



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

FUNCIONALIDAD DE HDL EN SUJETOS CON
HIPOALFALIPOPROTEINEMIA SANOS Y CON ENFERMEDAD ARTERIAL
CORONARIA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA

AIDA XOCHITL MEDINA URRUTIA

DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS POSADAS ROMERO

MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2006



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.

Agradezco al consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACYT), la beca otorgada durante el desarrollo del presente trabajo para la obtención del grado de Maestra en Ciencias.

Además agradezco a los miembros de mi comité tutorial por el tiempo y dedicación otorgados.

COMITÉ TUTORAL

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Carlos Posadas Romero

Dr. Jaime Mas Oliva

Dr. Oscar Armando Pérez Méndez

ÍNDICE.

	Página
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	
Descripción de las HDL	1
Papel de las HDL en la enfermedad arterial coronaria (EAC)	2
Mecanismos ateroprotectores de las HDL	2
Transporte reverso de colesterol	2
Subclases de HDL	4
Asociación de LCAT, CETP y PLTP con la EAC	5
HDL y sus propiedades antioxidantes	6
HDL y sus propiedades anti-inflamatorias	7
MATERIAL Y MÉTODOS	
Diseño del estudio	9
Descripción del estudio	9
Análisis de laboratorio	10
Análisis estadístico	13
RESULTADOS	15
DISCUSIÓN	23
BIBLIOGRAFÍA	30

ABREVIATURAS.

ABCA-1: Transportador de membrana dependiente de ATP
Apo: apolipoproteína
CE: Colesterol esterificado
CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol
C-HDL: Colesterol de las lipoproteínas de alta densidad
CL: Colesterol libre
C-LDL: Colesterol de las lipoproteínas de baja densidad
CT: Colesterol total
EAC: Enfermedad arterial coronaria
HA: Hipoalfalipoproteinemia
HDL: Lipoproteína de alta densidad
HOMA RI: Modelo de homeostasis para determinar resistencia a la insulina
HTA: Hipertensión
HTG: Hipertrigliceridemia
ICAM-I: Molécula de adhesión intracelular tipo I
IL-I: Interleucina I
IMC: Índice de masa corporal
LCAT: Lecitín colesterol acil transferasa
LDL: Lipoproteína de baja densidad
LDLox: LDL oxidadas
LE: Lipasa endotelial
LH: Lipasa hepática
PAF-AH: Factor activador de plaquetas acetilhidrolasa
PCR: Proteína C reactiva
PL: Fosfolípidos
PLTP: Proteína de transferencia de fosfolípidos
PON-1: Paraoxonasa
Qmr: Quilomicrones remanentes
SR-BI: Receptor pepenador B tipo I
TAD: Tensión arterial diastólica
TAS: Tensión arterial sistólica
TG: Triglicéridos
TNF α : Factor de necrosis tumoral
TRC: Transporte reverso de colesterol
VCAM-I: Molécula de adhesión vascular tipo I
VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad

RESUMEN.

Aunque los valores bajos de C-HDL son aceptados universalmente como un factor de riesgo independiente para desarrollar EAC, existen algunas condiciones con valores muy bajos de C-HDL tales como la Apo A-I_{milano}, la deficiencia LCAT y la enfermedad de ojo de pescado, que en general no se asocian con la EAC. Esto puede deberse a que las HDL son una clase muy heterogénea de lipoproteínas con subespecies que difieren en composición de apolipoproteínas y lípidos, tamaño, densidad, carga y propiedades funcionales. El objetivo del presente estudio fue analizar simultáneamente varias características de las HDL que incluyeron su composición química, distribución de subclases, eflujo de colesterol in-vitro, actividades de algunas proteínas y enzimas involucradas en el TRC (LCAT, CETP y PLTP), así como las concentraciones de VCAM-1 en plasma, en sujetos con C-HDL bajo con EAC (G1), en sujetos con C-HDL bajo sin manifestaciones clínicas de EAC (G2), y en un grupo de controles sanos y concentraciones normales de C-HDL (G3). Esto pudiera permitir la identificación de características específicas de las HDL que proporcionen mayor poder de predicción del desarrollo de EAC que las concentraciones de C-HDL.

La distribución de las subclases de HDL, su composición en lípidos y proteínas, la actividad de las proteínas y enzimas involucradas en su metabolismo, y el eflujo de colesterol fueron semejantes en los grupos 1 y 2 de nuestro estudio. En comparación con el grupo con C-HDL normal, los dos grupos de sujetos con C-HDL disminuido mostraron menor actividad LCAT, actividad PLTP aumentada, partículas de HDL enriquecidas en triglicéridos y menor eflujo de colesterol. Estos resultados sugieren que el transporte reverso de colesterol es deficiente en los sujetos con C-HDL bajo, pero nuestro estudio no permitió identificar diferencias entre los pacientes HA con EAC y los sujetos con C-HDL bajo sin cardiopatía. Por otra parte, el síndrome metabólico fue más frecuente en el grupo con HA EAC +, lo que podría explicar la presencia de cardiopatía en este grupo.

Quiero agradecer a todas las personas que hicieron posible que concluyera este objetivo.

A ti mami, porque siempre has sido un apoyo incondicional.

A la señora Antonia Marín por haber sido como una segunda madre para mis hijos, el tiempo que dios le prestó la vida.

A mis hijos, Alejandra y Adolfo, quiero dedicarles este trabajo, y espero que con el pueda enseñarles que con dedicación puedes lograr todas las metas que te propongas en la vida.

A la Dra. Claudia Huesca por haber compartido conmigo sus conocimientos.

A el QFB Héctor Javier Pérez Cano, por su compañerismo y calidad humana.

A todos mis compañeros de trabajo GRACIAS.

INTRODUCCIÓN.

Descripción de las HDL.

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés), son complejos macromoleculares, caracterizados por su alta densidad (1.063-1.21 g/ml), y pequeño tamaño (5-17 nm)ⁱ, Figura 1. En su forma madura, el centro hidrófobo de las HDL contiene ésteres de colesterol y una pequeña proporción de triglicéridos (TG), rodeados por una monocapa de fosfolípidos, colesterol libre y apolipoproteínas (apos) que estabilizan la estructura de la lipoproteína y son cofactores de algunas enzimas. Sus componentes proteicos principales son la apo A-I y la apo A-II, pero también contienen apo A-IV, apo C (I, II y III) y apo E. Además de las apos, las HDL tienen otras proteínas involucradas en su metabolismo y remodelación, entre ellas, la lecitina:colesterol acil transferasa (LCAT), y las proteínas de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), y de fosfolípidos (PLTP)ⁱⁱ. Otras moléculas con función antioxidante como la paraoxonasa (PON-1) y el factor activador de plaquetas acetilhidrolasa (PAF-AH)ⁱⁱⁱ también forman parte de las HDL.

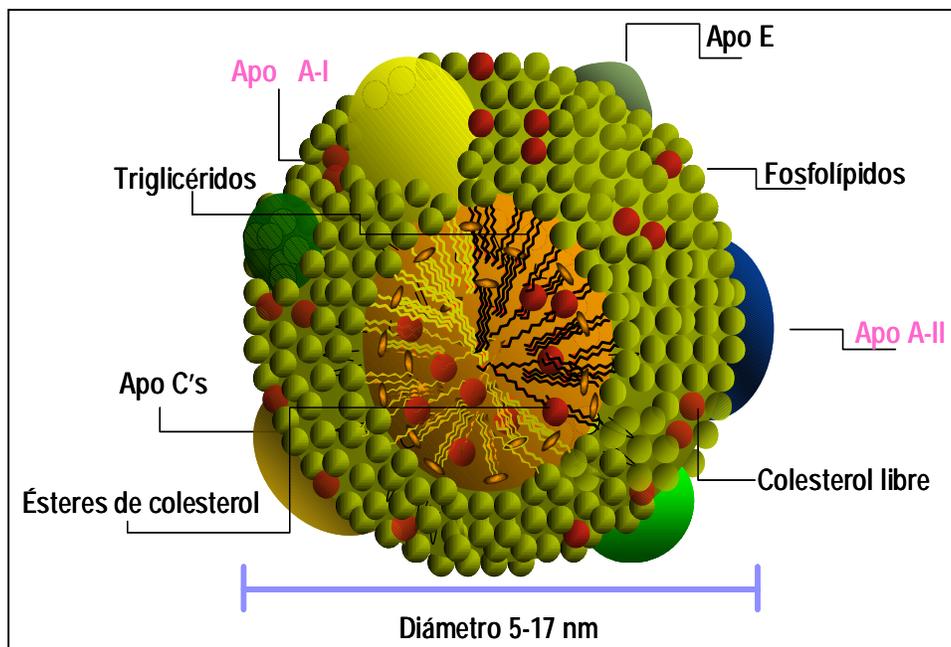


Figura 1. Representación esquemática de la lipoproteína de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés).

Papel de las HDL en la enfermedad arterial coronaria (EAC).

En las últimas 2 décadas se ha mostrado consistentemente una relación inversa e independiente entre las concentraciones de colesterol de HDL (C-HDL) y el riesgo de desarrollar enfermedad arterial coronaria (EAC)^{iv,v,vi}. Se ha estimado que por cada mg/dl de disminución en el C-HDL, el riesgo de desarrollar enfermedad aumenta 2 a 4%^{vii}, independientemente de la presencia de otros factores de riesgo, como edad, hipertensión, tabaquismo, obesidad y el aumento del colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés)^{viii}. Por otra parte, el papel protector de las HDL contra la aterosclerosis, ha sido apoyado por estudios que muestran una reducción de eventos cardiovasculares asociados al aumento de C-HDL, en respuesta al tratamiento con agentes farmacológicos^{ix,x}.

Mecanismos ateroprotectores de las HDL.

El mecanismo preciso mediante el cual las HDL ejercen su acción protectora contra la aterosclerosis, no ha sido bien definido. Sin embargo, su capacidad para remover el colesterol de los tejidos extrahepáticos mediante el proceso conocido como transporte reverso de colesterol (TRC), su efecto antioxidante y su capacidad anti-inflamatoria, son algunos de los mecanismos antiaterogénicos propuestos^{xi}.

Transporte reverso de colesterol.

En 1968 Glomset^{xii} propuso que la función antiaterogénica de las HDL podría estar relacionada con su capacidad para remover y transportar el colesterol de los tejidos periféricos (incluyendo la pared de las arterias), hacia el hígado para su reciclamiento o excreción en la bilis. Esta vía de TRC^{xiii} es muy dinámica, pero se puede resumir en cinco pasos (Figura 2): (1) La apo A-I libre y/o las partículas de HDL pre- β (HDL nacientes [HDLn], pobres en lípidos), producidas en el intestino, el hígado, o bien generadas durante la lipólisis de los remanentes de quilomicrón (Qmr), inician el eflujo de colesterol y fosfolípidos al interactuar a través de su apo A-I con receptores celulares específicos, como el transportador de membrana dependiente de ATP (ABCA-1 por sus siglas en inglés)^{xiv}, y el receptor pepenador B tipo I (SR-BI por sus

siglas en inglés)^{xv}. (2) El colesterol libre captado por las HDL es esterificado por la enzima LCAT, e incorporado hacia el centro hidrófobo de la lipoproteína. (3) Por acción de la CETP, la partícula de HDL intercambia el colesterol esterificado por triglicéridos, con las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés) y con las LDL. De este intercambio resultan partículas de HDL enriquecidas en triglicéridos. (4) La partícula de HDL enriquecida en triglicéridos es remodelada por la acción de la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP), y de las enzimas lipasa hepática (LH) y lipasa endotelial (LE). La acción de estas enzimas genera partículas de HDL empobrecidas en lípidos (HDL pre-β) y apo A-I libre que pueden reiniciar el ciclo. Por tanto, el TRC puede considerarse como un ciclo, en el que los aceptores de colesterol se regeneran constantemente para ejercer su función de remover el colesterol excedente de los tejidos extra-hepáticos. (5) Finalmente, el colesterol captado por las HDL puede ser depurado selectivamente en el hígado por el receptor SR-B1, la partícula completa de HDL también puede ser depurada por el receptor para apo E. Por otro lado, la interacción de las HDL con las lipoproteínas que contienen apo B, favorece que el colesterol transferido a estas lipoproteínas, sea finalmente depurado a través del receptor para apo B. También se ha encontrado que la apo A-I pobre en lípidos y la apo A-I libre, pueden ser endocitadas y catabolizadas en el riñón a través del receptor cubilina/megalina.

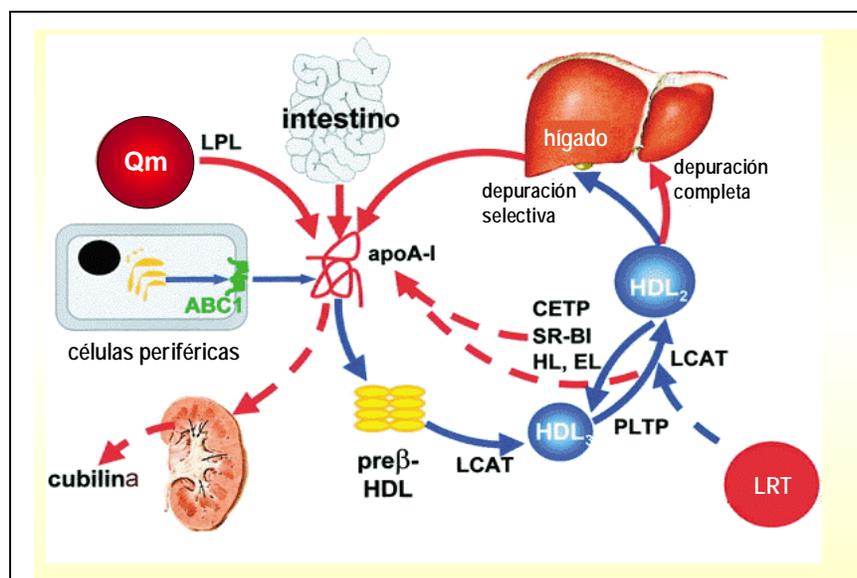


Figura 2. Transporte reverso de colesterol.

Subclases de HDL

Como ha sido descrito previamente, a lo largo del TRC las HDL son constantemente remodeladas, generando varias subpoblaciones, que difieren tanto en sus propiedades físicas (densidad, tamaño y carga), como químicas (composición en lípidos y proteínas). Existen varios métodos para clasificar a las partículas de HDL: Con base en su *densidad de flotación*, determinada por ultracentrifugación analítica, se encuentran dos subpoblaciones principales las HDL₂ (1.063-1.125 g/ml) y las HDL₃ (1.125-1.21 g/ml)^{xvi}. Mediante electroforesis no desnaturizante en gradiente de poliacrilamida se separan *por tamaño* 5 diferentes subclases, denominadas HDL 2a (12-9.7 nm), HDL 2b (9.7-8.8 nm), HDL 3a (8.8-8.2 nm), HDL 3b (8.2-7.8 nm) y HDL 3c (7.8-7.2 nm)^{xvii}. Con el método de electroforesis en 2 dimensiones en gel de agarosa, las HDL son separadas por *tamaño y carga*, en 6 subfracciones con migración α (pre- α_1 , α_1 , pre- α_2 , α_2 , pre- α_3 y α_3 de mayor a menor tamaño), y 2 subfracciones con migración β (pre- β_2 y pre- β_1)^{xviii}. La cromatografía de *inmunofinidad* es otra forma de clasificar a las HDL, con este método se separan 2 subclases, las que sólo contienen apo A-I denominadas Lp A-I, y las que contienen tanto apo A-I como apo A-II (Lp A-I/A-II)¹⁶. Se ha encontrado que la mayor parte de la apo A-I está en la fracción de HDL con movilidad electroforética α (α -Lp A-I), y que esta subfracción contiene prácticamente todo el colesterol de HDL (C-HDL) cuantificado rutinariamente en el laboratorio^{xix}. Recientemente se aplicó la resonancia magnética nuclear para determinar los tamaños de las diferentes lipoproteínas en plasma total. Con este método se han determinado 5 subfracciones de HDL que van de H1 a H5 con un tamaño promedio de partícula de 11.5 a 7.5 nm. Las subclases H5, H4 y H3, corresponden a las HDL grandes o HDL₂, mientras que H2 y H1 corresponden a las HDL pequeñas o HDL₃^{xx}.

Dada la diversidad de metodologías que existen para clasificar las subclases de HDL, hasta la fecha no existe un consenso en cuanto al tipo de partícula de HDL que confiere mayor protección contra la aterosclerosis. En estudios de casos y controles en los que se han analizando las subfracciones de HDL

por gradiente en gel de poliacrilamida, se sugiere que el riesgo de EAC puede incrementar cuando los índices HDL_{2b}/HDL_{3c} y HDL_{2b}/HDL_{3b} son bajos^{xxi,xxii}. Con el método de electroforesis en dos dimensiones, se encontró que los sujetos con EAC se caracterizaron por tener una concentración significativamente menor de la subfracción α -1, y concentraciones significativamente más altas de las subfracciones α -3 y pre β -1^{xxiii}. Más aún, en un estudio de seguimiento, la disminución en la subpoblación α -1 y el aumento en la α -3 predijeron el desarrollo de eventos cardiovasculares futuros^{xxiv}.

Asociación de LCAT, CETP y PLTP con la EAC.

LCAT. Utilizando lecitina como donador de ácidos grasos insaturados, la LCAT es la enzima responsable de esterificar el colesterol libre presente en la lipoproteínas circulantes^{xxv}. Esta enzima actúa preferentemente sobre las HDL, ya que contienen apo A-I que es su principal activador. En humanos, las mutaciones en gen de la LCAT se asocia con disminución parcial o total en la actividad de la enzima. En estos pacientes también se encuentran concentraciones reducidas de apo A-I y apo A-II, debido a un catabolismo incrementado de las HDL nacientes enriquecidas en colesterol libre^{xxvi}.

Primero porque la actividad LCAT se asocia directamente con las concentraciones de C-HDL^{xxvii}. En segundo lugar, porque estudios en primates no-humanos han mostrado que la expresión transitoria de LCAT humana incrementa significativamente el catabolismo de la lipoproteínas que contienen apo B^{xxviii}. Finalmente, porque existen evidencias de que esta enzima tiene propiedades antioxidantes ya que in vitro se ha observado que puede hidrolizar fosfolípidos oxidados en LDL^{xxix}. La LCAT puede considerarse una enzima ateroprotectora.

CETP. La redistribución de ésteres de colesterol, triglicéridos y en menor medida fosfolípidos, entre las HDL y VLDL y/o LDL, mediada por la CETP constituye una vía indirecta para la depuración hepática del colesterol removido de los tejidos periféricos por las HDL^{xxx}. En presencia de concentraciones normales de VLDL la transferencia de ésteres de colesterol se realiza preferentemente de las HDL a las LDL, y el

colesterol es finalmente depurado a través del receptor hepático para apo B. En caso de incremento en VLDL el colesterol de HDL es transferido de manera preferencial hacia esta partícula lipoprotéica. Por esta vía se generan partículas de VLDL grandes y enriquecidas en colesterol que son precursoras de las LDL pequeñas y densas, consideradas como el tipo de lipoproteína con mayor potencial aterogénico^{xxxii}. La participación de la CETP en el proceso de aterosclerosis parece depender principalmente de la concentración de triglicéridos³¹. En la hipertrigliceridemia la CETP favorece la disminución de C-HDL, da lugar a la formación de lipoproteínas aterogénicas e incrementa el riesgo de eventos cardiovasculares^{xxxii}.

PLTP. La acción de la LPL (lipasa lipoprotéica, por sus siglas en inglés) hidroliza los triglicéridos de los quilomicrones y las VLDL, y genera partículas remanentes de quilomicrón y de VLDL^{xxxiii}. En un proceso favorecido por la acción de la PLTP, es removido exceso en fosfolípidos de estas partículas remanentes, formando HDL nacientes^{xxxiv}. Estudios in vitro han mostrado que en forma dependiente de tiempo y de concentración de sustratos^{xxxv}, la acción de la PLTP sobre las HDL₃, puede generar tanto partículas mas grandes como mas pequeñas, sugiriendo que la PLTP ejerce también un efecto de remodelación en las HDL. La notable reducción en la progresión de la aterosclerosis observada en modelos animales con deficiencia de PLTP^{xxxvi}, y la asociación directa e independiente de su actividad con el riesgo de EAC en humanos^{xxxvii}, sugieren que esta proteína es potencialmente proaterogénica. Sin embargo, la PLTP también ha mostrado propiedades ateroprotectoras, ya que promueve la formación de HDL pre-β, y favorece el eflujo de colesterol^{xxxviii}.

HDL y sus propiedades antioxidantes.

La modificación oxidativa de las LDL (LDLox) en la íntima arterial es un factor clave en el desarrollo de la placa de ateroma. El efecto antioxidante de las HDL ha sido atribuido a su contenido en enzimas capaces de degradar lípidos oxidados (PON-1, PAF-AH y LCAT) ^{xxxix}. Un estudio in-vitro mostró que al incubar LDLox con HDL disminuye tanto la susceptibilidad a la oxidación, como la cantidad de lípidos oxidados en LDL y sugirió que las HDL pequeñas (HDL₃) tienen una mayor capacidad antioxidante, respecto a las HDL

grandes (HDL₂)^{xi}. Por otro lado, los ratones que no expresan los genes de PON-1 y PAF-AH tienen mayor susceptibilidad para desarrollar aterosclerosis, lo cual apoya el potencial ateroprotector de estas enzimas³⁹. Además, se ha observado que la apo A-I puede unir los lípidos oxidados de las LDL y removerlos^{xli}. La hidrólisis y remoción de lipoperóxidos de las LDLox disminuye el estrés oxidativo, evita su acumulación en la íntima arterial, y por tanto previene el desarrollo de la aterosclerosis.

HDL y su propiedades anti-inflamatorias.

La adhesión de monocitos al endotelio vascular mediada por la acción de las moléculas de adhesión es uno de los eventos tempranos en la aterogénesis. La expresión de la molécula de adhesión vascular tipo I (VCAM-I), la molécula de adhesión intracelular tipo I (ICAM-I), la selectina-E, y selectina-P, se producen en respuesta a la acción de citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF α) y la interleucina-1 (IL-1). Las moléculas de adhesión, parecen estar implicadas tanto en la aterogénesis temprana, como en la progresión y maduración de las placas de ateroma^{xlii}. En cultivo de células endoteliales humanas se ha mostrado que las HDL disminuyen la expresión de moléculas de adhesión inducida por TNF- α , esta respuesta es dosis-dependiente y el efecto máximo se observa a concentraciones fisiológicas de HDL. Las HDL pequeñas (HDL₃), son más eficientes que las grandes (HDL₂) para ejercer este efecto anti-inflamatorio^{xliii}. Al parecer, la forma de las HDL y su contenido en fosfolípidos, influye notablemente en su capacidad para inhibir a las moléculas de adhesión, las HDL esféricas que contienen apo A-I y linoleil-fosfatidilcolina son las más activas en esta función⁴².

Los estudios en animales de experimentación han proporcionado evidencias del efecto anti-inflamatorio de las HDL in-vivo. Al aumentar las concentraciones de HDL mediante la sobre-expresión de apo A-I en ratones deficientes de apo E (modelo animal de aterosclerosis), disminuyen las concentraciones de moléculas de adhesión y el reclutamiento de monocitos en la íntima arterial^{xliiv}. En humanos, la disminución

en los valores de C-HDL se asocia a un incremento en la concentración de moléculas de adhesión solubles, lo que constituye un indicador de la expresión de las mismas en el endotelio vascular^{xlv}.

Aunque los valores bajos de C-HDL son aceptados universalmente como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de EAC^{4,5,6,8}, no todos los sujetos con HA desarrollan aterosclerosis. De hecho, existen algunas condiciones con valores muy bajos de C-HDL tales como la Apo A-I_{milano}, la deficiencia LCAT y la enfermedad de ojo de pescado, que no siempre se asocian con EAC^{xlvi}. Esto puede ser debido a que las HDL constituyen una clase muy heterogénea de partículas lipoprotéicas con subespecies que difieren en composición de apolipoproteínas y lípidos, tamaño, densidad, carga y propiedades funcionales¹. Por tanto el objetivo del presente estudio fue analizar simultáneamente varias características de las HDL que incluyeron su composición química, distribución de subclases, eflujo de colesterol in-vitro, actividades de algunas proteínas y enzimas involucradas en el TRC (LCAT, CETP y PLTP), así como las concentraciones de VCAM-1 en plasma, en sujetos con C-HDL bajo que han desarrollado EAC, en sujetos con C-HDL bajo pero sin manifestaciones clínicas de EAC, y en un grupo de controles sin manifestaciones clínicas de EAC y con concentraciones normales de C-HDL. Esto pudiera permitir la identificación de características específicas de las HDL que proporcionen mayor poder de predicción del desarrollo de EAC que las concentraciones de C-HDL.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Diseño del estudio. Se realizó un estudio transversal de casos y controles. Los casos fueron pacientes con hipoalfalipoproteinemia (HA) y enfermedad arterial coronaria (EAC) (G1), y los controles fueron sujetos que también tenían HA pero sin manifestaciones clínicas de EAC (G2). Además, se incluyó un tercer grupo de sujetos sin EAC y con valores normales de C-HDL (G3). Se incluyeron únicamente sujetos del sexo masculino, de 30 a 60 años de edad, con cifras de C-HDL menores a 35 mg/dL para los sujetos HA (G1 y G2), y entre 40-60 mg/dl para el grupo (G3). Se excluyeron del estudio sujetos con TG \geq 250 mg/dl, aquellos con tratamiento con drogas que afectan las concentraciones de lípidos y lipoproteínas y los que presentaban abuso de alcohol, diabetes mellitus, enfermedad hepática, renal o tiroidea.

Descripción del estudio. De la consulta externa del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" se seleccionaron pacientes con diagnóstico bien establecido de EAC, que tuvieran HA, y que cumplieran con los criterios de inclusión y exclusión. Los grupos G2 y G3 se constituyeron con trabajadores del Instituto Nacional de Cardiología y sus familiares, y con empleados y padres de estudiantes de una escuela secundaria en la que estamos realizando estudios sobre factores de riesgo coronario. Las características del estudio fueron explicadas a todos los participantes y únicamente se incluyó a los que firmaron su forma de consentimiento informado, y no tuvieron antecedentes personales ni familiares de EAC.

A cada sujeto se le realizó una exploración clínica que incluyó la aplicación de un cuestionario, previamente validado, para averiguar la presencia de manifestaciones clínicas de EAC, y conocer su historia personal y familiar de infarto agudo del miocardio, hipertensión arterial (HTA), obesidad y diabetes mellitus. Además de obtener información sobre el consumo de cigarrillos y alcohol, estilo de vida, tipo de ocupación y actividades desarrolladas durante el tiempo libre. La tensión arterial sistólica y diastólica fue determinada en todos los sujetos, después de 5 min. de reposo, utilizando un baumanómetro de mercurio, reportando el promedio de la segunda y la tercera determinación.

En ayuno de 12 hrs., y después de que el individuo permaneció en posición sedente por 15 min., sin estasis venosa, se obtuvo una muestra de sangre utilizando tubos con EDTA (1 mg/ml). El plasma se separó del paquete celular por centrifugación a 2500 r.p.m. durante 20 min. a 4 °C. Las determinaciones de lípidos y lipoproteínas se realizaron dentro de los 3 días siguientes a la toma de muestra. Para otras mediciones, el plasma se dividió en alícuotas que se mantuvieron a -70 °C utilizando aprotinina (100 KIU/ml) y benzamidina como conservadores.

Análisis de laboratorio.

Para la determinación de lípidos y lipoproteínas y la composición química de las HDL, se utilizó un autoanalizador Hitachi 902 (Boheringer Mannheim). El colesterol total (CT), triglicéridos (TG) y fosfolípidos (PL) se cuantificaron por métodos enzimáticos colorimétricos (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania) y para el colesterol libre (CL) se utilizó un estuche comercial (Wako Chemicals, USA). El colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) se determinó mediante un método enzimático homogéneo (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania)^{xlvii}. El colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) se estimó con la fórmula de Friedewald modificada por De Long^{xlviii}. El colesterol esterificado contenido en las HDL se calculó mediante la siguiente fórmula $CE_{HDL} = (CT_{HDL} - CL_{HDL}) * 1.68$ ^{xlix}. La glucosa se determinó por el método de glucosa oxidasa (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania), y las concentraciones plasmáticas de apo A1, apo B y proteína C reactiva (PCR) se midieron por inmunonefelometría (Dade Bhering, Marburg Alemania) en un autoanalizador BN ProSpec (Dade Bhering). La insulina fue cuantificada por radioinmunoanálisis utilizando un estuche comercial (DPC, Los Angeles CA).

Las subpoblaciones de HDL fueron determinadas en HDL aisladas por ultracentrifugación secuencial, mediante electroforesis en gradiente (4% al 30%) en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (PAGE)^l. Como referencia se utilizaron estándares de alto peso molecular (Amersham Biosciences, England) con diámetros conocidos (tiroglobulina 17 nm, ferritina 12.2 nm, catalasa 10.4 nm, lactato deshidrogenasa 8.2 nm, y albúmina 7,1 nm). Previa tinción con azul de Coomassie R250, las proporciones relativas a las

diferentes subpoblaciones de HDL se cuantificaron por densitometría con un scanner BIO-RAD GS 670. Los cortes utilizados fueron: HDL_{3c} 7.8-7.2nm, HDL_{3b} 8.2-7.8 nm, HDL_{3a} 8.8-8.2 nm, HDL_{2b} 9.7-8.8 nm y HDL_{2a} 12.9-9.7 nm.

El contenido de apolipoproteínas en la subfracción de HDL se determinó semicuantitativamente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)ⁱⁱ, en gradiente del 4% al 21%. Las proteínas fueron teñidas con azul de Coomassie. Las apolipoproteínas fueron identificadas de acuerdo a su peso molecular (apo A IV 46 KD, apo E 34 KD, apo AI 28 KD, apo AII 17 KD, apo CI 8.8 KD, apo CII 6.6 KD), utilizando marcadores de peso molecular conocido (Fosforilasa 97 KD, albúmina 66 KD, ovoalbúmina 45 KD, anhidrasa carbónica 30KD, inhibidor de tripsina 20.1 KD, α -lactoglobulina 14.4 KD). Tomando el porcentaje de área bajo la curva, correspondiente a cada proteína, se cuantificó por densitometría la proporción relativa de cada apolipoproteína.

Actividad LCAT. La actividad de esta enzima se determinó in vitro, por el método del proteoliposoma marcado, descrito por Chen y Albersⁱⁱⁱ. El ensayo consiste en incubar durante 60 min. a 37°C 5 μ L de plasma, con 100 μ L de proteoliposomas formados por apo AI:fosfatidilcolina:[H³]-Colesterol (0.8:250:12.5), en presencia de albúmina sérica bobina (ASB) al 2% y β -mercaptoetanol 0.1M, en un buffer salino (TRIS 10mM, NaCl 140mM, EDTA Na₂ 1mM, pH=7.4). Al terminar el periodo de incubación los lípidos fueron extraídos con una mezcla de cloroformo:metanol (2:1). El colesterol libre fue separado del esterificado por cromatografía en capa fina, utilizando como eluyente una mezcla de éter de petróleo, éter etílico y ácido acético (90:10:5). Las bandas correspondientes al colesterol libre y al esterificado se identificaron usando un estándar interno después de ser reveladas con yodo. En cada banda se cuantificó la radioactividad, y la actividad LCAT se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ actividad} = \text{CE} / (\text{CL} + \text{CE}) * 100.$$

La actividad se expresa en nmoles de colesterol esterificado, por mL de plasma, por hora.

Actividad CETP. La actividad de esta proteína se cuantificó in vitro, empleando el método descrito por Tollefelson y Albersⁱⁱⁱ con algunas modificaciones. Se utilizaron HDL₃-³H como partículas donadoras de ésteres de colesterol y, como partículasceptoras, un pool de lipoproteínas que contienen apo B (VLDL/LDL), en presencia de 5µL de plasma problema. Estos tres componentes se incubaron en un buffer salino (TRIS 10mM, NaCl 140mM, EDTA Na₂ 1mM, pH=7.4) durante 16hrs. a 37 °C. Transcurrido el periodo de incubación, se tomó una alícuota de la mezcla de reacción para cuantificar las cuentas totales. Al resto se adicionaron 50µL de reactivo precipitante de heparina/Mn²⁺ para cuantificar, por diferencia, la radioactividad transferida a las VLDL/LDL. La actividad CETP se calculó en la forma siguiente:

$$\% \text{transferencia} = (\text{Cuentas precipitadas} / \text{Cuentas totales}) * 100.$$

La actividad CETP se expresa como el porcentaje de ésteres de colesterol transferidos, por mL de muestra, por hora.

Actividad PLTP. La actividad de esta proteína se determinó por el método descrito por KawanoK. et al.^{iv}, con algunas modificaciones. Para este ensayo se utilizaron liposomas de ³H-fosfatidilcolina:fosfatidilcolina (1:1000) como partículas donadoras y, un pool de HDL aisladas como aceptores de fosfolípidos en presencia de 1µL de plasma problema. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 1hr y, después de precipitar los liposomas con heparina/ Mn²⁺, se cuantificó la radioactividad transferida a las HDL. La actividad PLTP se expresa en nmoL de fosfolípidos transferidos por mL de plasma, por hora.

El *eflujo de colesterol* se midió con la línea celular de hepatoma de rata Fu5AH siguiendo el procedimiento descrito por De la Llera Moya et al.^v. Las células fueron marcadas con colesterol-³H e incubadas con suero problema al 2.5%, en medio de cultivo. Al término de 4 hrs. de incubación, se removió el medio de cultivo y se cuantificó la radioactividad transferida a la muestra problema. También fue removida la monocapa de células con NaOH para determinar la radioactividad remanente. La radioactividad presente en el medio se

dividió entre la radioactividad total (medio mas remanente en células), el resultado se multiplicó por 100, obteniéndose así el % de eflujo promovido por cada muestra problema.

La concentración plasmática de la fracción soluble de la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1) se cuantificó mediante ensayos de ELISA (R and D Duo Set, Minneapolis, MN) utilizando anticuerpos monoclonales comerciales.

La adiposidad general se cuantificó utilizando el índice de masa corporal (IMC=Peso en Kg / estatura en metros, elevada al cuadrado). Se diagnosticó sobrepeso cuando el IMC fue ≥ 25 Kg/m², pero menor de 30 Kg/m², y obesidad cuando el IMC fue ≥ 30 Kg/m². La obesidad abdominal se definió como la circunferencia de cintura ≥ 102 cm.

Para el cálculo de resistencia a la insulina (HOMA RI) se utilizó el modelo de homeostasis. La fórmula de este modelo es:

$$\text{Insulina de ayuno en } \mu\text{U/mL} \times \text{glucosa de ayuno en mmol/mL} \text{ divididos entre } 22.5^{\text{vi}}$$

El diagnostico del síndrome metabólico se estableció de acuerdo a los criterios del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol (NCEP ATP III)^{vii}. El diagnóstico se realiza con la presencia de 3 ó mas de las siguientes anomalías: 1) C-HDL < 40 mg/dL, 2) concentraciones de triglicéridos ≥ 150 mg/dL. 3) circunferencia de cintura ≥ 102 cm, 4) valores de tensión arterial sistólica (TAS) ≥ 130 mmHg, ó de tensión arterial diastólica (TAD) ≥ 85 mmHg, ó el empleo de medicamentos antihipertensivos. 5) glucosa de ayuno ≥ 110 mg/dL.

Análisis estadístico.

La distribución de las variables se analizó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las variables continuas con distribución normal, se reportan en medias \pm desviación estándar, y fueron comparadas por ANOVA, utilizando LSD para conocer las diferencias entre grupos. La insulina, el HOMA RI, el eflujo de colesterol, la PCR y la VCAM-1, tuvieron una distribución no paramétrica, por lo que se reportan medianas y rango

intercuartil y fueron comparadas mediante la prueba de U de Mann-Uhitney. Las variables categóricas las encontramos en porcentaje y se compararon con la prueba de χ^2 . La relación entre las diferentes variables fue analizada mediante los análisis de correlación de Pearson y Spearman, según fuera apropiado. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete para Windows SPSS 10.0 (SPSS, inc., Chicago, IL).

RESULTADOS.

En la tabla 1 se muestran las características antropométricas y metabólicas por grupo de estudio. La edad, el IMC y la circunferencia de cintura fueron significativamente mayores en los sujetos HA EAC +, en comparación con los otros dos grupos. Aunque los valores medianos más altos de insulina y HOMA-RI también correspondieron a los sujetos del G1, las diferencias solo fueron significativas al compararlos con el grupo N-HDL.

Tabla 1. Características antropométricas y metabólicas de los 3 grupos estudiados.

	HA EAC + n=20 (G1)	HA EAC - n=29 (G2)	N-HDL n=19 (G3)
EDAD (años)	53.0 ± 7.0 ^a	43.2 ± 8.8	43.3 ± 5.3
IMC (Kg/m ²)	28.8 ± 3.2	27.6 ± 2.7	26.6 ± 3.3 ^b
CINTURA (cm)	101.9 ± 9.0 ^a	95.7 ± 8.4	94.3 ± 8.7
GLUCOSA (mg/dl)	94.3 ± 7.6	95.1 ± 8.5	91.9 ± 6.8
TAS (mmHg)	123.5 ± 16.1	115.1 ± 10.1	119.5 ± 13.1
TAD (mmHg)	81.4 ± 11.0	80.7 ± 16.0	76.4 ± 8.9
Insulina (µU/ml)	5.6 (1.6-11.2)	3.7 (1.9-6.05)	1.7 ^{c,d} (0.6-3.1)
HOMA RI	1.32 (0.35-2.6)	0.75 (0.5-1.4)	0.38 ^{c,d} (0.14-0.7)

HA EAC + (C-HDL ≤ 35mg/dl CON enfermedad arterial coronaria), HA EAC - (C-HDL ≤ 35mg/dl SIN enfermedad arterial coronaria), N-HDL (sujetos sanos con concentraciones normales de C-HDL), IMC (índice de masa corporal), TAS (tensión arterial sistólica), TAD (tensión arterial diastólica), HOMA RI (modelo de homeostasis para el estudio de resistencia a la insulina). Los valores se expresan como media ± desviación estándar, excepto para insulina y HOMA RI para los que se anotan medianas (rango intercuartil). ^a p < 0.01 vs HA EAC - y N-HDL, ^b p < 0.05 vs HA EAC +, ^c p < 0.01 vs HA EAC +, ^d p < 0.005 vs HA EAC - (ANOVA, al comparar medias. U Mann-Whitney, al comparar medianas).

Los valores medios de lípidos, lipoproteínas y apolipoproteínas ajustados por edad e IMC se anotan en la tabla 2. Se observaron concentraciones más bajas de C-HDL y apo AI en los dos grupos de sujetos con hipoalfalipoproteinemia. Por el contrario, estos mismos grupos tuvieron valores más altos de TG y de los índices CT/C-HDL y TG/C-HDL que los sujetos N-HDL.

Tabla 2. Lípidos, lipoproteínas y apolipoproteínas, ajustados por edad e IMC, en los 3 grupos estudiados.

mg/dl	HA EAC + n=20 (G1)	HA EAC - n=29 (G2)	N-HDL n=19(G3)
CT	185.2 ± 8.5	173.2 ± 6.6	186.7 ± 7.9
TG	173.2 ± 12.5 ^b	154.5 ± 9.8	127.2 ± 11.7
Colesterol HDL	28.1 ± 1.2 ^a	31.6 ± 0.9 ^b	46.9 ± 1.1
Colesterol LDL	129.8 ± 7.8	116.9 ± 6.1	119.4 ± 7.3
CT/Colesterol HDL	6.6 ± 0.23 ^a	5.5 ± 0.18 ^b	4.0 ± 3.57
Colesterol no HDL	157.1 ± 8.0	141.6 ± 6.3	139.8 ± 7.5
TG/Colesterol HDL	6.1 ± 0.5 ^b	5.2 ± 0.4 ^b	2.9 ± 0.5
Apo AI	102.7 ± 3.4 ^a	115.6 ± 2.7 ^b	142.9 ± 3.2
Apo B	112.1 ± 5.1	98.7 ± 4.1	102.6 ± 4.9

Los valores se expresan como media ± error estándar. CT (colesterol total), TG (triglicéridos), HDL (lipoproteínas de alta densidad), LDL (lipoproteínas de baja densidad), resto de abreviaturas como en tabla 1. ^ap<0.01 vs HA EAC - y N-HDL, ^bp<0.05 vs N-HDL (ANCOVA).

La prevalencia de otros factores de riesgo fue mayor en los dos grupos HA, principalmente en G1 (Tabla 3). En este grupo, la hipertrigliceridemia y el índice CT/C-HDL fueron significativamente más altos. Aunque sin significado estadístico, debido probablemente al número relativamente corto de sujetos, la obesidad general (IMC ≥ 30 Kg/m²) y la obesidad abdominal (cintura ≥ 102 cm), fueron de 2 a 3 veces más frecuentes en el grupo 1, en comparación con G2 y G3. Debido a la alta frecuencia de los factores de riesgo comúnmente asociados al síndrome metabólico, se analizó la prevalencia de esta anomalía en los tres grupos de estudio, 14 de los 20 sujetos HA EAC + (70 %) presentaron 3 o más componentes del síndrome, 5 de los 29 sujetos HA EAC - tuvieron 3 componentes (17.2 %), y ningún sujeto con concentraciones normales de C-HDL tuvo más de 2 anomalías.

Tabla 3. Prevalencia de factores de riesgo en los 3 grupos estudiados.

	HA EAC + n=20 (G1)	HA EAC - n=29 (G2)	N-HDL N=19 (G3)
Insulina \geq 12.5 μ U/ml	10.5	10.3	5.3
TG \geq 150 mg/dl	80.0 *	41.4	15.8
Glucosa \geq 110 mg/dl	5.0	7.1	0
TA \geq 130/85	45.0 *	0	0
IMC 25-29.9 Kg/m ²	35.0	65.5	68.4
IMC \geq 30 Kg/m ²	50.0	24.1	15.8
Cintura \geq 102 cm	41.2	16.0	21.1
CT \geq 200 mg/dl	20.0	13.8	5.3
CT/Colesterol HDL \geq 5	90.0 *	72.4	5.3
Sx. Metabólico	70 *	17.2	0

Los valores se expresan en porcentaje. Sx. metabólico (3 o más de los siguientes componentes del síndrome metabólico: circunferencia de cintura \geq 102 cm, C-HDL $<$ 40 mg/dl, tensión arterial \geq 130/85, glucosa \geq 110 mg/dl o TG \geq 150 mg/dl), resto de abreviaturas como en tabla 1. * $p < 0.001$ (Chi-cuadrada).

En comparación con el grupo N-HDL, la actividad LCAT fue significativamente menor tanto en los sujetos HA EAC +, como en los HA EAC - (tabla 4). En contraste, la actividad PLTP fue mas alta en estos dos grupos con diferencia estadística marginal ($p=0.08$). En el total de la población estudiada ($n=68$), la actividad de la PLTP correlacionó directamente con las concentraciones de insulina ($r=0.264$, $p=0.07$) y con el HOMA-RI ($r=0.324$, $p=0.025$).

Tabla 4. Actividades de LCAT, CETP y PLTP por grupo de estudio.

	HA EAC+ n=20 (G1)	HA EAC - n=29 (G2)	N-HDL n=19 (G3)
LCAT (nM/ml/hr)	237.7 \pm 44.3 *	219.9 \pm 41.0 **	270.0 \pm 56.0
PLTP (mM/ml/hr)	3.63 \pm 1.3	3.57 \pm 1.76	2.54 \pm 1.91
CETP (%/ML/hr)	8.8 \pm 3.0	8.3 \pm 3.8	8.6 \pm 4.5

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. LCAT, lecitín colesterol acil transferasa. PLTP, proteína de transferencia de fosfolípidos. CETP, proteína de transferencia de ésteres de colesterol, resto de las abreviaturas como en tabla 1. ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$, vs N-HDL, (ANOVA).

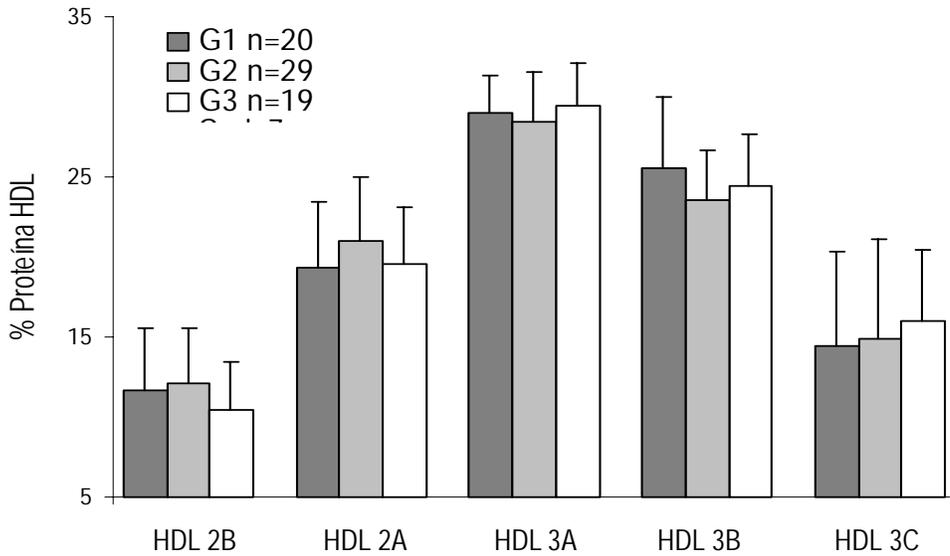


Figura 1. Distribución de subclases de HDL aisladas por ultracentrifugación secuencial en los 3 grupos estudiados. Se muestra el porcentaje promedio para cada grupo. $p=n.s$ (ANOVA). Abreviaturas como en tabla 1.

Al analizar la distribución de subclases de HDL, y su contenido de apolipoproteínas no se encontraron diferencias entre grupos. De las diferentes subpoblaciones de HDL analizadas (figura 1), aproximadamente el 30 % correspondió a HDL₂ y el resto a HDL₃. De las diferentes subpoblaciones, la HDL3a fue la más abundante ($\approx 29\%$), y la HDL2b la encontrada en menor proporción ($<15\%$). En cuanto al contenido de apolipoproteínas (figura 2), encontramos que la apo AI y AII fueron las más abundantes (57% y 32%, respectivamente).

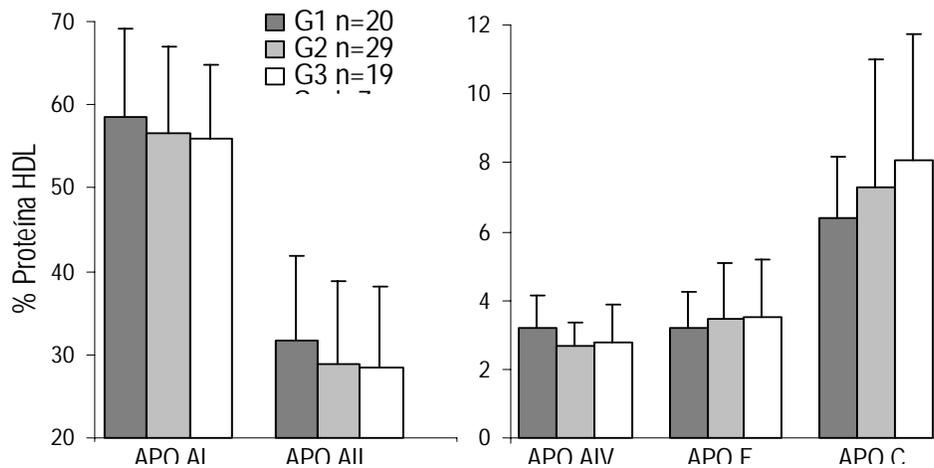


Figura 2. Proporción de apolipoproteínas en HDL aisladas por ultracentrifugación secuencial, en los 3 grupos de estudio. Se muestra el porcentaje promedio para cada grupo. $p=n.s$ (ANOVA). Abreviaturas como en tabla 1.

El análisis de la composición química de las HDL se muestra en la figura 3. Las HDL de los sujetos de los grupos 1 y 2 tuvieron proporciones significativamente menores de ésteres de colesterol y fosfolípidos, y mas altas de triglicéridos, comparadas con las HDL del grupo 3. Como consecuencia de estos cambios en composición, la relación TG/CE fue significativamente mayor en ambos grupos de sujetos con bajas concentraciones de C-HDL (G1 0.50 ± 0.24 , G2 0.45 ± 0.25 vs. G3 0.25 ± 0.11 , $p < 0.001$ y $p < 0.01$, respectivamente).

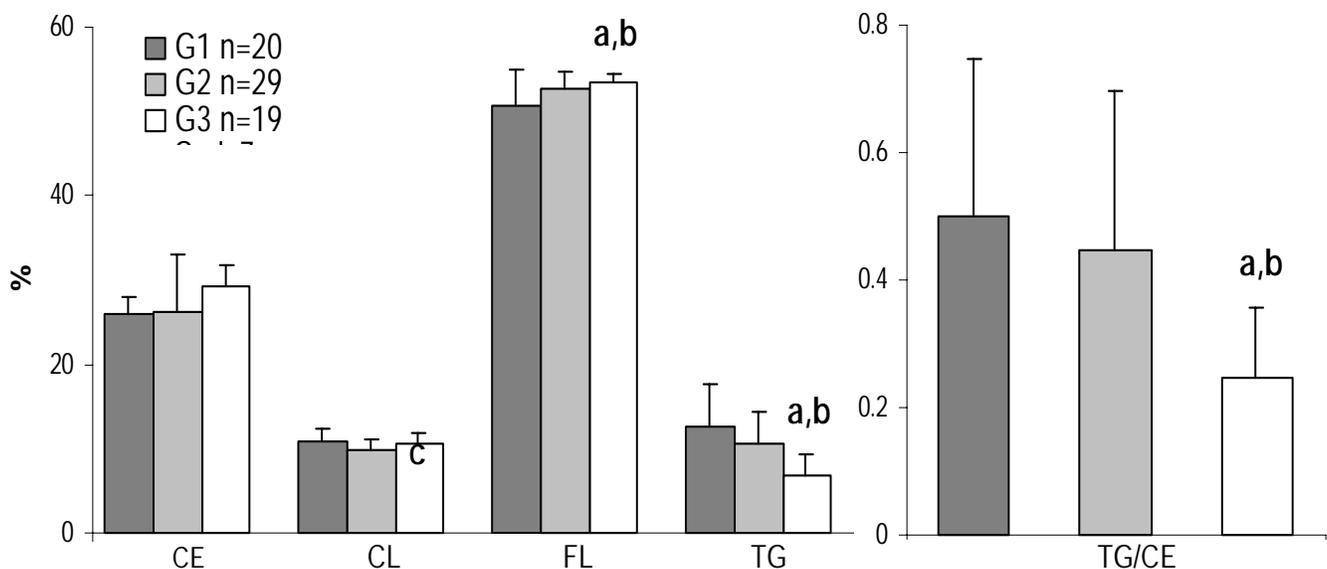


Figura 3. Análisis de la composición química de las HDL, aisladas por ultracentrifugación secuencial, en los 3 grupos de estudio . Se muestra el porcentaje promedio para cada grupo. CE, colesterol esterificado CL, colesterol libre FL, fosfolípidos TG, triglicéridos, resto de las abreviaturas como en tabla 1. ^a $p < 0.001$ vs G1, ^b $p < 0.01$ vs G2, ^c $p < 0.05$ G1 y G2. (ANOVA).

El eflujo de colesterol se determinó in-vitro, utilizando la línea celular Fu5AH (figura 4). La mediana de los porcentajes de eflujo obtenidos en los pacientes HA EAC + fue de 4.9%, y de 5.72% en los sujetos HA EAC -. Estos valores representan el 50 % (HA EAC +) y el 58% (HA EAC -), respecto al eflujo de colesterol obtenido para los sujetos N-HDL (9.78 %). Estas diferencias, sin embargo, no fueron estadísticamente significativas.

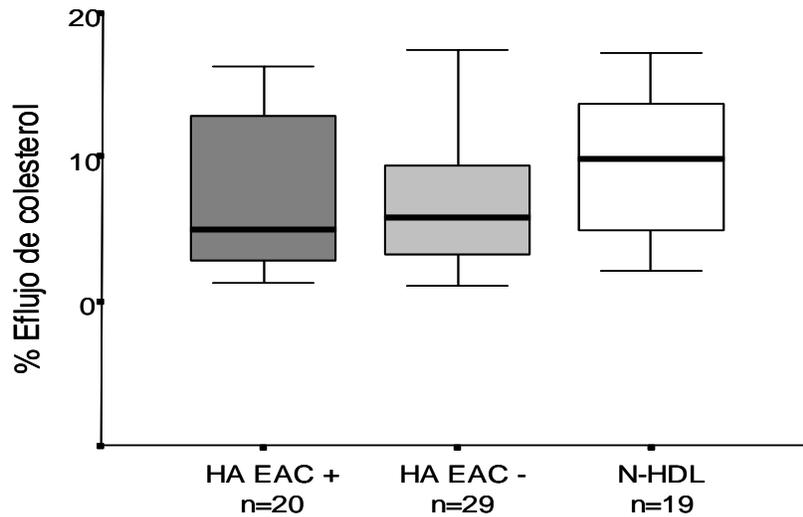


Figura 4. Las cajas muestran la mediana y el rango intercuartil del eflujo de colesterol obtenido con la línea celular Fu5AH, por grupo de estudio. p=n.s. (U Mann-Whitney).

Uno de los mecanismos mediante los cuales se ha propuesto que las HDL protegen contra la aterosclerosis es su efecto anti-inflamatorio, por lo que en la población estudiada se cuantificaron PCR y VCAM como marcadores de inflamación (figura 5). Para PCR y VCAM las concentraciones más altas se observaron en el grupo HA EAC +, y las más bajas en los sujetos N-HDL pero únicamente hubo diferencia estadísticamente significativa para VCAM, entre el grupo HA EAC + y los sujetos N-HDL, (118.6 [84.8-159.1] vs 78.4 [64.5-94.1], $p < 0.001$). La diferencia fue marginal al comparar HA EAC + vs HA EAC - (118.6 [84.8-159.1] vs 93.5 [69.6-140.4], $p = 0.055$). Las concentraciones de VCAM correlacionaron inversamente con el C-HDL ($r = -0.336$, $p = 0.006$), y directamente con los TG ($r = 0.273$, $p = 0.027$) y el IMC (0.367, $p = 0.003$), figura 6.

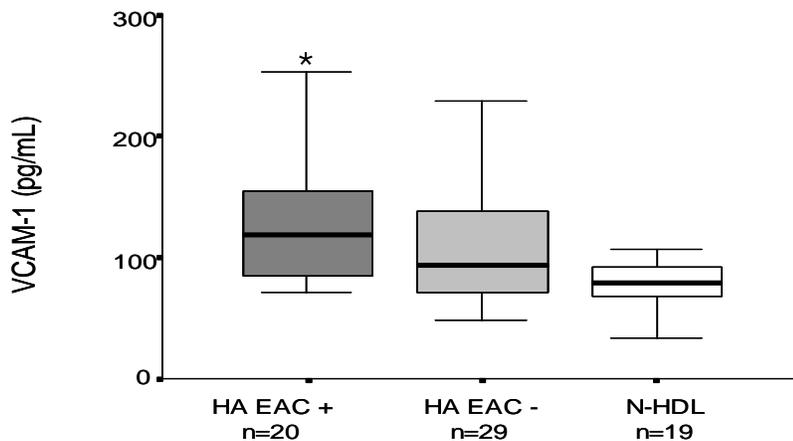


Figura 5. Las cajas muestran la mediana y el rango intercuartil, por grupo de estudio para VCAM-1 (molécula de adhesión vascular) * $p < 0.001$ vs N-HDL, $p = 0.055$ vs. HA EAC - (U Mann-Whitney).

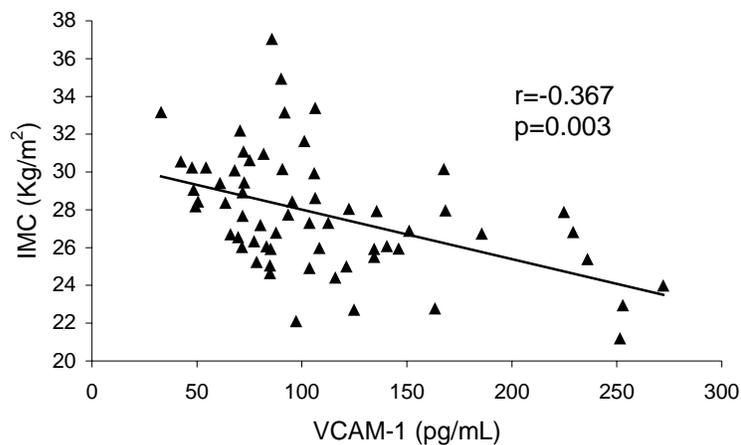
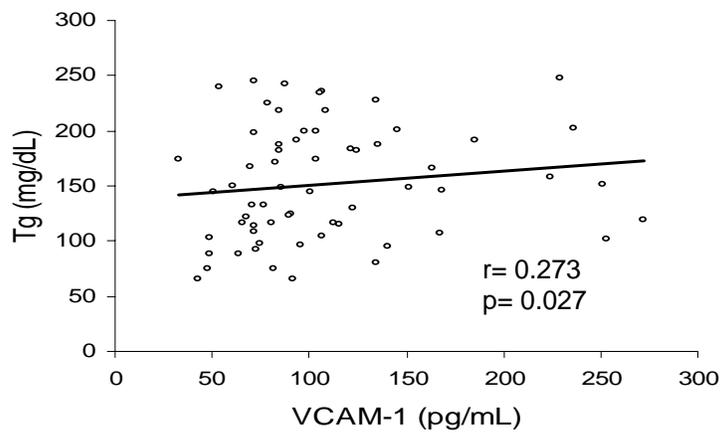
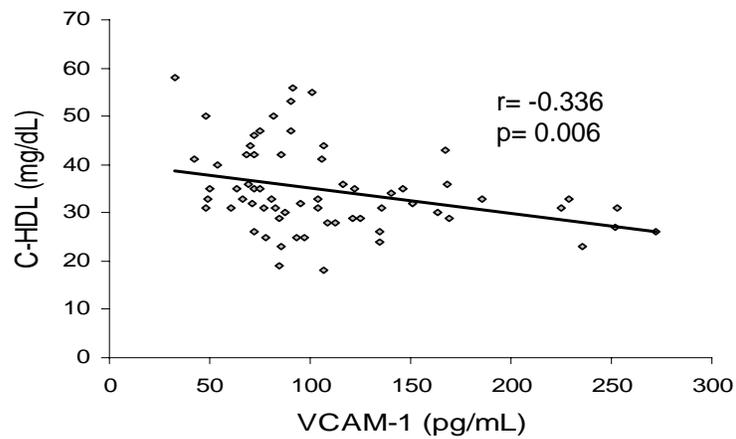


Figura 6. Coeficientes de correlación de Spearman entre las concentraciones de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL), triglicéridos (Tg) y el índice de masa corporal (IMC), con la molécula de adhesión vascular (VCAM-1) en el total de la población estudiada (n=68).

El análisis se repitió incluyendo únicamente a los sujetos con triglicéridos menores de 150 mg/dl. Los resultados mostraron un comportamiento muy semejante al observado en el total de los sujetos estudiados. Sin embargo, esto debe ser interpretado con precaución, ya que de los 20 sujetos del grupo 1 sólo 4 (20%) pudieron ser incluidos en el análisis de esta submuestra.

DISCUSIÓN.

Tradicionalmente el CT y el C-LDL se han considerado como indicadores de aterogénesis, y el C-HDL como un indicador de antiaterogénesis. Sin embargo, existen evidencias, tanto in-vivo como in-vitro, que sugieren que la medición de las actividades de las proteínas y enzimas que controlan el metabolismo de las lipoproteínas, puede ser relevante para comprender el desarrollo de aterosclerosis y, mas importante aún, para diseñar terapias antiaterogénicas. En este estudio, evaluamos el eflujo de colesterol, y otros factores involucrados en el transporte reverso de colesterol, con el propósito de investigar posibles diferencias en el metabolismo de las HDL, entre pacientes HA EAC + (G1), y aquellos también con valores bajos de C-HDL pero sin EAC (G2). Como referencia también examinamos un grupo de sujetos aparentemente sanos con valores normales de C-HDL (G3).

Durante el TRC, el colesterol de los tejidos extrahepáticos es removido y transportado hacia el hígado para ser reciclado o excretado en la bilis¹³. Este es uno de los mecanismos ateroprotectores propuestos para las HDL^{3,11}. De manera similar a lo informado previamente^{viii}, en el presente estudio los dos grupos con C-HDL bajo mostraron disminución de casi 50% en el eflujo de colesterol al ser comparados con el grupo de C-HDL normal. Aunque esta reducción en eflujo de colesterol puede ser el resultado de la menor cantidad de HDL circulantes en los sujetos con HA, otros factores también pueden haber participado. Se ha informado que las HDL enriquecidas en TG disminuyen la actividad LCAT y son ineficientes para mantener un eflujo de colesterol normal^{ix}. Por otra parte, el contenido de fosfolípidos en las HDL es el factor que mejor se asocia con en el eflujo de colesterol utilizando la línea celular Fu5AH^{ix,xi}. Un contenido mayor de TG y menor de fosfolípidos en las HDL, así como actividad LCAT reducida, fueron las anormalidades encontradas en los dos grupos con HA del presente estudio. Estos hallazgos sugieren que, en sujetos con C-HDL bajo el TRC es deficiente desde sus primeras etapas, debido probablemente a anormalidades en la composición de las HDL y a una menor actividad LCAT.

La CETP tiene un papel central en el metabolismo de las HDL, intercambiando ésteres de colesterol por TG entre las HDL y las lipoproteínas que contienen apo B (VLDL, LDL)³⁰. La concentración de TG es el factor con mayor impacto sobre la actividad de la enzima, pues se ha observado que a concentraciones semejantes de proteína CETP circulante, la transferencia de ésteres de colesterol es mayor en presencia de TG elevados^{lxii, lxiii}. En el presente trabajo, la actividad de la enzima fue similar en los 3 grupos estudiados. Pero, en comparación con los otros dos grupos, los pacientes del G1 mostraron valores medios de TG mas altos, y una proporción significativamente mayor de HTG (TG \geq 150 mg/dl). Con base en estos resultados se podría especular que la tasa de transferencia de ésteres de colesterol fue mas alta en el grupo 3. Esta interpretación parece tener apoyo en los datos de un estudio prospectivo de sujetos aparentemente sanos seguidos por 6 años³². Aunque los valores basales de CETP fueron semejantes en los sujetos que desarrollaron EAC y en los que permanecieron sin la enfermedad, los autores observaron asociación entre los valores de CETP y el desarrollo de EAC únicamente en los sujetos con TG \geq 150 mg/dl.

La PLTP esta involucrada tanto en la síntesis³⁴ como en la remodelación de las HDL³⁵, y participa en la mayor parte de los procesos de intercambio y transporte de fosfolípidos entre los diferentes tipos de lipoproteínas en el plasma³⁵. La síntesis y actividad de la PLTP son moduladas por varios factores. Su síntesis está aumentada en condiciones asociadas con resistencia a la insulina como obesidad o intolerancia a la glucosa^{lxiv, lxv}. Nuestro hallazgo de aumento de actividad PLTP en los sujetos de los grupos 1 y 2, que mostraron valores mas altos de insulina y de HOMA RI apoyan esta observación. Más aún, encontramos una correlación directa entre estas variables y la actividad PLTP (Insulina: $r=0.264$, $p=0.07$, HOMA RI: $r=0.324$, $p=0.025$). En conjunto estos resultados sugieren que la insulina regula a la PLTP, y que el incremento en su actividad fue un determinante de los valores bajos de C-HDL de los grupos 1 y 2 de nuestro estudio.

No está claro si la PLTP promueve la aterosclerosis o protege contra esta enfermedad. Su capacidad de facilitar el eflujo de colesterol^{lxvi} y generar partículas de HDL pre- β , son mecanismos ateroprotectores potenciales³⁸. Por otro lado, la PLTP favorece la secreción hepática de lipoproteínas que contienen apo B³⁶, y promueve la oxidabilidad de las lipoproteínas ricas en TG^{lxvii}, acciones que pueden ser proaterogénicas. En un estudio transversal de casos (EAC) y controles³⁷ la actividad PLTP fue mayor en los casos aún después de ajustar por variables confusoras. En el presente estudio no encontramos diferencias en la actividad PLTP entre los sujetos HA con y sin EAC. Se requieren estudios prospectivos para definir si el aumento en la actividad PLTP es un factor de riesgo para EAC.

Las HDL son heterogéneas en tamaño y otras características que pueden modificar su función y su utilidad como marcadores de riesgo para EAC. Estudios en la década de los 90's^{21,22,lxviii,lxix} no proporcionaron evidencias convincentes de que una subespecie de HDL fuera superior a otras en la predicción de riesgo cardiovascular. Durante el curso de nuestra investigación, Asztalos y colaboradores, empleando el método de electroforesis en dos dimensiones demostraron que, en comparación con sujetos control, los pacientes con EAC se caracterizaron por concentraciones significativamente menores de HDL grandes (α -1) y mas altas de las partículas pequeñas (α -3 y pre β -1)²³. Un patrón semejante en las subclases de HDL fue identificado por los mismos autores al comparar pacientes con EAC y C-HDL bajo (<40 mg/dl)²⁴. En contraste, nuestro trabajo mostró distribución de subpoblaciones de HDL similares en los tres grupos estudiados. La discrepancia en los resultados puede ser debida a los diferentes métodos utilizados en la separación de las subpoblaciones de HDL. La consistencia de los hallazgos de Asztalos^{23,24} parece sugerir que la electroforesis en 2 dimensiones permite una mejor identificación de las subclases de HDL.

Otro mecanismo ateroprotector de las HDL, es su capacidad para inhibir la expresión de moléculas de adhesión (E-selectina, VCAM-1, ICAM-1)^{lx}. La concentración en plasma de moléculas de adhesión solubles, es un indicador de su expresión por el endotelio vascular^{lxi}. Los valores bajos de C-HDL se

asocian a concentraciones elevadas de moléculas de adhesión solubles⁴⁵. La concentración de VCAM-1 tiene un alto valor predictivo de eventos cardiovasculares en pacientes con lesiones aterosclerosas avanzadas^{lxxii}. En línea con estos hallazgos, en nuestro estudio encontramos una mayor concentración de VCAM-1 en los sujetos HA EAC +, en comparación con los otros dos grupos. Esta observación parece indicar que la inflamación crónica, producto del proceso ateroscleroso presente en los sujetos con EAC, se suma al menor grado de protección mediado por las HDL en los sujetos con C-HDL bajo.

Varios estudios^{lxxiii, lxxiv, lxxv} han mostrado que la HA asociada a HTG frecuentemente se acompaña de resistencia a la insulina aumento en la proporción de LDL pequeñas y densas^{lxxvi}, lipemia postprandial prolongada^{lxxvii}, acumulación de grasa visceral^{lxxviii} y PCR elevada^{lxxix}. Se ha sugerido⁷³⁻⁷⁹ que el mayor riesgo de EAC, asociado a la presencia de HA e HTG, puede estar mediado por la agregación de éstos factores de riesgo, conocida con el nombre de síndrome metabólico⁵⁷. En el presente trabajo las prevalencias mas altas de HTG, obesidad general y abdominal, hipertensión, concentraciones altas de PCR y, por tanto, de síndrome metabólico se observaron en los pacientes HA con EAC +. Estos datos apoyan la sugerencia⁷³⁻⁷⁹ de que el aumento de riesgo cardiovascular en los sujetos con HA e HTG esta dado por las alteraciones frecuentemente asociadas a esta dislipidemia. La elevación de TG y la obesidad abdominal fueron las condiciones mas comúnmente asociadas a la HA. Un exceso en la liberación de ácidos grasos del tejido adiposo podría ser la explicación a las anomalías encontradas^{lxxx}. Es probable que este exceso de ácidos grasos circulantes se asocie a los cambios en composición química de las HDL observados en nuestro estudio. La participación de éstos cambios en la estructura de las HDL sobre sus propiedades antiaterogénicas no ha sido completamente aclarada^{lxxxi}. Se requieren estudios adicionales para evaluar la importancia de estos factores en la protección conferida por las HDL.

En resumen, encontramos que la distribución de las subclases de HDL, su composición en lípidos y proteínas, la actividad de las proteínas y enzimas involucradas en su metabolismo, y el eflujo de colesterol fueron semejantes en los grupos 1 y 2 de nuestro estudio. En comparación con el grupo con C-HDL

normal, los dos grupos de sujetos con C-HDL disminuido mostraron menor actividad LCAT, actividad PLTP aumentada, partículas de HDL enriquecidas en triglicéridos y menor eflujo de colesterol. Estos resultados sugieren que el transporte reverso de colesterol es deficiente en los sujetos con C-HDL bajo, pero nuestro estudio no permitió identificar diferencias entre los pacientes HA con EAC y los sujetos con C-HDL bajo sin cardiopatía. Por otra parte, el síndrome metabólico fue más frecuente en el grupo con HA EAC +, lo que podría explicar la presencia de cardiopatía en este grupo.

Limitaciones del estudio

Nuestro estudio tiene varias limitaciones. Primero, no se realizó ninguna prueba para demostrar definitivamente que los sujetos incluidos en los grupos 2 y 3 no tenían enfermedad arterial coronaria, sin embargo, ninguno de los sujetos incluidos en estos dos grupos tenía manifestaciones clínicas de la enfermedad, y en la mayoría de los casos no había antecedentes familiares de enfermedad arterial coronaria. Segundo, la media de edad de los sujetos del G1 fue significativamente mayor. En otros trabajos con un diseño semejante al nuestro, en los que se utilizó como criterio de selección valores bajos de C-HDL, y los sujetos se agruparon por la presencia o ausencia de EAC, los pacientes con EAC también fueron de mayor edad^{23,24,75}. Tercero, la prevalencia de otros factores de riesgo, particularmente hipertrigliceridemia (HTG) y obesidad (OB), también fue mas alta en el G1. Este hallazgo refleja el comportamiento de la hipoalfalipoproteinemia. En población abierta mexicana, cerca de la mitad de los sujetos con bajas concentraciones de C-HDL tienen cifras altas de Tg, y una tercera parte exceso de peso^{lxxxii}. A pesar de que el comportamiento de la HA es así, la inclusión de sujetos obesos es un factor confusor importante, que deberá ser controlado en estudios futuros. Otro aspecto limitante es que no se determinó la capacidad antioxidante de las HDL, que es una de las funciones ateroprotectoras propuestas para las HDL, y por tanto debería incluirse como parte del perfil funcional de esta lipoproteína.

Perspectivas.

Durante el tiempo en que se realizó el presente trabajo, gran número de reportes han sugerido que independientemente de las concentraciones de C-HDL, el estudio de las características estructurales y funcionales de las HDL y sus apolipoproteínas puede, en un futuro no lejano, ser de gran importancia en la predicción de eventos coronarios, así como en la prevención, estabilización y regresión de la placa de ateroma^{lxxxiii}. Se ha sugerido que los procesos inflamatorios, tanto agudos como los crónicos, modifican la estructura de las HDL, dando lugar a partículas disfuncionales. Es decir, deficientes en su capacidad para promover el eflujo de colesterol, y para prevenir la oxidación de las LDL, y la inflamación. De hecho, algunos estudios han mostrado que en estados agudos las HDL son pro-inflamatorias. La obesidad y la aterosclerosis son enfermedades caracterizadas por presentar inflamación crónica. Los sujetos incluidos en el presente estudio tuvieron una alta prevalencia de sobrepeso y obesidad, por lo que es probable que parte de los sujetos incluidos en el grupo 2 desarrollen aterosclerosis más tarde, y que sus HDL ya sean disfuncionales, estudiar prospectivamente a estos sujetos y analizar la funcionalidad de sus HDL a largo plazo es una posible línea de investigación.

Se ha descrito que en comparación con HDL normales, las HDL disfuncionales tienen características estructurales distintas, ya que:

Acumulan amiloide sérico A, tanto en inflamación crónica como aguda, incrementan su contenido en apolipoproteína J (clusterina), fosfolipasa A2, y aumentan su contenido en triglicéridos, ácidos grasos libres y colesterol libre. Por otro lado, disminuyen su contenido en apo AI, PON-1, CETP, LCAT, PLTP, fosfolípidos y ésteres de colesterol. Caracterizar estos cambios estructurales, bajo diferentes condiciones en las que se presente inflamación y conocer la temporalidad de la disfuncionalidad de las HDL es otro punto a estudiar.

Finalmente, los cambios en composición observados en las HDL disfuncionales pueden modificar la estructura de la apo A-I, haciéndola menos estable, y dar lugar a la reducción de esta apolipoproteína en

las partículas HDL. Sin embargo, también es probable que la apo A-I sea desplazada, por la presencia del amiloide sérico A y la clusterina. Caracterizar la estructura de la apo A-I en procesos inflamatorios nos permitiría conocer mejor el mecanismo por el cual disminuye su concentración, ya que incluso se ha propuesto como una proteína negativa de fase aguda de la inflamación.

BIBLIOGRAFÍA.

- ⁱ Von Eckardstein A, Huang Y, Assman G, Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin in Lipidol* 1994;5:404-416.
- ⁱⁱ Rye K-A., Clay M., Barter P., Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis* 1999;145:227-238.
- ⁱⁱⁱ Calabresi L., Gomaraschi M., Franceschini G., Endotelial Protection by High-Density Lipoproteins From Bench to Bedside. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003;23:1724-1731.
- ^{iv} Frick MH., Elo O., Haapa K., Heinsalmi P., et al. Helsinki Herat Study: primary prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men wiyh dislipidemia: safety of treatment, changes in risk factors, and the incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* 1987;317:1237-1245.
- ^v Gordon D., Rifkind B., Current concepts: high density lipoproteins-the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med.* 1989;21:1311-1315.
- ^{vi} Assman G., Schulte H., von Eckardstein A., Huang Y., High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk: the PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 1996;124(suppl):S11-S20.
- ^{vii} Castelli WP., Anderson K., Wilson PW., Levy D., Lipids and risk of coronary heart disease: the Framingham Study. *Ann Epidemiol* 1992;2:23-28.
- ^{viii} Gordon DJ., Probstfield JL., Garrison RJ., et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease:four prospective American studies. *Circulation* 1989; 79:8-15.
- ^{ix} Brown BG., Zhao XQ., Chait A., et al. Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. *N Engl J Med* 2001;345:1583-92.
- ^x Rubins HB., Robins SJ., Collins D., et al. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density lipoprotein cholesterol intervention trial study group. *N Engl J Med* 1999;34:410-418.
- ^{xi} Assmann G., Gotto AM., Dphil HDL Cholesterol and Protective Factors in Atherosclerosis *Circ.* 2004;109(suppl III):III-8-III-14.
- ^{xii} Glomset JA., The plasma lecithin:cholesterol acyltransferase reaction *J lipid Res.* 1968;9:155-167.
- ^{xiii} Fielding CJ, Fielding PE, Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 1995;36:211-28.
- ^{xiv} Wang N., Silver DL., Thiele C., Tall AR., ATP-binding Cassette Transporter A1 (ABCA1) Functions as a Cholesterol Efflux Regulatory Protein *J Biol Chem.*2001;276:23742-23747.

-
- ^{xv} Krieger M., Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems *J Clin. Invest.* 2001;108:793-797.
- ^{xvi} Silverman D., Pasternak R., High-Density Lipoprotein Subfractions. *Am. J. Med.* 1993;94:636-643.
- ^{xvii} Blanche P., Gong T., Nichols A., Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1981;665:408-419.
- ^{xviii} Asztalos B., Sloop C., Wong L., et al. Comparison of apoA-I containing subpopulations of dog plasma and peritoneal lymph: evidence for alteration in subpopulations in the interstitial space. *Biochim Biophys Acta* 1993;1169:301-304.
- ^{xix} Eckardstein A., Nofer J-R., Assman G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol.* 2001;21:13-27.
- ^{xx} Otovos J. Measurement of lipoprotein subclass profiles by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Lab.* 2002;48:171-180.
- ^{xxi} Wilson H., Patel C., Skinner E., The distribution of high-density lipoprotein subfractions in coronary survivors. *Biochem. Soc. Trans.* 1992;12:332-340.
- ^{xxii} Johansson J., Carlson L., Landou C., Hamsten A., High density lipoproteins and coronary atherosclerosis. A strong inverse relation with the largest particles is confined to normotriglyceridemic patients. *Arterioscler. Thromb.* 1991;11:174-182.
- ^{xxiii} Asztalos B., Cupples L., Demissie S., et al. High-density lipoprotein subpopulation profile and coronary heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol.* 2004;24:1-7
- ^{xxiv} Asztalos B., Cupples L., Demissie S., et al. Value of high-density lipoprotein (HDL) subpopulations in predicting recurrent cardiovascular events in the veterans affairs HDL intervention trial. *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol.* 2005;25:2185-2191.
- ^{xxv} Santamarina-Fojo S., Lambert G., Hoeg J., et al. Lecitin-cholesterol acyltransferase:role in lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport and atherosclerosis. *Curr Opin. Lipidol.* 2000;11:267-275.
- ^{xxvi} Kuivenhoven J., Pritchard H., Frohlich J., et al. The molecular pathology of Lecitin-cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes. *J Lipid Res.* 1997;38:191-205.
- ^{xxvii} Solajic-Bozicevic N., Stavijenic-Rukavina A., Sesto M., Lecitin-cholesterol acyltransferase activity in patients with coronary artery disease examined by coronary angiography. *Clin Invest.* 1994;72:951-956.
- ^{xxviii} Amar M., Shamburek R., Foger B., et al. Adenovirus-mediated expression of LCAT in non human primates leads to an antiatherogenic lipoprotein profile with increased HDL and decreased LDL. *Circulation* 1998;98:I-35.

^{xxix} Vohl M., Neville T., Kumarathasan R., et al. A novel Lecitin-cholesterol acyltransferase antioxidant activity prevents the formation of oxidized lipids during lipoprotein oxidation. *Biochem* 1999;38:5976-5981.

^{xxx} Tall A., Plasma cholesteryl ester transfer protein *J Lipid Res.* 1993;34:1255-1274.

^{xxxi} Guerin M., Le Goff W., Lassel T., et al. Atherogenic role of elevated CE transfer from HDL to VLDL (1) and dense LDL in type 2 diabetes: impact of the degree of hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:282-288.

^{xxxii} Boekholdt S., Kuivenhoven J., Wareham N., et al. Plasma levels of cholesteryl ester transfer protein and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women. *Circ.* 2004;110:1418-1423.

^{xxxiii} Levy E., Deckelbaum R., Thibault E., et al. In vitro remodelling of plasma lipoproteins in whole plasma by lipoprotein lipase in primary and secondary hypertriglyceridemia. *Eur. J.Clin Invest.* 1990;20:422-431.

^{xxxiv} Tollefson J., Ravnik S., Albers J. Isolation and characterization of a phospholipid transfer protein (LTP-II) from human plasma. *J Lipid Res.* 1988;29:1593-1602.

^{xxxv} Jauhainen M., Metso J., Phglman R., et. Al. Human plasma phospholipid transfer protein causes high density lipoprotein conversion. *J Biol Chem.* 1993;268:4032-4036.

^{xxxvi} Jiang X., Qin S., Qiao C., et. al. Apolipoprotein B secretion and atherosclerosis are decreased in mice with phospholipid-transfer protein deficiency. *Nat Med.* 2001;7:847-852.

^{xxxvii} Schlitt A., Bickel C., Thumma P., et. al. High plasma phospholipid transfer protein levels as a risk factor for coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1857-1862.

^{xxxviii} Huuskonen J., Olkkonen V., Jauhainen M., et al. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis* 2001;155:269-281.

^{xxxix} Durrington P., Mackness B., Mackness M., Paraonase and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:473-480.

^{xl} Kontush A., Chantepie S., Chapman M., Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1881-1888.

^{xli} Kunitake S., Jarvis M., Hamilton R., Kane J., Binding of transition metals by apolipoprotein A-I-containing plasma lipoproteins: inhibition of oxidation of low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:6993-6997.

^{xlii} Wood KM, Cadogan MD, Ranshaw AL, Parums DV, The distribution of adhesion molecules in human atherosclerosis. *Histopatology* 1993;22:437-444.

^{xliii} Barter P., Baker P., Rye K., Effect of high-density lipoproteins on the expression of adhesion molecules in endothelial cells. *Curr Op Lipidol* 2002;13:285-288.

-
- ^{xliv} Theilmeyer G., De Geest B., Van Veldoven PP., et al. HDL-associated PAF-AH reduces endothelial adhesiveness in apoE^{-/-} mice. *FASEB J.* 2000;14:2032-2039.
- ^{xliv} Calabresi L., Gomaraschi M., Villa B., et al. Elevated soluble cellular adhesion molecules in subjects with low HDL-cholesterol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002;22:656-661.
- ^{xlvi} Belacazar L., Ballantyne C. Defining specific goals of therapy in treating dyslipidemia in the patient with low high-density lipoprotein cholesterol. *Prog in Cardiovasc Dis* 1998;41:151-174.
- ^{xlvii} Sugiuchi H., Uji Y., Okabe H., et al. Direct measurement of High-Density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated α -cyclodextrin. *Clin Chem* 1995;41:717-723.
- ^{xlviii} De Long D., De Long E., Wood P., et al. A comparison of methods for the estimation of plasma low- and very low- density lipoprotein cholesterol. *JAMA* 1986;256:2372-2377.
- ^{xlx} Tailleux A., Torpier G., Caron B., et al. Immunological properties of apo B- containing lipoprotein particles in human atherosclerotic arteries. *J Lipid Res.* 1993;34:719-728.
- ⁱ Blanche P., Gong E., Forte T., et al. Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta.* 1981;665:408-419.
- ⁱⁱ Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
- ⁱⁱⁱ Chen C., Albers J. Characterization of proteoliposomes containing apoprotein A-I: a new substrate for the measurement of lecithin:cholesterol acyltransferase activity. *J Lipid Res.* 1982;23:680-691.
- ⁱⁱⁱⁱⁱ Mann C., Yen F., Grant A., et al. Mechanism of plasma cholesteryl ester transfer in hypertriglyceridemia. *J. Clin Invest.* 1991;88:2059-2066.
- ^{liv} Kawano K., Qin S-C., Lin M., Cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein have nonoverlapping functions in vivo. *J Biol Chem* 2000;275:29477-29481.
- ^{lv} De la Llera Moya M., Atger V., Paul J., et al. A cell culture system for screening human serum for ability to promote cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb.* 1994;193:1056-1065.
- ^{lvi} Matthews D., Hosker A., Rudenski A., et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetología* 1985;28:412-419.
- ^{lvii} Executive summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *J Am Med Assoc* 2001;285:2486-97.
- ^{lviii} Brites F., Bonavita C., Geitere C., et al. Alterations in the main steps of reverse cholesterol transport in male patients with primary hypertriglyceridemia and low HDL-cholesterol levels. *Atherosclerosis* 2000;152:181-192.

-
- ^{lix} Skeggs J., Morton R., LDL and HDL enriched in triglyceride promote abnormal cholesterol transport. *J. Lipid Res.* 2002;43:1264-1274.
- ^{lx} Fournier N., Paul J-L., Atger V., et al. HDL phospholipid content and composition as a major factor determining cholesterol efflux capacity from Fu5AH cells to human serum. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2685-2691.
- ^{lxi} Fournier N., Atger V., Cogny A., et al. Analysis of the relationship between triglyceridemia and HDL-phospholipid concentrations: consequences of the efflux capacity of serum in the Fu5AH system. *Atherosclerosis* 2001;157:315-323.
- ^{lxii} Freeman DJ., Packard CJ., Shepherd J., et al. Polymorphisms in the gene coding for cholesteryl ester transfer protein are related to plasma high-density lipoprotein cholesterol and transfer protein activity. *Clin Sci.* 1990;79:575-581.
- ^{lxiii} Murakami T., Michelagnoli S., Longhi R., Triglycerides are major determinants of cholesterol esterification/transfer and HDL remodeling in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1819-1828.
- ^{lxiv} Albers J., Wolfbauer B., Cheung J., et al. Functional expression of human and mouse plasma phospholipid transfer protein: effect of recombinant and plasma PLTP on HDL subspecies. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1258:27-34.
- ^{lxv} Murdoch S., Carr M., Hokanson J., et al. PLTP activity in premenopausal women: relationship with lipoprotein lipase, HDL, LDL, body fat, and insulin resistance. *J Lipid Res.* 2000;41:237-244.
- ^{lxvi} Wolfbrauer G., Albers J., Oram J. Phospholipid transfer protein enhances removal of cellular cholesterol and phospholipids by high-density lipoprotein apolipoproteins. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1439:65-76.
- ^{lxvii} Jiang X., Qin S., Schneider M., et al. Phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency represents an anti-oxidant state mice. *Circulation* 2001;104:II-232.
- ^{lxviii} Cheung M., Brown B., Wolf A., et al. Altered particle size distribution of apolipoprotein A-I-containing lipoprotein in subjects with coronary artery disease. *J Lipid Res.* 1991;32:383-394.
- ^{lxix} Syvanne M., Ahola M., Lahdenpera S., et al. High density lipoprotein subfractions in non-insulin-dependent diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Lipid Res.* 1995;36:573-582.
- ^{lxx} Barter P., Nicholls S., Rye K-A., et al. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004;95:764-772.
- ^{lxxi} Hwang S-J., Ballantyne C., Sharrett R., et al. Circulation adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases. The atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Circulation* 1997;96:4219-4225.

-
- lxxii BlanKenberg S., Rupprecht H., Bickel C., et al. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;104:1336-1342.
- lxxiii Tai E-S., Emmanuel S., Chew S-K., et al. Isolated low HDL cholesterol. An insulin-resistant state only in the presence of fasting hypertriglyceridemia. *Diabetes* 1999;48:1088-1092.
- lxxiv Despres J-P., Lemieux I., Aduenáis G-R., et al. HDL-cholesterol as a marker of coronary Herat disease risk: the Québec cardiovascular study. *Atherosclerosis* 2000;153:263-272.
- lxxv Soderlund S., Soro-Paavonen A., Ehnholm C., et al. Hypertriglyceridemia is associated with pre β -HDL concentrations in subjects with familial low HDL. *J Lipid Res.* 2005;46:1643-1651.
- lxxvi Tchernof A., Lamarche B., Prud'Homme D., et al. The dense LDL phenotype. Association with plasma lipoprotein levels, visceral obesity, and hyperinsulinemia in men. *Diabetes Care* 1996;19:629-637.
- lxxvii Couillard C., Bergeron N., Bergeron J., et al. Metabolic heterogeneity underlying postprandial lipemia among men with low fasting plasma HDL-cholesterol concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4575-4582.
- lxxviii Després JP., Moorjani S., Lupien PJ., et al. Regional distribution of body fat, plasma lipoproteins, and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 1990;10:497-511.
- lxxix Frohlich M., Imhof A., Berg G., et al. Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2000;23:1835-1839.
- lxxx Gotto A., Dphil, Brinton E. Assessing low levels of high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor in coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:717-724.
- lxxxi Baker P., Rye K-A., Gamble J., et al. Phospholipid composition of reconstituted high density lipoproteins influences their ability to inhibit endothelial cell adhesion molecule expression. *J Lipid Res* 2000;41:1261-1267.
- lxxxii Aguilar-Slinas C., Olaiz G., Valles V., et al. High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *J Lipid Res* 2001;42:1298-1307.
- lxxxiii Ansell B., Watson K., Fogelman A., et al. High-Density lipoprotein function. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1792-8.