y SE  
CONSTRUYA A SÍ MISMO EN EL AMOR.

*EFESIOS 4,14-16.*

AGRADESCO A DIOS POR LAS  
OPORTUNIDADES QUE ME HA  
BRINDADO Y POR LAS COSAS QUE  
ME HACEN REFLEXIONAR  
CADA DIA PARA SER MEJOR.

AGRADESCO AL SER QUE ME Dio LA VIDA Y QUE HA  
DADO Y CUIDADO MIS PASOS POR ESTE  
SISTEMA DE VIDA DE LA VIDA.  
A LA MADRE QUE HA DADO TODO POR SUS HIJOS.  
A MI MADRE.

DESCO ESTE TRABAJO A MI MEJOR  
AMBA, QUE ME COMPRENDE Y AYUDA  
A TOMAR LAS MEJORES DECISIONES.  
A MI HERMANA REGINA

UN AGRADECIMIENTO MUY ESPECIAL AL  
DR. CARLOS A. ABUSLAR DALMAZ  
POR LA CONFIANZA Y APOYO  
PARA REALIZAR ESTE TRABAJO

AGRADESCO SINCERAMENTE LA  
PARTICIPACION DE TODAS AQUELLAS  
PERSONAS, DEL DEPARTAMENTO DE  
ETNOLOGIA Y MEDICINA,  
DEL IMA, QUE CON SU TRABAJO  
HICIERON POSIBLE LA REALIZACION  
DE ESTE ESTUDIO

# ÍNDICE

I	Introducción .....	2
II	Antecedentes	
	2.1 Fundamentos básicos de la diabetes mellitus .....	4
	2.2 Metabolismo de lípidos .....	9
	2.3 Fisiopatología de la aterosclerosis en la diabetes .....	14
	2.4 Participación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el proceso de aterosclerosis .....	23
	2.5 Estrógenos: fundamentos básicos e importancia en la aterosclerosis.....	30
	2.6 Importancia de la colaboración de progestágenos con los estrógenos.....	35
III	Hipótesis .....	38
IV	Objetivo .....	39
V	Parte Experimental .....	40
VI	Resultados .....	43
VII	Discusión de Resultados .....	50
VIII	Conclusiones .....	53
IX	Apéndice .....	54
X	Bibliografía .....	57

# INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es un importante factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, entre las cuales se encuentra la aterosclerosis.

La incidencia de aterosclerosis es significativamente más alta en hombres que en mujeres hasta la menopausia, después de ésta, la incidencia se iguala para el hombre y la mujer; este cambio es debido a la acción de esteroides sexuales en el perfil de lípidos, los niveles séricos de colesterol-HDL tienden a disminuir y los niveles séricos de colesterol-LDL se aumentan en la mujer postmenopáusica.

Evidencias epidemiológicas y experimentales muestran que el proceso oxidativo *in vivo*, incluyendo la oxidación de LDL, juega un papel importante en el desarrollo de aterosclerosis y que este proceso puede acelerarse en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, la oxidación de LDL es el proceso clave durante el inicio de la aterosclerosis, una de las principales propiedades de las LDL oxidadas es su disposición para estimular la formación de placas ateroscleróticas en las células endoteliales.

La tendencia a enfermedades ateroscleróticas se aumenta aún más en mujeres que además de sufrir diabetes se encuentran en la etapa posmenopáusica, ya que la deficiencia de estrógenos produce cambios en el endotelio vascular y en el perfil de lípidos.

La administración de estrógenos en mujeres postmenopáusicas podría disminuir la incidencia de complicaciones cardiovasculares ya que se mejoraría la función endotelial, aumentaría la concentración sérica de colesterol-HDL y disminuiría la concentración sérica de colesterol-LDL, además, se ha observado que en estudios *in vitro* se reduce la susceptibilidad a la oxidación de LDL.

Se han elaborado varios estudios sobre el efecto de los estrógenos en mujeres postmenopáusicas sin afección de diabetes, pero el efecto de los estrógenos en mujeres postmenopáusicas con diabetes mellitus está poco documentado; de aquí la importancia de realizar este estudio, para evaluar el efecto de los estrógenos en mujeres postmenopáusicas con diabetes mellitus tipo 2, las cuales presentan mayor riesgo, ya que la diabetes proporciona un medio más favorable para la oxidación de LDL, debido a una mayor presencia de especies oxidantes.

Siendo las enfermedades cardiovasculares una de las principales causas de muerte en las mujeres postmenopáusicas con diabetes, es importante buscar tratamientos preventivos para reducir el riesgo de dichas enfermedades en este tipo de pacientes, por lo que son justificables los estudios que buscan reducir o retardar el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en mujeres postmenopáusicas con diabetes.



El objetivo de este estudio es analizar la susceptibilidad de las LDL a la oxidación *in vitro* en mujeres postmenopáusicas con diabetes mellitus tipo 2, para ello se incluirán: 1) mujeres postmenopáusicas con diabetes mellitus tipo 2 sin evidencia de complicaciones crónicas de diabetes y bajo control con dieta y/o hipoglucemiantes orales, una parte de las cuales recibirán de manera continua estrógenos conjugados más medrogestona y otra parte recibirá placebo, 2) mujeres postmenopáusicas sin diabetes que tomen estrógenos, 3) mujeres postmenopáusicas sin diabetes que no tomen estrógenos, y 4) mujeres premenopáusicas sin diabetes. Se aislará la fracción correspondiente de LDL de los diferentes pacientes, se medirá la oxidación de LDL, se obtendrán los tiempos de retardo de la oxidación de LDL y, se compararán dichos tiempos entre los diferentes tipos de pacientes, viendo de esta manera el efecto de estrógenos sobre la oxidación de LDL.

El beneficio de este estudio será demostrar que en las LDL disminuye la susceptibilidad a la oxidación en mujeres postmenopáusicas con diabetes mellitus tipo 2 que tomen estrógenos, para con ello poder recomendar el uso de estrógenos como tratamiento preventivo de la aterosclerosis.

# ANTECEDENTES

## FUNDAMENTOS BÁSICOS DE LA DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus se considera una enfermedad metabólica crónica, degenerativa, caracterizada por hiperglucemia, como resultado del defecto en la secreción o acción de la insulina o de ambas; con lo que se altera el metabolismo de los carbohidratos, las proteínas y las grasas, se asocia con cambios en los pequeños y grandes vasos arteriales; que complican la enfermedad con lesiones renales, oculares, nerviosas, aterosclerosis y susceptibilidad a infecciones.<sup>(1,2,3)</sup>

Durante las últimas décadas la enfermedad cardiovascular ha llegado a ser la causa más importante de mortalidad y morbilidad entre los pacientes con diabetes, la incidencia y la prevalencia de diabetes se modifican notablemente de acuerdo a la edad, la raza, el ambiente, el peso y la distribución de grasa corporal.<sup>(4)</sup> La encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas, llevada a cabo por la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud y el Departamento de Diabetes del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", mostró una prevalencia nacional de diabetes de 7.2% en sujetos de 20-69 años.<sup>(4)</sup> Seis estudios independientes muestran que la mujer mexicana tiene más riesgo de padecer diabetes; no hay explicación clara, pero la paridad, el exceso de peso y posiblemente defectos genéticos en la acción de la insulina, sean factores contribuyentes a este fenómeno.<sup>(4)</sup>

### DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES MELLITUS.

La siguiente tabla muestra los criterios de diagnóstico según la OMS y el National Diabetes Data Group:

---

#### a) *Adultos (no embarazo): criterios de diabetes*

- Glucemia plasmática igual o superior a 200 mg/dL (11mmol/L) asociada a los signos y síntomas clásicos: polidipsia, poliuria, polifagia y pérdida de peso.
- Glucemia plasmática en ayunas igual o superior a 126 mg/dL (7.0 mmol/L) demostrada en, al menos, dos ocasiones.
- En la curva de tolerancia oral a la glucosa (CTOG) la muestra obtenida a las dos horas y al menos una más durante el período

comprendido entre el tiempo 0 y 2 horas después de la ingesta oral de 75 g de glucosa deben mostrar una concentración de glucosa superior o igual a 200 mg/dL.

b) *Criterios de intolerancia a la glucosa*

- Glucemia plasmática en ayunas igual o superior a 110 mg/dL (6.1 mmol/L) pero menor de 126 mg/dL, o
- Glucemia a las dos horas en la curva de tolerancia oral a la glucosa igual o mayor de 140 mg/dL (7.8 mmol/L) pero menor de 200 mg/dL.

c) *Criterios de diabetes mellitus gestacional*

El monitoreo de la diabetes mellitus gestacional puede no ser necesario en ciertas mujeres embarazadas, siempre y cuando cumplan con los siguientes requisitos: edad menor a 25 años, peso corporal normal, no tener historia familiar de diabetes y no ser miembro de un grupo racial o étnico con alta prevalencia de diabetes (por ejemplo, hispano, americano nativo, asiático o afro-americano).

El estudio debe ser realizado entre las semanas 24 y 28 de gestación, y la paciente no necesita hacer ayuno. El monitoreo consiste en una carga oral de glucosa de 50 gramos seguida por la determinación de glucosa plasmática después de 1 hora, un valor igual o mayor a 140 mg/dL indica la necesidad de una curva de tolerancia oral a la glucosa con un carga de 100 gramos de glucosa. El diagnóstico de diabetes gestacional se establece si dos de las siguientes determinaciones resultan iguales o superiores a:

Ayuno	1 h	2 h	3 h	
105	190	165	145	(mg/dL)

---

Referencia 1

## CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES MELLITUS

La clasificación que a continuación se muestra es la proporcionada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el National Diabetes Data Group.

- 
- I. Diabetes tipo 1 (destrucción de células  $\beta$ , usualmente deficiencia absoluta de insulina).
    - A. Mediada por inmunidad.
    - B. Idiopática.
  - II. Diabetes tipo 2 (puede variar de: una predominante resistencia a la insulina con relativa deficiencia de la misma a un predominante defecto de secreción con resistencia a la insulina).

### III. Otros tipos específicos

- A. Defectos genéticos de la función de células  $\beta$ .
- B. Defectos genéticos en la acción de la insulina.
- C. Enfermedades exócrinas del páncreas.
- D. Endocrinopatías.
- E. Inducida por agentes químicos o fármacos.
- F. Infecciones.
- G. Formas no comunes de diabetes mediada por inmunidad.
- H. Otros síndromes genéticos algunas veces asociados con diabetes.

### IV. Diabetes mellitus gestacional (DMG).

---

Referencia 1

## DIABETES TIPO 1.

### PATOGENIA.

La diabetes tipo 1 se produce por la interacción de una serie de elementos ambientales que inciden sobre un organismo con unas características de predisposición o susceptibilidad, en su mayor parte de base genética.<sup>(3)</sup> Éste tipo de diabetes se caracteriza por una pérdida de la población de células  $\beta$  insulares, mientras el resto de los distintos componentes celulares de los islotes de Langerhans del páncreas están relativamente conservados, en consecuencia, la síntesis insulínica es baja y los valores insulinémicos se hallan disminuidos, no hay respuesta celular  $\beta$  al estímulo con glucosa, aminoácidos, sulfonilureas o glucagon,<sup>(6)</sup> sin insulina no hay freno en la producción hepática de glucosa, lipólisis y cetogénesis,<sup>(6)</sup> ésto ocasiona que se metabolice la grasa corporal como fuente de energía y se liberen cuerpos cetónicos (ácido acetoacético y ácido  $\beta$ -hidroxibutírico) hacia la sangre, de modo que sobreviene una acidosis metabólica sistémica. La hiperglucemia y la glucosuria causan desequilibrios hidroelectrolíticos, que pueden conducir al coma y a la muerte. Éste tipo de pacientes muchas veces experimentan aumento de la diuresis (poliuria), causado por la glucosuria, y la sed consiguiente (polidipsia), muchos pacientes tienen un apetito insaciable (polifagia), pero pierden peso debido al metabolismo defectuosos de los glúcidos y por el derroche de calorías. Con frecuencia, el comienzo de la enfermedad coincide con situaciones de estrés metabólico de un desorden agudo, como en una infección.<sup>(7)</sup>

**DIABETES MEDIADA POR INMUNIDAD (diabetes tipo 1A):** La susceptibilidad para desarrollar diabetes tipo 1A viene determinada por genes cercanos a la región HLA-D del sistema mayor de histocompatibilidad; concretamente han sido involucrados 3 loci, DP, DQ y DR. La expresión de DR2 se asocia a una menor incidencia de la enfermedad, la expresión de DR3 o DR4 confiere un riesgo de desarrollar diabetes tipo 1 entre 3 y 5 veces superior al de la población general, siendo 20 veces superior en los

heterocigotos DR3/DR4. Los genes de la subregión DQ codifican antígenos que se expresan en forma de cadenas diméricas (cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ ) en la superficie de las células del sistema inmune que participan en la presentación de los antígenos a los linfocitos T efectores; las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de DQ son probablemente los mayores determinantes de susceptibilidad a la diabetes tipo 1; así, se ha demostrado que la presencia de un residuo aspártico en la posición 57 de la cadena  $\beta$  del HLA-DQ disminuye la susceptibilidad para diabetes tipo 1, mientras que la sustitución del aspartato por aminoácidos neutros la incrementa, así como la presencia de arginina como aminoácido 32 de la cadena  $\alpha$ .<sup>(3, 8)</sup>

Se han demostrado componentes de autoinmunidad celular dirigidos contra las células  $\beta$  del páncreas tales como: anticuerpos citoplasmáticos antiinsulares, anticuerpos antiinsulares de superficie, anticuerpos antiinsulares citotóxicos fijadores de complemento, anticuerpos anti-GAD (glutámico-decarboxilasa) y anticuerpos que precipitan al reaccionar con una proteína de 37 Kd.<sup>(1, 8, 9)</sup>

**DIABETES IDIOPÁTICA (diabetes tipo 1 B):** Algunas formas de diabetes tipo 1 son de etiología desconocida; sin embargo, algunos de estos pacientes tienen insulinopenia permanente y son propensos a cetoacidosis, pero no presentan evidencia de autoinmunidad, ni asociación a la región HLA.<sup>(11)</sup>

## **DIABETES TIPO 2.**

La diabetes tipo 2 suele ocurrir en adultos, y su prevalencia aumenta a medida que avanza la edad, cuatro de cada cinco pacientes tienen un peso corporal excesivo, las influencias genéticas son un factor clave en la instalación de la enfermedad,<sup>(7)</sup> los defectos genéticos en los receptores de insulina son los más frecuentes, también se han descrito, con menos frecuencia, defectos genéticos en la molécula de insulina ocasionando una molécula mutada o una falla en el proceso de la proinsulina.<sup>(10)</sup>

### **PATOGENIA.**

Los pacientes con diabetes tipo 2 muestran dos defectos fisiológicos: la secreción de insulina y la resistencia a la acción de la insulina en los tejidos efectores, varios estudios sugieren que la resistencia a la insulina se presenta como lesión inicial y el defecto de secreción de insulina se desarrolla más tarde. La resistencia a la insulina ocasiona una hiperinsulinemia para poder mantener los niveles de glucosa normales o al menos una intolerancia a la glucosa, conforme pasa el tiempo los mecanismos compensatorios decaen por una disminución de la función de las células  $\beta$  del páncreas, esta caída en la secreción de insulina provoca la aparición de hiperglucemia durante el ayuno.<sup>(11)</sup>

Presumiblemente, en estos sujetos no existe lesión de las células beta o ésta es mínima, la población de células alfa aumenta, elevándose la relación entre células alfa y beta, lo que explica el exceso relativo de glucagon con respecto a la insulina que

caracteriza a la diabetes tipo 2 y que constituye un rasgo de todos los estados hiperglucémicos.<sup>(5)</sup>

La resistencia a la insulina en la diabetes tipo 2 se asocia a una disminución de los receptores de insulina sin disminución de la afinidad, pero principalmente la resistencia es de tipo posreceptor (anomalía de la transmisión de las señales),<sup>(5,10)</sup> la resistencia a la insulina en la diabetes tipo 2, también puede ser ocasionada por el depósito de amilina en los islotes, éste material formado por un péptido de 37 aminoácidos se almacena normalmente con la insulina dentro de los gránulos secretores y se libera en respuesta a los estímulos de secreción de insulina, en determinadas circunstancias la amilina posee un efecto inhibitorio de la liberación de insulina inducida por la glucosa en las células beta, es capaz de desarrollar un potente efecto inhibitorio en la síntesis de glucógeno por la insulina y, también del consumo de glucosa por las células del músculo esquelético.<sup>(5)</sup>

# METABOLISMO DE LÍPIDOS

Los lípidos de la dieta son mínimamente digeridos en la boca y el estómago, por la lipasa lingual, la mayor parte de la digestión de la grasa alimentaria tiene lugar en el intestino, en el duodeno y el yeyuno proximal, la motilidad normal gástrica y retropulsión del contenido antral son los que llevan a la formación de una emulsión cruda, llamada quimo.<sup>(12,13)</sup>

Las células en el yeyuno y duodeno producen una hormona, *colecistocinina*, en respuesta a la estimulación de grasas y proteínas parcialmente digeridas, esta hormona estimula el flujo biliar y la salida del jugo pancreático para la secreción de enzimas pancreáticas, esto también causa un decremento de la motilidad gástrica, resultando una disminución del vaciamiento del contenido gástrico al intestino delgado; las células del intestino producen una segunda hormona, *secretina*, en respuesta al bajo pH en el intestino, esta produce la liberación desde el páncreas de una solución rica en bicarbonato que ayuda a neutralizar el pH del contenido intestinal, llevando al pH apropiado para la actividad de las enzimas<sup>(14)</sup>. En el lumen intestinal la lipasa pancreática se une a la interfase aceite-agua de un sustrato emulsionado de triglicéridos, las propiedades detergentes de las sales biliares permiten que la lipasa pancreática acceda a los lípidos insolubles en el agua, la *colipasa*, una proteína existente en el jugo pancreático, ayuda a mantener a la lipasa en íntimo contacto con la superficie de las gotas de triglicéridos.<sup>(15,16)</sup>

La vía principal de digestión de las grasas va desde los triglicéridos hacia 1,2-diglicérido, a 2-monoglicérido y ácidos grasos por acción de la triglicérido lipasa, sólo un pequeño porcentaje de grasa es hidrolizada a glicerol, quizá después de la isomerización a 1-monoglicérido; los primeros estadios de la digestión grasa son procesos reversibles y modifican la composición química de la grasa alimentaria ingerida.<sup>(12)</sup> Con respecto a los ésteres de colesterol, estos son hidrolizados a colesterol libre y ácidos grasos libres, y esta reacción es catalizada por la enzima colesterol esterasa.<sup>(12,13)</sup> En cuanto a la degradación de los fosfolípidos, la fosfolipasa A<sub>2</sub> remueve los ácidos grasos del carbono 2 del fosfolípido produciendo lisofosfolípido, el ácido graso remanente en el C-1 es removido por la lisofosfolipasa, produciendo glicerofosforil-base que puede ser excretado en las heces o ser absorbido.<sup>(13,14)</sup>

No se sabe con certeza de que manera los monoglicéridos, ácidos grasos y otros lípidos presentes en las micelas del lumen intestinal son incorporadas por las células mucosas; sin embargo, se acepta que las micelas se desintegran en contacto con el ribete del cepillo de las microvellosidades de la membrana de las células mucosas, permitiendo la incorporación diferencial de los diversos componentes micelares.<sup>(12)</sup> Después que los monoglicéridos y los ácidos grasos ingresan al retículo endoplásmico de las células mucosas, presumiblemente por difusión, los monoglicéridos y ácidos grasos derivados de los triglicéridos de cadena larga son rápidamente reesterificados a triglicéridos por enzimas del retículo endoplásmico; el colesterol y lisofosfolípidos son también reesterificados por ácidos grasos activados y la enzima lecitin: colesterol acil

transferasa.<sup>(12)</sup>

## TRANSPORTE DE LOS LÍPIDOS.

A). VIA EXÓGENA. Una vez que se han resintetizado los triglicéridos, estos reaccionan con apolipoproteínas específicas, apo A-I, apo A-II, apo A-IV y apo B-48 más colesterol libre, colesterol esterificado y fosfolípidos, formando quilomicrones nacientes, que inicialmente se acumulan en el aparato de Golgi de las células y después son secretados por pinocitosis inversa a los vasos linfáticos de la región abdominal y más tarde a la circulación sistémica. Cuando los quilomicrones ingresan a la circulación general intercambian algunos de sus componentes con las HDL: apo E, apo C-II y apo C-III pasan de las HDL a los quilomicrones; apo A-I pasa de los quilomicrones a las HDL,<sup>(17)</sup> en los capilares de los tejidos periféricos, principalmente en tejido adiposo, músculo y pulmón, se lleva a cabo la hidrólisis de los triglicéridos, por acción de la enzima lipasa de lipoproteína, una enzima unida en el lado luminal del endotelio capilar que es activada por la apolipoproteína C-II e inhibida por la apolipoproteína C-III,<sup>(18)</sup> se forman entonces partículas más pequeñas, conocidas como remanentes de quilomicrones, con menor contenido de triglicéridos y con una proporción importante de colesterol esterificado y apo E que recibieron de las HDL, a su vez, les ceden a estos triglicéridos, colesterol libre y fosfolípidos, después de la hidrólisis de los triglicéridos, regresan a las HDL las apoproteínas C-II y C-III que habían recibido de ellas.<sup>(17)</sup> Los ácidos grasos libres obtenidos a partir de los triglicéridos pasan a las células de tejido adiposo y músculo donde son utilizados para síntesis de triglicéridos, o como fuente de energía mediante la oxidación de sus cadenas hidrocarbonadas (oxidación beta).<sup>(17)</sup>

Los remanentes de quilomicrones así formados son captados por el hígado mediante la apo E, sea a través de supuestos receptores específicos para esta apoproteína o a través del receptor de LDL, dentro del hígado tiene lugar el catabolismo de los componentes lipídicos y proteicos de las partículas, este proceso incluye la hidrólisis de ésteres de colesterol en colesterol libre que puede ser eliminado por vía biliar como tal o previa oxidación en ácidos biliares, o bien incorporado en las lipoproteínas sintetizadas en el hígado<sup>(19)</sup> figura 1.

Existe otro mecanismo de depuración de los remanentes y de los quilomicrones, en caso de existir concentraciones elevadas o tiempo de circulación prolongado de estas partículas, que estos sean fagocitados por los macrófagos y células del músculo liso de la pared vascular, las cuales tienen receptores para estas partículas, convirtiéndose así en células espumosas.<sup>(17)</sup>

B). VIA ENDÓGENA. Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) son sintetizadas por el hígado y su producción puede ser estimulada por un incremento en la disponibilidad de ácidos grasos libres que llegan a los hepatocitos,<sup>(20)</sup> las VLDL están formadas principalmente por triglicéridos, fosfolípidos y cantidades menores de colesterol esterificado y colesterol libre, a diferencia de los quilomicrones las VLDL contienen apolipoproteína B-100, cuando las VLDL son liberadas del hígado ellas son partículas nacientes y deben obtener apo E y apo C-II de las HDL de la circulación. Gran parte de los triglicéridos de las VLDL son hidrolizados en los capilares donde



interactúan con la lipasa de lipoproteína, liberándose ácidos grasos libres que van a ser utilizados por músculo y tejido adiposo, después de la hidrólisis de triglicéridos, las moléculas de VLDL ceden colesterol no esterificado, apoproteína C y fosfolípidos a las HDL, recibiendo a cambio ésteres de colesterol, la apo B-100 permanece con la partícula de lipoproteína original, se forman entonces partículas más pequeñas y densas con menor contenido de triglicéridos y enriquecidas con ésteres de colesterol, a las que se denomina remanentes de VLDL y lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), los remanentes son captados por el hígado a través de la apo E y a continuación catabolizados. Algunos autores consideran que las IDL son más pequeñas, tiene menor cantidad de triglicéridos y están destinadas a convertirse en LDL.<sup>(21)</sup> Una vez liberadas las partículas de IDL del endotelio capilar tienen dos destinos metabólicos, algunas de ellas son depuradas rápidamente por el hígado, por endocitosis mediada por receptores, que se denomina *receptor de lipoproteínas de baja densidad*, este receptor fija lipoproteínas que contienen apoproteína E o B-100 y en consecuencia reaccionan con las partículas IDL y LDL; alrededor de la mitad de las partículas IDL no son depuradas rápidamente por el hígado, sino que permanecen en la circulación donde la mayor parte de los triglicéridos restantes son eliminados y se pierden todas las apolipoproteínas, excepto la apolipoproteína B-100 y la densidad de las partículas aumenta hasta que pasan a ser lipoproteínas de baja densidad (LDL).<sup>(21)</sup> En el hombre, estas partículas circulan durante un tiempo relativamente prolongado ( $t_{1/2}$  1.5 días) y finalmente son degradadas,<sup>(21)</sup> el 60% de las LDL va a ser tomado por el hígado a través de un receptor de alta afinidad para la apo B-100, *receptor de lipoproteínas de baja densidad*, la interioriza al hepatocito por un proceso de endocitosis, la fusión de la membrana vesicular con la membrana lisosómica expone a las LDL a una serie de enzimas hidrolíticas que degradan la apo B-100 a aminoácidos, los ésteres de colesterol son hidrolizados por una lipasa ácida, y el colesterol libre abandona los lisosomas para ser utilizado en reacciones celulares. Dentro del hepatocito, el colesterol libre origina disminución en la síntesis y expresión del receptor de LDL en las células hepáticas, para evitar así mayor captación de colesterol circulante; asimismo, se disminuye la síntesis de la  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA reductasa, enzima clave en la síntesis de colesterol, de esta manera se frena la síntesis; por otra parte se aumenta la actividad de la enzima acil-colesterol-aciltransferasa (ACAT), que se encarga de reesterificar el colesterol libre dentro del hepatocito, los ésteres de colesterol así formados son utilizados por el hígado en la síntesis de ácidos biliares, y de nuevas lipoproteínas.<sup>(12, 17)</sup> Figura 1

Aproximadamente el 10% de las LDL son tomadas por las glándulas suprarrenales, las cuales también tienen receptores para LDL; aquí el colesterol es utilizado para síntesis de hormonas esteroideas (glucocorticoides y mineralocorticoides), el 30% es depurado por tejidos periféricos a través de mecanismos independientes del receptor, básicamente por macrófagos y células endoteliales, las cuales, aun cuando no tienen receptores para la LDL nativa, sí son capaces de reconocer y fagocitar a las LDL que han sufrido modificaciones oxidativas,<sup>(12, 17)</sup> figura 1.

## METABOLISMO DE LAS HDL.

Las HDL son secretadas por el intestino delgado, de donde salen como HDL<sub>3</sub> o naciente, la cual es discoide y está formada por fosfolípidos, apo A-I, apo A-II, apo A-IV y pequeñas cantidades de apo E y apo C,<sup>(17)</sup> una vez que las HDL se encuentran en el plasma la principal lipoproteína es la apo A-I con aportes menores de apo E y apo C.<sup>(12)</sup> Las HDL remueven el colesterol tanto de tejidos periféricos como de otras lipoproteínas, incluyendo las LDL, trabajos recientes sugieren que ciertas subclases de HDL pueden preferentemente aceptar colesterol de las células, también de acuerdo a algunos reportes la composición apoproteica de HDL afecta su disponibilidad para aceptar colesterol de las células, estos estudios muestran que las HDL que sólo contienen apo A-I son receptores más efectivos de colesterol de las células que las HDL que contienen apo A-I y apo A-II.<sup>(22)</sup> Las HDL, además, intercambian con las lipoproteínas ricas en triglicéridos (quilomicrones, VLDL, IDL y remanentes) colesterol esterificado y apoproteínas, recibiendo triglicéridos, colesterol libre y fosfolípidos por medio de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP). El proceso por el cual las HDL promueven la eliminación del colesterol de las células periféricas y facilita su regreso al hígado se denomina *transporte reverso del colesterol*,<sup>(17)</sup> en este proceso las partículas de HDL remueven colesterol de las células periféricas y convierten el colesterol libre a su forma esterificada por la acción de la enzima lecitina: colesterol acil transferasa (L-CAT) la cual utiliza apo A-I como cofactor presente en las HDL, esto permite almacenar el colesterol esterificado en el centro de la lipoproteína, de este modo se forma la HDL<sub>2</sub> o madura, la cual es esférica. Los substratos de la L-CAT son la fosfatidil colina y el colesterol libre y los productos son: la 2-lisolecitina y el colesterol esterificado.<sup>(12)</sup> Subsecuentemente, los ésteres de colesterol pueden ser transferidos de las HDL a otras lipoproteínas por la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) o ser liberados al hígado. En el cuerpo humano, el hígado y los órganos productores de hormonas esteroideas, son cuantitativamente los únicos tejidos importantes que pueden metabolizar colesterol libre, en el hígado el colesterol puede ser secretado en la bilis como ácidos biliares o como colesterol libre.<sup>(23,24)</sup> Se desconoce en detalle el catabolismo de las HDL, pero estudios recientes han mostrado que llegan hasta el hígado, en donde, dependiendo de su contenido de triglicérido, actúa sobre ellas la lipasa hepática y son subsecuentemente catabolizadas, o quizá, se remueve sólo el exceso de fosfolípidos y regresan a la circulación para continuar su función.<sup>(17)</sup>

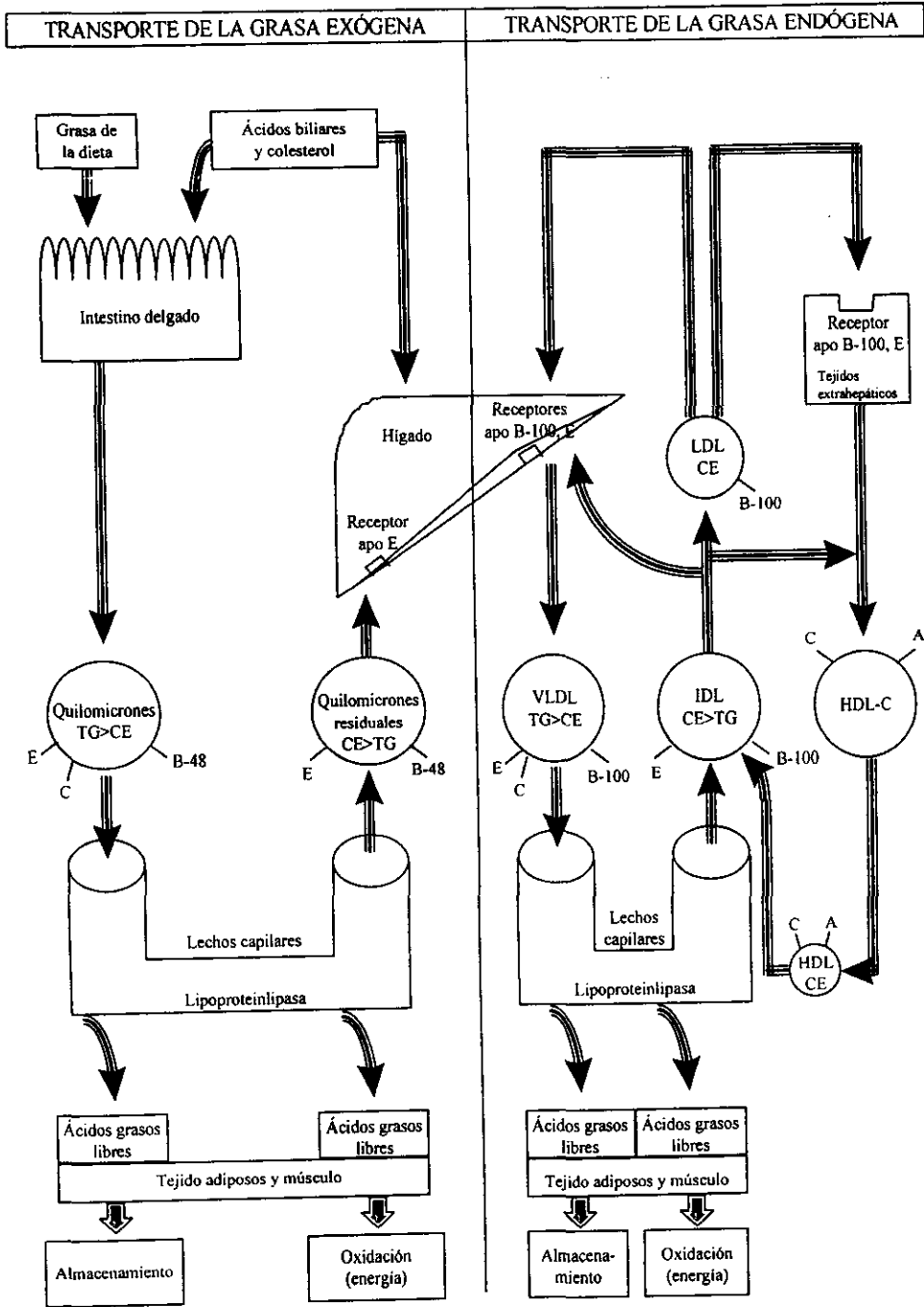


FIGURA 1. Transporte de los lípidos. CE: ésteres de colesterol, TG: triglicéidos. <sup>(20)</sup>

# FISIOPATOLOGÍA DE LA ATEROSCLEROSIS EN LA DIABETES.

Resulta un hecho indiscutible que la diabetes se asocia a enfermedades cardiovasculares en un porcentaje alto de casos, de modo que su incidencia es de tres a cuatro veces más alta en personas con diabetes que en personas sin diabetes.<sup>(25)</sup> Los enfermos de diabetes padecen enfermedades cardiovasculares en edad más temprana y en mayor proporción que los no diabéticos, debido a la aterosclerosis acelerada a causa de la propia diabetes y de los factores de riesgo asociados (hiperinsulinemia, hipercoagulabilidad, proteinuria, hipertensión arterial, hiperlipidemias, hábito de fumar, etc.),<sup>(26)</sup> tabla 1.

**TABLA 1. Factores de riesgo de enfermedad aterosclerótica.**

- ◆ Aumento de la edad: La enfermedad no es común por debajo de los 30 años.
- ◆ Obesidad patológica: más del 30 % del peso corporal ideal.
- ◆ Falta de ejercicio físico
- ◆ Factores altamente significativos:
  - ◇ Sexo masculino: Los varones se afectan más que las mujeres; la incidencia del sexo es igual después de los 65 años de edad.
  - ◇ Historia familiar: Historia de cardiopatía congénita.
  - ◇ Hiperlipidemia: Es el principal factor de riesgo en pacientes menores de 45 años de edad. Las lipoproteínas específicas implicadas en el aumento del riesgo son como sigue:
    - Colesterol total > 240 mg/dL
    - Triglicéridos totales > 250 mg/dL
    - Colesterol de LDL > 160 mg/dL
    - Colesterol de HDL bajo < 35 mg/dL
    - Lipoproteína (a) alta en el plasma.
  - ◇ Hipertensión: Es el principal factor de riesgo en pacientes mayores de 45 años de edad; estas personas tienen un riesgo cinco veces mayor en comparación con personas normotensas.
  - ◇ Tabaquismo: Diez cigarrillos por día aumenta el riesgo tres veces.
  - ◇ Diabetes: La diabetes se asocia con un incremento.

Referencias 38, 39

La Organización Mundial de la Salud define la aterosclerosis como "una combinación variable de cambios en la íntima de las arterias que contribuye a la acumulación focal de los lípidos, hidratos de carbono complejos, sangre y derivados hemáticos, tejido fibroso y calcio, asociados a manifestaciones clínicas",<sup>(28)</sup> lo cual

termina por invadir la luz de arterias musculares, y en combinación con procesos trombóticos puede comprometer la funcionalidad circulatoria de estos vasos.<sup>(29)</sup> La aterosclerosis es una enfermedad lentamente progresiva que comienza en la infancia y tiene su máxima incidencia en la edad adulta.<sup>(26,27,28)</sup>

En México, la cardiopatía isquémica, desde 1980 se ubica como líder en este rubro y en los últimos años se ha encontrado un aumento de hasta 30 veces, en 1985 fue de 3.8%, en el último decenio, uno de cada cinco mexicanos que fallecen después de los 75 años lo hacen por cardiopatía isquémica.<sup>(29,30)</sup>

La enfermedad de las arterias coronarias, una manifestación de la aterosclerosis, incrementa con la edad y es más alta en hombres que en mujeres, según un estudio hecho por Framingham, tabla 2.

<b>Edad</b>	<b>Hombres(%)</b>	<b>Mujeres(%)</b>
25-44	8.2	1.2
45-54	21.6	6.9
55-64	40.3	19.8
65-74	45.1	27.2
75-84	50.5	46.8

Referencia 31

En esta tabla puede observarse que los índices de morbilidad por cardiopatía isquémica son significativamente mayor en los hombres hasta los 75 a 84 años de edad, entre los cuales la incidencia en hombres y mujeres se iguala,<sup>(31)</sup> de modo que en la postmenopáusia se pierde la protección propia del sexo.<sup>(25)</sup> Tanto la diabetes como la tolerancia disminuida a la glucosa acentúa la extensión y la severidad de la aterosclerosis con mucha mayor importancia en mujeres que en hombres.<sup>(25)</sup>

No se comprende por completo la etiología de la aterosclerosis acelerada en la diabetes, pero es probable que sea multifactorial.<sup>(32)</sup> Ross y Glomset en 1986 proponen su teoría de la *reacción a la agresión*, donde afirman que las lesiones de aterosclerosis se inician como respuesta a algún tipo de agresión al endotelio arterial, la lesión puede ser sutil o una llamativa descamación de células endoteliales. Las lesiones de la pared arterial pueden clasificarse en varios grados:

- + Disfunción del endotelio sin pérdida evidente de la integridad del mismo.
- + Denudación endotelial y daño en la íntima arterial, pero sin que la lesión sobrepase la lámina elástica interna; en consecuencia, la capa media está indemne.
- + La lesión sobrepasa la lámina elástica interna con daño de las capas íntima y media.

Debido a que las lesiones ateromatosas tienden a aparecer en los sitios de bifurcación arterial, se piensa que el daño endotelial puede relacionarse con la presión

ejercida por el flujo sanguíneo sobre las paredes arteriales en estos sitios. Otros posibles agentes causales de daño endotelial incluyen: las LDL oxidadas, las sustancias químicas contenidas en el humo del tabaco, la homocisteína, el estrés de "desprendimiento" del endotelio por hipertensión arterial y la infección (algunos tipos de virus). Las lesiones focales producen un aumento de la permeabilidad a los constituyentes del plasma, como los lípidos, y permiten la adherencia de monocitos y linfocitos T de la sangre al endotelio o al tejido conjuntivo subendotelial; el endotelio sintetiza las llamadas moléculas de adherencia que incluyen a VCAM-1, ICAM y ECAM (vascular, intercelular y endotelial moléculas de adhesión celular, respectivamente), éstas son de naturaleza glucoproteica y facilitan la adherencia de los monocitos y linfocitos T circulantes a la superficie endotelial y la migración de los mismos al espacio subendotelial, es posible que los propios leucocitos también produzcan estas moléculas. Una vez adheridas al endotelio las células mononucleares migran a través de las uniones intercelulares del mismo para localizarse en el subendotelio, este hecho ocurre bajo la influencia de moléculas reguladoras del crecimiento o de sustancias quimiotácticas producidas por el endotelio, los leucocitos adheridos y posiblemente los miocitos, tabla 3. Las células musculares lisas sintetizan componentes de la matriz extracelular, lo que produce acumulo de colágeno, fibras elásticas y proteoglicanos, los monocitos también penetran en la íntima, se transforman en macrófagos, acumulan lípido hasta transformarse en las células espumosas características de la estría grasa. Las agresiones únicas o de poca duración se siguen de regeneración del endotelio, restauración de la función endotelial y regresión de la lesión; sin embargo, las agresiones crónicas o repetidas llevan finalmente al desarrollo de una placa ateromatosa, <sup>(28, 33, 34)</sup> figura 2.

**Tabla 3. MOLÉCULAS QUE INTERVIENEN EN LA ATEROSCLEROSIS**

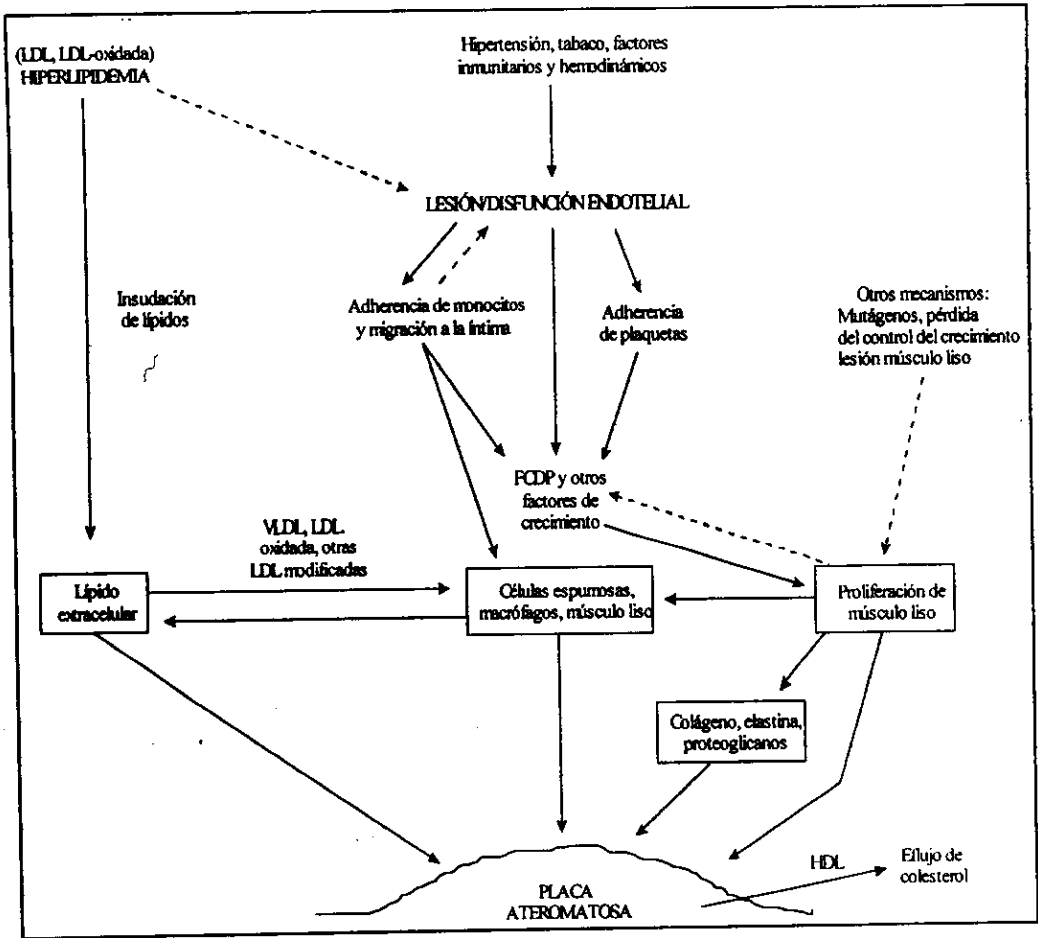
MOLÉCULA	FUNCIÓN	ORIGEN
<b>FACTORES DE CRECIMIENTO</b>  <b>PDGF o FCDP</b> (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas)	Favorece la migración de las células del músculo liso de la capa media al espacio subendotelial de la íntima y permite el cambio de estas células del fenotipo contráctil al sintético.	Liberada por los gránulos alfa plaquetarios, sintetizada también por células endoteliales, macrófagos y miocitos.
<b>bFGF</b> (Factor de crecimiento derivado de los fibroblastos)	Inducen la proliferación del músculo liso.	Se expresan en arterias afectadas por aterosclerosis.
<b>HB-EGF</b> (Factor de crecimiento epidérmico fijador de heparina)		

*continúa...*

MOLECULA	FUNCION	ORIGEN
<p>IFG-1 (Factor de crecimiento tipo insulina)</p> <p>IL-1 (Interleucina 1)</p> <p>TNF<math>\alpha</math> (Factor de necrosis tumoral alfa)</p> <p>TGF<math>\beta</math> (Factor de crecimiento y transformaci3n beta)</p>	<p>Inducen la proliferaci3n del m3sculo liso.</p>	<p>Se expresan en arterias afectadas por aterosclerosis.</p>
<p><b>QUIMIOATRAYENTES</b></p>		
<p>CSFs (Factores estimulantes de colonias)</p> <p>MCP-1 (Prote3na quimiot3ctica de los monocitos)</p> <p>Ox-LDL (Lipoprote3na de baja densidad oxidada)</p> <p>TGF<math>\beta</math></p>	<p>Inducen la quimiot3xis de monocitos y su migraci3n transendotelial.</p>	
<p>PDGF</p> <p>IGF-1</p>	<p>Induce quimiot3xis de c3lulas de m3sculo liso.</p>	
<p>FGF</p>	<p>Potente mit3geno y quimio-atrayente para el endotelio. Mit3geno para c3lulas del m3sculo liso.</p>	
<p><b>CITOCINAS</b></p>		
<p>IL-1</p> <p>TNF<math>\alpha</math></p> <p>IFN<math>\gamma</math> (Interferon gama)</p> <p>IL-2</p> <p>CSFs</p>	<p>Son moduladores de la respuesta inflamatoria que ocurre una vez que el endotelio ha sido expuesto a agentes agresivos. Es probable que estas mismas citocinas puedan tener un papel como mediadores de la respuesta inmunitaria inducida durante el proceso aterog3nico.</p>	

Referencia 35

**FIGURA 2.** Representación esquemática de una hipotética secuencia de acontecimientos e interacciones celulares en la aterosclerosis.



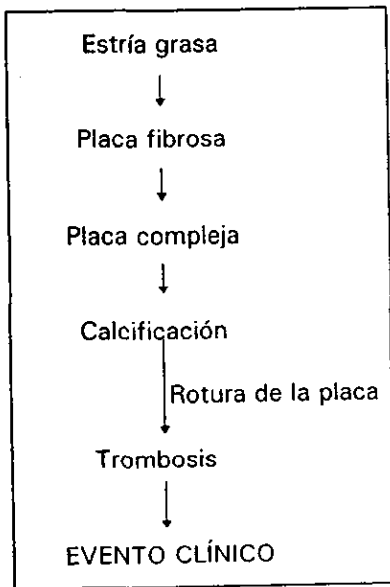
Aunque la aterosclerosis es un proceso complejo y multifactorial el hecho clave del comienzo, es el acúmulo de lipoproteínas los lípidos, particularmente el colesterol, juegan un papel crucial en el origen y desarrollo, como han demostrado tanto los estudios epidemiológicos como anatomopatológicos y experimentales.

### FASES EVOLUTIVAS DE LA ATROSCLEROSIS.

**FASE 1.** La aterosclerosis se inicia en la primera década de la vida con la aparición de las llamadas estrías grasas, que se consideran la fase inicial de la aterosclerosis y pueden encontrarse hasta en niños recién nacidos; sin embargo, muchas de ellas desaparecen en las primeras décadas, otras, generalmente las cercanas a ramificaciones de los vasos, progresan hasta ser lesiones fibrosas o ateromas



complicados, especialmente en personas con hipertensión e hiperlipidemias,<sup>(29)</sup> figura 3. Las estrías grasas aparecen inicialmente en las paredes de la aorta torácica, a manera de pequeñas placas confluentes amarillo-grisáceas, ligeramente elevadas, histológicamente se constituyen por células espumosas derivadas de células del músculo liso, macrófagos, linfocitos T y un número reducido de miocitos.<sup>(33)</sup> La formación de la estría grasa comienza con la retención de lípidos en el espacio subendotelial; las LDL se transportan a través del endotelio intacto y son atrapadas en la matriz tridimensional de fibras y fibrillas de colágeno segregados por las células de la pared arterial, son las proteínas de la matriz extracelular, particularmente el proteoglicano segregado por las propias células y, quizás, enzimas lipolíticas como la lipoproteína lipasa y la esfingomielinasa las que producen el secuestro de las LDL. Las células de la pared arterial segregan productos oxidantes procedentes de múltiples fuentes que inician la oxidación de LDL atrapada en la matriz colágeno subendotelial,<sup>(36)</sup> tabla 4.



**FIGURA 3.** Modelo mostrando la secuencia de eventos de estría grasa al evento clínico.<sup>(36)</sup>

**Tabla 4. Desarrollo de la estría grasa.**<sup>(36)</sup>

1. Transporte de lipoproteínas
2. Retención de lipoproteínas
3. Modificación de lipoproteínas
4. Adherencia de monocitos
5. Migración de monocitos (quimiotaxis)
6. Diferenciación de monocitos
7. Formación de células espumosas

**FASE 2.** La verdadera lesión aterosclerosa es la *placa fibrosa* y el *ateroma* (placa de predominio graso). En la formación de la placa es fundamental la proliferación y emigración del músculo liso de la capa media a la íntima, en que el músculo liso o la matriz a que da lugar rodea el núcleo graso, formando la placa elevada de ateroma; si domina el elemento fibroso se denomina placa fibrosa y si tiene un núcleo graso

rodeado de una cápsula fibrosa se denomina fibroateroma o, simplemente, ateroma. Las placas aparecen elevadas sobre el resto de la pared endotelial y lo hacen en las zonas que han sido más abundantes en estrías grasas, el elemento celular protagonista es la célula del músculo liso que prolifera y emigra de la capa media a la íntima. Las células del músculo liso en la media están dispuestas en capas concéntricas de miofilamentos, constituyendo el denominado fenotipo «contráctil», en cambio, en la placa de ateroma, las células del músculo liso emigradas a la íntima han perdido esta apariencia, apenas tienen miofilamentos y sí un abundante retículo sarcoplásmico constituyendo el denominado fenotipo «sintético» este fenotipo da origen a toda la matriz proteica de la placa: colágeno, sobre todo de tipo I, pero también tipos III, IV y V y proteoglicanos y elastina.<sup>(26,33)</sup> La placa fibrosa, que puede ser excéntrica o concéntrica, aunque es más frecuentemente concéntrica, es una placa estable que permanece sin modificaciones durante años, dando lugar al cuadro clínico de la angina estable pero que puede progresar también por pequeñas fisuras asintomáticas que producen lesión del endotelio, trombos de plaquetas y fibrina que se incorporan en la placa, este crecimiento lento y subclínico puede conducir a la oclusión total del vaso, que en el 75% de los casos es asintomática porque se crea circulación colateral compensadora.

**FASE 3.** El *ateroma*. Microscópicamente la placa está constituida por fibras de músculo liso, miofibroblastos y células mioepiteliales proliferadas, fibras de colágena y elásticas, proteoglicanos, fibrina, algunos fibroblastos, macrófagos y gran cantidad de lípidos, especialmente colesterol; la proporción y disposición de todos estos componentes es variable en cada placa, dependiendo de su localización y tiempo de evolución. La disposición de la placa típica consiste en:

- a). Un casquete fibroso compuesto predominantemente por músculo liso, leucocitos, tejido conectivo y material de membrana basal;
- b). Una área celular interna formada por una mezcla de macrófagos, músculo liso y linfocitos T; y
- c). Un núcleo necrótico profundo que contiene restos celulares, gotas lipídicas, cristales de colesterol, proteoglicanos, depósitos de calcio y, a veces, macrófagos y células del músculo liso cargadas de lípidos.

Alrededor de la placa puede observarse una banda de proliferación vascular, se desconoce cuál es el mecanismo en el que predominan las células del músculo liso o los macrófagos en cada placa; el colesterol aparece dentro de las células o en forma de cristales acirculares en los espacios intercelulares, el lípido extracelular es de dos formas: el más abundante está formado por vesículas coalescentes de colesterol libre que forman cristales de colesterol y el menos abundante de gotas de ésteres de colesterol de ácido linoleico. El colesterol libre puede provenir de los macrófagos, cuyas estrías grasas hidrolizan los ésteres de colesterol de las lipoproteínas y los vierte en el espacio extracelular y las gotas de ésteres de colesterol de ácido linoleico que proceden por simple filtración del plasma. La placa está cubierta por varias capas de células endoteliales, con el tiempo se produce una proliferación de los vasa vasorum, que pueden llegar hasta la íntima de la arteria, la disminución de la luz que produce la placa de ateroma suele ser incompleta e irregular, sin llegar a cubrir toda la

circunferencia del vaso.<sup>(37)</sup>

## PLACAS COMPLICADAS.

Las complicaciones de las placas de ateroma son las siguientes:<sup>(37, 38)</sup>

1. Calcificación. Los ateromas en la enfermedad avanzada sufren casi siempre una calcificación focal o masiva, la cual se localiza en la base de la placa aterosclerosa, en las placas de arterias grandes y de las coronarias, principalmente, puede afectar a toda la pared convirtiendo la arteria en un conducto rígido, que con el tiempo puede osificarse.
2. Ulceración. Cualquier placa de ateroma de cualquier vaso puede ulcerarse por reblandecimiento de la zona central de la placa, con salida de material y producción de embolias del contenido de la placa (émbolos de colesterol).
3. Trombosis. Es la complicación más importante de la aterosclerosis, ya que puede causar oclusión completa de la arteria y producir un infarto, se forma principalmente sobre placas ulceradas o en dilataciones aneurismáticas, en algunos casos, la trombosis va seguida de una reendotelización con inclusión del trombo en la placa de ateroma.
4. Hemorragia. En la placa puede producirse, especialmente en las arterias coronarias, por rotura de su endotelio de revestimiento o de los capilares de pared delgada que la irrigan, el hematoma resultante puede quedar localizado dentro de la íntima o romperse hacia la luz. Es frecuente observar en las placas macrófagos cargados de hemosiderina por fagocitosis de sangre extravasada.
5. Aneurismas. La fibrosis de la placa y la sustitución fibrosa del músculo liso condicionan una disminución de la elasticidad y resistencia de la pared de la arteria, como consecuencia de ello, se producen dilataciones aneurismáticas, que son un foco de turbulencia y de trombosis, en las placas grandes ulceradas de la aorta, junto a bifurcaciones arteriales, pueden formarse aneurismas disecantes. La rotura de los aneurismas produce hemorragias agudas frecuentemente mortales.

Aunque cualquier forma de ateromatosis es grave, la "lesión complicada", en especial la trombosis sobreañadida, es la que da a esta enfermedad su grave significación clínica.

## LA ROTURA DE LA PLACA.

La rotura de la placa es el acontecimiento crítico que cambia la evolución de la aterosclerosis, porque pone en marcha el mecanismo de trombosis que mata al paciente. La rotura de la placa y la trombosis subsiguiente da lugar al cuadro clínico de los *síndromes coronarios agudos o malignos*, caracterizados por: angina inestable, infarto de miocardio y muerte súbita.<sup>(36)</sup>

Ambrose y Fuster han demostrado que la disrupción de la placa y la trombosis subsiguiente ocurre en el 75% de los casos en placas con estenosis coronaria angiográfica leve o moderada. En general no son las estenosis severas las que rompen, sino que las placas *vulnerables* son placas pequeñas, probablemente con un núcleo

lipídico excéntrico localizado en la íntima, y si las obstrucciones severas que afectan a muchos vasos tienen alto riesgo, es debido a que actúan de *marcadores* de otras múltiples lesiones pequeñas, a veces inaparentes, que son las más propicias a producir infarto de miocardio.<sup>(36)</sup>

Estudios anatomopatológicos han mostrado reiteradamente que las placas aterosclerosas, durante mucho tiempo, tienen un crecimiento expansivo, hacia fuera de la luz; por lo tanto, la mayoría de las placas obstructivas pasan una fase que dura años o décadas del denominado «remodelado» sin compromiso de la luz.<sup>(36)</sup>

## DIAGNÓSTICO DE LA ATEROSCLEROSIS.

- Observación angiográfica de deformaciones de la luz vascular.
- Sondajes Doppler para medir la velocidad de flujo.
- Evaluación de los cambios electrocardiográficos inducidos por la prueba de esfuerzo
- Los defectos de la perfusión miocárdica demostrables con técnicas de imagen mediante isótopos (talio 201) radioactivos suelen ser atribuibles a aterosclerosis.
- La pletismografía digital con ejercicio a menudo desenmascara una aterosclerosis importante de las extremidades inferiores.

A pesar de que existen diversos tipos de pruebas, la detección de la aterosclerosis suele hacerse cuando aparece alguna complicación clínica debida a la disminución importante del flujo en un vaso, en la actualidad el indicador más fiable de aterosclerosis es la *cardiopatía isquémica* (sinónimo de cardiopatía coronaria y cardiopatía aterosclerótica).<sup>(34,39)</sup>

# PARTICIPACION DE LAS LDL EN EL PROCESO DE ATEROSCLEROSIS

Una fuerte asociación entre la elevación de los niveles plasmáticos de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y el riesgo de enfermedad cardiovascular está bien reconocido; sin embargo, la vía que liga a las LDL con la enfermedad cardiovascular aún no es clara. Estudios recientes indican que la modificación oxidativa de las LDL suele verter LDL más aterogénicas; el daño oxidativo que sufren las LDL afecta tanto a su componente lipídico como a su apoproteína (apo- B).<sup>(40)</sup>

Las propiedades aterogénicas de las LDL oxidadas (LDL-Ox) incluyen:<sup>(41)</sup>

## *Propiedades químicas y fisicoquímicas.*

- Pérdida completa de antioxidantes.
- Pérdida más o menos completa de ácidos grasos poliinsaturados.
- Pérdida de fosfatidil colina y ésteres de colesterol.
- Incremento del contenido de lisofosfatidil colina y oxisteroles.
- Incremento del contenido de hidroxil- e hidroxiperóxidos de ácidos grasos poliinsaturados.
- Incremento del contenido de conjugados dieno.
- Incremento del contenido de malonaldehído, hexanal, hidroxinonal, y otros aldehídos.
- Pérdida parcial de grupos amino libres en apo B.
- Fragmentación de apo B a péptidos pequeños.
- Malonaldehído e hidroxinonal aparecen como epítopes en apo B que son reconocidos por anticuerpos específicos.
- Incremento de la movilidad electroforética y aumento de la densidad.
- La apo B presenta un rearrreglo conformacional en su estructura<sup>(41)</sup>

## *Propiedades biológicas.*

- Incremento de la captación y degradación por macrófagos.
- Es citotóxica a la mayoría de las células.
- Quimioatrayente de monocitos y células del músculo liso.
- Inhibe la activación de óxido nítrico por la guanilatociclasa.
- Estimula la producción del factor quimioatrayente de monocitos (MCP-1), moléculas de adhesión endotelial de leucocitos (ELAM), factor de crecimiento de monocitos (M-CSF) y granulocitos (G-CSF) y factor tisular (FT) esencial para la coagulación.
- Es inmunogénica y puede dar lugar a la formación de autoanticuerpos.
- Puede alterar las vías de coagulabilidad.
- Puede alterar las propiedades vasomotoras de las arterias coronarias.

Aún no es claro como la LDL se oxida *in vivo*, como se inicia el proceso o como se propaga; sin embargo, se puede describir el mecanismo de oxidación de las LDL en dos etapas, una primera etapa de *oxidación parcial* y una segunda etapa de *oxidación total*.<sup>(36)</sup>

La primera etapa ocurre en el espacio subendotelial antes del reclutamiento de los monocitos, en ésta se han propuesto varias vías por las cuales se inicia la oxidación de las LDL:

- 1) las células del músculo liso, células endoteliales o macrófagos pueden generar intracelularmente lipoperóxidos por acción de la 15-lipoxigenasa, los cual son transferidos a las LDL,
- 2) las células de la pared arterial segregan productos oxidantes (tiol, NO<sub>2</sub>) procedentes de múltiples fuentes que producen la oxidación directa de los lípidos de la LDL atrapada en la matriz colágeno subendotelial,
- 3) especies oxígeno reactivas tales como anión superóxido o radicales hidroxilo (O<sub>2</sub><sup>2-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, •OH), pueden ser secretadas al medio iniciando así la peroxidación de lípidos de las LDL.<sup>(42, 43)</sup>

Una vez que una mínima cantidad de peróxido es generada dentro de las LDL, estudios *in vitro* han mostrado que la peroxidación puede ser amplificada por tales catálisis como metales de transición o proteínas hem.<sup>(44)</sup>

La segunda etapa comienza cuando, una vez reclutados, los monocitos se convierten en macrófagos y contribuyen, con su enorme capacidad oxidativa, a la oxidación completa de LDL y de su porción proteica, la apo B, estas modificaciones en las LDL hacen que no sea reconocida por los receptores naturales de LDL, sino que lo sea por unos receptores *scavenger*, *barrendero* o *receptor de LDL-acetilada* y se transformen en células espumosas, cargadas de colesterol, que constituyen la base celular de la estria grasa. La clave de la formación de la célula espumosa es el receptor del macrófago que, al perder la lisina la carga positiva por acetilación de su amino terminal, reconoce la carga negativa de la proteína del LDL (apo B), el receptor (tipo I y tipo II) es un trimero que recuerda a la estructura de la triple hélice del colágeno.<sup>(41, 42)</sup>

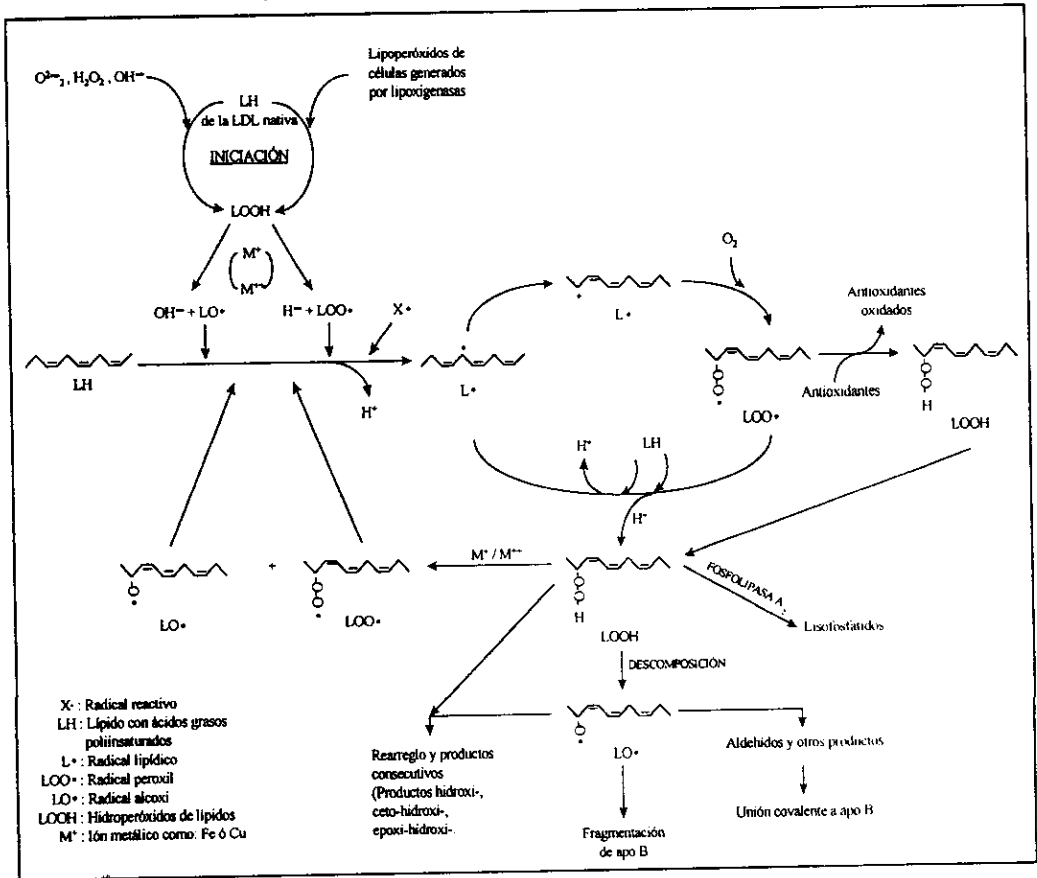
La peroxidación de los lípidos se define como la deteriorización oxidativa de los lípidos, principalmente los que contienen ácidos grasos poliinsaturados, figura 4. El ataque de los radicales libres sobre las membranas da comienzo a la peroxidación de los lípidos y el mecanismo se describe a continuación:

1. La iniciación de la primera cadena de la secuencia de la peroxidación consiste en que un radical de oxígeno suficientemente reactivo, como el radical hidroxilo (•OH) o el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>2-</sup>), extrae un átomo de hidrógeno de un grupo metileno (-CH<sub>2</sub>) de la cadena lateral de un ácido graso poliinsaturado de una membrana celular o de una lipoproteína, generando un radical lipídico.
2. Este radical lipídico se estabiliza reorientándose para formar un *dien conjugado*, en condiciones aeróbicas se combina con O<sub>2</sub>, y da lugar a un *radical peroxil* o *radical peroxi* (lípidio-CHOO).
3. Los radicales peroxi sustraen átomos de hidrógeno de otras moléculas de lípidos y continúan la reacción en cadena de peroxidación de los lípidos.

- El radical peroxi también puede combinarse con el hidrógeno que sustrae de otro ácido graso y da lugar al hidroperóxido lipídico (lípidos-COOH).
- Diversos compuestos metálicos ( $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ ) reaccionan con los peróxidos de lípidos, para dar lugar a la fisión de un enlace O-O y forman un *radical alcoxi* (lípidos-CO).

Ambos radicales peroxi (lípidos-CHOO) y alcoxi (lípidos-CO) estimulan la reacción en cadena sustrayendo ulteriores átomos de hidrógeno. <sup>(41, 43, 45)</sup>

FIGURA 4. Principales eventos que ocurren durante la oxidación de LDL.



Referencias 41,42

Durante la modificación oxidativa hay una amplia conversión de lecitina a lisolecitina catalizada por la fosfolipasa A<sub>2</sub>, los inhibidores de esta fosfolipasa A<sub>2</sub> bloquean la generación de lisolecitina y la propagación de peróxidos de lípidos, y así se previene la modificación oxidativa de LDL completamente. <sup>(42)</sup>

Se ha observado que la LDL modificada es inmunogénica, pues se han

encontrado autoanticuerpos contra esta LDL, los epítopes hallados en la LDL oxidada son malonaldehído-lisina (MDA-lisina) y 4-hidroxionenal-lisina (HNE-lisina). Los autoanticuerpos contra estos epítopes han sido encontrados en suero humano, Ylä aisló una IgG de lesiones ateroscleróticas de conejos WHHL (Watanabe hereditable hiperlipidemic) y humanos que reacciona con la LDL modificada (con malonaldehído y LDL oxidada con cobre) pero no con la LDL nativa.<sup>(41,42)</sup> Algunos estudios<sup>(42,46)</sup> sugieren que el complejo antígeno-anticuerpo existe dentro de las plaquetas de la pared arterial, los macrófagos toman también éstos complejos, permitiendo de este modo la entrada y acumulación de colesterol en el macrófago.<sup>(42)</sup> El anticuerpo contra la LDL modificada también se une a la albúmina, hemoglobina, polilisina y ácido  $\epsilon$ -amino caproico.<sup>(41,42)</sup>

Rosenfeld mostró en un análisis por Western Blot y radioinmunoensayo (RIA) que residuos de MDA-lisina y HNE-lisina se encuentran en la apo B de la LDL oxidada con cobre y en la LDL extraída de la pared arterial de conejos WHHL, lo cual sugiere que tales epítopes de la apo B son formados *in vitro* e *in vivo*.<sup>(41)</sup>

## MECANISMOS Y CINÉTICA DE OXIDACIÓN DE LDL.

El curso de la oxidabilidad de LDL puede ser seguido por la medición :

- 1) de la formación de TBARS (thiobarbituric acid reactive substances),
- 2) de la formación de hidroperóxidos de lípidos,
- 3) de la formación de conjugados dienos,
- 4) de la formación de aldehídos,
- 5) del incremento en la fluorescencia a 430 nm,
- 6) la desaparición de antioxidantes o ácidos grasos poliinsaturados (AGPI),
- 7) de la fragmentación de apo B,
- 8) de la movilidad electroforética de LDL,
- 9) de la inmunoreactividad.<sup>(41, 46)</sup>

Cada uno de estos procedimientos debe efectuarse a diferentes tiempos para poder predecir el estado de oxidación y la posible relación entre los diferentes eventos.

La elección del método debe hacerse según el objetivo del estudio, pues de acuerdo a éste los métodos ofrecerán ventajas y desventajas en cuanto al procedimiento y resultados que ofrecen; por ejemplo, el método para la medición de TBARS y fluorescencia tiene baja especificidad,<sup>(46)</sup> en la medición de la inmunoreactividad en algunas ocasiones no se alcanza a detectar la reacción debido a las bajas concentraciones de la LDL modificada en el plasma; otros inconvenientes pueden ser el tamaño de la muestra, tiempo para realizar la prueba, sensibilidad de los métodos, costo, etc.<sup>(41)</sup>

*In vitro* la oxidación de LDL puede ser realizada por células o en un medio libre de células con trazas de metales de transición (cobre o hierro); las propiedades de la LDL oxidada tanto por células como por metales son muy similares.<sup>(46)</sup>

En base al análisis cronológico de oxidación de LDL por iones  $\text{Cu}^{++}$  la oxidabilidad de LDL puede ser dividida en tres fases:<sup>(41, 46)</sup>

- 1) fase lag o fase de retardo,
- 2) fase log o fase de propagación y



### 3) fase de descomposición.

Durante la fase lag la LDL agota progresivamente sus antioxidantes, primeramente  $\alpha$ -tocoferol y finalmente  $\beta$ -caroteno (otros antioxidantes son:  $\gamma$ -tocoferol, licopene, criptoxantina, lutein, zeaxantina), durante este periodo sólo una mínima cantidad de peroxidación de lípidos ocurre (0.3nmol/mg LDL/min.).<sup>(41, 42)</sup>

Cuando los antioxidantes de la LDL son agotados se da el inicio de la *fase de propagación*, en la cual se acelera la peroxidación de lípidos de una manera exponencial. El cambio de la fase lag a la fase de propagación y el incremento exponencial de la oxidación es mediada por la descomposición, catalizada por iones  $\text{Cu}^{++}$ , de los hidroperóxidos preformados durante la fase lag a radicales lipídicos ( $\text{LO}\bullet$ ,  $\text{LOO}\bullet$ ), la cual inicia con la rotura de las cadenas, formando nuevas series de cadenas de radicales libres.

Durante la fase lag, fase de propagación y principios de la fase de descomposición, el curso del tiempo de formación de dienos refleja completamente la formación de hidroperóxidos de lípidos. El segundo incremento de absorbancia a 234 nm ocurre poco después de alcanzar el máximo de absorbancia, esto no es debido a la formación de nuevos peróxidos, sino que es atribuido a un incremento de productos de degradación (por ejemplo:  $\alpha,\beta$ -carbonilos insaturados que absorben también a 234 nm).

Se define el tiempo máximo de formación de dienos como el final de la propagación y el inicio de la fase de descomposición, temporalmente ambas fases se sobrelapan y no pueden ser completamente disociadas una de la otra.<sup>(41, 46)</sup>

Los cambios que dan inicio a la fase de descomposición incluyen:<sup>(41)</sup>

- 1). Incremento en la producción de aldehídos
- 2). Generación de cromóforos fluorescentes en la apo B y en lípidos de LDL
- 3). Incremento de la carga negativa de superficie
- 4). Fragmentación y modificación de apo B
- 5). Formación de lisofosfátidos y oxidienos
- 6). Pérdida de grupos amino libres en apo B.

La descomposición de hidroperóxidos de lípidos a aldehídos es un fenómeno general durante la peroxidación de lípidos en sistemas biológicos, y muchos hallazgos sugieren que esos aldehídos actúan como "segundos mensajeros tóxicos".

El fuerte incremento de la fluorescencia a 430 nm de apo B y la pérdida de grupos amino libres es probablemente la causa para las reacciones de aldehídos con grupos  $\epsilon$ -amino de residuos de lisina. Similarmente, el fuerte incremento de la carga negativa de superficie de LDL es probablemente debido a la pérdida de carga positiva de grupos amino o formación de aductos de Michael con  $\alpha,\beta$ -aldehídos.<sup>(40)</sup>

La unión covalente de aldehídos a apo B está probablemente también, en al menos una parte, envuelta en la formación de los epítopes característicos de los receptores *scavenger* de los macrófagos los cuales reconocen la LDL-oxidada.<sup>(42)</sup>

Alternativamente, algunas de las funciones de los radicales carbonilo pueden ser producidas por radicales libres ( $\text{LO}\bullet$ ,  $\text{LOO}\bullet$ ) mediando la degradación de aminoácidos en apo B. Los radicales lípido-alcóxido son probablemente la causa de la fragmentación de apo B, pues al incrementar la formación de dienos, aumenta la fragmentación de apo B.<sup>(41)</sup>

## IMPORTANCIA DE LAS SUBPARTÍCULAS DE LDL.

El tamaño y densidad de las subpartículas de LDL varía substancialmente. Dos patrones principales han sido descritos:

- Subclase A: grandes y ligeras.
- Subclase B: pequeñas y densas.<sup>(47)</sup>

El predominio de las LDL pequeñas y densas ha sido asociado con un incremento en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus. El tamaño de la LDL es más pequeño en mujeres con diabetes que en mujeres sin diabetes y la asociación entre el tamaño y la diabetes esta relacionado más fuertemente en mujeres que en hombres. La densidad de la partícula de LDL está relacionada con el contenido de triglicéridos.<sup>(47)</sup>

La prevalencia de LDL pequeñas y densas incrementa considerablemente con la edad, obesidad y con la diabetes mellitus no dependiente de insulina. Las LDL densas son menos comunes en las mujeres jóvenes, después de la menopausia, la concentración de las LDL densa se incrementa, esto puede en parte explicar el aumento en el riesgo de enfermedades cardiovasculares en mujeres postmenopáusicas.<sup>(47)</sup> La razón por la cual las LDL pequeñas y densas son más aterogénicas no es clara, pero existen dos suposiciones para explicar este hecho: 1) la partícula de LDL puede ser oxidada más rápidamente o 2) la depuración de estas LDL es más lenta.<sup>(47)</sup>

## FACTORES QUE POTENCIALMENTE AFECTAN LA OXIDABILIDAD DE LDL *IN VIVO*.

### A. Factores intrínsecos a LDL

1. Composición de ácidos grasos (particularmente ácidos grasos poliinsaturados).
2. Contenido endógeno de antioxidantes ( $\beta$ -caroteno, vitamina E, ubiquinol-10); exógeno (probucof).
3. Actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>.
4. Otros, incluyendo tamaño de la partícula, propiedades inherentes de apo B, localización de ácidos grasos (fosfolípidos en la superficie o triglicéridos en el núcleo o ésteres de colesterol).<sup>(42)</sup>

### B. Factores extrínsecos a LDL.

1. Variación potencial en la actividad celular de prooxidantes (p.e. variación genética en la expresión en macrófagos de la actividad de 15-lipoxygenasa y secreción celular de anión superóxido)
2. Concentración plasmáticas y fluido extracelular de componentes prooxidantes (p.e. concentración de trazas de metales).
3. Concentración plasmática y fluido extracelular de componentes antioxidantes (p.e. ascorbato, urato).
4. Concentración de otros factores que influyen la oxidación de LDL (p.e. HDL).

5. Factores que influyen en el tiempo de residencia de LDL en la íntima (p.e. factores que incrementan la unión como Lp (a); glicosilación no enzimática de LDL).<sup>(42)</sup>

## DEFENSA NATURAL ANTIOXIDANTE.

Hemos desarrollado defensa antioxidante para protegernos de los radicales libres, los cuales involucran:

- A) La superóxido dismutasa (SOD) convierte el superóxido de hidrógeno. Estas enzimas se encuentran en las mitocondrias y en el citosol.
- B) Las catalasas, que se encuentran en los peroxisomas de la mayoría de los tejidos, eliminan el peróxido de hidrógeno originado por las oxidasas de los propios peroxisomas.
- C) Las glutatión peroxidasas son las enzimas mayores y las más importantes que quitan el hidrógeno del peróxido de hidrógeno generado por la SOD, tanto en el citosol como en las mitocondrias, eliminando el peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno se reduce a agua empleando como agente reductor el tripéptido glutatión (GSH) que se transforma en su forma oxidada. (GSSG). La glutatión reducida (GSH) se encuentra en todas las células humanas.
- D) Como la defensa antioxidante no es completa, hay enzimas reparadoras que destruyen las proteínas alteradas por radicales libres, quitan los ácidos grasos oxidados de las membranas y reparan el ADN dañado por los radicales libres. Todas estas defensas son intracelulares.
- E) Algunas defensas extracelulares incluyen: la transferrina y lactoferrina (que transportan el hierro), la ceruloplasmina (que transporta cobre), esta proteína puede actuar como pro-oxidante de LDL, la albúmina (liga iones de cobre y recoge radicales libres).
- F) Algunos antioxidantes son extra e intracelulares. La vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol, TH) está situado en las membranas celulares y en las lipoproteínas, bloquea la reducción en cadena de la peroxidación de los lípidos barriendo los radicales peroxil intermedios. El radical tocoferol es mucho menos reactivo para atacar cadenas laterales de ácidos grasos adyacentes y se puede reconvertir en  $\alpha$ -tocoferol por la vitamina C. La vitamina A (retinol), su provitamina el  $\beta$ -caroteno, y el selenio son factores dietéticos antioxidantes.<sup>(41,43,45)</sup>

# ESTRÓGENOS: FUNDAMENTOS BÁSICOS E IMPORTANCIA EN LA ATEROSCLEROSIS.

Hay tres estrógenos humanos naturales:  $17\beta$ -estradiol, el principal estrógeno producido por el ovario; estriol, el principal estrógeno producido por la placenta; y estrona, un metabolito del  $17\beta$ -estradiol.

## ACCIONES FISIOLÓGICAS.

Los estrógenos se requieren para la maduración normal de la mujer, estimulan el desarrollo de la vagina, el útero y de las trompas de Falopio, así como de los caracteres sexuales secundarios, también estimulan el desarrollo del estroma y el crecimiento de los conductos en las mamas y son la causa de la fase de crecimiento acelerado y del cierre de las epífisis de los huesos largos que ocurre en la pubertad, cantidades mayores producen pigmentación de la piel que predomina en la región de los pezones, areolas, y en la zona genital. <sup>(48,49,50)</sup> Los estrógenos también desempeñan una función importante en el desarrollo del revestimiento del endometrio.

La exposición continua a los estrógenos por períodos prolongados conduce a una hiperplasia anormal del endometrio que por lo general se relaciona con patrones anormales de hemorragia. Cuando la producción de estrógenos esta apropiadamente coordinada con la de progesterona durante el ciclo menstrual humano normal, ocurre la hemorragia periódica y la esfacelación del revestimiento endometrial. <sup>(48,49,50)</sup>

Los estrógenos tienen numerosos efectos metabólicos importantes: contribuyen en parte al mantenimiento de la estructura normal de la piel y los vasos sanguíneos en las mujeres, disminuyen la velocidad de resorción de hueso, antagonizando el efecto de la hormona paratiroidea sobre el mismo aunque no estimulan su formación, pueden tener efectos importantes sobre la absorción intestinal porque reducen la movilidad del intestino. Las alteraciones en la composición de los lípidos del plasma causadas por los estrógenos están caracterizadas por un aumento en las lipoproteínas de alta densidad, una reducción ligera en las lipoproteínas de baja densidad y una disminución en los valores de colesterol plasmático, las concentraciones plasmáticas de triglicéridos están aumentadas. Los estrógenos tienen muchos otros efectos: facilitan la pérdida de líquido intravascular hacia el espacio extracelular produciendo edema y modulan el control de la función del músculo liso por el sistema nervioso simpático. <sup>(48,49,50)</sup>

## MENOPAUSIA.

Entre los 45 a 55 años, el ciclo sexual comienza a ser irregular y en muchos de los ciclos no se produce ovulación, después de unos cuantos meses o años, los ciclos cesan completamente, este período, durante el cual cesan los ciclos y las hormonas sexuales femeninas disminuyen con rapidez casi hasta llegar a cero, se llama

*menopausia* o *climaterio*, durante todo este período se produce una pérdida gradual y progresiva de la función ovárica, así como diversos cambios endocrinológicos, somáticos y psicológicos.<sup>(49,50,51)</sup>

La menopausia es la consecuencia del agotamiento de los folículos ováricos, el número de óvulos es muy escaso y, probablemente, su función es nula, la detención del desarrollo folicular determina un descenso de la producción del estradiol y de otras hormonas, que a su vez anulan la retroalimentación negativa sobre los centros hipotálamo-hipofisarios, por su parte, los niveles de gonadotropinas en el plasma se elevan; la concentración de la hormona folículo estimulante aumenta de forma más precoz e intensa que la de la hormona luteinizante.<sup>(49,50,51)</sup>

En el momento en que sobreviene la menopausia, la mujer debe reajustar su vida, desde la estimulada en forma fisiológica por estrógenos y progesterona hasta una que se encuentra desprovista de estas hormonas. La falta de estrógenos produce a menudo cambios fisiológicos importantes en el cuerpo, como:

- 1). "Sofocos" caracterizados por rubefacción extrema de la piel
- 2). Sensación psíquica de disnea
- 3). Irritabilidad
- 4). Fatiga
- 5). Ansiedad
- 6). En ocasiones diversas alteraciones psicóticas
- 7). Síntomas vasomotores
- 8). Atrofia genitourinaria
- 9). Osteoporosis
- 10). Enfermedades cardiovasculares<sup>(49,50,51)</sup>

Estos efectos pueden disminuir con el empleo de la terapia de reemplazo estrogénico durante la menopausia.<sup>(49,50,51)</sup>

## **TERAPIA DE REEMPLAZO ESTROGÉNICO.**

Dentro de los beneficios de la terapia de reemplazo estrogénico se observan: prevención de la osteoporosis, de la atrofia genitourinaria, de los síntomas vasomotores y disminución del riesgo de enfermedades cardiovasculares.<sup>(49,52,53)</sup>

Después de la menopausia aumentan los niveles de colesterol total y paralelamente a esto incrementan los niveles de colesterol de LDL.<sup>(54)</sup> Por décadas se ha observado que la mujer pierde su resistencia natural a enfermedades cardiovasculares después de la menopausia, esto es debido a la pérdida del efecto protector de los estrógenos, la terapia de reemplazo estrogénico ha mostrado un efecto cardioprotector en mujeres que presentan ya un daño o en mujeres sanas, el mecanismo exacto por el cual los estrógenos confieren protección no es bien conocido, aunque se ha observado un efecto directo en los lípidos séricos.<sup>(31, 54,55)</sup>

Tabla 5.

En un estudio *in vitro* se ha observado que la adición de estrógenos, a la muestra en estudio, prolonga la fase de retardo de la oxidación de partículas de LDL y

**TABLA 5. Efectos de la Terapia de Reemplazo Estrogénico**

EFECTOS FAVORABLES	EFECTOS DESFAVORABLES
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disminución del colesterol total</li> <li>• Incremento del colesterol de HDL (HDL<sub>2</sub> y HDL<sub>3</sub>)</li> <li>• Decremento del colesterol de LDL</li> <li>• Reducción de la oxidación de LDL <i>in vitro</i></li> <li>• Decremento de la apo B</li> <li>• Aumento de apo A</li> <li>• Decremento de lipoproteína (a)</li> <li>• Reducción del tono vascular</li> <li>• Preservación de la función endotelial</li> <li>• Incremento de la liberación de prostaciclina</li> <li>• Decremento de la formación de tromboxano A<sub>2</sub></li> <li>• Decremento de fibrinógeno</li> <li>• Disminución en la presión sanguínea</li> <li>• Decremento de la glucosa sanguínea en ayunas e insulina.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento de triglicéridos</li> <li>• Aumento de VLDL</li> <li>• Neoplasia</li> </ul>

Referencias 56, 57, 58,59, 60

que de acuerdo a la dosis añadida la fase de retardo se ira incrementando, es decir, cuanto mayor sea la cantidad añadida de estrógenos más grande será la fase de retardo,<sup>(55)</sup> el mecanismo por el cual se obtiene este efecto benéfico no esta bien establecido pero se cree que los estrógenos actúan como agentes antioxidantes; recordemos que la vitamina E es un antioxidante natural en el organismo humano, por lo cual se supone, que el 17β-estradiol al tener una estructura similar a la de la vitamina E, actué de forma similar, ambas moléculas tienen un grupo hidroxilo fenólico del cual un átomo de hidrógeno con su electrón desapareado puede ser transferido al radical peroxil del lípido, esto puede prevenir la propagación de la oxidación de los ácidos grasos en las LDL.<sup>(61,62)</sup>

### **EFECTOS ADVERSOS.**

Entre los posible efectos colaterales, el más preocupante es el aumento del riesgo de carcinoma endometrial, el riesgo relativo en las usuarias de estrógenos varía entre seis y ocho veces, el riesgo aumenta con la duración y la dosis de los estrógenos, pero disminuye cuando se administra en combinación con un

progestágeno.<sup>(51)</sup> Una dosis de 0.625 mg de estrógeno conjugado es suficiente para producir este efecto aterogénico y la administración combinada de un progestágeno por más de 10 días muestra una reducción marcada de dicho efecto de los estrógenos solos.<sup>(63)</sup> En conclusión, en cada paciente deben evaluarse los riesgos y beneficios particulares según su estado y así tomar la decisión más conveniente.<sup>(49)</sup>

## FARMACOLOGÍA DE LOS ESTRÓGENOS.

### MECANISMO DE ACCIÓN.

Las hormonas se difunden en forma pasiva a través de las membranas celulares, se distribuyen en las células y finalmente se fijan a un receptor nuclear para estrógenos, este receptor que se encuentra en varios tejidos (aparato reproductor femenino, mama, hipófisis e hipotálamo), es una proteína fijadora de DNA homóloga con los receptores de otras hormonas esteroideas, vitamina D, ácido retinoico y hormonas tiroideas, una vez activado por el ligando, el receptor de estrógenos se fija a secuencias específicas de DNA (elementos de respuesta a las hormonas) que estimulan la transcripción de genes adyacentes.<sup>(52,64)</sup>

### RELACIÓN ESTRUCTURA ACTIVIDAD.

En los estrógenos naturales y semisintéticos pertenecientes a los esteroides, la actividad estrogénica va ligada al carácter aromático del anillo A, figura 5, siendo necesario un grupo oxhidrilo en la posición 3 y un grupo oxhidrilo o cetónico en el carbono 17, justamente, la deshidrogenación del oxhidrilo en la posición 17 (transformación del estradiol en estrona) o bien la hidroxilación del anillo D (estriol) disminuye la actividad estrogénica, mientras que el agregado de un grupo etinilo en la posición 17 (etinilestradiol) la potencia sobremanera y la hace muy activa por vía bucal.<sup>(49)</sup> El descubrimiento de los estrógenos sintéticos demuestra que el núcleo esteroide no es necesario para la actividad estrogénica; sin embargo, la disposición de las fórmulas de estos estrógenos muestran su similitud con los esteroides, la esterificación de uno o dos oxhidrilos prolonga la acción de los estrógenos, especialmente cuando se utiliza la vía intramuscular.<sup>(49)</sup> Figura 5.

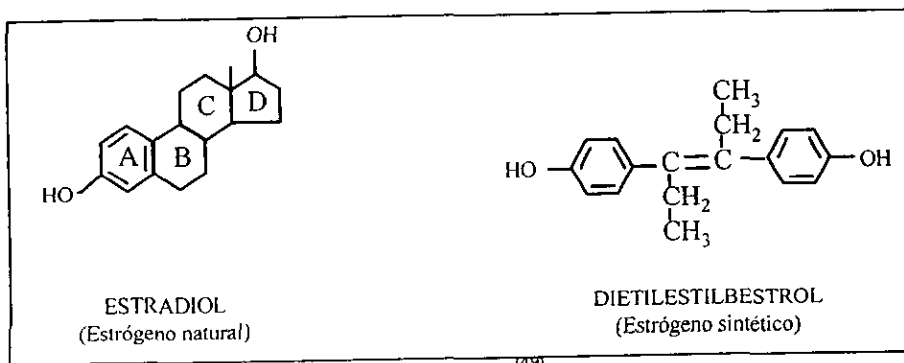


FIGURA 5. Estrógenos naturales y sintéticos<sup>(49)</sup>

## **ABSORCIÓN, DESTINO Y EXCRECIÓN.**

Los estrógenos usados en terapéutica son en general fácilmente absorbidos a través de la piel, mucosas y tracto gastrointestinal, cuando se aplican para una acción local, la absorción a menudo es suficiente para causar efectos sistémicos. Los estrógenos son liposolubles, por lo que al ser administrados intramuscularmente su absorción es lenta y prolongada lo que ocurre especialmente cuando se emplean los ésteres de los estrógenos, tanto naturales como sintéticos; en esta forma, su acción resulta más potente, cuanto más larga y múltiple es la cadena lateral, más prolongada es la acción. <sup>(48,64)</sup>

La inactivación del estrógeno se realiza principalmente en el hígado, una cierta proporción del estrógeno se excreta en la bilis y luego es reabsorbida en el intestino, durante la circulación enterohepática, el estrógeno se degrada por conversión a productos menos activos como estriol y otros numerosos estrógenos por oxidación a sustancias no estrógenas y por conjugación con los ácidos sulfúrico y glucurónico. <sup>(48,64)</sup>

Los estrógenos naturales circulan en la sangre en asociación con albúmina y globulina fijadoras de hormonas sexuales, una proporción importante de estrógeno se encuentra en forma de conjugados, en particular sulfato, que son excretados por el riñón. <sup>(48,64)</sup>



# IMPORTANCIA DE LA COLABORACIÓN DE PROGESTÁGENOS CON LOS ESTRÓGENOS.

La progesterona es el progestágeno más importante en la especie humana; sin embargo, se secretan también junto con ella pequeñas cantidades de otros progestágenos como  $17\alpha$ -,  $20\alpha$ - y  $20\beta$ -hidroxiprogesterona, que en esencia tienen las mismas acciones pero actividad más débil, es sintetizada en el ovario, testículos y suprarrenales a partir del colesterol circulante, grandes cantidades también son sintetizadas y liberadas por la placenta durante el embarazo.<sup>(48,49,50)</sup>

## ACCIONES FISIOLÓGICAS.

La progesterona liberada durante la fase luteínica del ciclo lleva al desarrollo de un endometrio secretor, la declinación abrupta de la liberación de progesterona por el cuerpo amarillo al final del ciclo es la principal determinante del comienzo de la menstruación, en circunstancias normales, el estrógeno antecede y acompaña a la progesterona en sus acciones sobre el endometrio y es esencial para el desarrollo del patrón normal. La progesterona influye sobre las glándulas endocervicales y modifica la abundante secreción acuosa de las estructuras estimuladas por el estrógeno dando un escaso material viscoso, la maduración inducida por el estrógeno del epitelio vaginal humano es modificada por la acción de la progesterona acondicionándolo para el embarazo.<sup>(64)</sup> La progesterona tiene poco efecto sobre el metabolismo de proteínas, estimula la actividad de la lipoproteína lipasa y parece favorecer los depósitos de grasas, los efectos en el metabolismo de carbohidratos son más intensos; la progesterona aumenta los valores basales de insulina y la respuesta de ésta a la glucosa, por lo general, no se modifica la tolerancia a carbohidratos; en el hígado, se favorece el almacenamiento de glucógeno, posiblemente para facilitar el efecto de la insulina, también estimula la cetogénesis. La progesterona puede competir con la aldosterona en el túbulo renal causando una disminución en la reabsorción de sodio, esto conduce a un aumento en la secreción de aldosterona por la corteza suprarrenal, también se altera el funcionamiento de los centros respiratorios, la respuesta ventiladora al  $\text{CO}_2$  está aumentada, es responsable del desarrollo alveolar del sistema secretor de los pechos, causa la maduración y los cambios secretorios en el endometrio que se observan después de la ovulación, abate las concentraciones plasmáticas de muchos aminoácidos y produce un aumento en la excreción urinaria de nitrógeno; finalmente, también se han observado efectos depresores e hipnóticos sobre el encéfalo.<sup>(48,49)</sup>

Poco se sabe acerca de los efectos de los progestágenos en las mujeres postmenopáusicas, sin embargo, se han usado en combinación con los estrógenos en la terapia de reemplazo hormonal para reducir el riesgo de cáncer endometrial; ya que muchos de los efectos de los progestágenos son contrarios a los efectos de los

estrógenos, se han realizado varios estudios para evaluar las ventajas y desventajas del uso de estrógenos en combinación con los progestágenos (progesterona).<sup>(47,55,58,59)</sup> Existe una serie de estudios, acerca de la terapia de reemplazo hormonal, en los cuales se han evaluado diversos efectos tales como: el metabolismo de lípidos, presión sanguínea, metabolismo de carbohidratos y coagulación/hemostasia, la progesterona induce la actividad de la lipasa hepática y la degradación de C-HDL; sin embargo, este efecto es contrarrestado por los estrógenos, de tal manera que se observa un aumento en el nivel de HDL, aunque tal aumento, ya no es tan alto como el que se observa al administrar solamente estrógenos, el catabolismo de las VLDL se disminuye y la concentración de triglicéridos se reduce por la progesterona, en general, la elevación de triglicéridos por la acción de los estrógenos es eliminada con la adición de la progesterona, los niveles de C-LDL se incrementan con la progesterona, pero la acción de los estrógenos es mayor, de tal manera que los niveles de C-LDL decaen; en cuanto a los otros parámetros medidos, metabolismo de carbohidratos y presión sanguínea, no se observa el efecto de la progesterona, es decir, el efecto obtenido al administrar estrógenos solo es el mismo que al administrar los estrógenos combinados con progesterona.<sup>(47,55,58,59)</sup>

A pesar de los efectos encontrados de la progesterona y los estrógenos en el perfil de lípidos, la administración de progestágenos es ampliamente recomendada en la terapia de reemplazo estrogénico, para la disminución del riesgo de cáncer endometrial; el cual es el principal efecto adverso de los estrógenos.

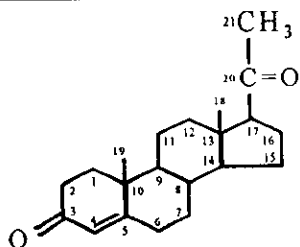
## **FARMACOLOGÍA DE LOS PROGESTÁGENOS.**

### **MECANISMO DE ACCIÓN.**

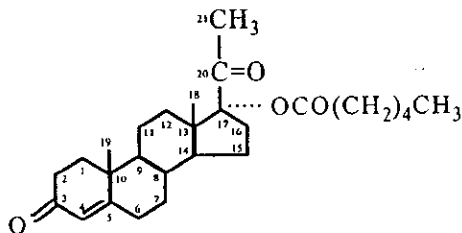
Los progestágenos se difunden libremente en el núcleo celular donde se fijan a los receptores de la progesterona y afectan la transcripción de un limitado grupo de genes, la acción antiestrógenica de los progestágenos está mediada en parte por la inducción de la 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa (que cataliza la oxidación de estradiol a estrona, que es menos potente) y de la estrógeno sulfotransferasa (que cataliza la sulfatación y la inactivación de los estrógenos); también esta reprimida la expresión de los receptores para estrógenos y, se promueve la diferenciación celular a expensas del crecimiento, que es estimulado por los estrógenos.<sup>(52,64)</sup>

### **RELACIÓN ESTRUCTURA ACTIVIDAD.**

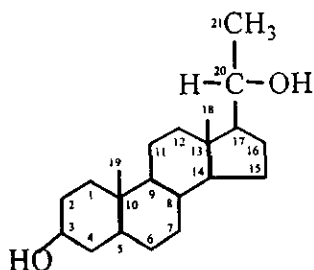
- 1). La actividad progestacional depende de la existencia de un doble enlace en 4-5 y un grupo cetónico en la posición 3. El pregnandiol sin doble enlace y con grupos oxhidrilos en 3 y 20 es inactivo.
- 2). La hidroxilación de la progesterona en la posición 17 disminuye su actividad, pero la esterificación (capronato de hidroxiprogesterona) la aumenta y prolonga mucho los efectos.
- 3). La sustitución de la cadena lateral a nivel del carbono 17 en la progesterona por una cadena acetilénica (etisterona) disminuye la potencia progestacional, pero hace a la sustancia muy activa por vía bucal.<sup>(49)</sup>



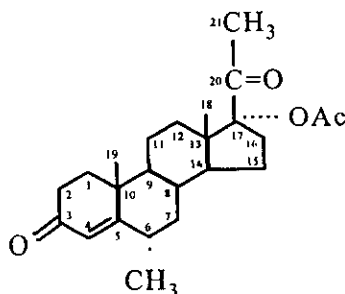
PROGESTERONA



CAPROATO DE HIDROXIPROGESTERONA



PREGNANDIOL



ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA

Estructura de diversos progestágenos. <sup>(49)</sup>

### ABSORCIÓN, DESTINO Y EXCRECIÓN.

La progesterona es absorbida rápidamente después de administrarla por cualquier vía, su vida media en el plasma es de aproximadamente 5 minutos y pequeñas cantidades son almacenadas temporalmente en la grasa del cuerpo. Es metabolizada casi completamente en un solo paso por el hígado y, por esa razón, es bastante ineficaz cuando se administra por vía bucal. <sup>(48,64)</sup>

En el hígado la progesterona es metabolizada en pregnandiol y conjugada con el ácido glucurónico, es excretada en la orina como glucurónido de pregnandiol. <sup>(48,64)</sup>

### EFFECTOS ADVERSOS.

Los principales efectos adversos asociados con el uso de progestágenos son: aumento en el peso corporal, edema y depresión, en algunas ocasiones puede ocurrir tromboflebitis y embolia pulmonar. <sup>(52)</sup>

# HIPÓTESIS

Evidencias epidemiológicas y experimentales indican que el proceso oxidativo *in vivo*, incluyendo la oxidación de LDL, juega un papel importante en el desarrollo de aterosclerosis y que este proceso se favorece en las mujeres postmenopáusicas, debido a la pérdida de estrógenos que actúan como agentes protectores, y que el proceso se acelera aún más en mujeres postmenopáusicas con diabetes mellitus.

Se ha observado que los estrógenos disminuyen la susceptibilidad a la oxidación de LDL *in vitro*, cuando son adicionados al medio en estudio; sin embargo, el efecto *in vivo* no es bien conocido, por ello la importancia de realizar este estudio para evaluar el efecto de los estrógenos sobre la oxidabilidad de LDL *in vitro*, en mujeres postmenopáusicas con diabetes tipo 2 después de haber recibido la terapia de reemplazo hormonal.

El tiempo que tardan en oxidarse (tiempo lag) las LDL, el cual se obtendrá de la medición de la oxidabilidad de las LDL de los diferentes tipos de pacientes, será la herramienta que nos permita establecer la diferencia de la susceptibilidad a la oxidación de LDL.

Por los resultados obtenidos de estudios *in vitro* se cree que los estrógenos actúan como antioxidantes y de este modo *disminuyen* la susceptibilidad a la oxidación de LDL.

El estudio se realizará en mujeres postmenopáusicas con diabetes tipo 2, debido a que es el tipo de diabetes más frecuente en nuestra población.

# OBJETIVO

Evaluar el efecto de la terapia de reemplazo hormonal, en la susceptibilidad a la oxidación de LDL *in vitro* en mujeres postmenopáusicas con diabetes tipo 2 controladas.

Analizar y comparar la resistencia a la oxidabilidad de LDL, por la determinación del tiempo lag (o tiempo de retardo), en:

1. Mujeres postmenopáusicas con diabetes tipo 2 controladas, que tomen estrógenos conjugados más medrogestona,
2. Mujeres postmenopáusicas sin diabetes que tomen estrógenos conjugados,
3. Mujeres postmenopáusicas sin diabetes que no tomen estrógenos y
4. Mujeres premenopáusicas sin diabetes.

# PARTE EXPERIMENTAL

## DISEÑO DEL ESTUDIO.

El estudio se llevó a cabo con un diseño prolectivo doble ciego placebo controlado experimental paralelo con distribución aleatoria. Fue aprobado por el Comité de Estudios en Humanos del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" (INNSZ) y cada paciente aceptó en forma voluntaria participar en el estudio dando su consentimiento por escrito.

Se incluyeron 25 pacientes con diabetes mellitus tipo 2, que acudieron a la consulta externa del INNSZ, postmenopáusicas y sin evidencia de complicaciones crónicas de diabetes mellitus (retinopatía proliferativa, albuminuria o neuropatía visceral) y bajo control con dieta y/o hipoglucemiantes orales (sulfonilureas, biguanidas o mezcla) con buen control metabólico definido como  $HbA_{1c} < 8$ . Otros criterios de inclusión fueron edad entre 45 y 60 años, climaterio demostrado por ausencia de menstruaciones en los últimos seis meses y exámenes de laboratorio compatibles (hormona luteinizante y hormona folículo estimulante anormalmente altas), colesterol total menor de 300 mg/dL. Se consideraron criterios de eliminación: aparición durante el estudio de descontrol glucémico, consumo de otros medicamentos que afecten el metabolismo de lípidos, triglicéridos séricos por arriba de 300 mg/dL, alteración de pruebas de función hepática durante el tratamiento o consumo diario de más de una ración de alcohol por día.

Con el fin de asegurar la estabilidad del buen control metabólico, a su ingreso se incluyeron en una fase de estabilización durante la cual consumieron una dieta isocalórica fase I según las recomendaciones del Programa Nacional para la Educación en Colesterol (NCEP), prescrita por un Licenciado en Nutriología, la misma dieta fue consumida a lo largo del estudio, la adherencia a la misma fue confirmada en cada visita. Al término de esta fase las pacientes fueron sorteadas para recibir de manera continua estrógenos conjugados (0.625 mg/día) más medrogestona (5 mg/día los últimos diez días de cada ciclo) o placebo durante 12 semanas. Los pacientes fueron revisados cada cuatro semanas y en cada visita se midió  $HbA_{1c}$ , glucemia, lípidos séricos y pruebas de función hepática.

Como pacientes control se incluyeron: 1) 5 mujeres postmenopáusicas sin diabetes de pacientes, de edad entre 45 y 60 años que tomaran estrógenos conjugados (0.625 mg/día), con perfil de lípidos normal, 2) 9 mujeres postmenopáusicas sin diabetes de edad entre 45 y 60 años con perfil de lípidos normal, que no tomaran estrógenos, 3) 9 mujeres premenopáusicas sin diabetes de edad entre 24 y 35 años con perfil de lípidos normal. Se consideró el perfil de lípidos

normal como: colesterol total menor de 200 mg/dL, triglicéridos séricos menores de 150 mg/dL, colesterol de HDL mayor de 35 mg/dL y colesterol de LDL menor de 130 mg/dL.

## MÉTODOS.

1. Para la medición de glucosa se utilizó el método descrito por Trinder (glucosa oxidasa GOD-PAP, estuche reactivo de laboratorios Boehringer-Mannheim). El coeficiente de variación inter-ensayo fue de 3.17%.
2. El colesterol total se midió por el método descrito por Siedel (CHOD-PAP, estuche reactivo de laboratorios Boehringer-Mannheim). El coeficiente de variación inter-ensayo fue de 2.89%.
3. Los triglicéridos fueron medidos por el método de hidrólisis enzimática y determinación enzimática subsecuente del glicerol formado (GPO-PAP, estuche reactivo de laboratorios Boehringer-Mannheim). El coeficiente de variación inter-ensayo fue de 4.99%.
4. Para determinar el colesterol-HDL se utilizó el método de precipitación con ácido fosfotúngstico y  $Mg^{++}$  (estuche reactivo de laboratorios Boehringer-Mannheim). El coeficiente de variación inter-ensayo fue de 3.7%.
5. Para colesterol-LDL se utilizó el método de precipitación con polivinil sulfato (estuche reactivo de laboratorios Boehringer-Mannheim). El coeficiente de variación inter-ensayo fue de 5%.
6. Para la medición de HbA1c, se utilizó el sistema DCA 2000. Este análisis se basa en la inhibición de la inmunoaglutinación de partículas de latex.
7. Las pruebas de funcionamiento hepático (AST, ALT y ALP) se realizaron en un autoanalizador Beckman Synchron CX<sup>®</sup> 5.

Antes del inicio del tratamiento y en la semana 12 se midió la distribución de subclases de LDL, usando un gradiente de densidades y ultracentrifugación en un rotor SW40 de acuerdo a lo descrito por Lossow y modificado por Aguilar. De cada gradiente se obtuvieron veinte muestras en las cuales se midió la concentración de colesterol y triglicéridos. Las LDL fueron clasificadas como grandes y ligeras (1.019-1.035) o pequeñas y densas (1.036-1.063) de acuerdo a la densidad de cada fracción.

De cada clase de LDL (ligeras y densas) se tomó una alícuota para medir la oxidabilidad de acuerdo al método descrito por Esterbauer.<sup>(45)</sup> La cinética de la oxidación de LDL fue seguida por la continua medición de los cambios de absorbancia a 234 nm, cada 10 minutos. El tiempo lag (tiempo de retardo) para la oxidación de LDL es definido como el intervalo de tiempo entre el inicio (tiempo 0) de la oxidación y el cambio de pendiente durante el seguimiento de la oxidación, por lo que el tiempo lag se obtiene de la gráfica de cinética de la oxidación de LDL. Es importante destacar que cada sujeto exhibe sus propias características en la cinética de oxidación de LDL y que muestra a muestra la variación puede ser un serio problema al comparar los resultados, si los datos de la cinética se obtienen de diferentes preparaciones de LDL. Una solución a este problema es usar en cada experimento el dieno contra el perfil de tiempo como marcador de tiempo para la longitud de la fase lag y la fase de

propagación. Los conjugados dienos se desarrollan en la LDL por la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados con dobles enlaces aislados produciendo hidroperóxidos de ácidos grasos poliinsaturados con dobles enlaces conjugados (=dienos), que absorben a una longitud de onda máxima de 234 nm. La medición de dienos no requiere extracción de los lípidos, ya que puede ser realizada directamente en la muestra que se está oxidando, pues la LDL y sus remanentes son completamente solubles en fase acuosa durante la oxidación.<sup>(41)</sup> La concentración apropiada para la medición de la oxidación es de 0.1-0.5 mg LDL/mL PBS/ 5 $\mu$ M Cu<sup>++</sup> y el solvente debe ser suficientemente transparente a 234 nm<sup>(41)</sup>

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los resultados se expresan como promedios  $\pm$  desviación estándar (SD). Las comparaciones de los tiempos lag entre los grupos en estudio se realiza mediante un análisis de varianza (prueba de ANOVA, tabla 5 de resultados), para datos no paramétricos. Como la prueba de ANOVA solo nos dice si hay diferencia o no, utilizamos la prueba de DUNCAN para saber cuales grupos difieren (tabla 6 de resultados). Los resultados fueron considerados como estadísticamente significantes cuando  $p < 0.05$



# RESULTADOS

No se encontraron diferencias significativas en las características de los grupos de mujeres con diabetes tipo 2 que recibieron placebo y sustitución hormonal, catorce recibieron placebo y once reemplazo hormonal. Las mujeres con diabetes tipo 2 que se incluyeron en el estudio presentaron un control metabólico satisfactorio, al inicio del estudio, demostrado por la determinación de glucosa, HbA1c y perfil de lípidos, cuyos valores se encontraron dentro de los límites de inclusión, descritos en el diseño del estudio, tabla I. Durante y al final del estudio este grupo de mujeres se mantuvo en buen control metabólico, los cambios observados son mínimos, pero importantes, pues la HbA1c presentó un ligero aumento ( $p=0.04$ ) en las mujeres que recibieron sustitución hormonal y el colesterol-LDL disminuyó ( $p<0.05$ ), el resto de las características se mantuvo sin cambio significativo.

**TABLA I. Características de las mujeres postmenopáusicas con diabetes tipo 2 que recibieron tratamiento**

	BASAL		POSTERIOR AL TRATAMIENTO	
	PLACEBO (n=14)	TRH (n=11)	PLACEBO (n=14)	TRH (n=11)
Edad	55 ± 3.1	57 ± 1.96	---	---
Evolución	4 ± 4	4.8 ± 2.8	---	---
Peso	68 ± 9.6	69 ± 13	68 ± 9.5	67.5 ± 13
Glucosa (mg/dL)	112 ± 52	122 ± 34	95 ± 12	109 ± 26
HbA1c	6.5 ± 1	6.6 ± 0.9	6.3 ± 0.9	7.5 ± 1*

*continúa...*

	BASAL		POSTERIOR AL TRATAMIENTO	
	PLACEBO	TRH	PLACEBO	TRH
Colesterol total (mg/dL)	219 $\pm$ 33	277 $\pm$ 46	220 $\pm$ 32	210 $\pm$ 33
Triglicéridos (mg/dL)	157 $\pm$ 73	137 $\pm$ 51	145 $\pm$ 50	156 $\pm$ 64
C-LDL (mg/dL)	136 $\pm$ 33	150 $\pm$ 41	137 $\pm$ 27	124 $\pm$ 38*
C-HDL (mg/dL)	50 $\pm$ 13	51 $\pm$ 13	49 $\pm$ 10	54 $\pm$ 11

TRH Terapia de reemplazo hormonal (Estrógenos conjugados + Medrogestona)

Datos presentados como promedio  $\pm$  DE.

- $p < 0.05$  basal vs tratamiento.

Las mujeres control fueron divididas en tres grupos de la siguiente manera:

- GRUPO 1: Nueve mujeres premenopáusicas sin diabetes.
- GRUPO 2: Nueve mujeres postmenopáusicas sin diabetes que no tomen estrógenos.
- GRUPO 3: Cinco mujeres postmenopáusicas sin diabetes que tomaran estrógenos.

Los valores de glucosa y perfil de lípidos de las mujeres de los grupos control se encontraron dentro de los valores normales: glucosa de 70-110mg/dL, triglicéridos menor de 160mg/dL, colesterol total de 150-200 mg/dL, colesterol-HDL mayor de 35 mg/dL y colesterol-LDL menor de 130 mg/dL, tabla II. Las mujeres premenopáusicas incluidas fueron de edad entre 25 y 30 años y la edad de las mujeres postmenopáusicas fue de 45-60 años.

**TABLA II. Características de las mujeres control**

	MUJERES PRE-MENOPÁUSICAS SIN DIABETES (n=9)	MUJERES POST-MENOPÁUSICAS SIN ESTRÓGENOS SIN DIABETES (n=9)	MUJERES POST-MENOPÁUSICAS CON ESTRÓGENOS SIN DIABETES (n=5)
Glucosa (mg/dL)	76 $\pm$ 2.4	86 $\pm$ 10	82 $\pm$ 10
Colesterol total (mg/dL)	179 $\pm$ 19	195 $\pm$ 26	248 $\pm$ 24
Triglicéridos (mg/dL)	72 $\pm$ 20	137 $\pm$ 52	150 $\pm$ 60
C-LDL (mg/dL)	105 $\pm$ 15	117 $\pm$ 25	165 $\pm$ 18
C-HDL (mg/dL)	59 $\pm$ 17	51 $\pm$ 14	53 $\pm$ 9

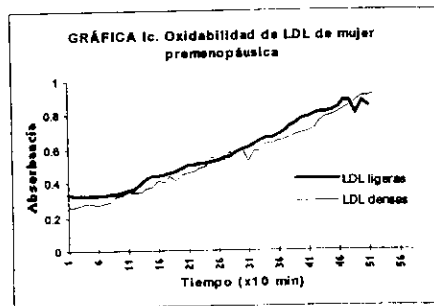
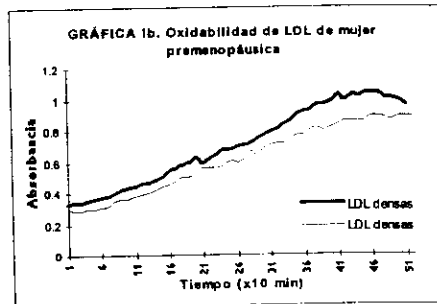
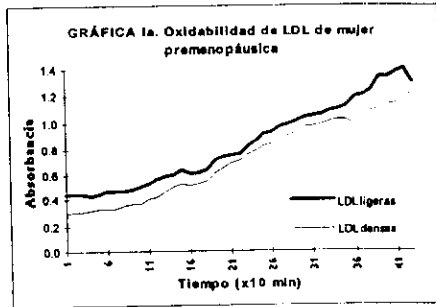
Datos presentados como promedio  $\pm$  DE.

Las gráficas I, II y III, de oxidabilidad corresponden a las mujeres control, las gráficas Ia a Ii muestran la oxidabilidad de las nueve mujeres premenopáusicas, tanto de las LDL ligeras como densas; las gráficas Ila a Ili muestran la oxidabilidad de LDL ligeras y densas, de las nueve mujeres postmenopáusicas sin diabetes que no tomaron estrógeno y las gráficas IIIa a IIIe corresponden a las cinco mujeres postmenopáusicas sin diabetes que tomaron estrógenos. En todas las gráficas de estos tres grupos control se puede observar que la cinética de oxidación es similar, tanto para las LDL pequeñas y densas como para las LDL grandes y ligeras, dentro del mismo grupo; esto es, el tiempo de retardo es semejante y, la fase de propagación (fase log) se inician casi al mismo tiempo y con similar pendiente.

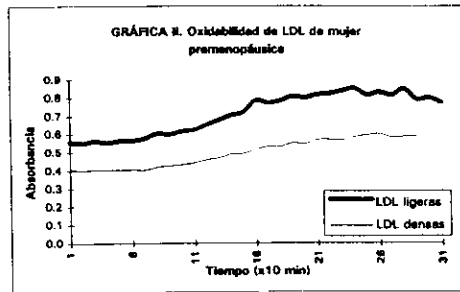
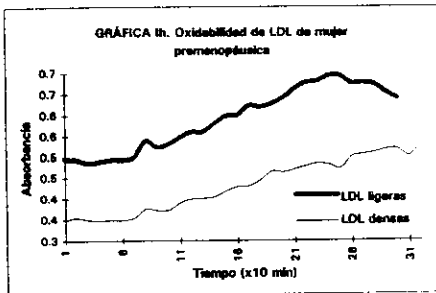
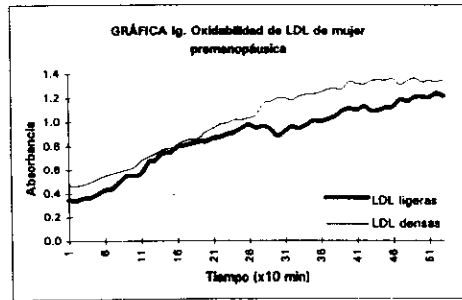
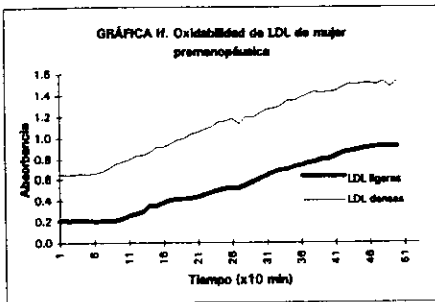
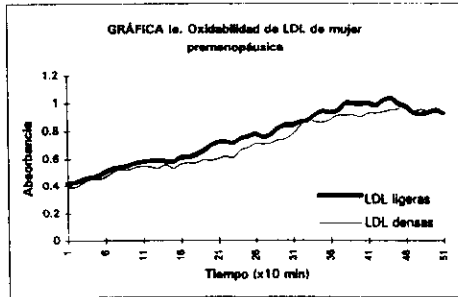
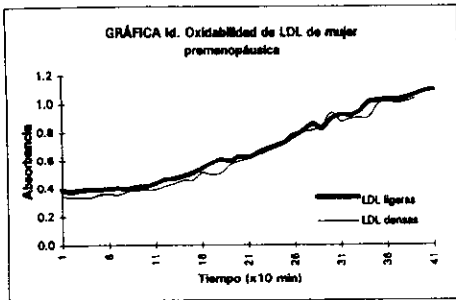
Las gráficas IV a V representan la oxidabilidad de LDL de las catorce mujeres con diabetes tipo 2 que tomaron placebo, las gráficas IVa a IVn corresponden al estado basal de éste grupo y las gráficas Va a V-l corresponden a la oxidabilidad medida al final de la administración de placebo. Las gráficas VI a VII representan la oxidabilidad de las once mujeres con diabetes tipo 2 que recibieron la terapia de reemplazo estrogénico, las graficas VIa a VIk corresponden al tiempo basal y las gráficas VIIa a VIIj corresponden al estado post-tratamiento. En estas gráficas, tanto las del grupo que tomó placebo (gráficas IV y V) como las que recibieron la terapia de reemplazo hormonal (gráficas VI y VII), se puede observar que la

oxidabilidad de las LDL ligeras difiere claramente de la oxidabilidad de las LDL densas; también es notoria la gran variación entre las gráficas del mismo grupo, es decir, en algunas gráficas es fácil de distinguir la fase de retardo y la fase de propagación, estas variaciones pueden deberse, en parte, a que cada persona exhibe sus propias características en la cinética de oxidación de LDL y muestra a muestra la variación puede ser un serio problema al comparar los resultados, si los datos de la cinética se obtienen de diferentes preparaciones de LDL.

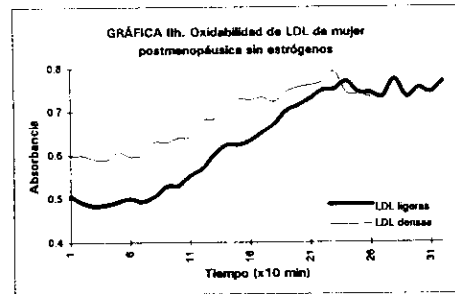
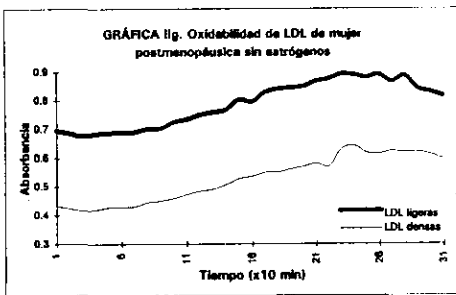
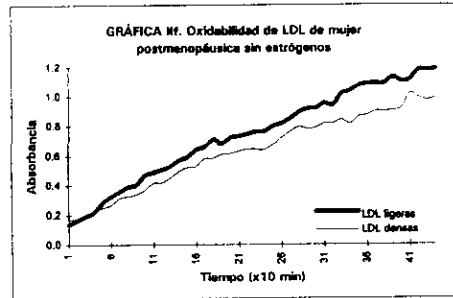
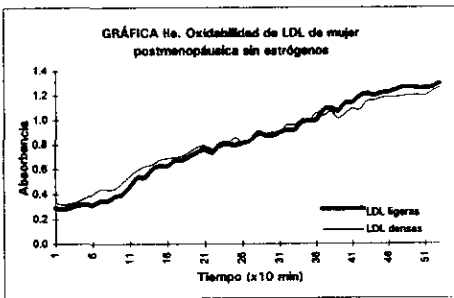
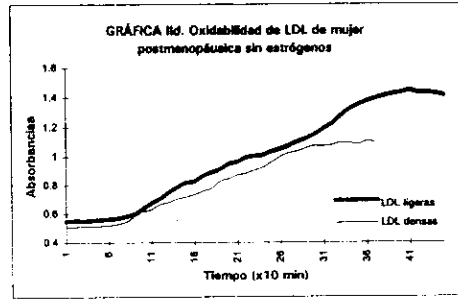
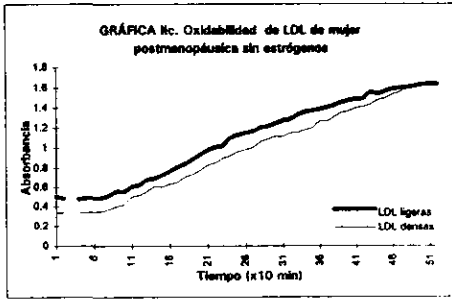
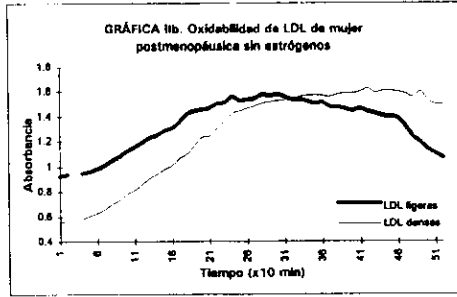
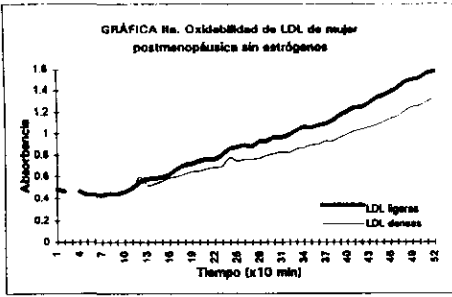
### GRÁFICAS DE OXIDABILIDAD DE LDL DE MUJERES PREMENOPÁUSICAS.



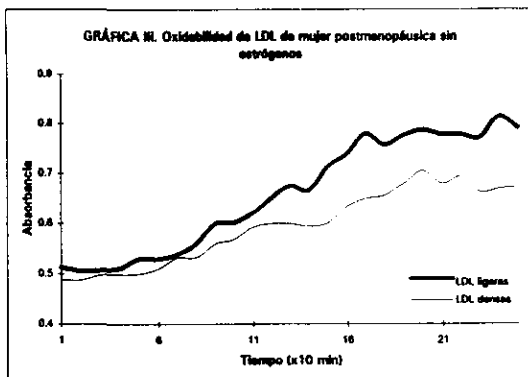
## GRÁFICAS DE OXIDABILIDAD DE LDL DE MUJERES PREMENOPÁUSICAS



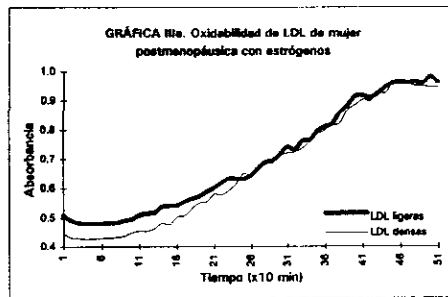
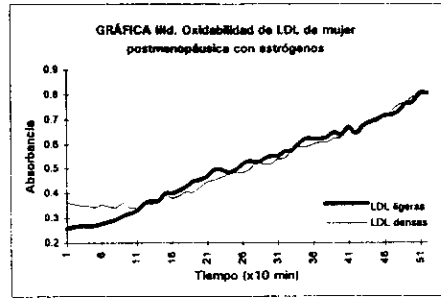
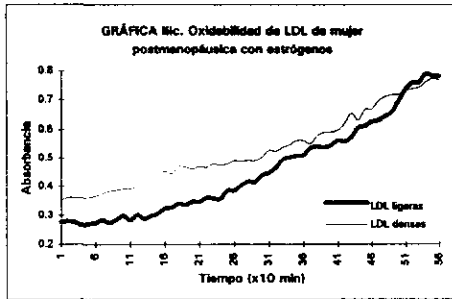
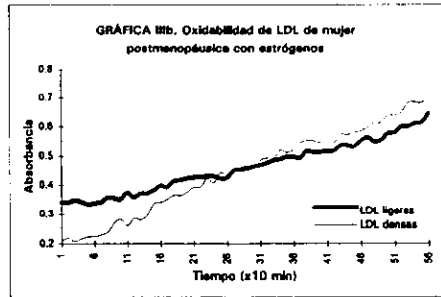
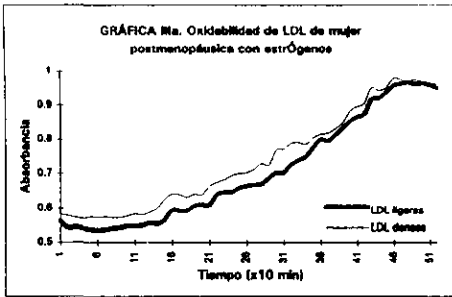
**GRÁFICAS DE OXIDABILIDAD DE LDL DE MUJERES POSTMENOPÁUSICAS SIN ESTRÓGENOS**



# GRÁFICAS DE OXIDABILIDAD DE LDL DE MUJERES POSTMENOPÁUSICAS SIN ESTRÓGENOS

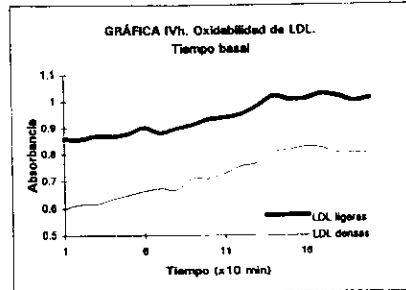
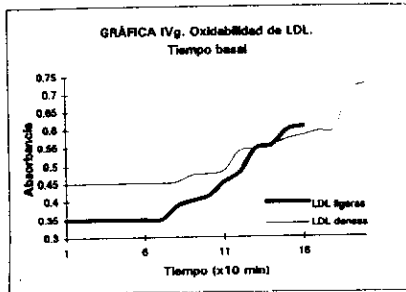
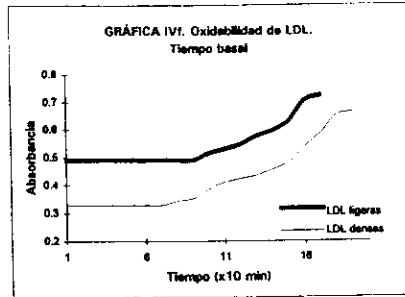
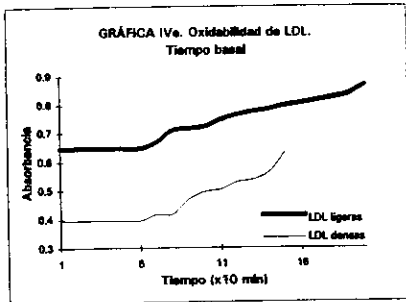
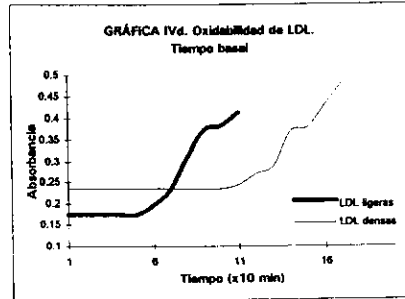
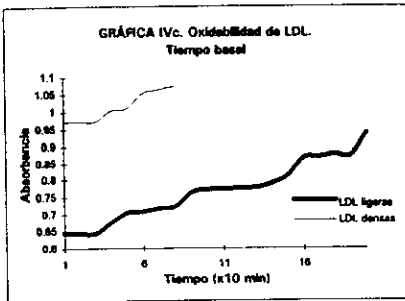
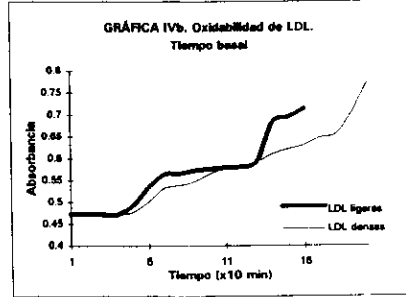
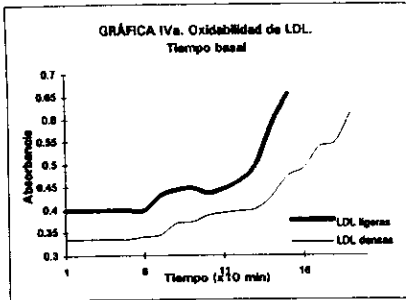


# GRÁFICAS DE OXIDABILIDAD DE LDL DE MUJERES POSTMENOPÁUSICAS CON ESTRÓGENOS

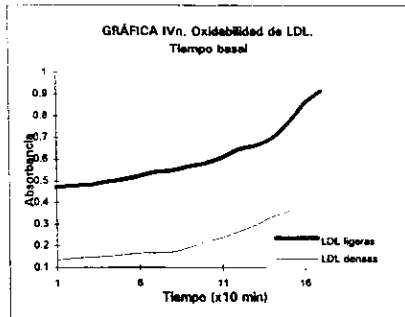
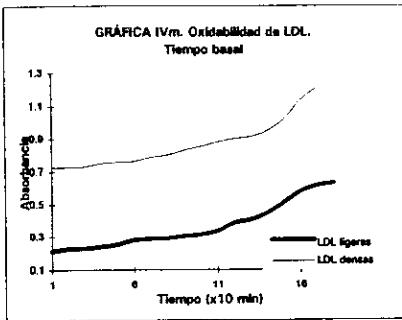
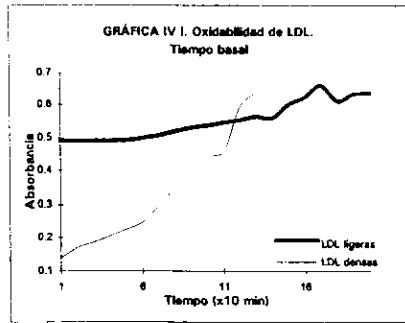
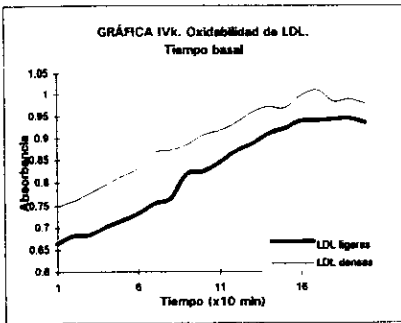
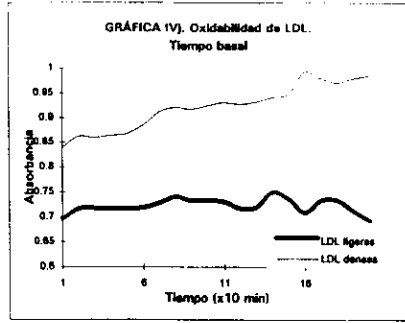
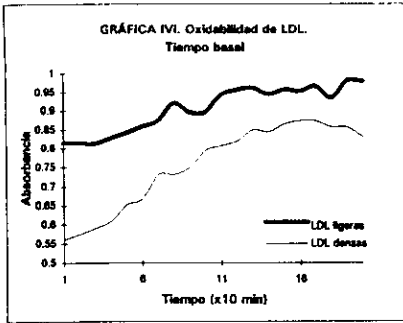




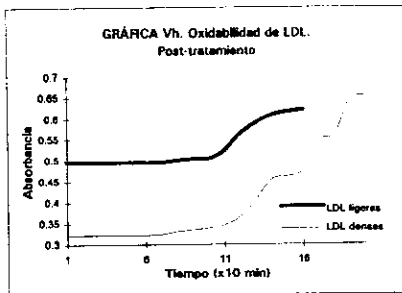
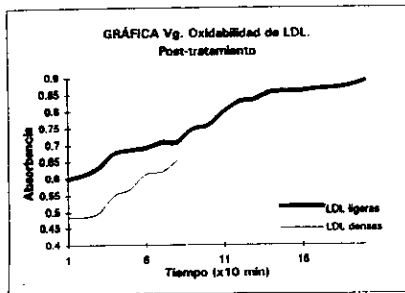
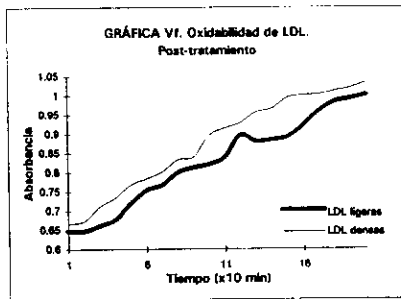
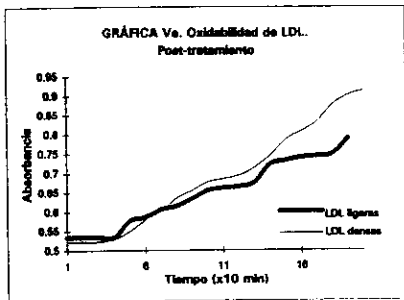
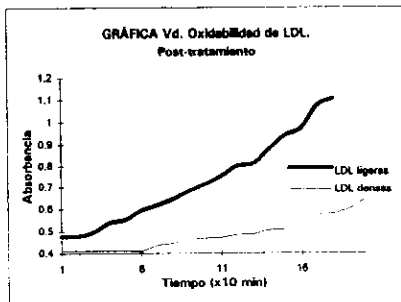
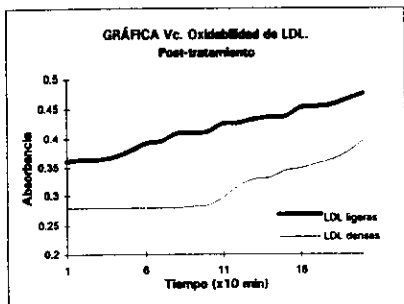
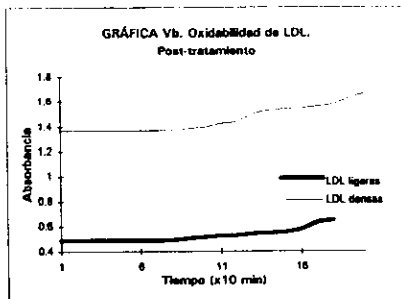
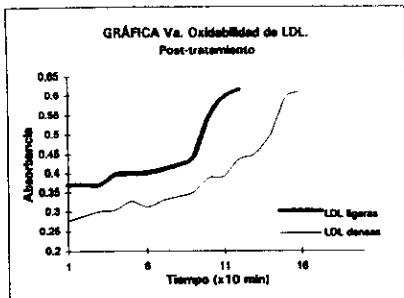
**OXIDABILIDAD DE LDL DE MUJERES POSTMENOPÁUSICAS CON DIABETES TIPO 2  
ESTADO BASAL DEL GRUPO QUE TOMÓ PLACEBO**



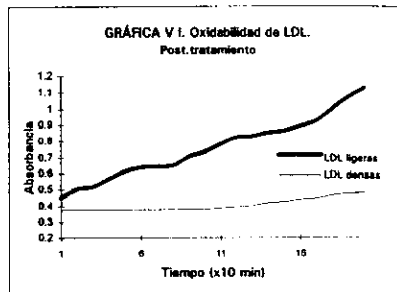
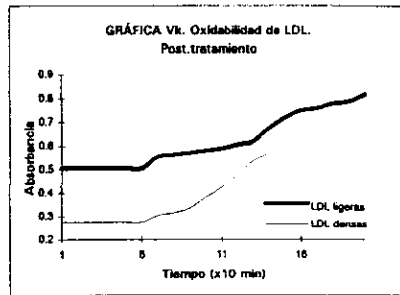
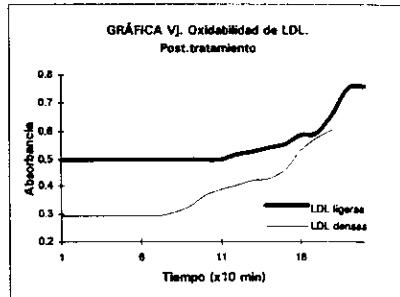
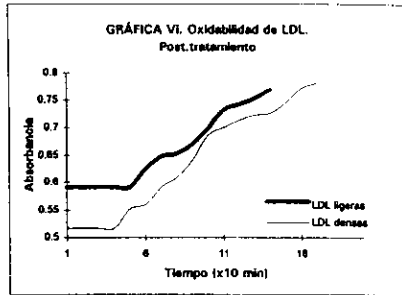
**OXIDABILIDAD DE LDL DE MUJERES POSTMENOPÁUSICAS CON DIABETES TIPO 2  
ESTADO BASAL DEL GRUPO QUE TOMÓ PLACEBO**



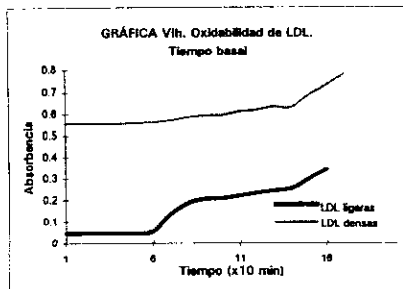
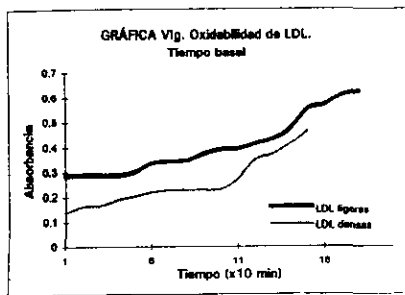
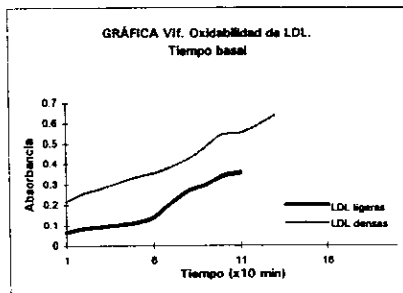
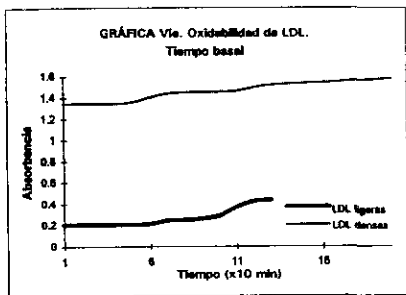
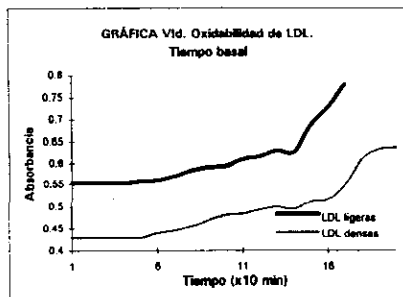
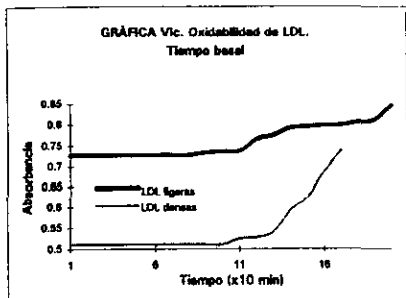
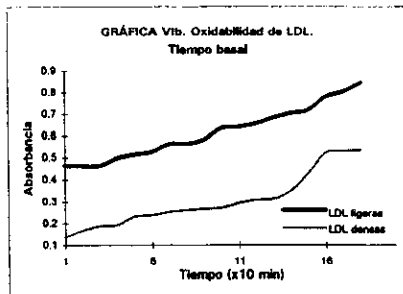
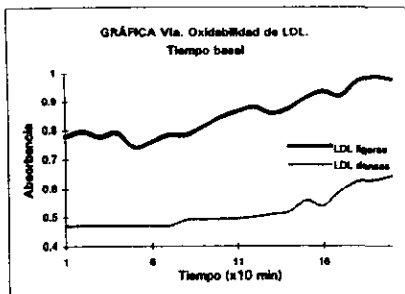
**OXIDABILIDAD DE LDL DE MUJERES POSTMENOPÁUSICAS CON DIABETES TIPO 2  
ESTADO POST-TRATAMIENTO DEL GRUPO QUE TOMÓ PLACEBO**



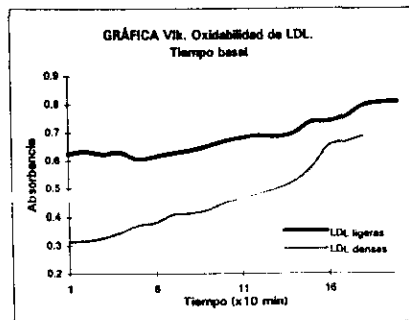
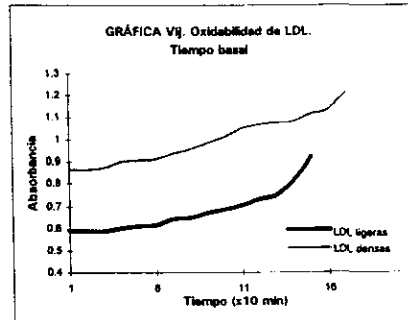
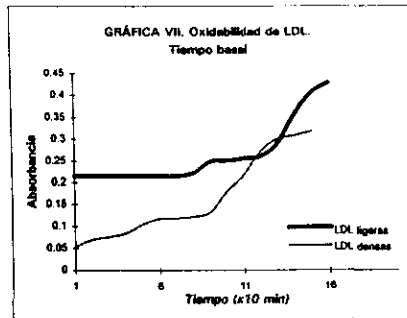
OXIDABILIDAD DE LDL DE MUJERES POSTMENOPÁUSICAS CON DIABETES TIPO 2  
ESTADO POST-TRATAMIENTO DEL GRUPO QUE TOMÓ PLACEBO



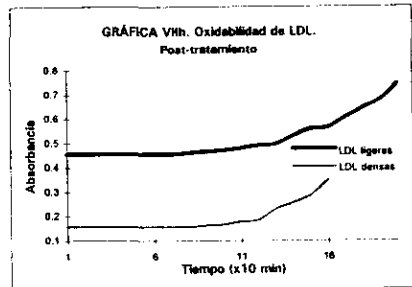
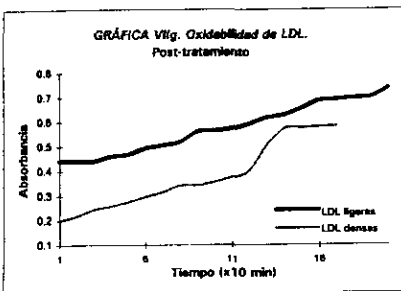
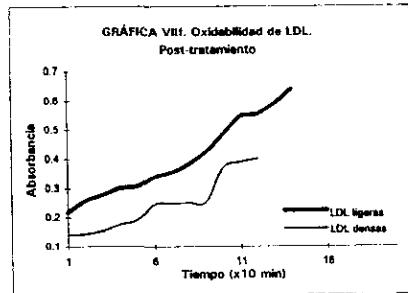
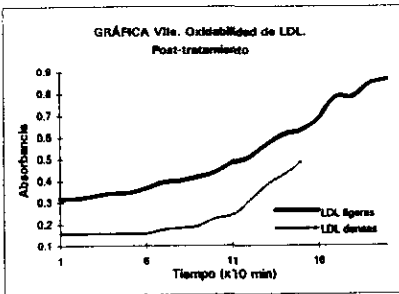
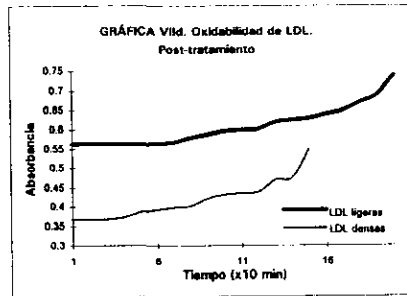
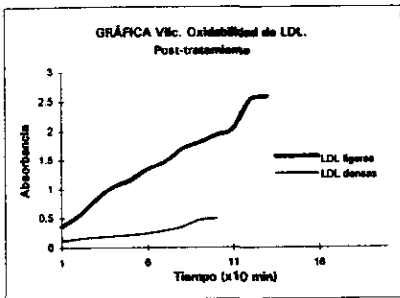
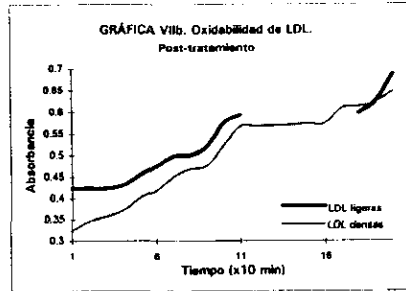
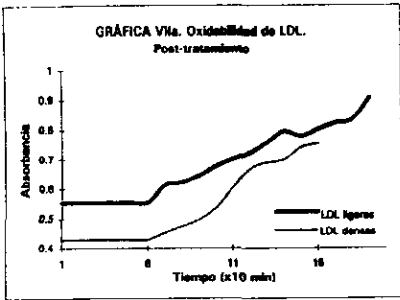
**OXIDABILIDAD DE LDL DE MUJERES POSTMENOPÁUSICAS CON DIABETES TIPO 2.  
ESTADO BASAL DEL GRUPO QUE TOMÓ ESTRÓGENOS**



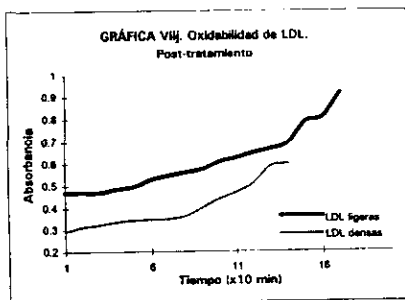
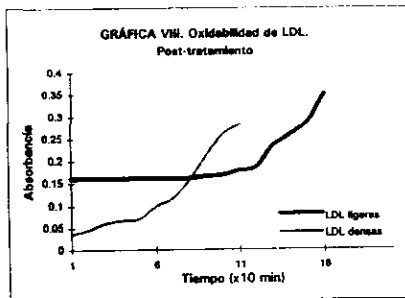
OXIDABILIDAD DE LDL DE MUJERES POSTMENOPÁUSICAS CON DIABETES TIPO 2  
ESTADO BASAL DEL GRUPO QUE TOMÓ ESTRÓGENOS



**OXIDABILIDAD DE LDL DE MUJERES POSTMENOPÁUSICAS CON DIABETES TIPO 2.  
ESTADO POST-TRATAMIENTO DEL GRUPO QUE TOMÓ ESTRÓGENOS**



**OXIDABILIDAD DE LDL DE MUJERES POSTMENOPÁUSICAS CON DIABETES TIPO 2.  
ESTADO POST-TRATAMIENTO DEL GRUPO QUE TOMÓ ESTRÓGENOS**





El tiempo de retardo (o tiempo lag) se obtiene de las gráficas y comprende el intervalo entre la adición de  $\text{Cu}^{++}$ , es decir, del tiempo 0, y el punto en el cual ocurre el cambio de pendiente de la curva de oxidabilidad, tablas III y IV.

**TABLA III. Tiempo lag de mujeres postmenopáusicas con diabetes tipo 2**

	BASAL		POSTERIOR AL TRATAMIENTO	
	LDL LIGERAS	LDL DENSAS	LDL LIGERAS	LDL DENSAS
PLACEBO	90 ± 28 min.	95 ± 37 min.	108 ± 38 min.	109 ± 39 min.
TRH	91 ± 41 min.	76 ± 34 min.	80 ± 36 min.	84 ± 17 min.

Datos promedio ± DE

TRH: Terapia de reemplazo hormonal

**TABLA IV. Tiempos lag de mujeres control.**

CONTROL	LDL LIGERAS	LDL DENSAS
Mujeres premenopáusicas	80.1 ± 17.4 min.	71 ± 15.1 min.
Mujeres sanas postmenopáusicas sin estrógenos	62.9 ± 9.0 min.	54.4 ± 11.8 min.
Mujeres sanas postmenopáusicas con estrógenos	103.3 ± 15.3 min.	83.3 ± 15.3 min.

Datos presentados como promedio ± DE.

Al determinar y analizar los tiempos de retardo de los diferentes grupos control, vemos que, para el mismo grupo control no hay diferencia significativa entre LDL ligeras y densas ( $p > 0.05$ ), tabla V.

**TABLA V. Comparación de LDL ligeras contra LDL densas de grupos control**

CONTROLES	<i>z</i>	<i>p</i>
Mujeres premenopáusicas	0.6623	0.2546
Mujeres postmenopáusicas sin estrógenos	1.4570	0.0720
Mujeres postmenopáusicas con estrógenos	1.3093	0.0951

Sin embargo, al analizar los tiempos de retardo en las mujeres con diabetes, tanto las que recibieron placebo como la TRH, no presentaron cambios, es decir, éste fue similar al inicio y al final del estudio, tanto para las LDL ligeras como para las LDL densas, tabla 3.

Al comparar las LDL ligeras de los tres grupos control se encontraron diferencias significativas, ( $p=0.0012$ ) al igual que al comparar las LDL densas de los tres grupos ( $p=0.0092$ ), tabla VI. De la tabla VI sólo se puede saber si al menos uno de los grupos difiere de los demás, pero en la tabla VII se hace una comparación más específica grupo por grupo, para averiguar cuales grupos son diferentes, de aquí se obtienen, que para las LDL ligeras, los tres grupos entre si difieren uno de otro, pero en las LDL densas, vemos que entre mujeres premenopáusicas y mujeres postmenopáusicas con sustitución de estrógenos no hay diferencia, es decir, que los tiempos lag son similares en este caso, este resultado era de esperarse, pues de esta manera se ve la influencia de los estrógenos.

**TABLA VI. Comparación de los *tiempos lag*, entre grupos, de las LDL ligeras y LDL densas de los grupos control**

	LDL LIGERAS (I vs II vs III)	LDL DENSAS (I vs II vs III)
F	10.06**	6.15**
p	0.0012	0.0092

- I. Mujeres premenopáusicas
- II. Mujeres postmenopáusicas sin estrógenos
- III. Mujeres postmenopáusicas con estrógenos
- \*\* Diferencia altamente significativa

**TABLA VII. Comparación grupo por grupo de los *tiempos lag* de los controles.**

LDL LIGERAS				LDL DENSAS			
	I	II	III		I	II	III
I				I			
II	*			II	*		
III	*	*		III	NS	*	

- I. Mujeres premenopáusicas
- II. Mujeres postmenopáusicas sin estrógenos
- III. Mujeres postmenopáusicas con estrógenos
- \* Diferencia significativa
- NS No hay diferencia significativa

# DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La afección cardiovascular es la principal causa de muerte en pacientes con diabetes, se inicia a edad más temprana y las manifestaciones son más graves que en las personas sin diabetes, no se conoce por completo la etiología acelerada de la aterosclerosis en la diabetes, pero se sabe que la hiperlipidemia tiene una participación importante.

En las mujeres postmenopáusicas se aumenta la incidencia de enfermedades cardiovasculares, debido en parte, al cambio en el perfil lipídico, ya que la concentración de colesterol-LDL se aumenta notablemente, lo que favorece la formación de placas ateroscleróticas, pues las partículas de LDL son primordiales en el inicio de la formación de dichas placas; se ha observado un incremento de la subpoblación de partículas de LDL pequeñas y densas, que son las más aterogénicas, también se ha observado que la susceptibilidad a la oxidación de las partículas de LDL se incrementa. La pérdida de estrógenos en la postmenopausia favorece el desarrollo de las placas ateroscleróticas, debido a que los estrógenos confieren cierto efecto protector al desarrollo de aterosclerosis. El riesgo de aterosclerosis se aumenta de 2 a 5 veces cuando existe la presencia de diabetes, y se incrementa 15 veces más si además hay la presencia de dislipidemia.<sup>(66)</sup>

Dado el alto índice de mortalidad por enfermedades cardiovasculares en mujeres postmenopáusicas con diabetes y la falta de estudios para prevenir o controlar dichas enfermedades, es importante y justificable la búsqueda de nuevas terapias preventivas, que cuanto menos riesgos y más fáciles resulten de usar, más favorecerán a la población en general; como es el caso de la terapia de reemplazo hormonal, que aunque uno de sus principales inconvenientes es el riesgo de cáncer endometrial, si se lleva el seguimiento adecuado este riesgo puede disminuir o desaparecer. Se ha observado que la terapia puede disminuir hasta en un 50 % el riesgo de enfermedades cardiovasculares en mujeres sin diabetes.<sup>(47)</sup>

Se han realizado varios estudios<sup>(59,61,62,65,66,67)</sup> para averiguar el mecanismo protector de los estrógenos, tales mecanismos involucran el metabolismo de lípidos y carbohidratos, parámetros de coagulación y presión sanguínea; el más importante a considerar es el que involucra la participación de lípidos, se ha encontrado que el uso de estrógenos disminuye el colesterol-LDL, esta aseveración es confirmada en nuestro estudio, ya que se obtuvo dicha disminución del C-LDL después de la terapia de reemplazo hormonal, al disminuir la concentración de C-LDL de alguna manera se está disminuyendo el riesgo de aterosclerosis. Los estrógenos también pueden tener efecto protector al actuar como antioxidantes; estudios<sup>(61,67)</sup> *in vitro*

han mostrado que los estrógenos prolongan el tiempo lag de la oxidabilidad de las partículas de LDL, lo que nos lleva a pensar que *in vivo* ocurre un mecanismo similar. En nuestro estudio es claro que el tiempo lag de las LDL de mujeres premenopáusicas es mayor que el de las LDL de mujeres postmenopáusicas sin estrógenos, tanto para las LDL ligeras como densas, esto puede deberse a que las mujeres premenopáusicas aún conservan su protección natural que les confiere los estrógenos, lo que provoca que las LDL sean menos susceptibles a la oxidación y que las mujeres postmenopáusicas tengan mayor susceptibilidad a la oxidación por la pérdida de tal protección. Las mujeres postmenopáusicas sin diabetes que tomaron estrógenos presentan más largo el tiempo de retardo que las mujeres postmenopáusicas que no tomaron estrógenos, con lo que podemos demostrar el efecto protector de los estrógenos en la oxidabilidad de LDL, pues, este grupo de mujeres postmenopáusicas que tomó estrógenos de alguna manera se protegió contra dicha oxidación, tal protección, por tamaño del tiempo lag, parece ser similar a la de las mujeres premenopáusicas.

La protección que ofrecen los estrógenos puede ser: que éstos actúen como antioxidantes, compitiendo con los componentes de las partículas de LDL por los agentes oxidantes (dentro de la partícula de LDL) o disminuyendo los agentes pro-oxidantes (fuera de la partícula de LDL).

En las mujeres con diabetes tipo 2 que tomaron estrógenos, desafortunadamente no se observaron cambios en el tiempo de retardo, pues este fue igual al inicio y al final del estudio, y además, fue similar al obtenido en las mujeres postmenopáusicas con diabetes tipo 2 que tomaron placebo. En la diabetes se genera un medio rico en agentes oxidantes que favorecen la oxidación de LDL, los cuales no se hayan en mujeres sin diabetes, por lo que la sustitución de estrógenos puede no ser suficiente para proteger a las LDL de la oxidación; sin embargo, *in vitro* la adición directa de estrógenos a la mezcla en estudio, muestra una prolongación en el tiempo de lag,<sup>(61,67)</sup> pero la cantidad que se requiere para prolongar el tiempo lag es de aproximadamente 45 veces mayor a la concentración obtenida en plasma después de la administración de estrógenos ya menos del 5% del estrógeno se halló asociado a la partícula de LDL;<sup>(61)</sup> estos datos indican que concentración de estrógenos es muy baja para tener un efecto directo en la oxidación de LDL, pero tal vez tienen su efecto protector al disminuir las especies oxígeno reactivas, y no directamente sobre las partículas de LDL, también puede ser que el efecto protector de los estrógenos se deba al efecto que tienen sobre la concentración de C-LDL, ya que la disminuyen, o al aumento del C-HDL que provocan. Otro de los factores que pueden favorecer la oxidación de LDL en mujeres con diabetes es la glicosilación de LDL; a pesar de que el grupo de mujeres con diabetes se mantuvo bajo buen control metabólico, el aumento en la HbA1c nos hace pensar que este proceso de glicosilación de LDL puede llevarse a cabo; la glicosilación de las apoproteínas dificulta su internalización y degradación por los fibroblastos, al mismo tiempo que se reconoce un aumento de la fracción no esterificada del colesterol unido a la partícula de LDL, el efecto de la

glicosilación de las lipoproteínas ocasiona que no sean reconocidas por el receptor normal de LDL, con lo que aumenta su vida media plasmática y permite que sean atrapadas por macrófagos y por tanto, se formen células espumosas.<sup>(5,6)</sup> Niveles altos de glucosa pueden además generar especies oxígeno reactivas lo que proporciona un medio oxidativo enriquecido que favorecería la oxidación de LDL.<sup>(61)</sup>

Otro de los factores que están involucrados en la oxidación de LDL son las subclases de LDL, ya que en las mujeres postmenopáusicas con diabetes presentan un predominio de las LDL pequeñas y densas, las cuales son más aterogénicas; esta propiedad puede ser porque dichas partículas se oxidan más rápido, tal vez por su mayor contenido de triglicéridos, o bien porque su metabolismo es más lento.<sup>(47)</sup> Algo que llama la atención, es que a diferencia de lo reportado en la bibliografía<sup>(61,62)</sup> no se halló diferencia en la oxidabilidad entre las LDL ligeras y densas de las mujeres control, se esperaba que las LDL ligeras tuvieran un tiempo de retardo más prolongado que las LDL densas.

Finalmente podemos decir que la terapia de reemplazo hormonal aumenta significativamente, *in vitro*, el tiempo lag en las LDL de mujeres postmenopáusicas sin afección de diabetes; pero que en las mujeres postmenopáusicas con diabetes no se obtiene el mismo resultado debido probablemente al aumento de especies oxígeno reactivas propiciadas por la diabetes.

# CONCLUSIONES

Se concluye, que la terapia de reemplazo hormonal (TRH), estrógenos conjugados más medrogestona, ofrece resultados favorables en mujeres postmenopáusicas sin afección de diabetes, ya que el tiempo lag en la oxidabilidad es mayor que en las mujeres postmenopáusicas que no toman estrógenos y, que el tiempo lag de las mujeres postmenopáusicas con la TRH es similar al obtenido en la oxidabilidad de LDL de mujeres premenopáusicas.

La TRH no ofrece un mejoramiento significativo en la oxidabilidad de LDL de mujeres postmenopáusicas con diabetes tipo 2, pero sí se observa un cambio importante en el perfil de lípidos, ya que la concentración de LDL disminuye, con lo que probablemente disminuirá la formación de placas ateroscleróticas.

En las mujeres postmenopáusicas con diabetes tipo 2, el mecanismo es más complicado, debido a la mayor presencia de especies oxígeno reactivas generadas por la misma diabetes.

Aunque el mecanismo de protección sigue siendo incierto, es indudable, que la terapia de reemplazo hormonal ocasiona una disminución significativa del riesgo de aterosclerosis; sin embargo en mujeres postmenopáusicas sin diabetes la protección es mayor que en las mujeres postmenopáusicas con diabetes tipo 2.

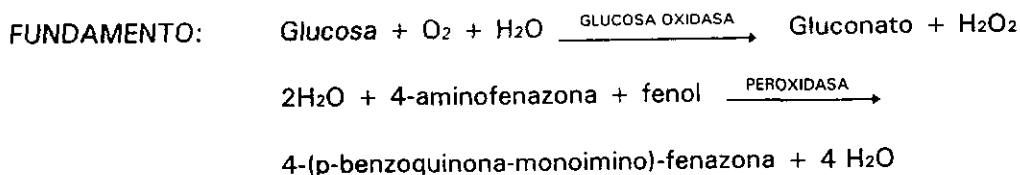
Un paso a seguir podría ser el estudio de la administración combinada de la terapia de reemplazo hormonal con un agente antioxidante, como la vitamina E; también podría ser la cuantificación de especies oxígeno reactivas en las partículas y su entorno, para validar el efecto antioxidante de los estrógenos.

# APÉNDICE

## MÉTODOS

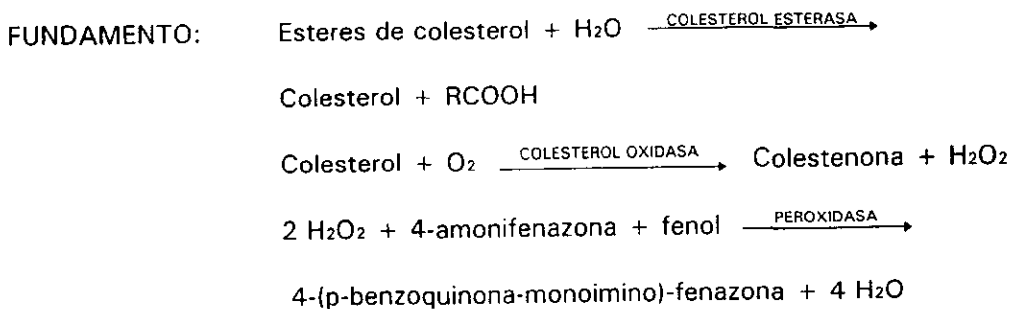
### DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

MÉTODO: Trinder sin desproteinizar



### DETERMINACIÓN DE COLESTEROL

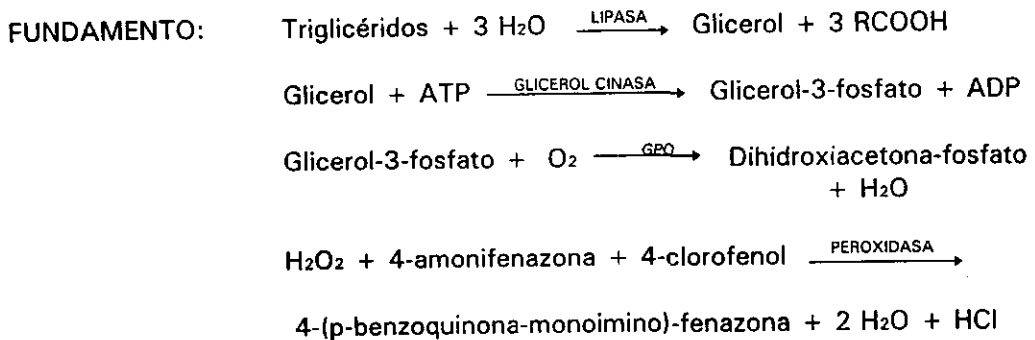
MÉTODO: Enzimático colorimétrico.





## DETERMINACIÓN TRIGLICÉRIDOS

**MÉTODO:** Hidrólisis enzimática de los triglicéridos y determinación enzimática subsiguiente del glicerol formado (reacción colorimétrica)



## DETERMINACIÓN DE COLESTEROL DE HDL

**FUNDAMENTO:** La adición de ácido fosfotúngstico e iones de magnesio a la prueba provoca la precipitación de los quilomicrones, VLDL y LDL. El sobrenadante de la centrifugación contiene las HDL, cuya concentración de colesterol es determinada enzimáticamente.

## DETERMINACIÓN DE COLESTEROL DE LDL

**MÉTODO:** Precipitación con polivinilsulfato (PVS).

**FUNDAMENTO:** El polivinilsulfato provoca la precipitación de las LDL. El valor de colesterol LDL se calcula a partir de la diferencia entre los valores de colesterol en el suero y el sobrenadante de la precipitación.

## **MEDICIÓN DE LA OXIDABILIDAD DE LAS LDL.**

1. Las lipoproteínas a medir deben ser almacenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . No deberán permanecer en refrigeración por más de 24 horas.
2. Se determina la concentración de apoproteínas por nefelometría.
3. Se incuban de 50-100  $\mu\text{g}$  de proteína más 5  $\mu\text{mol}$   $\text{Cu}^{+}$  más 1 mL de PBS a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Checar pH (7.4). Se requiere de agitación ocasional de las muestras. La concentración de  $\text{Cu}^{+}$  se estima agregando 5 $\mu\text{L}$  de solución de  $\text{Cu}^{+}$  por cada mililitro de solución con LDL y PBS.
4. Se mide la absorbancia a 234 nm cada 10 minutos.

# BIBLIOGRAFÍA

1. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes care*. 20:1183-1197, 1997.
2. George S. Eisenbarth. Classification, diagnostic testing, and pathogenesis of type I diabetes mellitus en: Kenneth L. Becker. *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*. 2º edición. J.B. Lippin. Co. Phil. 1995;1202-1215.
3. Puig-Domingo, De Leiva Hidalgo. Diabetes Mellitus: concepto, clasificación, etiología en: F. Casanueva Fleijo, J.A. Vázquez García. *Endocrinología Clínica*. 1º edición. Eds. Díaz de Santos. España 1995;241-251.
4. Ricardo Quibrera Infante. Epidemiología de la diabetes en: F.J. Gómez Pérez, J.A. Rull. *Tratado de Diabetología*. 1º edición. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. México 1997;135-171.
5. Daniel W. Foster. Diabetes Mellitus en: Kurt J. Isselbacher, Eugene Braunwald, Jean D. Wilson, Joseph B. Martin, Anthony S. Fauci, Dennis L. Kasper. *Principios de Medicina Interna*. Vol. II. 13º edición. Editorial Interamericana. Madrid 1994;2281-2305.
6. De Leiva Hidalgo, J.M. Pou Torelló. Diabetes Mellitus en: José M. Miralles, Alberto de Leiva. *Endocrinología y Nutrición*. 1º edición. Editorial Universidad Salamanca. España 1996;275-330.
7. John E. Craighead. Diabetes en: Emanuel Rubín, John L. Farber. *Patología. Fundamentos*. 1º edición. Editorial Panamericana. México 1992;565-569.
8. John A. Todd, John I. Bell & Hugh O. McDevitt. HLA-DQ $\beta$  gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*. 329:599-604, 1987.
9. Pavlos I. Neophytou, Bart O. Roep, Susan D. Arden, Elizabeth M. Muir, Gaby Duinkerken, Aram Kallan, René R.P. de Vries, and John C. Hutton. T-cell epitope analysis using subtracted expression libraries (TEASEL): Application to a 38-Kda autoantigen recognized by T cells from an insulin-dependent diabetic patient. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 93:2014-2018, 1996.
10. C. Ronald Kahn. Etiology and pathogenesis of type II diabetes mellitus and related disorders en: Kenneth L. Becker. *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*. 2º edición. Editorial J.B. Lippin. Co. Phil. 1995;1210-1215.

11. Yolanda T. Kruszynska and Jerrold M Olefsky. Cellular and Molecular Mechanisms of Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus. *J. Investig. Med.* 44(8):413-428,1996.
12. Herbert K. Naito. Trastornos del metabolismo en: Lawrence A. Kaplan, Amadeo J. Pece. *Química Clínica*. 1° edición. Editorial Panamericana. Argentina 1990; 647-699.
13. Martha D. Wilson and Lawrence L. Rudel. Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol. *J. Lipid Res* 35:943-955,1994.
14. Pamela C. Champe, Richard a. Harvey. Metabolism of Dietary Lipids en Unit IV *Biochemistry*. 1° edición. Editorial J.B. Lippin. Co. Phil. 1987;149-158.
15. Norton J. Greenberger, Kurt J. Isselbacher. Trastornos de la absorción en: Kurt J. Isselbacher, Eugene Braunwald, Jean D. Wilson, Joseph B. Martin, Anthony S. Fauci, Dennis L. Kasper. *Principios de Medicina Interna*. Vol. II. 13° edición. Editorial Interamericana. Madrid 1994;1593-1595.
16. William E. Momsen, Maureen M. Momsen and Howard L. Brockman. Lipid Structural Reorganization Induced by the Pancreatic Lipase Cofactor, Procolipasa en. *Biochem.* 34:7271-7281, 1995.
17. Ceres Araceli Ochoa Sosa. Metabolismo de las lipoproteínas en: C. Posadas Romero. *Dislipidemias y Aterosclerosis*. 1° edición. Editorial Interamericana. México 1995; 43-64.
18. William E. Momsen, Maureen M. Momsen and Howard L. Brockman. Lipid Structural Reorganization Induced by the Pancreatic Lipase Cofactor, Procolipasa. *Biochem.* 34:7271-7281, 1995.
19. Simon W. Coppack, Michael D. Jensen and John M. Miles. In vivo regulation of lipolysis in humans. *J. Lipid Res.* 35:177-193,1994.
20. Soler-Argilaga. Lipoproteínas plasmáticas. Consideraciones fisicoquímicas y metabólicas en: R. Carmena. *Hiperlipoproteinemias, clínica y tratamiento*. 2° edición. Editorial Doyma. España 1990; 1-11.
21. Robert W. Mahley. Biochemistry and physiology of lipid and lipoprotein metabolism en: Kenneth L. Becker. *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*. 2° edición. J.B. Lippin. Co. Phil. 1995;1369-1378.
22. Michael S. Brown y Joseph L. Goldstein. Agentes usados en el tratamiento de las hiperlipoproteinemias en: Alfred Goodman, S. Gilman, Theodore W. Rall, Alan S. Nies, Palmer Taylor. *The pharmacological basis of therapeutics*. 8° edición. Editorial Pergamon Press. USA 1990;851-857.
23. Kathleen Bottum and Ana Jonas. Cholesterol Transfer from Low Density Lipoproteins to Reconstituted High Density Lipoproteins is Determined by the Properties and Concentrations of Both Particles. *Biochem.* 34:7264-7270,1995.
24. Moniek N. Pieters, Donald Schouten and Theo J.C. Van Berkel. In vitro and in vivo evidence for the role of HDL in reverse cholesterol transport. *Biochim Biophys.* 1224:125-134,1994.

25. Coma Canella. Complicaciones cardiovasculares de la diabetes en: Manuel de Santiago. *Diabetes mellitus en la práctica médica*. Tomo I. 1º edición. Editorial Libro del año 51. España 1992; 161-171.
26. Pedro Zarco. Biología molecular de la aterosclerosis y los síndromes coronarios agudos en: Pedro Zarco. *Bases moleculares de la cardiología clínica*. 1º edición. Editorial Médica Panamericana. España 1996; 127-155.
27. Urrutia y Rey-Joly. Clínica general de la aterosclerosis en: Juan Rubiés-Prat. *Temas actuales en hiperlipidemias y aterosclerosis*. 1º edición. Publicaciones Médicas. Barcelona, España 1992;135-140.
28. Merino y Pascual. Fisiopatología de la aterosclerosis en: Juan Rubiés-Prat. *Temas actuales en hiperlipidemias y aterosclerosis*. 1º edición. Publicaciones Médicas. Barcelona, España 1992;109-133.
29. Camejo, Hurt-Camejo y Bondjers. Mecanismos aterogénicos de las lipoproteínas en: R. Carmena. *Hiperlipoproteïnemias, clínica y tratamiento*. 2º edición. Editorial Doyma. España 1990; 29-59.
30. Sergio Olvera Cruz. Epidemiología de la aterosclerosis coronaria en: C. Posadas Romero. *Dislipidemias y Aterosclerosis*. 1º edición. Editorial Interamericana. México 1995; 29-41.
31. Donna S. Hanes, Mattehew R. Weir, an James R. Sowers. Gender Considerations in Hypertension Pathophysiology and Treatment. *Am. J. Med.*, 101 (supl 3\*):10S-21S, 1996
32. Jerrold M. Olefsky. Diabetes sacarina en: James B. Wyngaarden, Lloyd H. SmitH, J. Claude Bennett. *Tratado de medicina interna*. Vol. II. 19º edición. Editorial Interamericana. México 1994;1503-1525.
33. Miguel Ahumada Ayala. Patogenia de la aterosclerosis en: C. Posadas Romero. *Dislipidemias y Aterosclerosis*. 1º edición. Editorial Interamericana. México 1995; 1-16.
34. Edwin L. Bierman. Aterosclerosis y otras forman de arteriosclerosis en: Kurt J. Isselbacher, Eugene Braunwald, Jean D. Wilson, Joseph B. Martin, Anthony S. Fauci, Dennis L. Kasper. *Principios de Medicina Interna*. Vol. II. 13º edición. Editorial Interamericana. Madrid 1994;1274-1286.
35. Russel Ross. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 362: 801-809, 1993.
36. Judith A. Berliner, Mohamad Navad, Alan M. Fogelman, Joy S. Frank, Linda L. Demer, Peter A. Edwards, Andrew D. Watson and Aldons J. Lulis. Atherosclerosis: Basic Mechanisms. *Circulation*. 91:2488-2496, 1995.
37. Pardo Mindán. Anatomía patológica de los vasos en: F. J. Pardo Mindán. *Anatomía patológica*. 1º edición. Editorial Mosby. España 1997; 527-538.
38. Parakrama Chandrasoma, Clive R. Taylor. *Patología general*. 2º edición. Editorial El Manual Moderno. México 1995; 330-337.
39. Lori Mosca, JoAnn E. Manson, Susan E. Sutherland, Robert D. Langer, Teri Manolio, Elizabeth Barrett-Connor. Cardiovascular Disease in Women: A

ESTA TERCERA EDICIÓN  
 DE LA BIBLIOTECA

- Statement for Healthcare Professionals from the American Heart Association. *Circulation*. 96:2468-2482, 1997.
40. Hui-Chong Chiu, Jing-Ren Jeng and Shyh-Ming Shieh. Increased oxidizability of plasma low density lipoprotein from patients with coronary artery disease. *Biochim. Biophys Acta*. 1225:200-208, 1994.
  41. Hermann Esterbauer, Janusz Gebicki, Herbert Puhl and Günther Jürgens. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology & Medicine*. 13:341-390, 1992.
  42. Joseph L. Witztum and Daniel Steinberg. Role of oxidized Low Density Lipoprotein in Atherogenesis. *J. Clin. Invest*. 88:1785-1792, 1991.
  43. Barry Halliwell. Oxidation of low-density lipoproteins: questions of initiation, propagation, and the effect of antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr*. 61:670S-677S, 1995.
  44. Min Yang, David S. Leake and Catherine A. Rice-Evans. Non-oxidative modification of native low-density lipoprotein by oxidized low-density lipoprotein. *Biochem. J*. 316:377-380, 1996.
  45. Pedro Zarco. Los radicales libres y el problema de la isquemia-reperfusión en: Pedro Zarco. *Bases Moleculares de la Cardiología Clínica*. 1º edición. Editorial Médica Panamericana. España 1996; 199-219.
  46. Esterbauer, Striegl, Puhl and Rotheneder. Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radical Res. Commun*. 6:67-75, 1989.
  47. Timothy O'Brien, Tu T. Nguyen. Subspecialty Clinics: Endocrinology. Lipids and Lipoproteins in Women. *Clin. Proc*. 74:235-244, 1997.
  48. Alan Goldfien. Hormonas Gonadales e inhibidores en: Bertram G. Katzung, *Farmacología básica y clínica*. 4º edición. Editorial El Manual Moderno. México 1993; 500-522.
  49. Michael K. Fritsch, Fern E. Murdoch. Estrogens, Progestins and Oral Contraceptives en: Theodore M. Brody, Joseph Larner, Kenneth P. Minneman, Harold C. New, *Human Pharmacology*. 2º edición. Editorial Mosby. St Louis 1994; 482-500.
  50. Arthur C. Guyton. *Textbook of medical physiology*. 8º edición. Editorial W. B. Saunders Company. USA 1991:899-914.
  51. Bruce R. Carr, Jean D. Wilson. Enfermedades del ovario y el aparato reproductor femenino en: Kurt J. Isselbacher, Eugene Braunwald, Jean D. Wilson, Joseph B. Martin, Anthony S. Fauci, Dennis L. Kasper. *Principios de Medicina Interna*. Vol. II. 13º edición. Editorial Interamericana. Madrid 1994;2325-2350.
  52. Richard A. Harvey, Pamela C. Champe. *Pharmacology*. 1º edición. Editorial J. B. Lippin. Co. United States of America 1992; 243-258.
  53. Stephen R. Plymate, Ronald S. Swerdloff. Androgens, Lipids and Cardiovascular Risk. *Ann. Int. Med*. 117:371-372, 1992.

54. Jay M. Sullivan. Estrogen Replacement Therapy. *Am. J. Med.* 101: 56S-60S, 1996.
55. Rogerio A. Lobo. Effects of Hormonal Replacement on Lipids and Lipoproteins in Postmenopausal Women. *J. Clin. Endocrinol. and Metab.* 73:925-931, 1991.
56. Seed. Sex hormones, lipoproteins, and cardiovascular risk. *Atherosclerosis.* 90: 1-7, 1991.
57. Tikkanen, Kuusi, Nikkila and Sipinen. Postmenopausal hormone replacement therapy: effects of progestogens on serum lipids and lipoproteins. *Maturitas.* 8:7-17, 1986.ç
58. John C. LaRosa. Metabolic effects of estrogens and progestins. *Fertility and Sterility.* 62: 140S-146S, 1994.
59. Writing Group for the PEPI Trial. Effects of Estrogen or Estrogen/Progestin Regimens on Heart Disease Risk Factors in Postmenopausal Women: the Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI). *JAMA.* 273:199-208, 1995.
60. Elizabeth Barrett-Connor, Trudy L. Bush. Estrogen and Coronary Heart Disease in Women. *JAMA.* 265:1861-1867, 1991.
61. Hanny E. Brussaard, Jan A. Gevers Leuven, Cornelis Kluft, H. Michiel J. Krans, Wim van Duyvenvoorde, Rien BuytenheK, Arnoud van der Laarse, Hans M. G. Princen. Effect of 17 $\beta$ -Estradiol on Plasma Lipid and LDL Oxidation in Postmenopausal Women with Type 2 Diabetes Mellitus. *Arterioscler. Thromb. Vase Biol.* 17:324-329, 1997.
62. Víctor Guetta, Julio A. Panza, Myron A. Waclawiw and Richard O. Cannon. Effect of Combined 17 $\beta$ -Estradiol and Vitamin E on Low-Density Lipoprotein Oxidation in Postmenopausal Women. *Am J. Cardiol.* 75:1274-1277, 1995.
63. Barbara S. Hulka. Links between hormone replacement therapy and neoplasia. *Fertility and Sterility.* 62:168S-173S. 1994.
64. Ferid Murad, Jeffrey A. Kuret. Estrogens and progestins en: Alfred Goodman, S. Gilman, Theodore W. Rall, Alan S. Nies, Palmer Taylor. *The pharmacological basis of therapeutics.* 8 $^{\circ}$  edición. Editorial Pergamon Press. USA 1990:1384-1395.
65. Stephen Hulley, Deborah Grady, Trudy Bush, Curt Furberg, David Herrington, Betty Riggs, Eric Vittinghoff. Randomized Tial of Estrogen Plus Progestin for Secondary Prevention of Coronary Hert Disease in Postmenopausal Women. *JAMA.* 280:605-613, 1998.
66. Brussaard, Gevers Leuven, Frölich, Kluft, Krans. Short-term oestrogen replacement therapy improve insulin resistance, lipids and fibrinolysis in postmenopausal women with NIDDM. *Diabetologia.* 40:843-849, 1997.
67. Michael Sack, Daniel Rader, Richard O Cannon. Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoprotein in postmenopausal women. *Lancet.* 343:269-270,1994.

68. Reaven, Herold, Barnett, Edelman. Effects of Vitamin E on Susceptibility of Low-Density Lipoprotein and Low-Density Lipoprotein Subfractions to Oxidation and on Protein Glycation in NIDDM. *Diabetes Care*. 18:807-814,1995.